



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE GK-1 EN LA REVERSIÓN DEL
AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS T EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE
MAMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Juan Alberto Hernández Aceves

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Edda Sciutto Conde

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Armando Pérez Torres

Facultad de Medicina

Ciudad de México. Agosto, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

PRESIDENTE Martha Patricia Ostrosky Wegman

VOCAL Juan Wolfgang Zinser Sierra

VOCAL Claudia González Espinosa

VOCAL Yvonne Rosenstein Azoulay

SECRETARIO Constantino López Macías

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA INVESTIGACIÓN

Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

SUSTENTANTE

Juan Alberto Hernández Aceves

Agradecimientos

Agradezco sobremanera a la Dr. Edda Sciutto y a la Dra Gladis Fragoso por darme una oportunidad de formar parte del gran equipo que conforman, mostrando siempre apoyo incondicional. Además, este trabajo no hubiera sido posible sin el gran apoyo de la Dra. Diana Torres, quien, durante todo el proceso fue un pilar en mi capacitación y desarrollo del proyecto, dándome las bases para su elaboración.

Mi gratitud al Dr. René Segura y a la Unidad de Investigación de la FMVZ, donde se desarrollo la lectura de la mayoría de pruebas, donde siempre hubo gran disponibilidad de tiempo y apoyo. En este mismo sentido agradezco al M en C. Carlos Castellanos y al Laboratorio Nacional de Citometria de Flujo.

Durante el desarrollo del trabajo, el apoyo de la Dra. Laura Montero y la Dra Jacquelynne Cervantes, fue sustancial, sus criticas y apoyo en la parte experimental, se ve reflejado en este trabajo.

Agradezco a CONACYT por el apoyo brindado durante todo el posgrado, sin él hubiera sido imposible completar este trabajo. Además, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo recibido en la otorgación de la beca 093921 para concluir mis estudios de maestría

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT número IN213219 “Evaluación de las propiedades antitumorales de la inmunoterapia basada en la administración del péptido adyuvante GK-1”. Así mismo agradezco a la UNAM por darme una formación de excelencia y multidisciplinaria

Personalmente agradezco el inmedible apoyo brindado por toda mi familia, mis padres, mis hermanos, mis tíos y mis primos, que siempre han tratado de animarme a buscar ser una mejor persona con calidez y excelencia. Menciono especialmente a mi madre Carlota Aceves, por siempre darme más que un apoyo, por darme dedicación, tiempo y esfuerzo. ¡Gracias! Y a mi hermano Carlos, por darme un ejemplo de esfuerzo y constancia.

Agradezco a mis amigos por ser un pilar emocional, académico y de vida durante este tiempo; Mike, Sersh, Bruno, Alan, Merino, Erick, Mena, Pao, May, Jess (y todos los Besties), Clau, Ed, Gerardito, Leo; son parte de mi, y sé que haremos algo importante en el futuro. Gracias por darme fuerza y valor cuando más dudaba del qué hacer. En especial a ustedes Mike, Sersh y Mena ¡Gracias!

Dedicatorias

A mi madre Carlota que aún con las carencias y enfermedades pudo brindarme valores y entusiasmo por la vida, que sin ella no hubiera sido posible nada de esto. A mi padre Ernesto por ser la fortaleza, por darme siempre un punto crítico de las situaciones. A mi hermano Carlos por darme un ejemplo claro del que una licenciatura no es suficiente. A mi hermana Eliza por darme una muestra de valor inquebrantable. A Miranda por mostrarme que debo de ser siempre un buen ejemplo. A mis tías Lupe y Julía por siempre darme un ánimo incondicional; les dedico este trabajo realizado con esfuerzo.

Y a Alejandro, Juan, y mi Abuelo Lorenzo, aún cuando ya no estén físicamente aquí, sé que me brindaron su confianza y apoyo. A ustedes también les dedico este trabajo.

La historia de las ciencias nos demuestra que las teorías son perecederas. Con cada nueva verdad revelada, tenemos una mejor comprensión de la naturaleza y nuestras concepciones, y nuestros puntos de vista, se modifican.

Nikola Tesla

ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud.

GK-1: Péptido Gohar-Karen-1

P53: Gen que codifica a la proteína p53

MYC: Familia de genes que codifican proteínas que facilitan la transcripción.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BRCA 1/2: Breast Cáncer, por sus siglas en inglés. Es la familia de genes encargados de producir dos proteínas asociadas a la reparación de ADN

TP53: Es el gen que produce a la proteína p53.

BCL-2: Es una familia de proteínas que participa en la apoptosis celular.

p53: Proteína p53 encargada de la reparación del ADN y procesos celulares.

WT-1: Es el gen que produce a la proteína WT-1 (William tumor 1, por sus siglas en inglés), favorece la transcripción de genes oncogénicos.

VEGF (1-3): Vascular Endothelial Growth Factor. Por sus siglas en inglés es el factor de crecimiento endotelial vascular.

PDGF: Platelet Derived Growth Factor. Por sus siglas en inglés es el factor de crecimiento derivado de plaquetas

SDF1: Stromal Derived Factor 1. Por sus siglas en inglés es el factor 1 derivado del estroma.

CTC: Células troncal cancerosas, son las células con capacidad de generar nichos metastásicos y nuevos tumores.

ABC: ATP Binding Cassette. Por sus siglas en inglés es un sistema de transporte mediado por ATP.

CD44: Es una glicoproteína superficial expresada en Linfocitos T y en muchas células hematopoyéticas. Su función es la adherencia células- células. En los linfocitos T ayuda a determinar el fenotipo efector.

CD133: Es una glicoproteína transmembranal característica de células progenitoras; en cáncer es utilizado para identificar a las CTC

ALDH1: Aldehído deshidrogenasa 1. Es una enzima que realiza la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos. Se sobre expresa en las CTC.

OMS: Organización Mundial de la Salud. Es el organismo encargado de salvaguardar y asegurar la salud a nivel mundial

ER: Estrogen Receptor. Por sus siglas en inglés es el receptor a estrógeno.

PR: Progesterone Receptor. Por sus siglas en inglés es el receptor a progesterona.

Her2-neu: Human Epidermal receptor 2. Por sus siglas en inglés es el receptor 2 al factor de crecimiento epidermal humano 2. Se sobre expresa en algunos tipos de cáncer de mama y ovario.

Ki67: Es una proteína de ciclo celular que se sobre expresa cuando las células se encuentran proliferando.

CK: Cytokeratine. Por sus siglas en inglés son citoqueratinas, las cuales tienen funciones estructurales y algunas ayudan a identificar diferentes tipos de cáncer.

PD-1: Programed Death-1. Por sus siglas en inglés es el receptor para muerte celular programada 1.

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4. Por su acrónimo en inglés es el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos. Al igual que PD-1 es un receptor de inhibición que controla la respuesta inmunológica.

CMTN: Cáncer de mama triple negativo.

APC: Antigen Presentator Cell. Por sus siglas en inglés son células presentadoras de antígeno, las cuales sobresalen las células dendríticas (DC) y macrófagos.

NK: Natural Killer. Por sus siglas en inglés son células asesinas naturales, son un tipo de linfocito con funciones citotóxicas.

TILs: Tumor infiltrating Lymphocytes. Por sus siglas en inglés son los linfocitos T infiltrantes de tumor.

NKGD2: Natural Killer Glicoprotein D2. Es la glicoproteína D2 de células asesinas naturales, sin embargo, también se expresa en linfocitos T CD8 activados.

TGFβ: Transforming Growth Factor Beta. Por sus siglas en inglés es el factor de crecimiento transformante beta.

TAF: Tumor Associated Fibroblast. Por sus siglas en inglés son los fibroblastos asociados a tumor.

LCMV: Lymphocytic choriomeningitis virus. Por sus siglas en inglés es el virus de coriomeningitis linfocítica

IDO1: Indolamine 2-3 dioxygenase. Por sus siglas en inglés es la enzima Indolamina 2-3 dioxigenasa, la cual se encarga de convertir al triptófano en kinureina.

MMP: Matrix Metallopeptidase 9. Por sus siglas en inglés son las metaloproteasas de matriz celular.

TCR: T cell receptor. Por sus siglas en inglés el receptor de células T (linfocitos T).

LFA1: Lymphocyte function associated antigen 1. Por sus siglas en inglés es el antígeno 1 asociado a la función linfocitaria. Es una integrina que participa en la transmigración sanguínea de los linfocitos

ICAM1: Intracellular Adhesion Molecule 1. Por sus siglas en inglés es la molécula 1 de adhesión intracelular. Es una integrina que participa en el Rolling celular.

IFN γ ó IFN γ : Interferon gamma

GZB: Granzima B.

IL2: Interleucina 2

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha. Por sus siglas en inglés es el factor de necrosis tumoral alfa.

MCP1: Monocyte chemoattractant protein 1. Por sus siglas en inglés la proteína 1 quimioatrayente de monocitos, también llamada CCL2, participa en el reclutamiento de macrófagos y monocitos.

NO: Nitric oxide. Por sus siglas en inglés es el óxido nítrico. Es una especie reactiva de nitrógeno que se produce en la activación de macrófagos.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases. Por sus siglas en inglés son las Cinasas activadas por mitógenos, mejor conocidas como MAP-cinasas.

NF κ B: Nuclear Factor Kappa B. Por sus siglas en inglés es el Factor nuclear kapa B, es un factor de transcripción importante en la inflamación y respuesta inmunológica.

SSI: Solución Salina Isotónica

Treg: Linfocitos T reguladores. Son la clase de linfocitos encargados de controlar la respuesta inmunológica

MDSC: Myeloid derived suppressor cells. Por sus siglas en inglés son las células supresoras derivadas mieloides.

IRs: Inhibitor Receptors: Por sus siglas en inglés son los Receptores de inhibición (RI's)

GM-CFS: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Por sus siglas en inglés es el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

ARN: Ácido ribonucleico

PRR: Pattern Recognition Receptor. Por sus siglas en inglés son los receptores de reconocimiento de patrones. Se expresan en una amplia cantidad de células del cuerpo humano.

CDK. Cyclin Dependent kinases. Por sus siglas en inglés son las ciclinas dependientes de cinasas, participan en el control de la división celular.

HDP's: Host Defense Peptides. Por sus siglas en inglés son péptidos de defensa al hospedero. Son péptidos producidos por bacterias o parásitos para protegerse.

TLR. Toll Like Receptors. Por sus siglas en inglés son los receptores similares a Toll. Fueron descubiertos en Drosophila y funcionan como receptores de defensa y reconocimiento de patrones.

ATCC. American Type Culture Collection. Por sus siglas en inglés es la colección de cultivos celulares americana. Es un organismo que se encarga de salvaguardar líneas celulares.

EDTA: Etilenodiamintetracetic acid. Por su nombre en inglés es el ácido etilenodiaminotetraacético

PBS: Phospate buffer solution. Por su nombre en inglés es la solución amortiguadora de fosfatos.

DPT: Días posteriores al tratamiento, también hace referencia a días post-tratamiento.

SFB: Suero Fetal Bovino.

MFI: Mean Fluorescence Intesnsity. Por sus siglas en inglés es la intensidad media de fluorescencia. Puede calcularse como un promedio normal (MFI) o como una media geométrica (gMFI)

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate. Por su nombre en inglés es forbol- 13 acetil-12 miristato

MANOVA: Multivariate analysis of variance. Por su nombre en inglés es el análisis de varianza multivariante, siendo una extensión directa de los análisis de varianza (ANOVA).

Índice

ABREVIATURAS	6
I. Resumen	10
II. INTRODUCCIÓN	11
2.1 El cáncer	11
2.1.1 Historia del cáncer	11
2.1.2 Teorías del desarrollo y origen del cáncer	12
2.1.3 Reincidencia del cáncer: Células troncal cancerosas.	15
2.1.4 Epidemiología del cáncer	16
2.1.5 Cáncer de mama	18
2.2 Infiltrado tumoral en cáncer	21
2.3 Linfocitos T en cáncer de mama	25
2.4 Agotamiento de linfocitos T.....	27
2.4.1 Origen y características	27
2.4.2 Desarrollo del agotamiento en linfocitos T.	30
2.4.3 Agotamiento en cáncer. Influencia del microambiente tumoral	33
2.5.1 Terapia dirigida a PD-1/PDL-1	38
2.5.2 Terapia con péptidos pequeños e inmunopotenciadores	40
III. Antecedentes	42
3.1 Péptido GK-1 (Goar/Karen – 1).....	42
3.1.1 Identificación del péptido.....	42
3.1.2 Caracterización de sus propiedades inmunomoduladoras	42
3.1.2 GK-1 como inmunopotenciador contra el cáncer	44
IV. Justificación	46
V. Objetivos	46
5.1 Objetivo General	46
5.2 Objetivos particulares.....	46
V. Hipótesis	47
VI. Materiales y métodos	47
Ratones.....	47
Consideraciones éticas	47

GK-1	47
Línea celular 4T1	48
Implantación de células 4T1	48
Grupos experimentales	48
Cuantificación de poblaciones de linfocitos T	49
Extracción de células mononucleares de tejidos.....	50
Citotoxicidad de linfocitos T CD8+ extraídos de tumor	50
Producción de citocinas y proteínas de activación de linfocitos T.....	51
Análisis estadístico.....	51
VII. Resultados	52
7.1 GK-1 Disminuye el desarrollo tumoral y macrometástasis pulmonar	52
7.2 GK-1 aumenta la cantidad de linfocitos T extraídos de tumor	55
7.3 GK-1 Disminuye la expresión de PD-1 en linfocitos efectores.....	58
7.4 GK-1 Aumenta la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8+	60
7.5 GK-1 Aumenta la producción de citocinas en linfocitos T extraídos de tumor.....	62
VIII. Discusión	65
IX. Conclusiones	74
X. Perspectivas	74
XI. Bibliografía	75
XIII. ANEXOS	105
A1. Suplementarias.....	105
Análisis de regresión lineal del crecimiento tumoral	105
Producción de citocinas de linfocitos en bazo y tumor.....	106
Estrategias de análisis.....	107
A2. Reactivos y soluciones	111
A3. Efecto de GK-1 en células mieloides supresoras (MDSC)	113
A4. Formato de observaciones	114

I. Resumen

El cáncer de mama, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial, siendo un problema de gran importancia social y económica. Actualmente, el cáncer de mama puede ser tratado eficazmente si es detectado a tiempo. Sin embargo, continúa presentando alta mortalidad en mujeres; particularmente el cáncer de mama triple negativo, que es un tipo de cáncer de mamá que no expresa receptores a hormonas, tiene menos opciones de tratamiento. Así que se continúa con la búsqueda de nuevas terapias y adyuvantes para ofrecer nuevas y más eficientes opciones de tratamiento.

Nuestro grupo de trabajo desarrolló un inmunomodulador derivado del parásito *T. crassiceps*. Esta molécula denominada GK-1, es un péptido de 18 aminoácidos que ha mostrado efectos positivos como adyuvante de la vacuna contra influenza y posteriormente en protocolos de inmunoterapia en modelos murinos de melanoma (B16F10) y cáncer de mama (4T1). En el cáncer de mama como ocurre con otros tumores, el microambiente tumoral genera un estado de inmunosupresión específica que limita la eficiencia de la respuesta del individuo al tumor y genera un ambiente permisivo para su crecimiento. Uno de estos fenómenos es el agotamiento de linfocitos T que se define como un estado disfuncional caracterizado por el aumento de receptores de inhibición (RI's).

Este trabajo se diseñó para evaluar el efecto de GK-1 en la reversión o prevención del agotamiento de los linfocitos T en el modelo de cáncer de mama inducido con células 4T1. Para este propósito se analizaron linfocitos T de tumores de mama, bazo y linfonodo provenientes de ratones tratados y no tratados con una administración semanal de 5mg/kg (100ug por ratón) GK-1.

Mediante citometría de flujo y cultivos *in-vitro* se demostró que el tratamiento con GK-1 disminuye el crecimiento tumoral, mantiene a los linfocitos T con menor expresión de PD-1 y mayor capacidad citotóxica y funcional a 21 días del tratamiento. En conclusión, que GK-1 es una molécula que favorece la respuesta antitumoral en el modelo de 4T1.

II. INTRODUCCIÓN

La historia es, en esencial, la ciencia del cambio. Sabe y enseña que es imposible encontrar a dos acontecimientos que son iguales.

Marc Bloch

2.1 El cáncer

2.1.1 Historia del cáncer

El cáncer es una enfermedad histórica, tiene registros muy antiguos, ejemplo de ello son las pinturas en Egipto donde se reportaban modificaciones óseas, cuya descripción y apariencia, corresponden a lesiones observadas en osteosarcomas. En este sentido los registros más antiguos datan de alrededor del año 1600 a.c. en el papiro de Ebers, donde el cáncer de mama se registraba como una úlcera y enrojecimiento en el seno; la cual era tratada con cauterización, y evolucionaba hasta la muerte. Esta técnica de cauterización la llamaban “taladro de fuego” (Zeng and Yee 2013; Nahta, Hortobágyi, and Esteva 2003; Witsch, Sela, and Yarden 2010) (David and Zimmerman 2010).

Años más tarde en la Grecia clásica, Hipócrates, el padre de la medicina, comenzó a clasificar al cáncer en dos grupos; “carcinomas” y “carcinoma”, tomando en consideración, sus propiedades de generar úlceras y vasos sanguíneos semejando las pinzas de los cangrejos. Posteriormente, durante el renacimiento mucha de la investigación en cáncer fue realizada en cuerpos en donde las diferencias anatómicas sorprendían a los médicos, lo que inició el estudio del tejido canceroso (Maman and Witz 2018).

Posteriormente en 1863 Rudolph Virchow reportó un infiltrado de leucocitos dentro de los tumores sólidos y en 1889 Paget formuló una relación entre este infiltrado celular con el comportamiento del cáncer. Así Paget se convirtió en pionero en establecer el concepto de “microambiente tumoral”, concepto de suma importancia que nos invita a considerar la etiología dinámica del cáncer, mediada críticamente por el microambiente de donde se origina el cáncer y los factores ambientales y externos (Maman and Witz 2018)

Por otra parte, el conocimiento de las condiciones que influían en el desarrollo del cáncer también fueron cambiando a través del tiempo. Inicialmente, se consideraba que el cáncer era una enfermedad debida a los humores, teoría fundada por Hipócrates, en donde el balance de la bilis era lo que mantenía el cuerpo funcionando de manera saludable. Galeno basándose en esta teoría fundamentaba que el cáncer en etapas iniciales podía ser curable y proponía a su extirpación quirúrgica y la cauterización como las herramientas más efectivas (Papavramidou, Papavramidis, and Demetriou 2010).

Más tarde, en el siglo XVIII, Ramazzini planteaba una relación entre el desarrollo de cáncer y los factores ambientales y laborales, siendo Morgagni en 1761 quien encontró una relación directa entre la aparición del cáncer y el consumo del tabaco. Más tarde, Plott en 1775 demostró la relación entre la exposición al hollín (polvo al que se exponían los limpiadores de chimeneas) con la aparición de cáncer de escroto (Emory Winship University 2017).

En su conjunto el cáncer a pesar de ser una enfermedad que desde hace miles de años está siendo estudiada y que existen muchos registros de ella, no ha podido ser curada. El cáncer deja cada año millones de muertos; aquí la importancia de su estudio. Aunque en los últimos años se ha venido considerando el tratamiento individualizado del cáncer como la estrategia más efectiva, los elevados de esos tratamientos son una limitante importante para su aplicación extensiva en las condiciones actuales (Verma 2012).

2.1.2 Teorías del desarrollo y origen del cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial, en la cual su causa y desarrollo no pueden atribuirse únicamente a un factor, sin embargo, sí se conocen condiciones de riesgo o componentes que aportan en mayor medida al origen del cáncer. Entre los factores de riesgo destaca el componente genético en donde las mutaciones en genes como TP53 o la familia MYC (Myc Proto-oncogen) generan neoplasias (Visvader 2011) los carcinógenos ambientales, los cuales pueden generar daño en las células y daño directo al ADN (Ácido desoxirribonucleico), lo cual provoca una

desregulación en el crecimiento y muerte de las células (David and Zimmerman 2010)

A lo largo de la historia, se han propuesto diferentes teorías para explicar el origen del cáncer, las cuales han ido evolucionando hasta un enfoque más molecular. El primero en plantear un posible origen del cáncer, fue Hipócrates con su teoría humoral, basándose en la acumulación de bilis negra en los órganos afectados, esto provocaba una *discrasia*, fenómeno que años más tardes sería concebido como cáncer. Esta teoría fue aceptada durante muchos años, hasta que, en el siglo XVII, muchos médicos comenzaron a experimentar y a investigar sobre cambios en los órganos, encontrando que en la linfa se podían movilizar células provenientes del tumor y desarrollarse en otros tejidos, sin embargo no lograban entender cómo se establecía el cáncer (David and Zimmerman 2010)

Años más tarde, en el siglo XIX, Müller y Virchow postularon que una célula cancerosa era originada por otra célula y que esto era debido a un estrés o irritación crónica por el ambiente, consolidando la teoría de la blastema e irritación crónica (Maman and Witz 2018). Esta teoría consideraba un estímulo crónico el disparador del cáncer; por ejemplo, la inflamación, y explicaba que por daño continuo la célula se transformaba en cancerosa. Considerando estas propuestas, Paget en 1889 postuló su teoría de “semilla en la tierra”, en donde trataba de explicar que las células cancerígenas sólo podían colocarse en tejidos específicos, es decir, que sólo crecían si se encontraban en el contexto micro ambiental correcto (Emory Winship University 2017)

Todas estas teorías trataban de explicar el origen del cáncer desde un aspecto fenomenológico. No fue sino hasta los años 1970 en que se comenzó a tener un enfoque genético y molecular de lo que ocurría dentro de estas células tumorales (Visvader 2011). La identificación de los oncogenes, genes que en su mayoría regulan el ciclo celular y la reparación al ADN, entre los que destacan en cáncer de mama TP53, BCL-2 (B cell Lymphoma por su nombre en inglés), familia MYC y BRCA1 (Breast Cancer 1 por sus siglas en inglés), generaron la esperanza de

haber encontrado la etiología del cáncer y con ello de acuerdo a los dogmas médicos, se podría curar el cáncer reparando o previniendo el origen del mismo.

Con estos fundamentos se propusieron algunas teorías; por ejemplo, la teoría de los dos golpes, en donde no solamente se necesita la mutación, sino también un disparador o iniciador del cáncer. Esta teoría explica cómo la exposición a ciertos carcinógenos no siempre conlleva al desarrollo de neoplasias (Verma 2012). Por otra parte, la teoría de las aneuploidias y paneuploidias trata de explicar el cómo la sobreexpresión o la disminución de una proteína puede generar cáncer, por ejemplo deleciones o duplicaciones de genes como BRCA, TP53 y WT-1 (Wills tumoral-1, por sus siglas en inglés), se asocia con el desarrollo de cáncer (Rycaj and Tang 2015).

Con estas teorías se podía explicar la mayoría de las características distintivas (*hallmarks*) que tiene el cáncer, sin embargo, quedaban algunas incógnitas aún. La teoría de mutaciones somáticas y la teoría de células troncales o células madre cancerosas, tratan de encontrar el motivo de reincidencia y origen del cáncer. (Paduch 2015) La primera sugiere que el cáncer puede ser originado por cualquier tipo de célula, la cual tiene que sufrir cambios genéticos y metabólicos para comenzar a desarrollar el cáncer, así una célula de músculo puede desarrollar un sarcoma, es decir, esta teoría se fundamenta principalmente en los cambios moleculares existentes y que estos pueden heredarse al momento de hacer una división mitótica (Verma 2012).

Para explicar mejor el desarrollo tumoral se ha propuesto la teoría de las células troncal cancerosas, las cuales, por sus propiedades de diferenciación y desarrollo, explican de en mayor medida los fenómenos de reinsidencia, metástasis inmunosupresión y resitencia a quimioterapeúticos ocurridos en cáncer (Papaccio et al. 2017).

2.1.3 Reincidencia del cáncer: Células troncal cancerosas.

Una de las teorías más aceptadas para el desarrollo del cáncer es la teoría de las células troncal cancerosas (CTC), esta teoría postula que las mutaciones pueden des-diferenciar a las células somáticas convirtiéndolas en células similares a las células troncales o las mutaciones pueden ocurrir directamente en células mesenquimales, originando a células pluripotentes capaces de dividirse asimétricamente y originar una variedad de células tumorales diferentes, así como células diferenciadas de otros tipos celulares (Moharil et al. 2017).

Esta teoría explica hasta cierto punto características como la neovascularización, ya que estas células troncales pueden diferenciarse en células endoteliales y producir factores de crecimiento como VEGF-1 y 3 (Factor de crecimiento endotelial vascular), PDGF (Factor de crecimiento derivado plaquetario) y SDF1 (Factor 1 derivado del estromal). Los cuales generan nuevos vasos sanguíneos. Las CTC cuentan además con división asimétrica, esta división permite a las células tener una mayor heterogeneidad de las células tumorales, volviendo al cáncer más difícil de tratar (Papaccio et al. 2017).

Otra de las características que explica la importancia de las células madre cancerosas, es su resistencia a fármacos citotóxicos, los cuales en la mayoría de ocasiones son expulsados de la célula mediante transportadores ABC (ATP-Binding Cassete por sus siglas en inglés), así como su capacidad de moverse en el cuerpo mediante la transición epitelio mesénquima (Moharil et al. 2017), siendo entonces, las CTC las responsables de la metástasis en el organismo (Batlle and Clevers 2017).

Actualmente se busca atacar a estas células tumorales las cuales tienen algunos marcadores relacionados como CD44, CD133 y ALDH1 (Aldehido deshidrogenasa 1). No obstante las terapias no han logrado detener el crecimiento de estas células troncales, además de que dentro de los tumores representan una cantidad muy baja, por lo que su estudio es difícil, sin embargo, tienen la capacidad de formar *de-novo* a un tumor completo (Moharil et al. 2017). En la figura 1. se resumen

algunas de características de las CTC, así como su importancia en el desarrollo del cáncer.

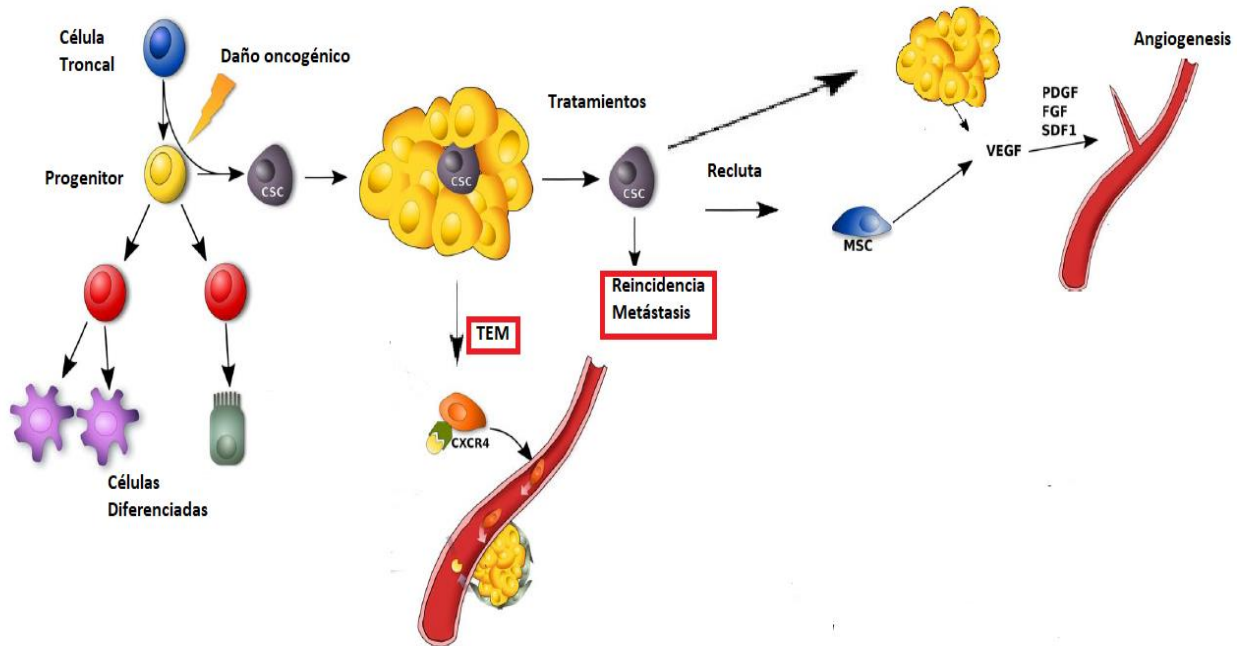


Figura1. Modelo de células troncales cancerosas para el desarrollo y progresión del cáncer. Una célula troncal puede sufrir un daño oncogénico y convertirse en una célula troncal cancerosa (CSC), o bien una célula progenitora puede des-diferenciarse en una CSC, la cual origina un tumor primario. Dentro de este tumor primario puede ocurrir la transición epitelio mesénquima (TEM) permitiendo esparcirse a otros órganos las CSC y originar otros tumores (metástasis). Por otra parte, cuando se aplican los tratamientos actuales como quimioterapia o radioterapia, las CSC tienen mayor resistencia a éstas, lo que genera recidiva del tumor. Así mismo, el tumor recluta células mesenquimales (MSC) las cuales favorecen la angiogénesis con la producción de factores de crecimiento, generando un ambiente favorable al tumor. VEGF: Factor de crecimiento vascular. PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos. SDF1: Factor derivado de estroma 1. Figura modificada de *Papaccio, F. et al. Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. Stem Cells Transl. Med. 6, 2115–2125 (2017).*

2.1.4 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una patología que engloba más de 100 enfermedades distintas, en donde su característica común es un aumento en la proliferación celular, originado por mutaciones genéticas en proteínas que regulan el ciclo celular o el crecimiento celular (NCI. National cancer institute 2015). Todas las neoplasias son clasificadas

como benignas o malignas dependiendo de su capacidad de invadir otros tejidos, siendo benignas aquellas que se mantienen en un solo sitio o también llamadas *in situ*, mientras que las que pueden dispersarse a través del organismo se les denomina *invasivas*.

El cáncer tiene hallmarks que le brindan la capacidad de evadir respuestas apoptóticas, presentar cambios genéticos y epigenéticos que alteran la expresión de distintos genes, entre los que destacan la reactivación de la telomerasa; la expresión de enzimas de degradación de matriz extracelular; que favorece la capacidad de migrar y establecerse en otros tejidos aumentando su capacidad invasiva (Reunanen and Kähäri 2013) y la capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (Hanahan and Weinberg 2011).

Actualmente, el cáncer es un problema mundial importante por la cantidad de muertes que se registran; de acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS) representa la cuarta causa de muerte a nivel mundial, en 2018 se registraron alrededor de 9 millones de muertes derivadas del cáncer (Organización Mundial de la Salud 2018). Además, se calcula que 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 11 mujeres morirán a causa de algún tipo de cáncer, siendo en hombres el cáncer de pulmón el más frecuente y en mujeres el de mama (Plummer et al. 2016) **(Figura 2)**.

Por otra parte, el cáncer no sólo representa un problema de salud, sino también económico, en 2010 representó un costo atribuible de 1.16 mil millones de dólares, cifra que continúa en aumento cada año. Por lo que la prevención y la detección temprana se ha convertido en una necesidad, así mismo el cambio de ciertas conductas como fumar, tener una mala alimentación y el consumo excesivo de bebidas alcohólicas, las cuales son factores de riesgo para el cáncer (International Agency for Research on Cancer. WHO 2018).

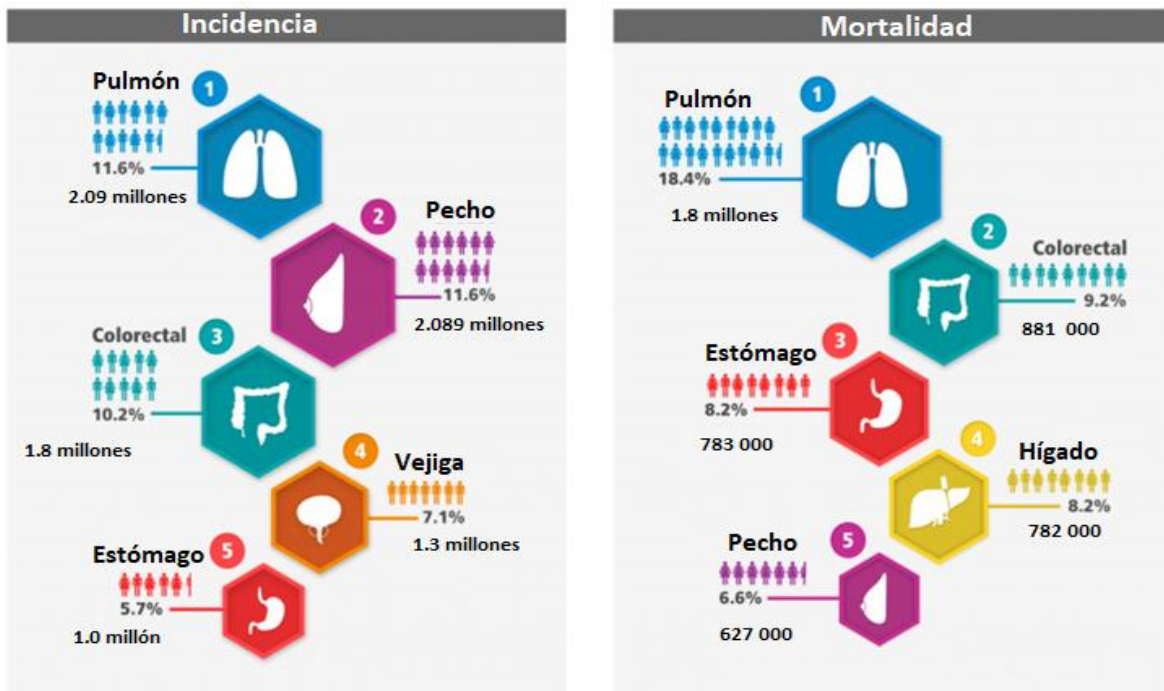


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en ambos sexos. En ambos parámetros el cáncer de pulmón predomina, no obstante, el cáncer de mama se encuentra entre los 5 cánceres con mayor incidencia y mortalidad. Figura modificada de “New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018. Accessed October 25, 2020. <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>.

En México, el cáncer también representa un problema de salud. En 2014 se registró como la tercera causa de muerte, siendo en hombres las principales neoplasias las de próstata, pulmón y estómago. Mientras que para las mujeres se reportó como principales el de mama y el cérvico-uterino (INEGI 2018) . Los tumores malignos han estado presentes en el país como una de las 10 principales causas de muerte desde 1960. Particularmente, el cáncer de mama ha aumentado a través del tiempo, registrando un total de 15.3% de defunciones registradas a nivel mundial (Reynoso-Noverón and Torres-Domínguez 2018)

2.1.5 Cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente, el cáncer de mama es la principal causa de muertes en mujeres a nivel nacional y mundial, reportándose aproximadamente 2 millones de nuevos casos y 700 mil muertes a causa de él en 2018 a nivel mundial (GLOBOCAN 2018). Ante esta problemática se ha buscado desarrollar técnicas de diagnóstico y clasificación para un mejor tratamiento y cuidado, debido

a que dependiendo del sub tipo de cáncer de mama se presentan diferencias en cuanto a efectividad de los diferentes tratamientos disponibles.

Histológicamente, el cáncer de mama puede ser clasificado como lobular (cáncer ubicado en las glándulas mamarias) o ductal (cuando la neoplasia es en los ductos de la mama), siendo la neoplasia más común la ductal con un 80% de los casos registrados a nivel mundial (Feng et al. 2018). De igual forma el cáncer ductal es el tipo de cáncer que evoluciona con mayor facilidad a una neoplasia invasiva por lo que al ser detectado, se requiere un tratamiento oportuno y de esta manera prevenir posteriores problemas de salud (Becker 2015).

Por otra parte, con los avances en biología molecular se ha logrado tener una clasificación más precisa, clasificándolos por la expresión de algunos biomarcadores como son: el receptor de estrógenos (ER), receptor a progesterona (PR), el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (Her2-Neu), así como la expresión de moléculas indicativas de alta proliferación como es Ki67, proteína que aumenta en citoplasma cuando la célula entra a ciclo celular (Feng et al. 2018). Además, se utilizan marcadores asociados a células basales, como son las citoqueratinas (CK), las cuales se asocian con una mayor agresividad (GLOBOCAN 2018). Con estos marcadores se puede realizar una clasificación molecular, clasificando al cáncer de mama en 6 tipos como se muestra en la **Tabla 1**.

La alta tasa de mortalidad que tiene el cáncer de mama refleja la incapacidad actual para el tratamiento de este tipo de neoplasias. El éxito de los pacientes radica en el diagnóstico oportuno con ayuda de herramientas como mamografías, biopsias y ensayos moleculares (de Souza Albernaz et al. 2017). Además, la elección del tratamiento es de suma importancia, ya que dependiendo del tipo de cáncer la efectividad de cada tratamiento cambia. El tratamiento contra el cáncer de manera general puede clasificarse en dos grupos: sistémico y localizado o específico. El primer grupo engloba a todos los medicamentos administrables como los anticuerpos monoclonales, quimioterapéuticos y antagonistas de

moléculas solubles o receptores; mientras que los localizados son la cirugía y la radioterapia (Galluzzi et al. 2014)

Tabla1. Clasificación molecular, pronóstico y tratamientos para diferentes tipos de cáncer de mama.

Clasificación	Marcadores	Pronóstico	Características	Tratamientos
<i>Luminal A</i>	ER ⁺ PR ⁺ HER2 ⁻ Ki67 ^{Bajo} CK 7 y 8	Bueno	70% de los casos registrados	Terapia hormonal o inhibidores de HER2
<i>Luminal B</i>	ER ⁺ PR ^{+/-} HER2 ^{+/-} Ki67 ^{Alto} CK 7 y 8	Bueno/ Intermedio	10- 20% de casos, su pronóstico es ligeramente peor que el de luminal A	Terapia hormonal o inhibidores de HER2
<i>HER2</i>	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ^{Alto} Ki67 ^{Alto}	Malo	5-15% de frecuencia; Tiene una tasa de crecimiento elevada	Terapia dirigida contra HER2
<i>Triple negativo</i>	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻ Ki67 ^{Alto} CK 5 y 6	Malo	15-20% de frecuencia y es diagnosticado principalmente en mujeres jóvenes premenopáusicas	Terapia limitada, se utiliza quimioterapia en conjunto con cirugía. Uso de inmunoterapia como última alternativa (PD-1/CTLA-4)
<i>Parecido a normal (Normal-like)</i>	ER ^{+/-} PR ^{+/-} HER2 ^{+/-} Ki67 ^{Bajo}	Intermedio	Se presenta poco, y se trata similar a Luminal A	Terapia hormonal y dirigida según sea el caso

En México el cáncer de mama triple negativo Er⁻PR⁻HER⁻ (CMTN) se presenta más frecuentemente (15 - 23%) en mujeres pre-menopáusicas (29 - 50 años) y en una edad productiva, por lo que puede referirse a un mayor impacto económico con tasas de mortalidad más elevadas respecto a los otros tipos de cáncer de mama (Fidler and Bray 2018; Bray et al. 2018).

El CMTN tiene gran capacidad de diseminarse a ganglios linfáticos y una mayor tasa de recurrencia, por lo que lo vuelve un problema severo. Genéticamente está estrechamente relacionado con el gen antitumoral BRCA1. Este gen produce una proteína involucrada en la reparación de ADN, ciclo celular y estrés oxidativo

(Gorodetska, Kozeretska, and Dubrovskaya 2019), por lo que fallas en su producción favorece la inestabilidad genómica.

La capacidad de invadir que tienen estos tipos de neoplasias y su incapacidad de responder a la terapia química y hormonal, lo convierte en una neoplasia de mal pronóstico y de gran interés en la investigación y salud pública, convirtiendo al tratamiento dirigido ineficaz (Gonçalves et al. 2018; Gluz et al. 2009). No obstante, actualmente se ha propuesto la integración del microambiente tumoral para el tratamiento del cáncer (Wahba and El-Hadaad 2015; Z. Liu et al. 2018; Marra, Viale, and Curigliano 2019) así como la importancia que tienen los linfocitos T infiltrantes (TIL's, Tumor infiltrating lymphocytes por sus siglas en inglés), debido a que se ha correlacionado positivamente la cantidad de TIL's con un mejor pronóstico (Zgura et al. 2018; Loi et al. 2019; Miyashita et al. 2015; Loi, Sirtaine, Piette, Salgado, Viale, Van Eeno, Rouas, Francis, Crown, Hitre, De Azambuja, et al. 2013).

2.2 Infiltrado tumoral en cáncer

Durante el desarrollo de las neoplasias, las células transformadas presentan mutaciones e inestabilidad genómica, las cuales provocan muerte celular y cambio en la expresión y composición de proteínas. Los cambios en las proteínas son reconocidos por el sistema inmunológico, otorgando señales de alerta y creando una respuesta contra las células transformadas (Coulie et al. 2014). El sistema inmunológico trata de contener a las células tumorales y en la mayoría de casos destruye a las células transformadas, sin embargo, cuando esto no ocurre se generan cambios que incluso pueden ayudar a la progresión y desarrollo del cáncer en distintos puntos temporales (Teng and Smyth 2017).

Inicialmente, esta interacción entre el sistema inmunológico y las células del cuerpo, era conocida como *inmunovigilancia*, se postulaba que el sistema inmune protege a los organismos ante la formación de neoplasias, infecciones virales y bacterianas; siempre y cuando el sistema inmune funcionara correctamente mediante un estado de vigilia constante (Ribatti 2017). Posteriormente esta teoría fue ampliada a la teoría conocida como inmunoedición (Schreiber, Old, and Smyth

2011), en donde el cáncer y el sistema inmune van editándose mutuamente. La inmunoedición se divide en 3 etapas:

- **Eliminación:** En esta etapa el sistema inmunológico elimina a las células transformadas que reconoce a través de la presencia de antígenos tumorales o señales relacionadas a daño celular. El sistema inmune innato es partícipe de la respuesta temprana, sin embargo, es necesario una respuesta adaptativa por parte de los linfocitos T para lograr la eliminación efectiva de estas células transformadas. Así mismo, se estudió la respuesta que se podía dar en ratones deficientes de linfocitos T B y NK (Natural Killers, por sus siglas en inglés) (RAG2^{-/-}; Gen activador de recombinación 2) encontrándose que estos ratones desarrollaban con mayor facilidad tumores y que además los tumores eran más inmunogénicos respecto a los ratones que tenían el gen de RAG2 intacto (Swann and Smyth 2007; Rogers et al. 2013; Nanni et al. 2012); demostrando que los linfocitos T B y NK son importantes en la edición y contención de los tumores (Vigneron 2015). Sin embargo, particularmente para los linfocitos T, se requiere que se encuentren en un estado activo y funcional.
- **Equilibrio:** En ocasiones las células tumorales no son lo suficientemente antigénicas para ser reconocidas por el sistema inmunológico, por lo que comienza una etapa de latencia en donde su crecimiento se ve limitado, más no impedido, por el sistema inmunológico, es decir, se encuentran en equilibrio con el sistema inmunológico, generándose tolerancia inmunológica. Esta etapa es muy importante ya que, el tumor comienza a modelar el microambiente, modificando las células del tejido cercano a él, generando nuevos vasos sanguíneos y modificando los nutrientes. Esto depende en gran medida del infiltrado tumoral; se ha observado de manera general en los tumores sólidos, que un infiltrado alto de linfocitos T CD8⁺ NK y $\gamma\delta$ T así como un bajo número de células derivadas mieloides supresoras (MDSC por sus siglas en inglés) y linfocitos T reguladores (FoxP3⁺) mantienen controlado el desarrollo del tumor y pueden conducirlo a su eliminación (Miyashita et al. 2015)(Lanitis et al.

2017)(Binnewies et al. 2018). Cuando esta relación se invierte, y existe mayor cantidad de poblaciones supresoras, se dice que el ambiente es *pro-tumoral*.

- **Escape:** Es la última etapa que contempla esta teoría y señala que una vez que el tumor se ha “editado”. Se desarrolla una respuesta supresora y antiinflamatoria, lo que favorece el crecimiento y escape del tumor primario del sistema inmunológico. Si células tumorales escapan del tumor primario, se dice que el tumor es invasivo y maligno, siendo entonces el ambiente tumoral, así como el infiltrado celular favorables para el desarrollo de la metástasis. En esta etapa, los macrófagos antiinflamatorios M2 y fibroblastos asociados a tumor (TAF por sus siglas en inglés), producen factores pro-tumorales como el factor de crecimiento vascular endotelial, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β por sus siglas en inglés) (Kim, Emi, and Tanabe 2006) entre otros. Además hay un aumento en la expresión de moléculas reguladoras de la respuesta inmune como PDL-1 en células presentadoras de antígenos (Kumar et al. 2016; Marra, Viale, and Curigliano 2019; Ostrand-Rosenberg and Fenselau 2018) y PD-1 (Programed death 1), CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) y otros receptores de inhibición en linfocitos T, los cuales pueden ser posibles blancos terapéuticos (Catakovic et al. 2017)(Stanton and Disis 2016; Egelston et al. 2018; Turnis, Andrews, and Vignali 2015; Burugu et al. 2017)

Debido a que la inmunoedición participa en la capacidad que tienen los tumores para volverse malignos, la cuantificación de células infiltrantes en tumor ha sido considerado como un biomarcador para conocer el pronóstico del cáncer o la funcionalidad de ciertas terapias dirigidas. Ejemplo de una de las poblaciones que se cuantifican son los linfocitos T citotóxicos activos (Skriver et al. 2020; Egelston et al. 2018; Burugu et al. 2017; Loi et al. 2019; Zgura et al. 2018). La información obtenida en este análisis es llamada marcador inmune (*Immunoscore*), e involucra otras observaciones, como el infiltrado de macrófagos, áreas necróticas, expresión de receptores. El immunoscore es dependiente del tipo de cáncer (Galon et al. 2016).

Tabla2. Etapas de la inmunoección y células infiltrantes que participan.

ETAPA DE INMUNIEDICIÓN	CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE QUE PARTICIPAN	EFFECTO EN EL INFILTRADO TUMORAL	PRODUCTOS O RECEPTORES
ELIMINACIÓN	Linfocitos Th1	Coopera con las células dendríticas activándolas	IFN- γ , FAS-L
	NK	Reconoce células tumorales por NKG2D, mediando citotoxicidad.	TRAIL
	Linfocitos citotóxicos	Desarrolla la citotoxicidad celular	Perforina y Granzimas IFN- γ
	Dendríticas CD8a ⁺ CD103 ⁺	Presentación adecuada de antígenos y respuesta inicial con linfocitos T citotóxicos	CCR7
	Macrófagos (principalmente M1)	Presentación de antígenos	TNF α . IL-8, IL-1 β
EQUILIBRIO	Linfocitos Th1	Mantienen un balance con las células tumorales, destruyendo a las células inmunogénicas y manteniendo únicamente las clonas poco inmunogénicas	IFN- γ , FAS-L Aumento en la expresión de PD-1 CTLA-4, TIM-3, LAG-3
	Linfocitos citotóxicos		Perforina y Granzimas IFN- γ Aumento en la expresión de PD-1 CTLA-4, TIM-3, LAG-3
	Macrófagos (Comienza un balance entre M1/M2d)	Presentación de antígenos. Si son M2d su efecto es protumoral y angiogénico	M1: TNF α . IL-8, IL-1 β M2: TGF- β , VEGF, IL-10
	Linfocitos Tregs (en bajas cantidades)	Supresión de la respuesta inmunológica y progresión tumoral	IL-10, TGF- β
	Linfocitos Th2	Evitan la expansión de linfocitos Th1, dando una respuesta regulatoria. Así mismo cooperan para el reclutamiento de macrófagos M2 (DeNardo et al. 2009)	IL-4, IL-5, IL-13
ESCAPE	Macrófagos M2d principalmente	Provocan inmunosupresión y un ambiente pro-tumoral. Evitan el reclutamiento de linfocitos citotóxicos.	TGF- β , VEGF, IL-10 Indolamina-dioxigenasa 1 (IDO1) MMP-9
	Linfocitos Tregs	Supresión de respuesta de linfocitos T y progresión tumoral	IL-10 y TGF- β
	Células dendríticas	Supresión de linfocitos T y generación de agotamiento en linfocitos T	Alta expresión de PD-L1 Disminución de la endocitosis
	Células mieloides supresoras	Suprimen la respuesta de linfocitos T, mantienen en la periferia a estos y generan angiogénesis	IDO, IL-10, VEGF, PDL-1 Arginasa

2.3 Linfocitos T en cáncer de mama

A pesar de que el cáncer de mama puede clasificarse molecularmente e histológicamente, la heterogeneidad del mismo hace difícil su tratamiento. Por ejemplo, entre los considerados triples negativos, existen al menos 4 variantes clasificadas por transcriptoma: triple negativo con expresión luminal del receptor a andrógenos, similar a mesenquimal, similar al basal tipo 1 y similar al basal tipo 2 (Lehmann et al. 2016). Estas variantes tienen diferencias en los marcadores, así como en el infiltrado de linfocitos T, que es importante para la selección de terapias contra el cáncer, ya que de esto depende su efectividad (Seo et al. 2013; Stanton and Disis 2016; Terranova-Barberio et al. 2020)

Los linfocitos T participan activamente en la respuesta antitumoral, sin embargo, requieren el funcionamiento adecuado de las células presentadoras de antígeno (APC) como son las células dendríticas y macrófagos, las cuales montan una respuesta en los órganos linfoides secundarios (como ganglios linfáticos y bazo) (Austyn 2001; Lewis, Williams, and Eisenbarth 2019) llevando a cabo una interacción conocida como *sinapsis inmunológica* (**Figura 3**) (Huppa and Davis 2003). Una vez montada la respuesta en estos lugares se puede llevar a cabo una expansión de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, los cuales migrarán al tumor donde ocurrirá la interacción y reconocimiento de células tumorales por los linfocitos (Cohen and Blasberg 2017).⁶⁴ .

Se comenzó a reconocer la importancia de los linfocitos T desde 1922, donde en un estudio clínico, se encontró que a mayor infiltrado tumoral de linfocitos T tenían mayor sobrevida los pacientes con cáncer de mama (Sistrunk and Maccarty 1922). Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad que representan los tumores sólidos, y aún se continúa explorando el papel que tienen los linfocitos T en el cáncer.

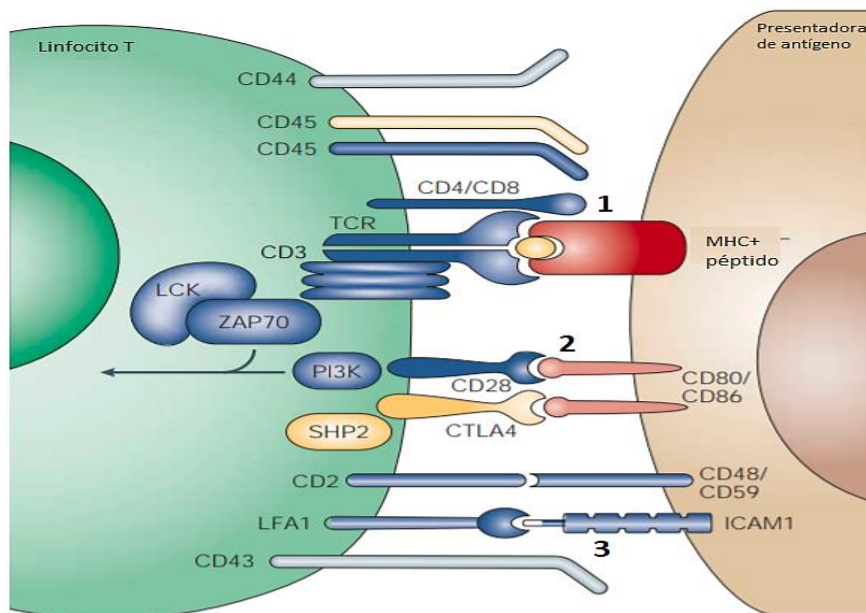


Figura 3. Sinapsis inmunológica necesaria para una correcta respuesta inmunológica. La sinapsis inmunológica es el proceso en donde los linfocitos T (LT) y las células presentadoras de antígenos interactúan para generar una respuesta adaptativa. Se compone de 3 elementos: **1.** La interacción entre el TCR (T cell receptor) y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, Main Histocompatibility Complex, por sus siglas en inglés) cargado con un péptido. Esta es la primera señal y con ella se inicia la sinapsis. **2.** La interacción con moléculas co-estimuladoras o co-inhibidoras, las cuales pueden definir el destino del linfocito T, generando una célula funcional o disfuncional. **3.** La adhesión celular es necesaria para que la interacción sea adecuada y pueda llevarse a cabo la activación. Las tres señales son necesarias para una correcta activación de los LT. LCK, ZAP70 y PI3K, son proteínas río abajo de la señalización del receptor de linfocitos T (TCR, T cell receptor, por sus siglas en inglés). CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, por sus siglas en inglés) y SHP-2 se encargan de regular la señal de activación del TCR. LFA-1 e ICAM-1 son moléculas de adhesión características de los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno. La respuesta generada tras la sinapsis inmunológica dependerá de las 3 características, teniendo como producto final la activación del linfocito T con proliferación y producción de IL-2, apoptosis, anergia, tolerancia e incluso agotamiento. Modificado de *Huppa, J. B. & Davis, M. M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. Nature Reviews Immunology vol. 3 973–983 (2003).*

Específicamente, en el cáncer de mama triple negativo en 2013 se observó que un puntaje alto en el infiltrado de linfocitos T mejoraba la supervivencia en 5 años en pacientes diagnosticados con cáncer de mama, en comparación a muestras de pacientes que tenían un puntaje bajo (Loi, Sirtaine, Piette, Salgado, Viale, Van Eenoo, Rouas, Francis, Crown, Hitre, de Azambuja, et al. 2013). Así mismo se ha observado que el aumentar el 10% de TIL's en los tumores, puede aumentar la supervivencia y el tiempo libre de enfermedad en 20% (Ibrahim et al. 2014) y que

además si el infiltrado tumoral es de CD8⁺, se tiene una mejor respuesta a la quimioterapia (Ibrahim et al. 2014) y en su contra parte se asocia a los linfocitos reguladores FoxP3⁺ con un mal pronóstico (Huang et al. 2017).

Por otra parte se ha descrito que existen diferencias en el fenotipo de los linfocitos T en cáncer de mama, siendo los TILs de cáncer de mama triple negativo los que se encuentran más suprimidos, con mayor expresión de receptores de inhibición como PD-1, LAG-3 CTLA-4, menor expresión de citocinas y de contar con una mayor cantidad de linfocitos reguladores activos(Z. Liu et al. 2018)

Además, los linfocitos T deben de localizarse dentro del tumor e interactuar directamente para que presenten un efecto antitumoral debido a que los tumores sólidos presentan una matriz extracelular rica en colágeno que impide el paso libre de las células del sistema inmunológico(Mrass et al. 2006). Sin embargo, los tumores pueden suprimir a los linfocitos infiltrantes de tumor, mediante diferentes procesos; uno de uno de ellos es el agotamiento de linfocitos T (Yi, Cox, and Zajac 2010)

2.4 Agotamiento de linfocitos T.

2.4.1 Origen y características

El agotamiento de los linfocitos T es un fenómeno que ocurre tras la exposición continua de antígenos por periodos largos de tiempo, se ha descrito principalmente en infecciones virales y en cáncer (Yi, Cox, and Zajac 2010). Fue definido inicialmente en las infecciones crónicas virales de LCMV (Lymphocytic choriomeningitis virus por sus siglas en inglés), en donde se observó que los linfocitos T CD8⁺ disminuían su capacidad de producir citocinas como IFN- γ y moléculas asociadas a la respuesta citotóxica como son granzimas y perforinas(Yi, Cox, and Zajac 2010). Posteriores se demostró que los linfocitos T CD4⁺ presentaban un fenómeno de agotamiento muy similar a los CD8⁺ (Pauken and Wherry 2015), consolidando el estado disfuncional en ambas poblaciones.

Posteriormente, en cáncer se estudió la posibilidad de que los linfocitos llegaran a un estado similar, ya que los antígenos tumorales se mantienen de forma crónica, además, los linfocitos perdían capacidades funcionales; encontrando un estado

en donde se pierde gradualmente la expresión de moléculas citotóxicas, la capacidad de responder y producir estímulos proliferativos como IL-2 (Lopez et al. 1998), y tienen un aumento en la expresión de receptores de inhibición tales como PD-1, TIM-3, CTLA-4 y LAG-3 (Catakovic et al. 2017), es decir, desarrollaban un estado similar al agotamiento descrito en infecciones virales, sin embargo, el contexto celular entre las infecciones virales y el tumoral es muy diferente. Sin embargo, el fenómeno emergente pareciera ser el mismo (Figura 4).

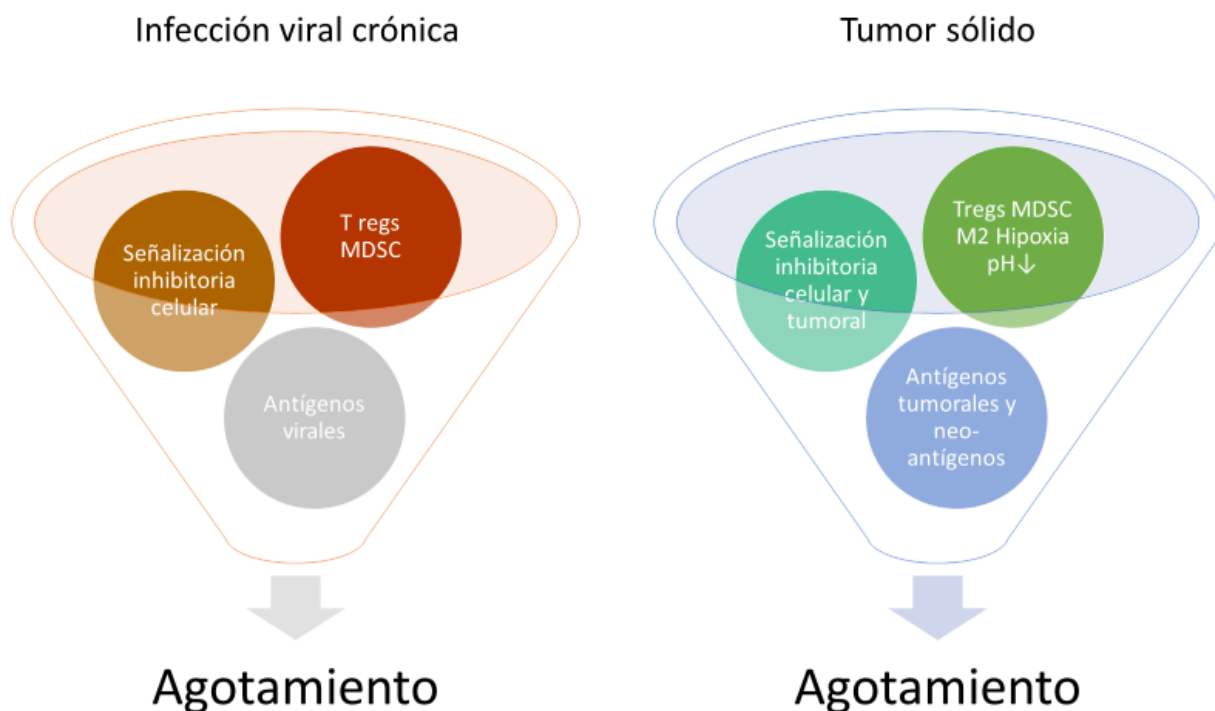


Figura 4. Factores generales de desarrollo del agotamiento en infecciones virales y en tumores sólidos. El agotamiento de linfocitos T, es un fenómeno emergente en donde participan varios factores, que puede verse acelerado dependiendo del entorno. Particularmente el ambiente tumoral es un ambiente dinámico, en donde por procesos de pérdida de interacción estromal e inmunoeedición, adquiere mecanismos que suprimen la respuesta inmune más rápido, como son las señales inhibitorias directas que ejerce el tumor como la expresión de PDL-1, el aumento de citocinas como IL-10 y TGF β , así como el reclutamiento de extirpes inhibitorias como Tregs y MDSC. T-regs (Linfocitos T reguladores), MDSC (Células supresoras derivadas mieloides por sus siglas en inglés), M2 (Macrófagos tipo 2.)

Las características principales del estado agotado de los linfocitos T se muestran en la **Tabla 3**. Cabe resaltar que una de las características que permite diferenciar entre otros estados disfuncionales a los linfocitos T es la sobreexpresión de

receptores de inhibición (RI's ó IR's, Inhibitor Receptors, por sus siglas en inglés), por ello se han postulado como biomarcadores para el pronóstico de las diferentes neoplasias, así como puntos de control (*checkpoints*) que pueden ser utilizados para prevenir o revertir el agotamiento de los linfocitos T.(Otano and Ait-oudhia 2017)

La manera directa para revertir o prevenir el agotamiento de linfocitos T es mediante el bloqueo de los receptores de inhibición, los cuales se encuentran sobreexpresados en esta condición (Turnis, Andrews, and Vignali, 2016.) En este sentido se encuentran ya en el mercado anticuerpos contra PD-1 y PDL-1, CTLA-4 y LAG-3 (Zou et al. 2019) así mismo se encuentra en fase clínica 1 un anticuerpo para bloquear a TIM-3 (Clinical Trials NCI 2019). A pesar de que estos anticuerpos han demostrado tener un amplio efecto en aumentar la actividad antitumoral de manera *in-vitro*, cuando han sido trasladados al uso *in-vivo*, presentan una amplia cantidad de efectos adversos (Yao et al. 2018), a causa de que estos receptores de inhibición participan activamente en la tolerancia inmunológica. Además de los efectos adversos, la ineffectividad de la inmunoterapia en la mayoría de las neoplasias, ha llevado a la investigación genómica y epigenómica, tratando de encontrar la manera de prevenir del agotamiento (Wherry and Kurachi 2015) (McLane, Abdel-Hakeem, and Wherry 2019).

Tabla3. Características principales del agotamiento

<i>Tipo de linfocitos</i>	Capacidad proliferativa	Marcadores	Pérdida de producción de citocinas	Capacidad antitumoral	Dependencia a IL-7 e IL-15	Tiempo de pérdida de función	Ganancia de función o expresión
CD8 ⁺	Baja	PD-1 TIM-3 LAG-3 2B4 TIGIT	TNF α IFN γ Granzima B Perforina	Baja o sin actividad	Sí	Tardía	EOMES TCF-1 TOX-1
CD4 ⁺	Baja o nula	PD-1 TIM-3 CTLA-4 2B4 TIGIT	TNF α IFN γ IL-2	Baja o sin actividad	No	Temprana	IL-10 IL-21 GATA-3 Bcl-6

2.4.2 Desarrollo del agotamiento en linfocitos T.

El desarrollo del agotamiento es gradual. Comienza con el aumento de receptores de inhibición y disminución de citocinas en pocas semanas (al menos se requieren más de 2 semana) (Kaech and Cui 2012), y debido a los efectos adversos que conlleva el uso de anticuerpos monoclonales contra los IR's (Martins et al. 2019), se ha tratado de encontrar puntos claves para la prevención del agotamiento, con el objetivo de que los linfocitos no alcancen un estado irreversible de reactivación, y se vuelvan *linfocitos T agotados terminales* (Chen et al. 2019; Z. Zhang et al. 2020) ; se han definido varios factores transcripcionales que juegan un papel en el destino de los linfocitos T, como son, NR4A TCF-1, NFAT-1, T-bet, Eomes y TOX 1 (Feng et al. 2018)(Chen et al. 2019)(Y. Wang et al. 2019)(Z. Zhang et al. 2020)

Se han propuesto estrategias terapéuticas para inhibir o modificar la expresión de genes debido a que el desarrollo del agotamiento es progresivo. Por ejemplo, esto se demostró en 2017 con ratones Knock Out (KO) de Dmmt3, una metil transferasa involucrada en el silenciamiento de genes asociados a la activación de los linfocitos T. En ese estudio se encontró que los linfocitos T provenientes de los ratones KO podían responder de mejor manera a la activación celular, tras el bloqueo de PD-1, es decir se reactivaban, caso contrario a los ratones silvestres (Ghoneim HE, Fan Y, Moustaki A, Abdelsamed HA, Dash P, Dograp 2017).

Otro experimento que ha demostrado que una manera de aumentar la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+, mediante cambios epigenéticos fue el realizado en 2019 , en donde al inhibir al gen EZH2 (que codifica una metil transferasa del sistema Polycomb), los linfocitos pueden responder de manera *in-vitro* a un estímulo inespecífico crónico de manera más duradera e intensa, es decir, mantienen un fenotipo efector durante más tiempo (Kakaradov et al. 2017).

Además, se han hecho estudios de redes de activación e inhibición en linfocitos T, en modelos de infección viral e *in-silico*, encontrando algunos factores de transcripción que regulan de manera previa el establecimiento del agotamiento de los linfocitos T (Bolouri et al. 2019; Chen et al. 2019; Y. Wang et al. 2019; Z. Zhang

et al. 2020). A partir de estos estudios se ha desarrollado una propuesta en la que el agotamiento se desarrolla en **dos etapas**. En la primera etapa, es posible regresar a los linfocitos a un estado efector y de memoria, mientras que la segunda etapa se caracteriza porque los linfocitos T adquieren una diferenciación terminal, y es imposible modificar su capacidad funcional.

Uno de los factores de transcripción que ha demostrado participar activamente en la diferenciación terminal es TCF1. En estudios *in-vivo* e *in-silico*, ha mostrado ser un regulador que divide a estos dos posibles estados, en donde si se presenta TCF1, los linfocitos aún pueden re-activarse con inmunoterapia (Chen et al. 2019), ya que se encuentran en un estado similar a célula troncal (**Figura 5**).

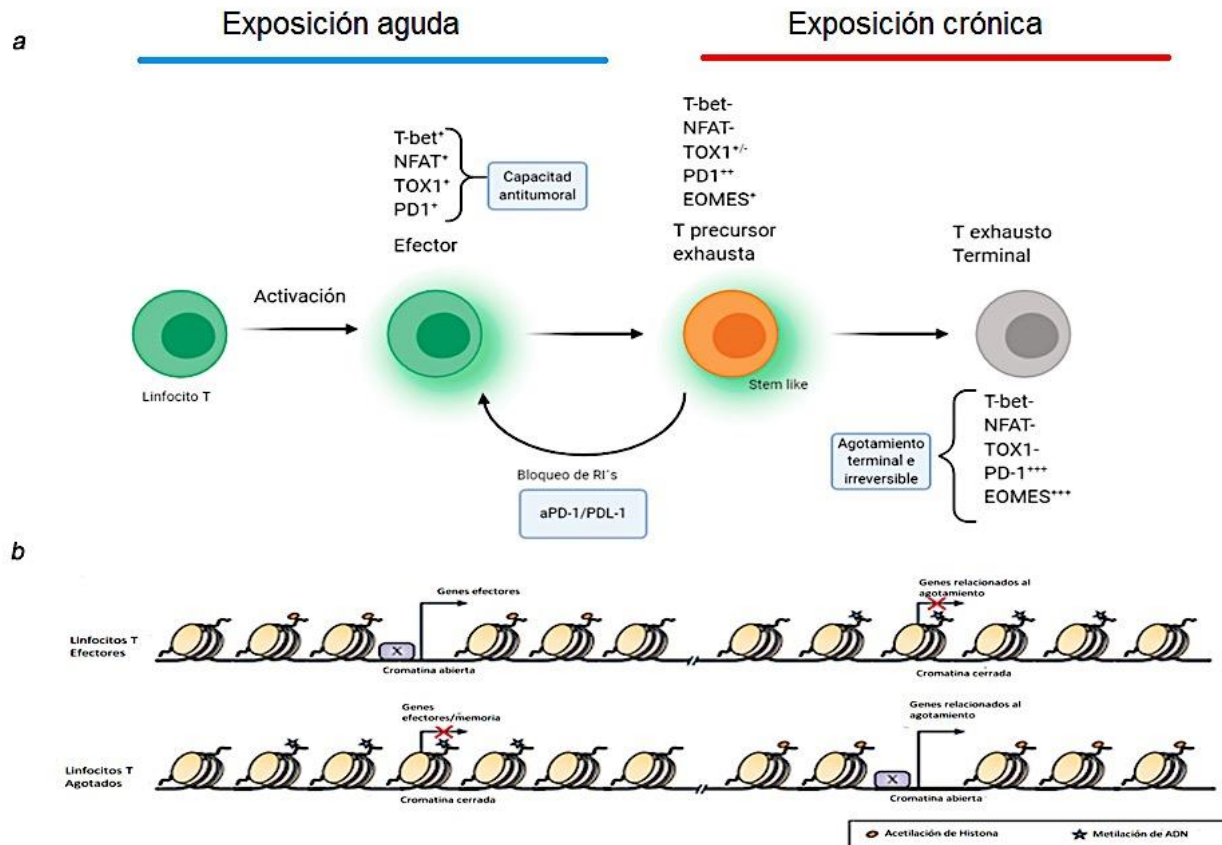


Figura 5. Transición de linfocitos T a linfocitos T agotados. Los linfocitos T desarrollan el agotamiento cursando por una etapa inicial o precursora, donde existen marcadores de agotamiento, sin embargo, transcripcionalmente mantienen un estado intermedio, el cual puede ser revertido con inmunoterapia. Cuando su cambio es además transcripcional, cursan por la segunda etapa y en ésta no hay reversión, es decir, están en un estado terminal. **a.** Proceso de agotamiento de linfocitos T con ejemplos de factores de transcripción y la expresión de PD-1. Inicialmente los linfocitos T después de una activación se vuelven *Efectores*, los cuales tienen un perfil antitumoral, sin embargo si la presencia del antígeno crónico o se tiene un ambiente supresor, el linfocito puede presentar agotamiento en una etapa temprana, *precursor*, el cual tiene un fenotipo como un linfocito T pero aún conserva su funcionalidad, así como la capacidad de revertir este estado y volver a ser efector si es tratado con terapia de bloqueo como aPD-1 o aPDL-1, si no es el caso y continúa la exposición, el linfocito entra a un estado *terminal* e irreversible. **b.** Existen cambios en la cromatina de los linfocitos T que permiten. La expresión de moléculas funcionales como Granzima B, interferón gamma e IL-2, las cuales ayudan a la respuesta antitumoral, sin embargo, cuando se hace el agotamiento terminal, la expresión de estas se pierde y se gana la expresión de moléculas inhibitorias. Figura construida de Wherry J. y Kurachi M. agosto 2015, Nature- Review. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion y Ghoneim H. December 2016. Cell. Opinion. Cell-Intrinsic Barriers of T cell based immunotherapy

En este sentido, actualmente se trata de encontrar biomarcadores que nos permitan identificar de manera oportuna a las dos clases de linfocitos. Algunos factores transcripcionales de interés son: OX2, TCF1, EOMES y TOX-1 (Doering et al. 2012; Bolouri et al. 2019; Chen et al. 2019), debido a que se ha encontrado que controlan el fenotipo de los linfocitos T. Por ejemplo, EOMES regula a Pdc1, gen que produce al receptor PD-1 (Wu and Shi 2017)

Los linfocitos se encuentran en tejidos donde mantienen una interacción continua con todo su entorno mediante señales celulares y solubles; es decir, su fenotipo será determinado por el ambiente (Fan and Rudensky 2016). En este sentido los linfocitos T que llegan al agotamiento por causa de una infección crónica viral son diferentes a los que llegan a este estado por un microambiente tumoral, por ejemplo se ha reportado pérdidas de función más rápida en el ambiente tumoral, cambios epigenéticos, como una mayor apertura en la cromatina para genes como Pdc1 y Tcf7, expresión de algunos marcadores como TIM-3 y LAG-3 (Wherry and Kurachi 2015), sin embargo comparten muchas similitudes.

2.4.3 Agotamiento en cáncer. Influencia del microambiente tumoral

El cáncer es una enfermedad multifactorial caracterizada principalmente por modificaciones genéticas asociadas al aumento en la proliferación celular, evasión de la apoptosis y activación de genes asociados al crecimiento celular acelerado y capacidad de invasión a otros tejidos (Hamaï et al. 2010). Se necesita un entorno celular que promueva el cáncer, como planteó Ingber (Ingber 2002) la interacción directa del epitelio es un factor esencial para el desarrollo tumoral y para la metástasis. Es decir, las células transformadas adquieren propiedades metabólicas y firmas epigenéticas totalmente diferentes a las células normales (Paduch 2015); activando factores de transcripción como HIF-1, aumentando la expresión de factores de crecimiento como SGF, VEGF o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CFS) (Schreiber, Old, and Smyth 2011).

Por otro lado, también existen cambios metabólicos que alteran el microambiente, el cambio metabólico más conocido es el efecto Warburg, donde el metabolismo glucolítico se realiza por la vía anaerobia, produciendo lactato y aumenta el

consumo de glutamina, aminoácido esencial para la respuesta inmunológica, lo que disminuye la respuesta antitumoral en el entorno (Shah, Wang, and Ma 2020). En conjunto favorece un sistema que desarrolla inmunosupresión, que favorece el agotamiento de los linfocitos T (J. C. Wang et al. 2018) mediante el aumento de células T reguladoras.

Así mismo algunas células tumorales, disminuyen la expresión de moléculas superficiales, lo cual los convierte en células invisibles para el sistema inmunológico, además algunos tipos de neoplasias, por ejemplo, melanoma y cáncer pulmonar (Lee et al. 2015) expresan CD80 y PDL1, ligandos de los receptores de inhibición CTLA-4 y PD-1 respectivamente. Estos RI's presentes en los linfocitos T activados, pueden dirigir a los linfocitos a un estado de agotamiento de manera directa.

El conocimiento del agotamiento de linfocitos T ha permitido tener un nuevo enfoque en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, se ha pensado que únicamente al bloquear los RI's se puede prevenir el agotamiento (University of Groningen 2015), lo cual es cierto hasta cierto punto.

Existen 3 ejes principales en el contexto del cáncer; *alteraciones en tejidos de desarrollo* como cambio en la expresión de moléculas de adherencia u ontogenia, por ejemplo el aumento de factores de crecimiento (M. Liu et al. 2015; Galon et al. 2016) (M. Liu et al. 2015; duPre' and Hunter 2007a; S. Yang, Zhang, and Huang 2012), *supresión inmunológica*; mediada principalmente por IL-10 y TGF- β (Batlle and Massagué 2019; Edechi et al. 2019; Standish et al. 2008) y *cambios metabólicos* que generan inmunosupresión como la disminución de glutamina y arginina o el aumento de lactato y metabolitos de triptófano y adenosina (**Figura 6**) (Wherry and Kurachi 2015).

En conjunto, estas señales del ambiente tumoral disminuyen el tiempo necesario para originar el agotamiento de linfocitos T, ya que se genera sinergismo entre vías (Kahan, Wherry, and Zajac 2015; Yi, Cox, and Zajac 2010) (Blackburn et al. 2009). Por lo que la complejidad que implica la supresión como son vías

metabólicas, incremento de receptores de inhibición y aumento de estirpes supresoras, justifica la baja eficacia que presenta la inmunoterapia terapias, pues la disfuncionalidad del linfocito no sólo depende de un receptor de inhibición. Por otro lado, se hipotetiza que una manera de prevenir el agotamiento es mediante la identificación de los factores o componentes principales.

Actualmente hay estudios que demuestran que al inhibir estirpes inmuno supresoras tales como células mieloides supresores y linfocitos T reguladores, se puede disminuir el agotamiento (Smyth et al. 2016), por otro lado, mediante lael uso de ARN interferente de genes asociados al agotamiento se ha encontrado una disminución en este fenómeno (Saeidi et al. 2018a). Lo importante es prevenir el estado disfuncional irreversible.

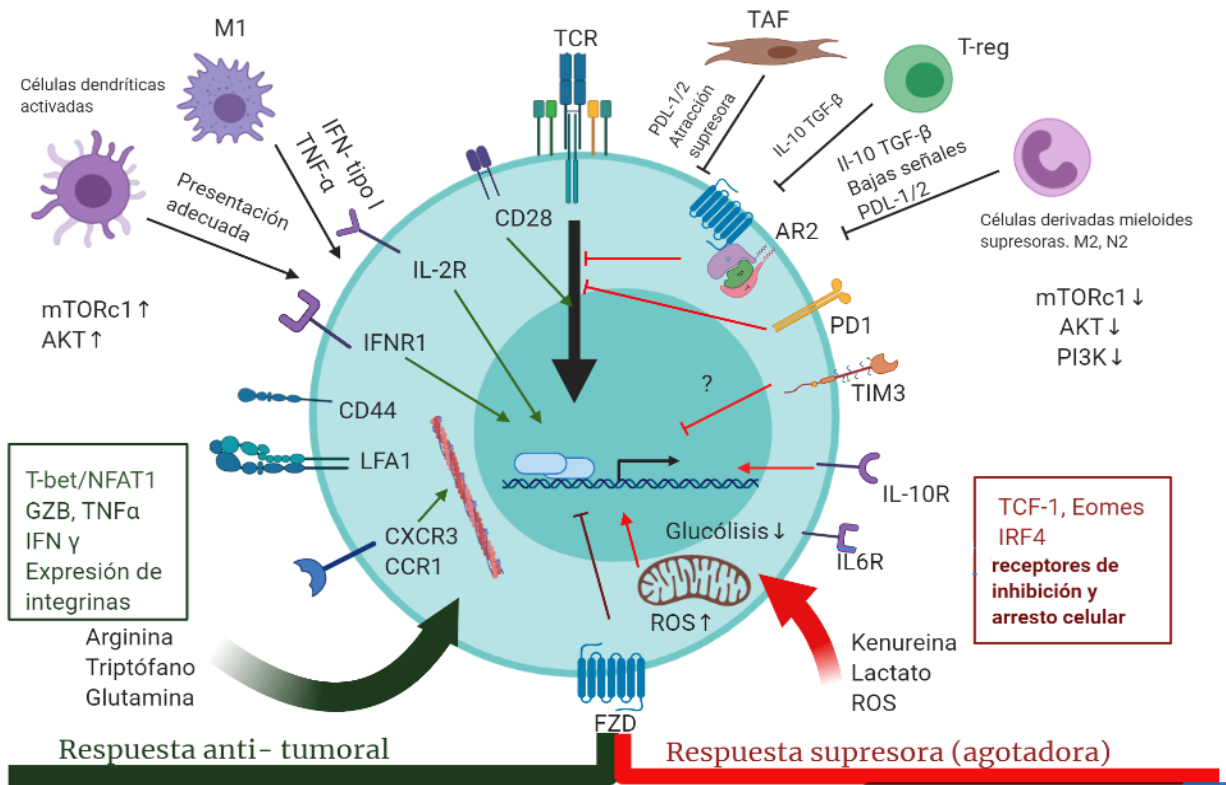


Figura 6. Influencia del microambiente tumoral en el agotamiento de linfocitos T. El agotamiento es un fenómeno evolutivo acelerado por señales supresoras. Se ha propuesto modificar estas señales, inhibiéndolas con anticuerpos monoclonales para el caso de PD-1, TIM-3 y otros receptores de inhibición; mediante antagonistas para las ecto-enzimas de ATP que generan adenosina, la cual al unirse a su receptor (AR2) inhibiendo directamente ZAP70 (Blackburn et al. 2009). Así mismo, el LT no puede ejercer sus funciones por el secuestro de moléculas como la arginina, el triptófano y la glutamina. Por otra parte, metabolitos como el lactato o las ROS generadas por la hipoxia generan supresión activando ERK1 y, en ocasiones, apoptosis de los linfocitos T, favoreciendo un estado anérgico. Este estado, tras la estimulación continua del TCR, conlleva al agotamiento, que si bien, puede caracterizarse membranalmente con los RIs, transcripcionalmente también se observa un aumento de IRF4, Eomes y TCF-1, con la pérdida de Tbet y NFAT-1. Los cambios de estos factores de transcripción se ven reflejados en la expresión de integrinas y selectinas como LFA1 y CD44, por ejemplo, CD44 disminuye la expresión en el agotamiento. Por otro lado, LFA-1 favorece la señalización del TCR mediante el reacomodo del citoesqueleto y el anclaje del LAT-osoma (Rognoni and Walko 2019)(H. Wang, Lim, and Rudd 2010). y en la expresión de receptores de quimiocinas como CXCR3 y CCR1, quienes dirigen el reclutamiento de linfocitos en sitios inflamatorios.

Otra línea de investigación para prevenir la disfuncionalidad de los linfocitos T en cáncer es a través del uso de adyuvantes inmunológicos, por ejemplo los agonistas a receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), en

este grupo se encuentran los nucleótidos cíclicos para potenciar la respuesta de genes de respuesta a interferón (Le Noci et al. 2015), LPS (Miura et al. 2016), AS04 (Ribas et al. 2018), CpG's (Le Noci et al. 2015), imiquimod (Salazar et al. 2017).

Los inmunopotenciadores se emplean también para mejorar la presentación de antígenos, sin embargo, el uso crónico de agonistas de PRR's puede ocasionar inmunosupresión por fenómenos compensatorios o regulatorios, por ejemplo las células dendríticas pueden aumentar la expresión de PDL-1 e IDO al ser estimuladas crónicamente (Snell, McGaha, and Brooks 2017).

Además se ha explorado el uso de agonistas a co-receptores como OX40, CD27, CD28 y CD40 (Buchan et al. 2015), que han demostrado sinergismo en la activación y reversión del agotamiento de linfocitos T. Los linfocitos T revertidos o revigorizados son linfocitos que tras la modulación de los receptores de inhibición, o través de la activación de ellos, recuperan la funcionalidad contra las infecciones virales o los tumores, entre lo que busca es la producción de citocinas, citotoxicidad y proliferación(Hassane 2017; Saeidi et al. 2018), sin embargo, la reversión del agotamiento no se logra en su totalidad o en ocasiones la terapia no previene el estado terminal de los linfocitos T (Wang et al. 2018; He et al. 2018).

Para revertir o prevenir el agotamiento existen diversas terapias, como son: el bloqueo de receptores de inhibición, a través de anticuerpos monoclonales o incluso péptidos con afinidad de unión a PDL-1(C. Li et al. 2018) y de esta manera inhibir la señalización de PD-1/PD-L1. También se usan estrategias que involucran la disminución o aumento de la actividad de factores de transcripción, por ejemplo, el ARN interferente miR-149-3p, disminuye la activación de FOXP1 quien regula la expresión de algunos RI's, este estudio fue realizado en células T intratumorales un modelo de cáncer de mama 4T1 (M. Zhang et al. 2019). En cuanto a potenciar la activación y funcionalidad de los linfocitos T, el ARN interferente miR-155 es un potenciador de Tbet, lo que previene el cambio al fenotipo agotado y potencia la actividad antitumoral (Martinez-Usatorre et al. 2019).

Otro enfoque para prevenir el estado de supresión de los linfocitos T es mediante la activación de correceptores (mencionado anteriormente) y vías relacionadas al TCR. Por ejemplo, se ha observado que linfocitos T a con la vía PI3K/AKT/mTOR activa constitutivamente sufren menos la supresión del microambiente tumoral (J. Sun et al. 2010). Incluso se ha propuesto la eliminación de estirpes celulares supresoras y citocinas supresoras para generar una mejor respuesta antitumoral, posiblemente debido a la prevención del agotamiento (Law, Valdes-Mora, and Gallego-Ortega 2020)

2.5.1 Terapia dirigida a PD-1/PDL-1

El agotamiento de linfocitos T produce una pobre respuesta contra virus y neoplasias debido a que los LT pierden la capacidad citotóxica, funcional y se vuelven sensibles a señales de inhibición. Una de las primeras moléculas encontradas en el agotamiento de linfocitos T fue PD-1 (Programmed death -1), quien se encontraba sobre expresado en LT de ratones infectados con el virus de LCMV, clona 13, quien causa una infección crónica y se ha observado que los linfocitos perdían su capacidad funcional (Wherry et al. 2007). Poco después, se definió a PD-1 y a otros receptores de inhibición como la característica molecular del agotamiento, y la manera en la cual se podía diferenciar de otros estados disfuncionales como senescencia o anergia (Saeidi et al. 2018; Wherry 2011; Schietinger and Greenberg 2014; Crespo et al. 2013), por lo que el bloqueo a estos receptores, y principalmente a PD-1 tiene importancia médica.

PD-1 es un receptor transmembranal de 288 aminoácidos, perteneciente a la familia de los co- receptores de CD28. Tiene dominios de inhibición de tirosina y un dominio de unión a la fosfatasa SHP2(Saeidi et al. 2018a)(Inés Vargas-rojas et al. 2008; Han, Liu, and Li 2020). Es un receptor cuya expresión aumenta tras la activación del linfocito T, siendo su función principal la tolerancia central y periférica (Han, Liu, and Li 2020; Schietinger and Greenberg 2014) (Figura7). Sin embargo, al reconocer a su ligando (PDL-1) en las células tumorales, el efecto que tiene es de inhibir la respuesta inmune y permitir el desarrollo del tumor.

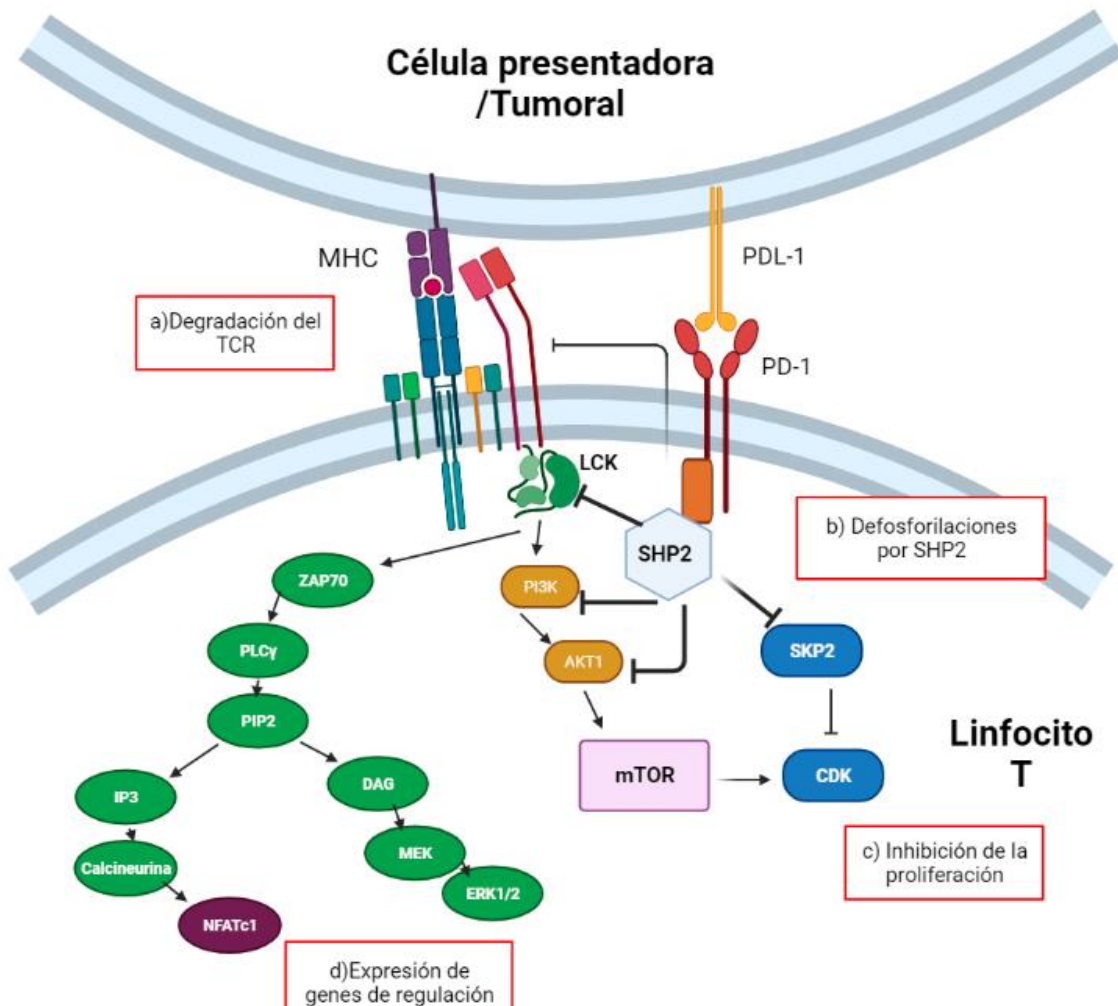


Figura 7. Vía de señalización de PD-1. Al activarse el receptor PD-1 ejerce un efecto directo en la vía del TCR, inhibiendo la activación y proliferación de los linfocitos T, cuando esta señal se prolonga, los linfocitos T pueden entrar en agotamiento (a) La activación de PD-1 lleva a la activación de CBL-B que puede generar el desacople y ubiquitinación del TCR para su degradación por proteasoma. (b) PD-1 en su parte citoplasmática cuenta con dominios ITSM e ITIM que puede reclutar la fosfatasa SH2/SHP2, que puede de-fosforilar a proteínas claves en la vía del TCR como PI3K, AKT, LCK y ZAP70. (c) Así mismo se lleva a un arresto celular por la activación de BATF que tiene un efecto directo sobre las cinasas de ciclinas CDK2 y CDK4. (d) La activación del TCR lleva la activación de NFATc1 y FOXO1 quienes regulan la expresión de Pcd1 (gen de PD-1), por lo que al activarse el TCR se activa un sistema de regulación de la respuesta inmunológica. Imagen modificada de Saeidi, A. et al. T-cell exhaustion in chronic infections: Reversing the state of exhaustion and reinvigorating optimal protective immune responses. *Front. Immunol.* 9, 2569 (2018).

Además se han propuesto esquemas de terapia conjunta, por ejemplo el uso de anticuerpos monoclonales contra CTLA-4 (T. Sun et al. 2020), TIM-3 (Sakuishi et al. 2010), LAG-3 (Burugu et al. 2017), vacunación con antígenos tumorales, citotóxicos, y citocinas como IL-2, e interferones, logrando una mejor respuesta antitumoral (Lee et al. 2015) (Anderson, Stromnes, and Greenberg 2017) (Barriga et al. 2019; T. Sun et al. 2020; Gilad et al. 2019). En conjunto, se busca modificar el microambiente tumoral y de esta manera disminuir la supresión generada.

Específicamente en cáncer de mama se han explorado los linfocitos T infiltrantes de tumor (TILs, por sus siglas en inglés) y la expresión de PD-1, encontrando que el subtipo de cáncer de mama que presenta más agotamiento es el triple negativo, teniendo además una mayor expresión de PDL-1 con un 32% de los casos en un estudio en pacientes diagnosticados con cáncer de mama (Shi et al. 2018). Actualmente se ha tratado de utilizar inmunoterapia dirigida PD-1 con el objetivo de reactivar a los linfocitos T agotados, obteniendo resultados prometedores para el cáncer de células pequeñas de pulmón, carcinoma renal, cáncer de cuello/cabeza y cáncer de mama (Lee et al. 2015).

2.5.2 Terapia con péptidos pequeños e inmunopotenciadores

La terapia antitumoral basada en péptidos, se fundamenta en la actividad citotóxica, anti-angiogénica e inmunopotenciadora que pueden ejercer algunos de ellos en el ambiente tumoral. De manera general, tales moléculas son péptidos pequeños de 10-60 aminoácidos, los cuales pueden estar cargados positivamente, lo que les confieren características que pueden desestabilizar la membrana celular (Saeidi et al. 2018a) . De hecho, muchos péptidos con actividades antitumorales han sido descritos como antimicrobianos, antivirales o antiparasitarios, por lo que son también llamados péptidos de defensa al hospedero (HDP's por sus siglas en inglés) (Hoskin and Ramamoorthy 2008).

El uso de los péptidos tiene varias ventajas respecto a la quimioterapia y la inmunoterapia como es la capacidad de penetración en el tejido (Soman et al.

2009; Madera and Hancock 2012) y el bajo costo (Hilchie, Hoskin, and Power Coombs 2019; Shoombuatong, Schaduangrat, and Nantasenamat 2018), sin embargo los péptidos actuales son muy caros. Otros péptidos son inmunopotenciadores, y generan un aumento en las funciones efectoras del sistema inmunológico. Son clasificados como un tipo de adyuvante, por ejemplo, el lipopéptido AS04 potencia la respuesta innata a través de la estimulación del receptor TLR4 (Didierlaurent et al. 2009).

En este sentido, existen péptidos pequeños de 9-25 aminoácidos que pueden interactuar de manera directa con las moléculas del MHC-I o II, generando el aumento de la respuesta inmunológica contra el cáncer (Schultze and Vonderheide 2001; Rozanov et al. 2018; Mahdavi and Moreau 2016). Por ejemplo, los péptidos expresados por células tumorales son tomados como base para la generación de péptidos con capacidad inmunopotenciadora y antitumoral (Didierlaurent et al. 2009) (Schultze and Vonderheide 2001; Peoples et al. 1995). Sin embargo la heterogeneidad de los tumores convierte a las vacunas tumorales en una terapia limitada debido a que los péptidos que inicialmente sirvieron como vacuna, con el tiempo ya no tienen un efecto antitumoral (Arbiser, Bonner, and Gilbert 2017; Feng et al. 2018).

Además se ha intentado aumentar la variedad de péptidos administrados con el objetivo de disminuir la pérdida del efecto antitumoral y potenciar la respuesta inmunológica y disminuir el efecto de la heterogeneidad de los tumores, aunque se ha observado que la respuesta inmunológica no siempre se potencia y en ocasiones se neutraliza (Slingluff 2011).

III. Antecedentes

3.1 Péptido GK-1 (Goar/Karen – 1)

*Lo que vemos cambia lo que sabemos.
Lo que conocemos cambia lo que vemos*
J. Piaget

3.1.1 Identificación del péptido

GK-1 es un péptido de 18 aminoácidos derivado de KETc7, una proteína expresada en el tegumento de parásitos como *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*. Inicialmente Sciutto y colaboradores buscaban desarrollar una vacuna contra cisticercosis. Durante el transcurso de esas investigaciones se identificó el péptido recombinante KETc7 con un potencial inmunogénico. KETc7 es un péptido de 100 amino ácidos sintetizado a partir de una biblioteca de cDNA de *Taenia crassiceps*. Su secuencia fue analizada en busca de epítopes inmunogénicos y con base en este análisis, se seleccionaron 3 regiones altamente inmunogénicas que se denominaron: GK-1, GK-2 y GK-3 (Gevorkian et al. 1996).

Los 3 péptidos fueron evaluados *in-vivo* en un modelo de cisticercosis murina, resultando GK-1 el péptido que confería mayor protección en contra la infección y desarrollo de la cisticercosis murina (Gevorkian et al. 1996). Así mismo, en experimentos *in-vitro*, se encontró que linfocitos T de bazo estimulados con GK-1 aumentaban su capacidad proliferativa y producción de IFN- γ e IL-2 (Segura-Velázquez et al. 2009)(R. Segura-Velázquez et al. 2006a)

3.1.2 Caracterización de sus propiedades inmunomoduladoras

Desde su descubrimiento se observó que GK-1 inducía protección contra cisticercosis aún en ausencia de algún adyuvante (R. Segura-Velázquez et al. 2006a; Gevorkian et al. 1996). Esta observación llevó a proponer que el péptido podía exhibir capacidad adyuvante intrínseca, potenciando la respuesta inmunológica. Se evaluó entonces su capacidad como adyuvante co-administrado con la vacuna contra influenza. Los resultados señalaron que GK-1 aumentaba la protección inducida por la vacuna en ratones viejos y jóvenes y, además,

aumentaba los niveles de anticuerpos en ratones viejos (R. Segura-Velázquez et al. 2006a; René Segura-Velázquez et al. 2009).

En este contexto se investigó el posible mecanismo que podría estar involucrado, y se observó que GK1 aumentaba la activación de células dendríticas *in-vivo* e *in-vitro*; aumentando la producción de IFN γ , TNF α y MCP1, así como la expresión de moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86 (Segura-Velazquez et al. 2009) . Así mismo en 2018 se definió que GK-1 puede perfilar a los macrófagos peritoneales a un estadio tipo M1, acompañado de un aumento en la producción de NO, CCL3 y TNF α , mostrando que además de activar a las células dendríticas, puede activar a macrófagos peritoneales (Sánchez-Hernández et al. 2018). Con base en este antecedente, se abordó el estudio de las vías de señalización que podrían estar activándose, encontrando que la adición de GK-1 activa una vía de señalización que depende de MyD88, MAPK α y NF κ B, posiblemente a través de un receptor TLR (Montero et al. 2020).

Interesantemente, durante los estudios de los efectos de GK-1 como adyuvante de la vacuna de influenza, se observó en los cortes histológicos de pulmón un mayor infiltrado celular en el parénquima pulmonar, lo cual fue asociado a una mayor protección contra la influenza (R. Segura-Velázquez et al. 2006). Por otro lado, también se observó que el tratamiento disminuía la presencia de adenocarcinomas pulmonares en ratones viejos en este mismo modelo de influenza (Información no publicada). Se ha reportado que los ratones BALB/cAnN de más de 18 meses desarrollan este tipo de neoplasia con una frecuencia de 20/100 (Stoner and Shimkin 1982). Notoriamente, los ratones tratados con GK-1 a una dosis de 2.5mg/Kg durante un régimen de inmunización de 21 y 48 días, presentaron tumores de menor tamaño respecto a los no tratados. Estas evidencias sugirieron que GK-1 podría presentar capacidad antitumoral, capacidad que podría residir en las propiedades inmunoestimuladoras. Los efectos de GK-1 que han sido descritos se resumen en la Figura 8.

3.1.2 GK-1 como inmunopotenciador contra el cáncer

Considerando la disminución de tumores pulmonares, se propuso evaluar el efecto de GK-1 en un modelo de melanoma murino con la línea B16-F10, debido a que esta línea genera metástasis pulmonar (Fowlkes et al. 2019). La administración de GK-1 en una dosis de 2.5mg/Kg cada 14 días de manera peri-tumoral en los tumores aumentaba la sobrevida en un 42% y el crecimiento del tumor era menor respecto a los ratones tratados con solución salina isotónica (SSI) (Pérez-Torres et al. 2013). En este mismo modelo se evaluó el efecto de GK-1 en conjunto con un anticuerpo monoclonal anti PDL-1, observando que el tratamiento, aumentó la sobrevida de los co-tratados con GK-1 respecto a los tratados con SSI o con anti PDL-1 únicamente (Vera-Aguilera et al. 2017).

Considerando estos antecedentes se continuó estudiando los posibles mecanismos que median la actividad antitumoral de GK-1. Partiendo de que GK-1 puede activar a los linfocitos T y células presentadoras de antígenos, se propuso que GK-1 podría estar interviniendo en el proceso de agotamiento de linfocitos T. Lo cual se fortaleció en 2019, donde en el modelo de melanoma con la línea B16F0-OVA, encontraron que GK-1 potencia la respuesta de linfocitos T CD8+ y que además disminuye la expresión de PD-1 en linfocitos extraídos de tumor (Rodríguez-Rodríguez et al. 2019).

Paralelamente, se estudió el efecto de GK-1 sobre otra neoplasia con metástasis pulmonar e importancia médica: el cáncer de mama triple negativo, generado a través de la línea 4T1. En este trabajo se encontró que el tratamiento con GK-1 a una dosis de 5 mg/kg administrado 3 veces cada 7 días, aumentaba la sobrevida de los ratones tratados con el péptido de manera intravenosa, disminuyendo el tamaño tumoral y la macro-metástasis pulmonar característica de este modelo (Torres-García et al. 2017). Así mismo se encontró disminución en los niveles de citocinas como CCL-2 CCL-3 y CXCL-9 en pulmón, asociadas al reclutamiento de macrófagos del tipo M2 y de células derivadas mieloides supresoras (House et al. 2020; Qian et al. 2011; Lindau et al. 2013)

Con estos antecedentes este trabajo tuvo el objetivo de evaluar la posibilidad de que GK-1 afecte el fenómeno de agotamiento de linfocitos T en el cáncer de mama, y de esta manera consolidar la hipótesis de que su mecanismo de acción es modular la respuesta inmunológica.

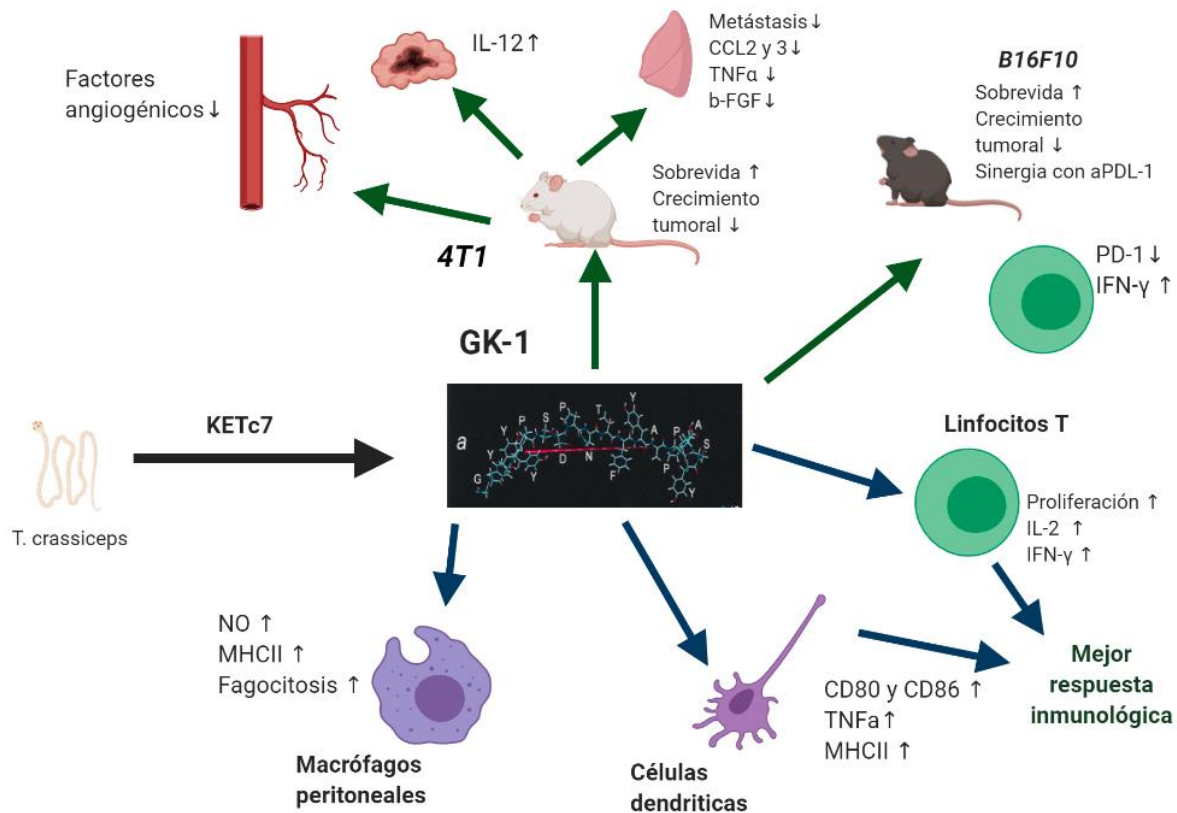


Figura 8. Efectos inmunomoduladores de GK-1 comprobados en distintos modelos. GK-1 es un inmunomodulador proveniente del clúster KETc7 del parásito *T. crassiceps*, el cual ha mostrado efectos inmunopotenciadores *in-vivo* e *in-vitro*, (líneas azules), lo cual ha fortalecido la idea de su potencial antitumoral. Además, GK-1 ha demostrado sus propiedades antitumorales en dos modelos de cáncer murino; mama triple negativo y melanoma metastásico, con las líneas 4T1 y B16-F10 respectivamente (líneas verdes). Encontrando aumento en la supervivencia y reducción del tamaño tumoral de manera significativa.

IV. Justificación

El cáncer de mama es uno de los problemas principales de salud debido a su alta tasa de incidencia y mortalidad en mujeres. La limitada terapia que existe para el cáncer de mama triple negativo y lo costoso que puede ser la inmunoterapia, deja un margen estrecho para el tratamiento de este tipo de neoplasia. El presente estudio pretende contribuir con el conocimiento de los mecanismos que median la actividad anti-tumoral de GK-1, tomando como antecedente sus propiedades inmuno-potenciadoras, soportando la idea de que GK-1 podría prevenir la generación del agotamiento dado que una de las causas es la inmunosupresión generada. Esta información podría servir para consolidar sus efectos antitumorales y proponerlo como una terapia adyuvante para el tratamiento del cáncer de mama.

V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del tratamiento de GK-1 intravenoso en la prevención del agotamiento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en bazo, linfonodo y tumor en el modelo de cáncer de mama murino inducido por células 4T1.

5.2 Objetivos particulares

En ratones tratados y no tratados con GK-1:

- Cuantificar las poblaciones linfocitarias CD4⁺, CD8⁺ y Tregs en bazo, linfonodo y tumor primario en distintos tiempos: 7, 14, 21 y 28 días posteriores al tratamiento.
- Cuantificar la expresión de PD-1 en linfocitos efectores (CD3⁺ CD44⁺ CD62L⁻) CD4⁺ y CD8⁺ para evaluar el posible estado de agotamiento de los linfocitos T, y evaluar si el tratamiento con GK-1 previene el agotamiento.
- Evaluar la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8⁺ de tumor en un cultivo mixto con células 4T1, mediante la liberación de calceína y su cuantificación de la calceína en sobrenadante.

- Medir la producción de IFN- γ , IL-2 y Granzima B (GZB) en linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ asociada al tratamiento con GK-1, para conocer su estado funcional.

V. Hipótesis

El tratamiento con GK-1 por vía endovenosa en ratones con cáncer de mama inducido por la inoculación de células 4T1 disminuirá el crecimiento tumoral reactivando la actividad de los linfocitos T citotóxicos y reduciendo el agotamiento en linfocitos T.

VI. Materiales y métodos

Ratones

Se utilizaron ratones hembras BALB/cAnN de 4 a 6 semanas de edad, producidas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, se mantuvieron en la sede 2 del Instituto de Investigaciones Biomédicas 1 semana antes de la implantación y manipulación. Se les proporcionó alimento y agua durante todo el tiempo del desarrollo del experimento con condiciones controladas de ciclos de luz y temperatura controlada.

Consideraciones éticas

Los animales fueron monitoreados durante el tiempo del experimento hasta su sacrificio, se registró el comportamiento de los ratones 3 veces a la semana, teniendo en cuenta el aspecto del pelo, bigotes, movilidad que tenían, así como si tenían cambios en el peso. Los sacrificios se realizaron con una sobredosis de Sevoflurano como anestésico general seguida de dislocación cervical.

GK-1

El péptido de 18 aminoácidos GK-1 (GYYYPSDPNTFYAPPYSA), fue comprado de USV, LTD Mumbai Maharashtra India (lote RD0001). La pureza del péptido fue evaluada por cromatografía de fase reversa con una columna de C18. Para su administración el péptido se disuelve en solución salina isotónica en una concentración de 1mg/mL.

Línea celular 4T1

La línea celular 4T1 se compró de la ATCC (American Type Culture Collection), Manassas VA. Se hizo crecer en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco) con 1% de penicilina y estreptomicina (Gibco). Las condiciones de cultivo fueron: temperatura de 37°C con una humedad relativa de 95% y 5% de CO₂. El cultivo al alcanzar una confluencia de al menos 85% fueron despegadas de las cajas, adicionando tripsina al 0.05% y EDTA al 0.5mM (Gibco) durante 5 minutos. Las células despegadas fueron lavadas dos veces con SSI o amortiguador salino de fosfatos (PBS por sus siglas en ingles).

Implantación de células 4T1

Los ratones fueron implantados vía subcutáneamente en el cojín mamario inferior con 1,000 células 4T1 viables. Las células viables fueron reconocidas mediante el método de exclusión de azul tripan, fueron re suspendidas en 50uL de solución salina estéril en una concentración de 1,000 células /50µL. Los ratones fueron revisados 3 veces a la semana, monitoreando el crecimiento tumoral, así como la condición general del ratón. El volumen tumoral fue calculado con la siguiente formula.

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

Donde L es el lado más largo del tumor y W el lado más corto del tumor. El desarrollo del tumor fue entre el día 15 y 21 posterior a la implantación. Una vez detectado el tumor (1mmx1mm) se administró SSI o GK-1 i.v. según fuera el caso.

Grupos experimentales

Se formaron 3 grupos de trabajo, ratones implantados y administrados con GK-1, ratones implantados y administrados con SSI (Control) y un grupo que no fue implantado (Sin tumor). Al grupo GK-1, se le administro GK-1 en una dosis de 0.005g/kg (100ug) re suspendidos en 100uL de SSI, administrándose semanalmente, dando un máximo de 4 administraciones. La primera dosis fue

administrada cuando el tumor fue palpable (1mmx1mm), siendo este el día 0. El grupo control de tratamiento, se le administró 100uL de SSI semanalmente con el mismo criterio de iniciación. Al grupo sin tumor no se le administró nada, pero se mantuvieron los mismos cuidados de los demás ratones.

Cuantificación de poblaciones de linfocitos T

Se cuantificó la cantidad de linfocitos T en bazo, linfonodo y tumor en un periodo de 28 días post tratamiento (dpt), se analizó el comportamiento de los linfocitos T cada 7 días analizando 6 ratones por grupo de tratamiento y 3 del grupo sin tumor, para observar los cambios que ejerció GK-1 en el infiltrado linfocitario.

Se extrajeron, pesaron y maceraron bazo, linfonodo y tumor, se filtró el macerado a través de una malla de 70um de poro. Se adicionó buffer de lisis de eritrocitos (NH₄ 160mM) durante 5 min a 4°C. Se cuantificaron las células extraídas por cada órgano y se evaluó la viabilidad de las células con azul tripan, teniendo una viabilidad mayor al 95%. Se tiñeron 1x10⁶ células para identificar linfocitos T efectores y 1x10⁶ T reguladores FOXP3⁺.

Los anticuerpos utilizados para el panel de linfocitos T efectores fue: CD3/APCCy-7 (17A2/IgG2bk) CD4/FITC (GK1.5/IgG2bk), CD8/PerCP (53-6.7/IgG2ak), CD44/APC (IM7/IgG2ak), CD62L/AF700 (MEL-14/IgG2ak), PD-1-PECY7 (29F.1A12/IgG2ak). Los anticuerpos utilizados para el panel de linfocitos T reguladores fue: CD3/APCCy-7 (17A2/IgG2bk) CD4/FITC (GK1.5/IgG2bk), CD25/biot (7D4 /IgM), Estreptoavidina /APC (cat. 405207), FOXP3-PE (FJK-16s/IgG2k).

Para su lectura en el citómetro se fijaron las células con *p*-formaldehído al 4%, para las tinciones intracelulares, las células fueron permeabilizadas con el kit de BD CytoFix/CytoPerm. La obtención de datos fue realizada en un citómetro Next Attune, con dos láseres (Rojo y Azul) y 7 canales de lectura. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo X.

Extracción de células mononucleares de tejidos

Para los ensayos funcionales de citotoxicidad y activación celular, se extrajeron las células macerando los tejidos en una malla de 70µm, posteriormente se hizo pasar la suspensión por un filtro de 50µm. Con esta suspensión celular se realizó una separación por gradiente de densidad con Ficoll Plaque- Plus ® de acuerdo al inserto para obtener células mono-nucleadas. Se realizó el conteo celular contando células viables a través del método de exclusión de azul tripan.

Citotoxicidad de linfocitos T CD8+ extraídos de tumor

Se evaluó la actividad citotóxica que tienen los linfocitos T CD8+ extraídos de bazo y tumor, purificados mediante gradiente de densidad y sorting con el citómetro FACS® ARIA (utilizando una selección positiva para CD3⁺ CD8⁺) la eficiencia fue mayor 95% y una pureza posterior al sorting mayor al 95%. Las células fueron co-cultivadas con la línea celular 4T1 previamente teñida con calceína AM (Life Technologies, Carlsbad, CA, Cat. C1430) en una concentración de 1µM durante 30min.

Los linfocitos purificados de tumor se cultivaron en una relación 1:1 con células tumorales, mientras que los linfocitos de bazo fueron cultivados en una relación 5:1. El cultivo se incubó durante 4hr en medio RPMI + SFB 10% a 37°C 5% CO₂, transcurrido el tiempo se centrifugo y se recuperó el sobrenadante para el análisis por fluorometría (Ex:470nm/ Em: 535), obteniendo la intensidad media de fluorescencia (MFI) de 100uL de sobrenadante durante 5 minutos en un equipo Synergy H1 Biotek®. Se obtuvo el porcentaje de citotoxicidad con base al control de liberación máxima (Lás células tumorales teñidas y tratadas con Triton al 0.1% durante 45 minutos).

$$\left[\frac{\text{Fluorescencia prueba} - \text{Fluorescencia control negativo}}{\text{Fluorescencia máxima} - \text{Control negativo}} \right] \times 100.$$

El botón de células del cultivo fue re suspendido y analizado a través de citometría de flujo en un citómetro Attune NXT, comparando el % de células con

fluorescencia y sin fluorescencia. La calceína se excita con el láser azul a 488nm. Los datos fueron analizados con el software FlowJo X

$$\frac{[(\text{Células fluorescentes en el control negativo} - \text{Células fluorescentes en la prueba}) / (\text{células fluorescentes en el control negativo})] \times 100.}{}$$

Producción de citocinas y proteínas de activación de linfocitos T

Se evaluó la capacidad funcional de los linfocitos T extraídos de bazo y tumor, fueron estimuladas con *Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™* (PMA/Ionomicina + Brefeldina) utilizando 1uL de activador por cada 1×10^6 células, en placas de 96 pozos. La incubación fue realizada a 37°C con 5% CO₂ durante 6 hrs. Transcurrido el tiempo las células fueron lavadas y fijadas con BD Cytotfix/Cytoperm™ durante 45 min a 4°C. Transcurrido la incubación, las células se lavaron y tiñeron con: CD3/APCCy-7 (17A2/IgG2bk) CD4/PE-Cy7(RM4-5/IgG2bk), CD8/PerCP (53-6.7/IgG2ak), IL-2-AF488 (JES6-5H4/IgG2bk), IFN-g-APC (XMG1.2/ IgG2a) y Granzima B- PE (QA16A02IgG2b). Transcurrido el tiempo fueron analizadas por citometría de flujo.

Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos a través de una prueba de Kolmogorov-Smirnov, realizando pruebas no paramétricas a los datos sin normalidad. Para comparar la progresión tumoral, expresión de PD-1 y citotoxicidad, se utilizó U-Mann Withney a dos colas para cada semana. Para la comparativa del área bajo la curva, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis. Para el análisis de producción de citocinas, se utilizó una MANOVA con una comparativa de T-cuadrada de Hotelling, utilizando el porcentaje de células como la producción de citocinas como variables dependientes. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando p fuera menor a: 0.05 *, 0.01 ** ó 0.001***. En el armado de clusters se utilizó un análisis no supervisado de medias y desviación (K-means). Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 7.0 o R-Studio 1.3

VII. Resultados

*La naturaleza nos ofrece las semillas del conocimiento,
no el conocimiento mismo.*

Séneca Lucio

7.1 GK-1 Disminuye el desarrollo tumoral y macrometástasis pulmonar

Para evaluar el efecto antitumoral que tiene GK-1 en el modelo murino de cáncer de mama inducido por las células 4T1, se realizó un estudio cinético observando el crecimiento tumoral durante 28 días post-tratamiento (dpt). Como puede observarse en la Figura 9a, el tratamiento de GK-1 (100µg por ratón) fue administrado i.v. al detectar el tumor (1mmx1mm) en la glándula mamaria y cada 7 días posteriores. Se realizaron observaciones del crecimiento tumoral 3 veces a la semana y cada 7 días se sacrificaron ratones para evaluar el peso del tumor y bazo, además de extraer órganos donde se ha reportado la aparición de metástasis (Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2000; Paschall and Liu 2016), dando principal importancia a los pulmones, ya que en éstos, la aparición de macrometastasis es clara.

Se encontró que el tratamiento con GK-1 disminuye el crecimiento tumoral a partir del 14 dpt, además se realizó un ajuste lineal para conocer la tasa de crecimiento entre los dos grupos, encontrando que las pendientes son significativamente diferentes, siendo el grupo tratado con GK-1 el que tuvo un crecimiento más lento (Figura 9b y Suplementaria 1). Así mismo el peso tumoral muestra una disminución significativa desde el 14 dpt (Figura 9c). Por otra parte, el peso del bazo fue significativamente menor al 21 dpt, mostrando una relación entre la esplenomegalia y el crecimiento tumoral, lo cual se ha observado en otros estudios similares (Figura 9d) (M. Liu et al. 2015; duPre' and Hunter 2007a)

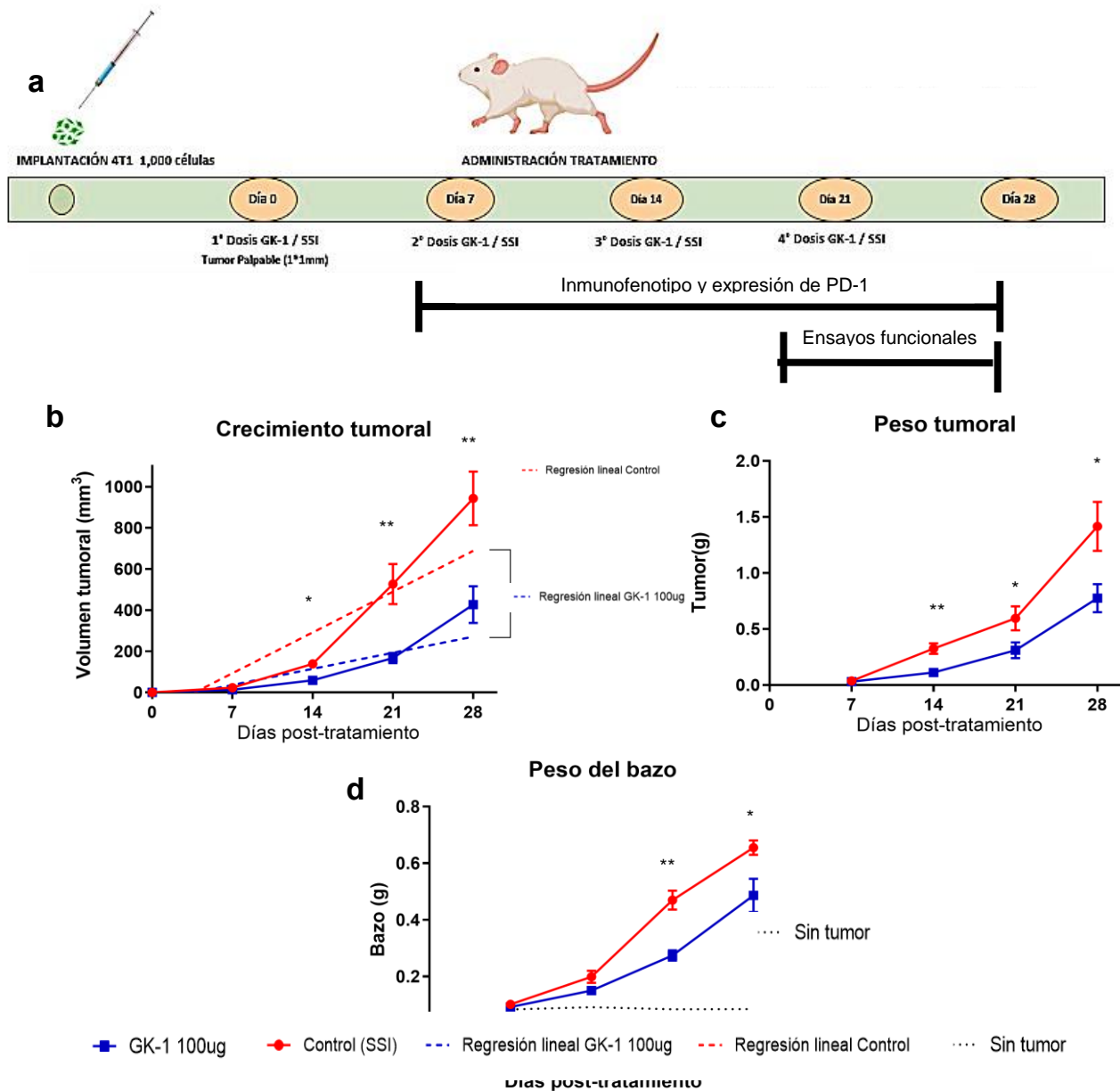


Figura 9. GK-1 Disminuye el desarrollo tumoral del modelo 4T1 de cáncer de mama murino.

a. Diseño experimental realizado indicando el número de dosis y tiempo en el cual se administró (GK-1 o SSI) i.v. El inmunofenotipo y el desarrollo tumoral fueron monitoreados a lo largo de los 28 dpt, mientras que los ensayos funcionales a los 21-28 dpt. **b.** Se midió el tumor en ancho y largo para el cálculo del volumen siguiendo la formula mencionada en metodología. GK-1 disminuye el crecimiento tumoral a través del tiempo en comparación al control, las mediciones se realizaron antes del sacrificio del ratón. Se realizó un análisis de regresión lineal: tratados con GK-1 (■-■) o control (- - -); siendo menor el crecimiento en los ratones tratados con GK-1. Se disectaron los ratones extrayendo el tumor y bazo para su posterior peso. **c.** GK-1 disminuye el peso del tumor primario extraído al día del sacrificio. **d.** GK-1 disminuye el peso del bazo extraído. Las barras muestran error estándar (SEM). Se aplicó una prueba U de Mann Whitney a dos colas con un $\alpha=0.05$. * $p<0.05$ ** $p<0.01$. Por cada 7 dpt: Control (n=6); GK-1 (n=6); Sin tumor (n=3).

Además, el tratamiento con GK-1 redujo significativamente la macrometastasis pulmonar, criterio importante para evaluar el desarrollo de este modelo. GK-1 mantuvo a la mayoría de ratones libres de macrometastasis pulmonar (Figura 10), lo que muestra la capacidad de GK-1 de evitar la progresión tumoral.

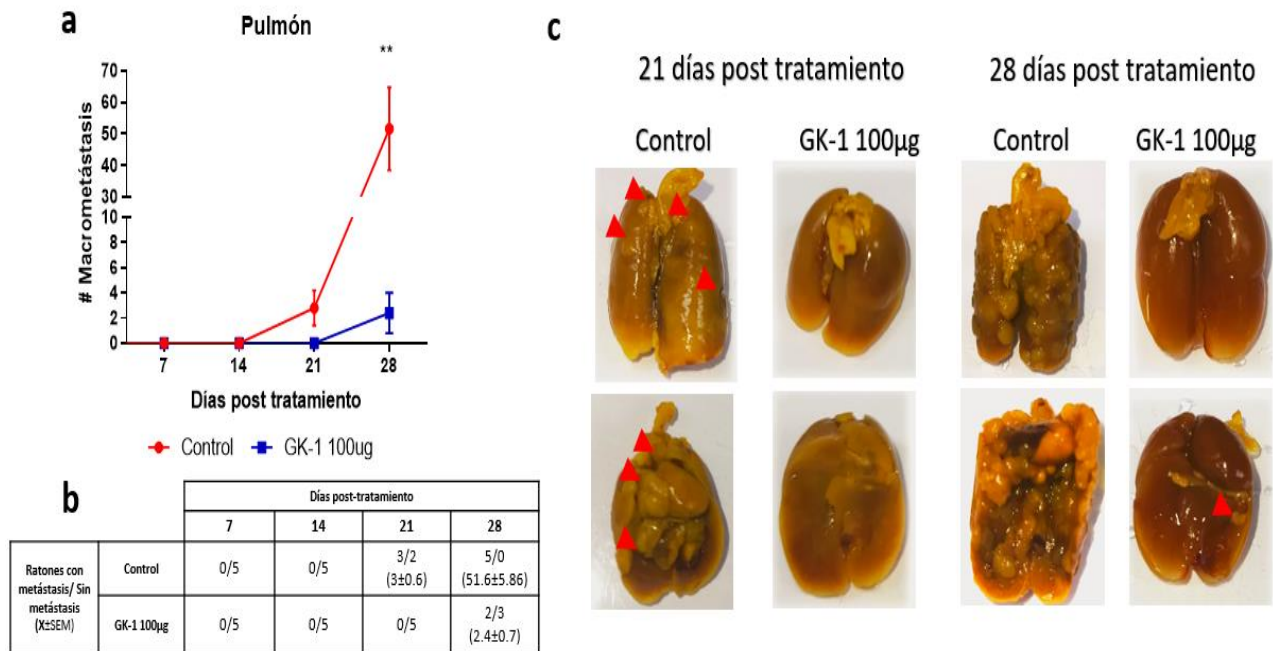


Figura 10. GK-1 Disminuye la macrometastasis pulmonar en el modelo de cáncer de mama inducido por 4T1.

a. Se graficó el promedio de las macrometastasis pulmonares a través de los 28 días post-tratamiento, **b.** Así como el número de ratones con metástasis o libres de metástasis por día de estudio. **c.** Se observan pulmones representativos de los días 21 y 28 posteriores al tratamiento. GK-1 mantuvo sin macrometastasis hasta el día 28, en donde sólo dos ratones presentaron tumores muy pequeños o con algún foco aislado. Los tumores son señalados con cabezas de flecha rojas. Para la fotografía de 28dpt los tumores son notorios sin los señalamientos. Las barras muestran error estándar (SEM). Se aplicó una prueba U de Mann Whitney a dos colas con un $\alpha=0.05$. * $p<0.05$ ** $p<0.01$. Por cada semana: Control (n=5); GK-1 (n=5). Además, se realizó una Chi-cuadrada ($p=0.032$) para el análisis de frecuencia encontrando diferencia significativa desde el día 21 post-tratamiento.

7.2 GK-1 aumenta la cantidad de linfocitos T extraídos de tumor

Para evaluar el efecto inmunopotenciador de GK-1 en el modelo 4T-1, se realizó un estudio cinético para evaluar las poblaciones de linfocitos T (LT). Los LT-CD4⁺ y LT-CD8⁺ efectores (CD3⁺, CD44⁺ y CD62L⁻) tienen participación directa en la eliminación del tumor primario, por lo que su cantidad infiltrante es muy importante; por otro lado, los LT reguladores (Treg) participan en la inmunosupresión y el escape del tumor, incluso la relación entre LT-CD8⁺ y LT-reg es utilizado como un biomarcador de pronóstico (X. Yang et al. 2017; Ibrahim et al. 2014) (Huang et al. 2017; Viana et al. 2015)

Las poblaciones linfocitarias efectoras y supresoras se evaluaron en bazo, linfonodo y tumor primario (La estrategia de análisis se muestra en el anexo 1 *Estrategia de análisis*). Las observaciones se realizaron cada 7 días. Se encontró que GK-1 aumenta la cantidad de LT en comparación al control, siendo la diferencia más importante en tumor primario (Figura 11), lo cual sugiere una mejor respuesta antitumoral. Por otro lado, la relación entre LT-CD8⁺ y LT-reg, marcador utilizado como parte del *Immunoscore*, se encuentra incrementado en los ratones tratados con el péptido GK-1, lo que se podría correlacionar con mejor pronóstico (Figura 12).

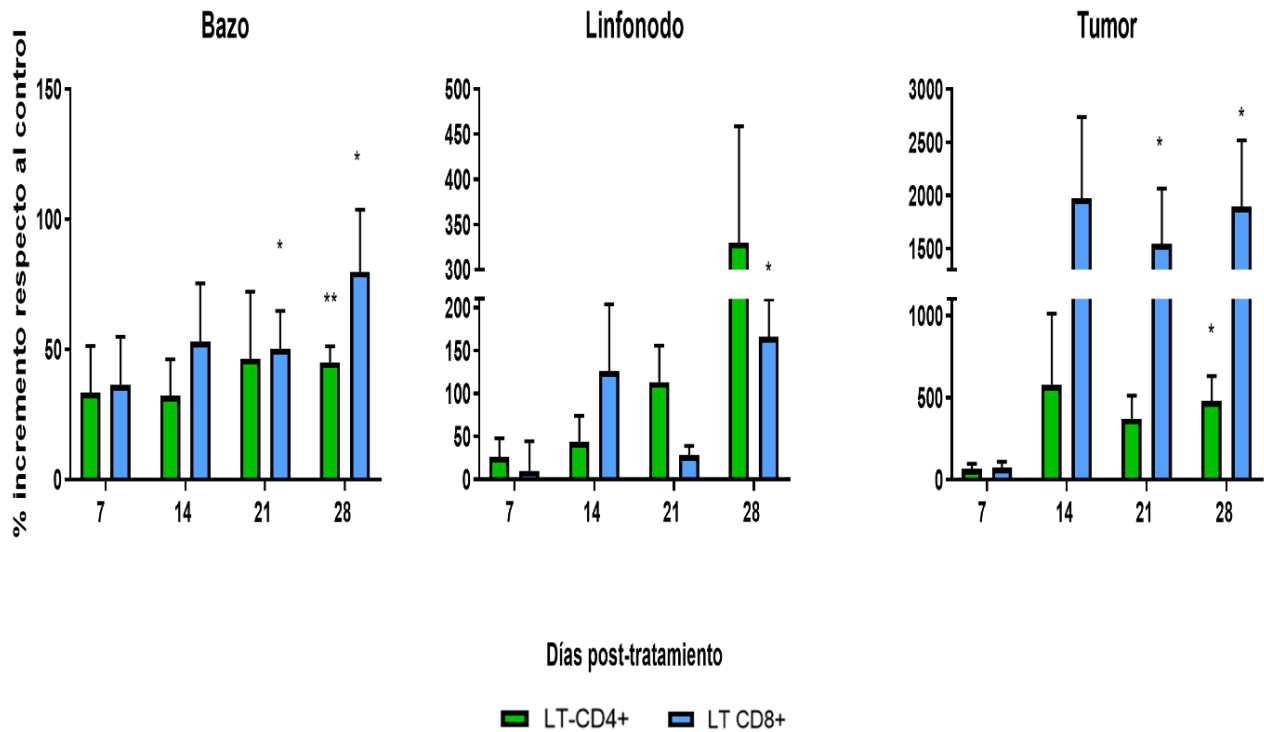


Figura 11. GK-1 aumenta la cantidad de linfocitos T efectores en órganos linfoides y tumor.

Cuantificación de linfocitos T CD4+ y CD8+ provenientes de una selección previa de CD3⁺CD44⁺ CD62L⁻. Los tejidos fueron extraídos y disgregados para la obtención de linfocitos T como lo indica material y métodos

En los tres tejidos existe un aumento significativo de LT a los 28 dpt, siendo el aumento más significativo el de los LT-CD8⁺ en tumor. Gráficas con media y error estándar (SEM), para el aumento relativo % se consideró la siguiente ecuación: $\Delta\% = \frac{(\text{Valor GK1} - \bar{x} \text{SSI})}{\bar{x} \text{SSI}} \times 100$; donde el valor de GK-1 es el valor obtenido por cada ratón, y $\bar{x} \text{SSI}$ es el promedio del valor obtenido en los ratones control. Se aplicó una prueba de U Mann Whitney a dos colas con una $\alpha=0.05$. * p<0.05 ** p<0.01. Por cada 7 dpt: Control (n=6); GK-1 (n=6)

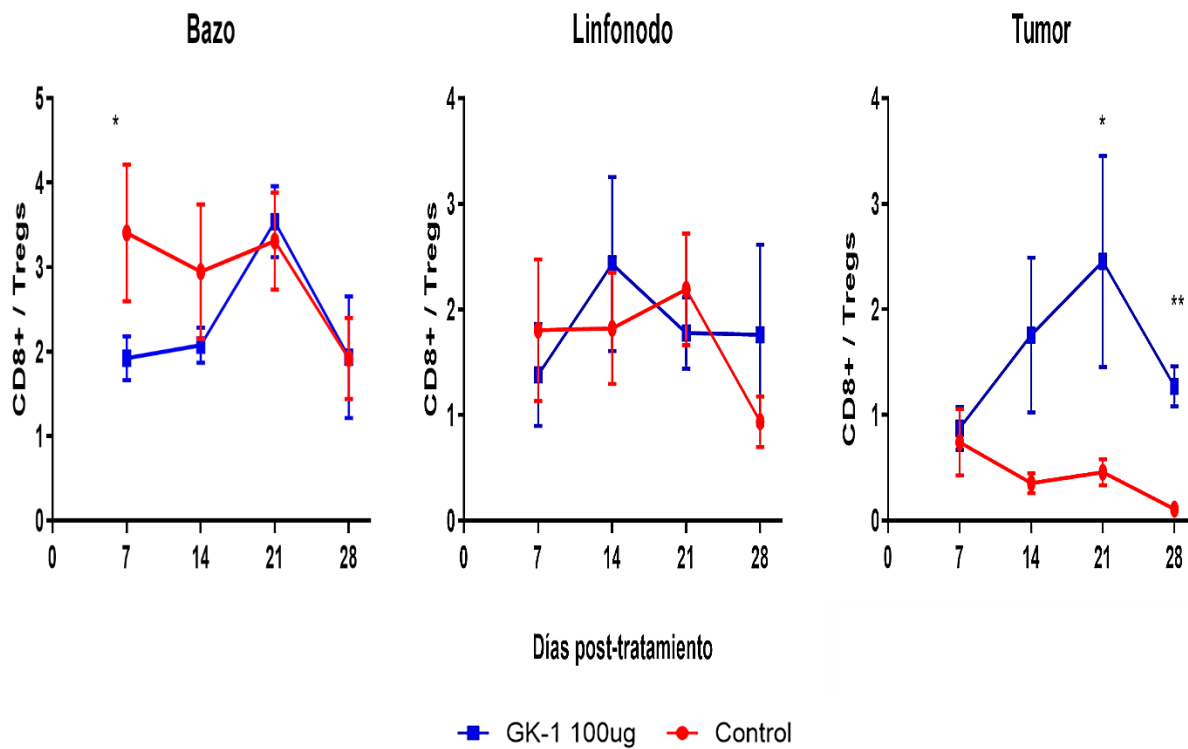


Figura 12. GK-1 Aumenta la relación CD8+ / T reg en tumor de manera significativa. Relación entre CD8+ y LT-reg (Tregs) en bazo, linfonodo y tumor. La relación entre estas poblaciones en bazo y linfonodo son muy similares, sin embargo, en tumor ocurre un aumento significativo al día 21 y 28 dpt. Las gráficas con media y error estándar (SEM). Se aplicó una prueba U de Mann Whitney a dos colas con un $\alpha=0.05$. * $p<0.05$ ** $p<0.01$. Por cada 7dpt: Control (n=6); GK-1 (n=6). Para el índice de CD8/Tregs, se dividió el valor obtenido de (CD8+ por g de tejido) / (Tregs por g de tejido)

7.3 GK-1 Disminuye la expresión de PD-1 en linfocitos efectores.

El agotamiento de linfocitos se caracteriza por el aumento de la expresión de receptores de inhibición, PD-1 es el receptor clásico para definir el agotamiento. Se evaluó la expresión de PD-1 mediante la gMFI (Intensidad media geométrica de fluorescencia) en los linfocitos T efectores a través de 28 dpt en bazo, linfonodo y tumor, con el objetivo de conocer su estado funcional. Se encontró que GK-1 previene la sobreexpresión de PD-1 en los LT en tumor de manera significativa al 28 dpt (Figura 13), es decir mantiene a los linfocitos en un estado potencial capaz de expresar actividad antitumoral.

Así mismo se calculó el área bajo la curva de la expresión de PD-1 a lo largo de los 28 dpt. con base a que un ligero cambio a lo largo del tiempo si puede ejercer modificaciones en la respuesta inmunológica; mostrando que hay una menor expresión de PD-1 en bazo, ganglio y tumor en comparación al control. Además, la expresión de PD-1 en ratones tratados con GK-1 es similar a la expresión basal que tienen los linfocitos T efectores de ratones sin tumor (Figura 13c)

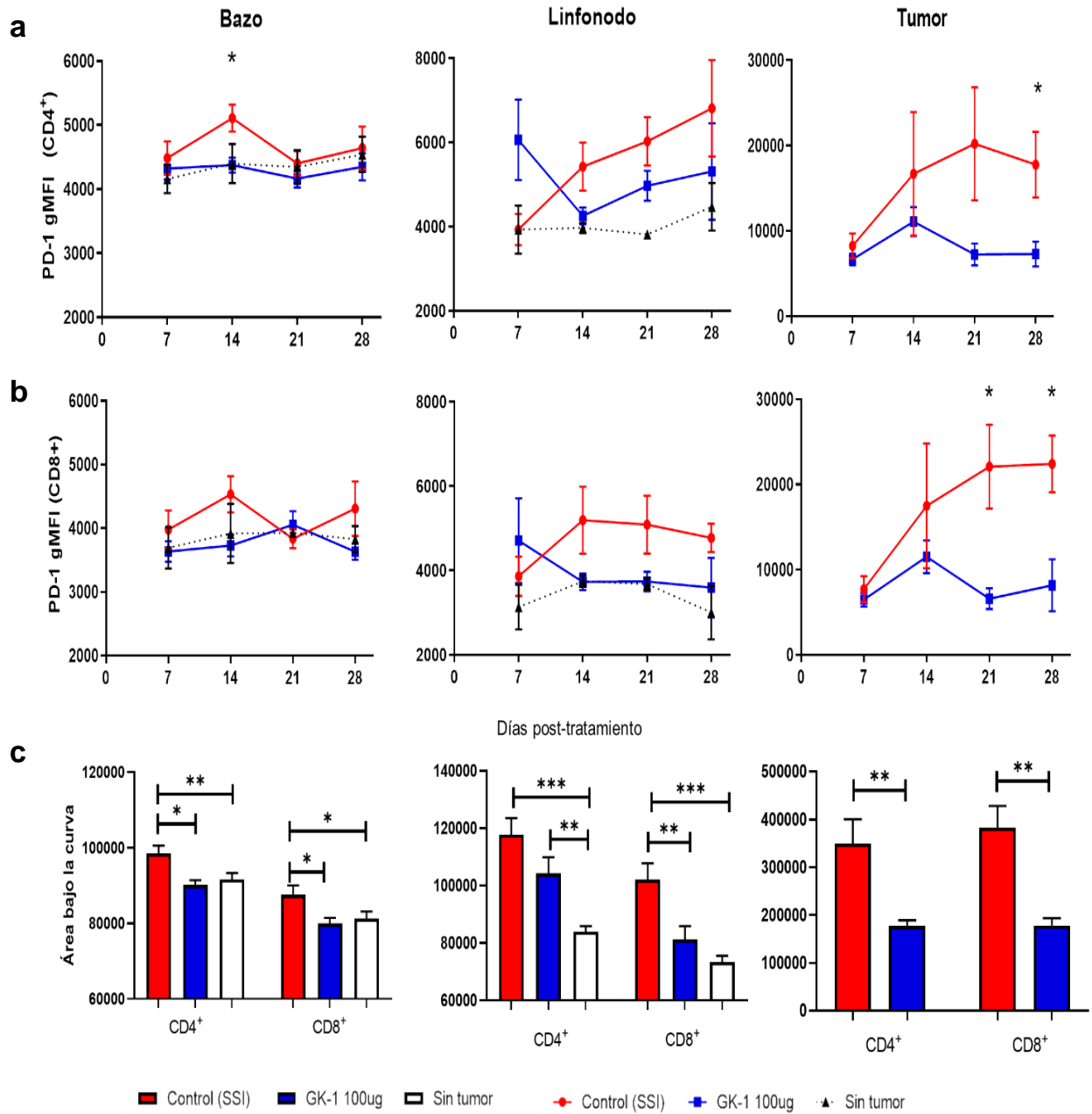


Figura 13. GK-1 disminuye la expresión de PD-1 de manera significativa en linfocitos T efectores. Cuantificación de la expresión de PD-1 en linfocitos T efectores (CD3⁺CD44⁺CD62L⁻) extraídos de bazo, linfonodo y tumor tras la disgregación de los tejidos. **a.** Expresión de PD-1 en LT-CD4⁺ efectores, se muestra una disminución al día 28 dpt. **b.** Expresión de PD-1 en LT-CD8⁺ efectores, se muestra una disminución desde el día 21 dpt. Las gráficas son el promedio y las barras muestran error estándar (SEM). Se aplicó una prueba U de Mann Whitney a dos colas con un $\alpha=0.05$. * $p<0.05$ ** $p<0.01$. Por cada 7dpt: Control (n=6); GK-1 (n=6).

7.4 GK-1 Aumenta la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8⁺

Una vez definido que el efecto de GK-1 en la expresión de PD-1 y posiblemente en el agotamiento de linfocitos T (ALT) ocurre entre el 21dpt y 28 dpt, se decidió estudiar las demás características del ALT. Particularmente la respuesta antitumoral se realiza por la función citotóxica de los linfocitos T CD8⁺, por lo evaluar esta característica funcional era de gran importancia para conocer si el efecto de GK-1 potenciaba la citotoxicidad directa de los linfocitos T.

Se realizó un co-cultivo de células 4T1 y linfocitos T CD8⁺ extraídos de tumor y bazo, purificados por FACS®, encontrando que GK-1 aumenta la citotoxicidad de los linfocitos T, debido a que los LT extraídos de ratones que fueron tratados con GK-1 matan más células 4T1 en comparación a los LT extraídos de los ratones no tratados (Figura 14). Este resultado se comprobó con dos metodologías; fluorimetría con el sobrenadante del cultivo; y citometría de flujo con las células del cultivo) (La estrategia de análisis se muestra en el anexo 1 *Estrategia de análisis*). Ambas metodologías concluyeron lo mismo; GK-1 aumenta la citotoxicidad de LT-CD8⁺, siendo más uniforme el ensayo de fluorimetría. Así mismo se encontró una mayor capacidad citotóxica en los LT de tumor en comparación a los de bazo; lo cual explica en parte la disminución del tamaño tumoral con el tratamiento.

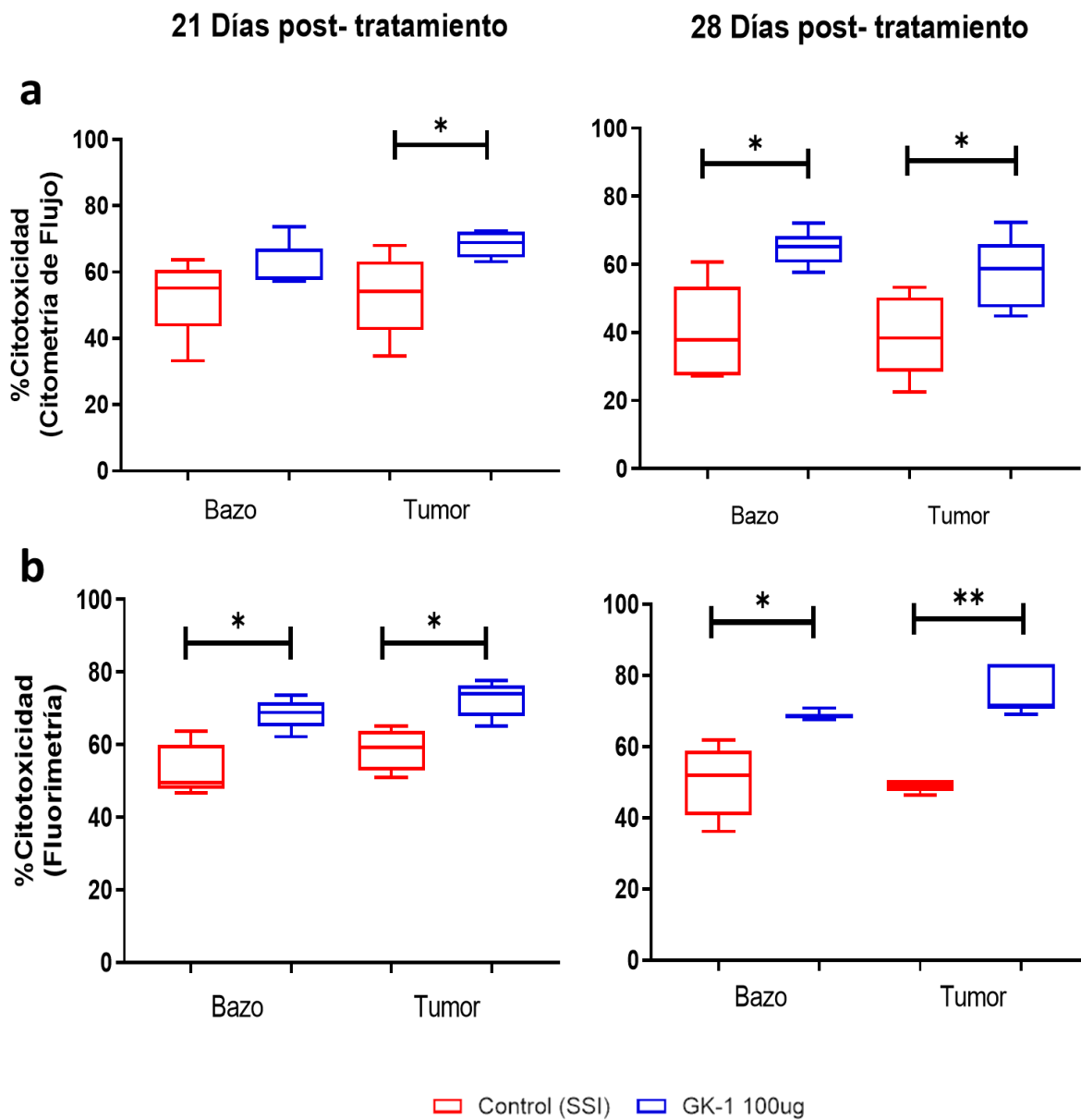


Figura 14. GK-1 aumenta la citotoxicidad de los LT-CD8⁺ frente a la línea celular 4T1. a. Citotoxicidad cuantificada por citometría de flujo a través de la cantidad de células 4T1 que aún mantenían la fluorescencia para calceína y las que perdían fluorescencia. **b.** Citotoxicidad cuantificada por fluorimetría, se realizó un índice entre la fluorescencia máxima liberada por un cultivo tratado con Tritón 0.1% y la de cada muestra. Se graficó box-plot con mínimo y máximo. Para cada grupo N= 12 ratones, 6 por 21 dpt y 6 por 28dpt. La relación entre células tumorales y efectoras en bazo y tumor fueron 1:5 y 1:1 respectivamente. Se aplicó una prueba de U Mann Whitney a dos colas con una $\alpha=0.05$. * $p<0.05$ ** $p<0.01$.

7.5 GK-1 Aumenta la producción de citocinas en linfocitos T extraídos de tumor

Otra característica del agotamiento de los linfocitos T es la pérdida de producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α y proteínas asociadas a la citotoxicidad como son Granzima B y perforina. Así que para reforzar la hipótesis de que GK-1 interviene en el agotamiento de los LT, se evaluó la capacidad de producción de citocinas y proteínas en LT CD4 y CD8.

Se cuantificó la producción intracelular mediante citometría de flujo y la intensidad media geométrica de fluorescencia (gMFI por sus siglas en inglés). La cuantificación se realizó a los 21dpt y 28 dpt en bazo y tumor (Suplementaria 2). Encontrando que GK-1 aumenta ligeramente la producción de citocinas intracelulares de una manera no significativa, no obstante, al analizar en conjunto la cantidad de células presentes en los tejidos y la gMFI de sus productos; GK-1 demostró aumentar significativamente la producción de IL-2 e IFN- γ en los LT-CD4, mientras que aumentó la producción de granzima B (GZB) e IFN- γ en los LT-CD8 extraídos de tumor (Figura 15).

Además, se realizó un análisis no supervisado para agrupar los diferentes ratones en clusters considerando los 3 productos de activación. Se realizó el análisis por tejido y por tipo de linfocito T, sea CD4 o CD8. Se encontró que en tumor se generan dos clusters en función del tratamiento. En el caso de los CD4, se cruzan en el tiempo 21dpt (Figura 16), lo que se correlaciona con el análisis hecho por MANOVA (Figura 15). En el caso del bazo se construyen dos clusters; uno grande donde se encuentran los ratones control y la mayoría de los ratones tratados con GK-1, y otro pequeño con ratones tratados con el péptido GK-1.

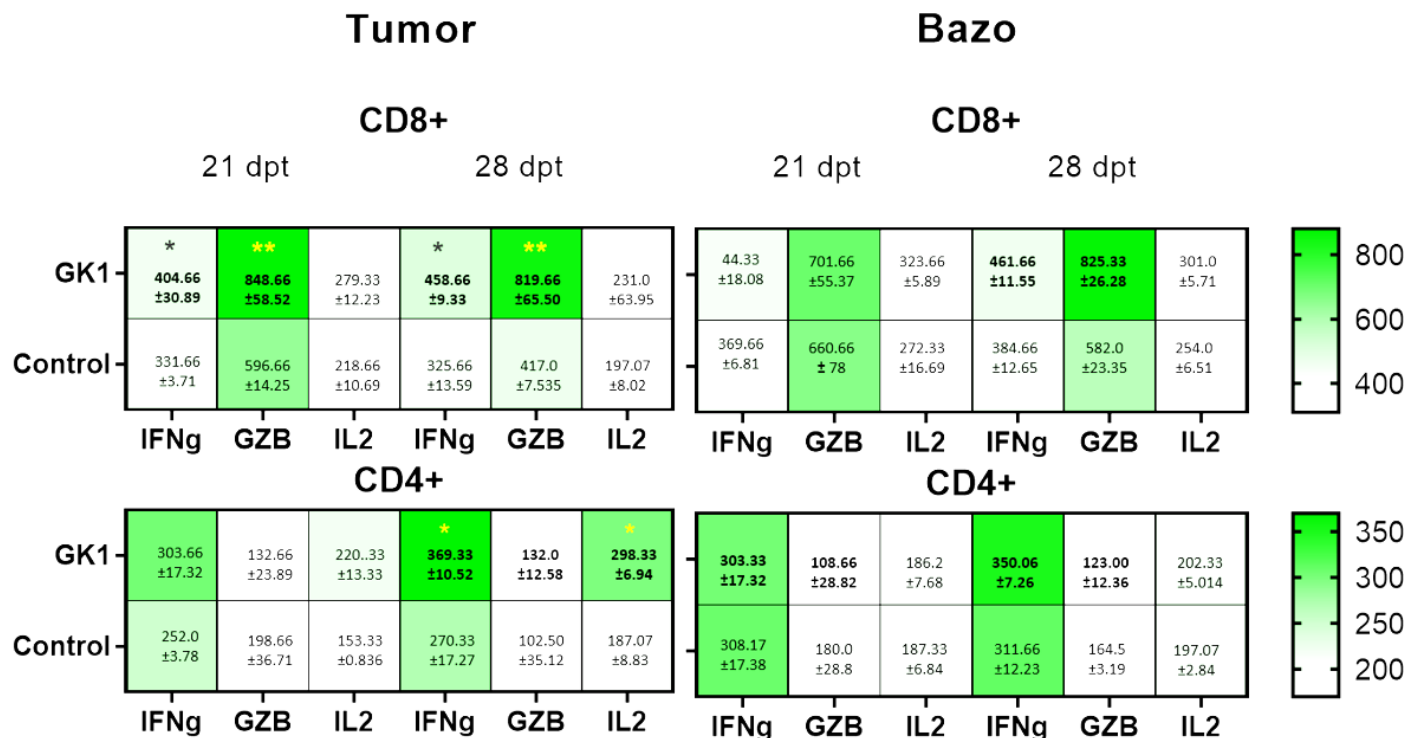
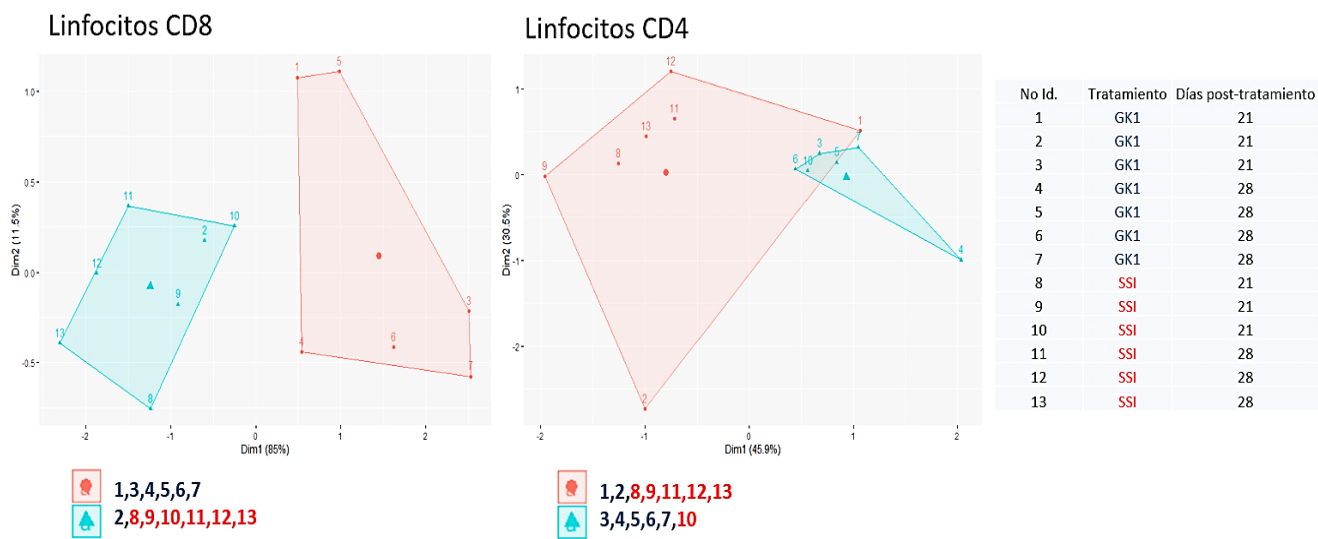


Figura 15. GK-1 aumenta la producción de GZB, IFN- γ e IL2 en tumor. Producción de citocinas de linfocitos T tras la estimulación con PMA/Ionomicina durante 6 h. Mapa de calor de la Intensidad media de fluorescencia (gMFI) de los diferentes productos intracelulares en LT-CD8 y LT-CD4 en tumor y bazo. Se aprecia un cambio de color en el grupo tratado en comparación al control desde el 21 dpt IFN γ : Interferón gamma, GZB: Granzima B, IL2: Interleucina 2. Para cada grupo N= 6 ratones, 3 por 21 dpt y 3 por 28dpt. Se estimuló con PMA/ionomicina durante 6 horas colocando brefeldina en el estímulo. en Se utilizó una MANOVA- T cuadrada de Hotelling, $\alpha=0.05$. * $p<0.05$ ** $p<0.01$.

Tumor



Bazo

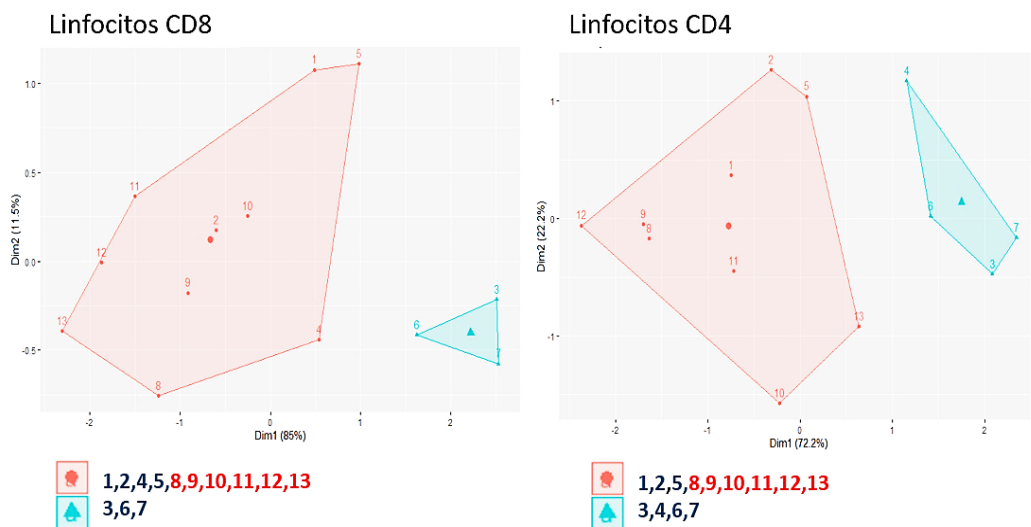


Figura 16. Agrupación no supervisada de la producción de moléculas asociadas a la activación de linfocitos T. Se realizó un análisis no supervisado de medias y dispersión (k-means) considerando la producción de IL-2, granzima B e interferon γ , $k=2$. Mostrando la formación de clusters dependientes del tratamiento. En el caso del bazo se visualizan aún mezclados, no obstante si existen ratones tratados con el péptido GK-1 con un comportamiento único y se asocian en un cluster independiente.

VIII. Discusión

El cáncer de mama es el principal tipo de cáncer en mujeres a nivel mundial, por lo que su tratamiento y oportuna detección es fundamental para reducir la morbi-mortalidad que implica. En este trabajo se encontró que el péptido GK-1 administrado de manera intravenosa reduce significativamente el crecimiento tumoral, la esplenomegalia y la metástasis pulmonar, aspectos característicos del modelo de cáncer de mama inducido por células 4T1 (Beth A. Pulaski 2000; Paschall and Liu 2016; duPre' and Hunter 2007a), confirmando lo previamente reportado (Torres-García et al. 2017). Adicionalmente, en este trabajo se observó que el efecto de GK-1 se vuelve notorio a partir del día 21 posterior al inicio del tratamiento, manteniendo la capacidad citocóxica, la producción de citocinas y aumentando el infiltrado de linfocitos T en tumor, siendo este punto clave para el uso de otras terapias, ya que al mantener la funcionalidad de linfocitos T (Smyth et al. 2016).

En busca de terapias adyuvantes se han utilizado agonistas a TLR4 en conjunto con quimioterapia, demostrando que el tratamiento previo con agonistas del TLR4, sensibiliza al tumor para la respuesta a quimioterapéuticos, teniendo una respuesta óptima a los días 14 y 18 posteriores al tratamiento con el agonista a TLR4 (D'Agostini et al. 2005). Actualmente se trata de buscar agonistas de los TLR's que sean más específicos y que produzcan mayor cantidad de citocinas específicas, y aumentar así la respuesta inmunológica contra el tumor (Gregg et al. 2017).

También se han utilizado combinaciones de agonistas de los receptores TLR7 y TLR9, resultando en la reducción e incluso eliminación de tumores en modelos murinos mediante la activación del sistema inmunológico con un aumento en la producción de TNF- α , IL-12 e infiltrado de linfocitos T tumorales, características importantes para la respuesta antitumoral (Zhao et al. 2014).

El modelo de cáncer de mama inducido por la línea celular 4T1 es un modelo de cáncer de mama triple negativo, altamente metastásico, usado para la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer debido a que no es sensible

a las hormonas tiene alta agresividad y que la metástasis es la principal causa de muerte en mujeres (Dillekås, Rogers, and Straume 2019). Particularmente el modelo es usado para encontrar compuestos capaces de mejorar la respuesta inmunológica (Manrique et al. 2016; Lauder et al. 2020; Lechner et al. 2013) debido a su baja inmunogenicidad; o para evaluar los efectos en el microambiente tumoral de distintos farmacos. Por ejemplo, el modelo es utilizado para estudiar la angiogénesis (Gao et al. 2013; Malekian et al. 2020) y el agotamiento de linfocitos T (M. Zhang et al. 2019)(Sakuishi et al. 2010) (M. Zhang et al. 2020). Además presenta características de células troncal cancerosas (Pulaski and Ostrand-Rosenberg 2000)(Kruger et al. 2006; X. R. Wang et al. 2010), por lo que es un modelo capaz de ser resistente a quimioterapia, y debido a sus propiedades de células troncal es menos inmunogénico y más adaptable a la respuesta inmunológico debido a su potencialidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares (MacCalli et al. 2014)

En este modelo de cáncer de mama, la metástasis pulmonar es una de las características más importantes, siendo observable desde los 14 días post desarrollo tumoral (duPre' and Hunter 2007a; Huang et al. 2017). En nuestro grupo de investigación se modificó el modelo reportado por Pulanski, implantando solo 1,000 células, número mucho menor a lo usado comúnmente ($\geq 100,000$ células). Esto tiene dos ventajas, la primera, nos otorga una ventana más prolongada para el desarrollo y supervivencia de los ratones, permitiendo estudiar en diferentes tiempos los efectos generados tras la administración de GK-1. La segunda, nos ayuda a aumentar la frecuencia de metástasis pulmonar característica del modelo, ya que se ha reportado que a menor cantidad de células implantadas aumenta la metástasis pulmonar (Gregório et al. 2016).

Previo a este trabajo reportamos que GK-1 disminuye la macrometastasis pulmonar (Torres-García et al. 2017). En este trabajo se demuestra que la administración de GK-1 retrasa la macrometastasis pulmonar hasta por 21 días iniciando el tratamiento o desarrollo tumoral; siendo un punto interesante de investigación lo ocurrido entre el día 21 y el día 28 posterior al desarrollo tumoral,

pues en este punto GK-1 deja de mantener la protección en contra de la metástasis pulmonar (Figura10) Profundizar en el estudio de este periodo podría explicar por qué los ratones que reciben el tratamiento al igual que el grupo no tratado, terminan muriendo aunque a mayor tiempo del desarrollo tumoral (Torres-García et al. 2017).

En cuanto al contexto inmunológico, GK-1 demostró modificar las proporciones y cantidades de las poblaciones linfocitarias principalmente en tumor, aumentando la cantidad de linfocitos T efectores CD4 y CD8, esta cuantificación es un marcador utilizado en la clínica para evaluar el pronóstico; siendo favorable el aumento del infiltrado linfocitario (Ibrahim et al. 2014; Stanton and Disis 2016; Loi et al. 2019; Miyashita et al. 2015). Así mismo se encontró un aumento en el índice CD8+/Treg, lo que nos indica que el microambiente tumoral en cuanto a los linfocitos T es antitumoral, debido a que los linfocitos T CD8 se encuentran en mayor proporción y estos dirigen la respuesta antitumoral en los tumores sólidos (Farhood, Najafi, and Mortezaee 2019; Shankaran et al. 2001; Maimela, Liu, and Zhang 2019).

Por otro lado, se observó un aumento de los linfocitos en la periferia (bazo y linfonodo) a los días 28 posteriores al tratamiento, esto podría deberse a una disminución del agotamiento de linfocitos y de manera general, que el ratón se encontraba menos inmunosuprimido, produciendo una respuesta linfocitaria efectiva, previniendo así la diseminación del tumor y posible metástasis. Esta idea podría ser complementada con la identificación de linfocitos T proliferantes a través de Ki67 (X. Sun and Kaufman 2018; Sakuishi et al. 2010), y además de esta manera denotar si el aumento de linfocitos es debido a la proliferación, característica en la respuesta inmune adaptativa contra el tumor y característica perdida durante el agotamiento.

Otro dato importante que se encontró en este trabajo es el tiempo necesario para que GK-1 tenga un efecto; siendo necesario al menos un periodo de 14 días para observar cambios en el crecimiento tumoral y 21 días para las demás características del modelo (Figura 1). Esto es un argumento que fortalece la

hipótesis que la respuesta que controla el crecimiento tumoral es la respuesta adaptativa (D. Li et al. 2019), además en este trabajo se encontró una relación entre la cantidad de linfocitos T tumorales y la disminución en las características del agotamiento con la disminución del desarrollo tumoral.

Esto nos ayuda a caracterizar de mejor manera la respuesta que genera GK-1 y con ello poder diseñar mejores estrategias para su uso, por ejemplo, el uso de algún antiinflamatorio o algún quimioterapéutico en conjunto.

En cuanto los efectos de GK-1 sobre el agotamiento se estudió la expresión de PD-1, capacidad citotóxica y producción de citocinas, tres características que se ven alteradas durante el agotamiento de linfocitos T (Zarour 2016; J. C. Wang et al. 2018; Wherry 2011).

La expresión de PD-1 así como otros RI's son característicos del agotamiento de linfocitos T, y es una manera rápida de diferenciar este estado disfuncional de la anergia o la senescencia (Crespo et al. 2013). GK-1 demostró disminuir la expresión de PD-1 significativamente en los linfocitos T extraídos de tumor (Figura 3). Se encontró que en los LT de bazo y linfonodo, GK-1 mantuvo la expresión de PD-1 en entre 3500 y 4000, lo cual es una expresión muy similar a los ratones sin tumor, mientras que ratones control oscilaban alrededor de 7000. Al hacer un análisis independiente por cada punto analizado no se encontró diferencia significativa, sin embargo, al hacer un análisis acumulativo como es el área bajo la curva (ABC) (Bushmakin et al. 2011; Lambert and Chevret 2016), encontramos diferencias significativas y además observamos de mejor manera como el tratamiento con GK-1 mantiene los niveles de expresión prácticamente iguales a los ratones sin tumor. Esto nos indica que los LT no sobre expresan este receptor y posiblemente guarden un estado funcional (Elezov and Kudryavtsev 2019).

Por otra parte, en los linfocitos T extraídos de tumor, se encontró diferencia significativa al 21 y 28 dpt, donde el tratamiento con GK-1 mantuvo el nivel de expresión de PD-1 en promedio en 10,000 unidades relativas, mientras que ratones control alcanzaron en promedio niveles de 20,000 unidades, siendo el doble de expresión, además se observa un aumento de la expresión de PD-1

respecto a los linfocitos T periféricos, lo cual está definido como parte del fenotipo efector, puesto que PD-1 se expresa tras la activación del TCR (Kumagai et al. 2020; Simon and Labarriere 2018). De la misma manera al hacer un análisis de ABC, encontramos una disminución significativa de la expresión de PD-1 en los linfocitos T extraídos de ratones que recibieron el tratamiento de GK-1 por vía endovenosa. Es decir, GK-1 previene la sobreexpresión de PD-1, uno de los principales receptores descritos en el agotamiento.

La segunda característica evaluada fue la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8 extraídos de tumor. Se ha definido que gran parte de la respuesta antitumoral está dirigida por los linfocitos T CD8, por lo que evaluar su capacidad de matar células tumorales, y en nuestro caso, a células 4T1, es necesaria para poder definir si conservan capacidades funcionales. Se realizó un cultivo mixto con células 4T1 y LT-CD8 purificados por sorter como fue descrito por Somanchi en 2015 (Somanchi et al. 2015). Esta metodología permite estudiar la capacidad citotóxica por medio de dos técnicas: citometría de flujo y fluorimetría. El ensayo con calceína evalúa la integridad de la membrana, ya que, al perder la integridad membranal, el compuesto fluorescente es liberado al medio y puede ser cuantificado.

Tanto en citometría de flujo como en fluorimetría se observó mayor citotoxicidad en los linfocitos provenientes de ratones tratados con GK-1. Además, se puede observar que la capacidad citotóxica no disminuye entre el día 21 y 28 posterior al tratamiento. Lo que nos indica que GK-1 previene la pérdida de la citotoxicidad, y mantiene una mayor capacidad antitumoral.

En el ensayo realizado para evaluar esta característica se puede suponer la capacidad de producir perforina o cualquier otra proteína que genere poros. Los poros generados además de facilitar la muerte de las células tumorales permite la salida de la calceína de las células y ser cuantificada en sobrenadante de cultivos (Neri et al. 2001; Somanchi et al. 2015; Jang et al. 2012), particularmente la presencia de perforina en tumores sólidos, se asocia con mejor pronóstico (Roufas et al. 2018; Kontani et al. 2001). Incluso se ha reportado su participación en la disminución de la metástasis en el modelo con células 4T1 (Emeche, Sinha, and

Ostrand-Rosenberg 2006), por lo que su presencia es importante para el control tumoral.

Otro aspecto interesante que se observó, fue que la cantidad de linfocitos T necesarios para observar un efecto citotóxico difiere del órgano donde se extraen. Siendo los LT extraídos de tumor quienes tienen mayor capacidad citotóxica; pues se necesitaba una relación 1:1 (Efectoras/células blanco), para observar el efecto, mientras que los extraídos de bazo requerían una relación de 5:1. Lo cual es esperable, puesto que el sitio de reclutamiento es el tumor y ahí encontraremos LT efectores, mientras que en el bazo habrá muchos linfocitos T no específicos al tumor, debido a que únicamente utilizamos una separación CD3+CD8+, seguramente se encontraban linfocitos T no específicos en el cultivo mixto del bazo.

Por último, se estudió la capacidad de producir Interleucina 2 (IL-2), Interferón gamma (IFN- γ) y granzima B (GZB), proteínas que se pierden durante el agotamiento de linfocitos T. Cada una cuenta con funciones específicas para una respuesta antitumoral efectiva. IL-2 es una citocina que permite la proliferación de los linfocitos y se ha observado que el incremento en los tumores es un indicador de buen pronóstico (Fasoulakis et al. 2018; Q. Zhang et al. 2018). Interferón gamma es un interferón de clase II que permite la activación de APC's y que además puede generar la apoptosis de las células tumorales y el aumento moléculas de MHC-I, por lo que su presencia es necesaria para el funcionamiento de la actividad antitumoral. Por último, la granzima B es una proteína que activa vías apoptóticas, es producida por linfocitos T CD8 y NK's principalmente; se ha observado que su aumento favorece la sobrevida, considerándose un indicador de buen pronóstico (Roufas et al. 2018; Kontani et al. 2001).

Se estudió la producción de estas proteínas en los días 21 y 28 post-tratamiento debido a que en estos días se encontró cambios significativos en el crecimiento tumoral y expresión de PD-1. En este sentido, se encontró que GK-1 aumenta la producción de citocinas a los días 21 y 28 en tumor; los LT-CD4 aumentaron la producción de IFN γ e IL-2, mientras que los LT-CD8 la producción de GZB e IFN γ .

Con este resultado se puede observar que GK-1 mejora la funcionalidad y capacidad antitumoral de los linfocitos T con el aumento de la producción de estas proteínas importantes para prevenir la progresión. Incluso se puede pensar con base a los antecedentes, que GK-1 inhibe el desarrollo del agotamiento de los linfocitos T, y con ello, los LT mantienen una capacidad antitumoral durante el periodo de estudio. Cabe señalar que el análisis realizado para este experimento fue un análisis multivariado, utilizado para aumentar la potencia del análisis debido al pequeño tamaño de muestra (D'Amico, Neilands, and Zambarano 2001). Para mejorar el trabajo sería conveniente repetir el experimento y así aumentar el tamaño de muestra.

Este trabajo describió los efectos que tiene GK-1 en el modelo de cáncer de mama inducido por la línea 4T1, definiendo el cómo afecta a los linfocitos T, principalmente a los intratumorales. Estas observaciones sobre los linfocitos son similares a las reportadas por Rodríguez (Rodríguez-Rodríguez et al. 2019), aunque en el modelo de melanoma con la línea celular B16-OVA, se encontró una disminución en la expresión de PD-1, mayor producción de IFN γ y mayor proliferación por parte de los linfocitos T intratumorales. Estas coincidencias permiten sostener mecanismos comunes mediados por GK-1 en dos distintos tipos tumorales, sin embargo, aún no conocemos los mecanismos que median estos fenómenos. Podemos considerar dos posibilidades del cómo GK-1 está ejerciendo su efecto; que active a células presentadoras de antígeno (macrófagos y dendríticas) y/o disminuyendo estirpes supresoras (Tregs o MDSC).

La primera posibilidad ya ha sido demostrada en modelos *in-vitro* e *in-vivo*. GK-1 es capaz de activar macrófagos y dendríticas a través de diferentes mecanismos, posiblemente mediados por un TLR, debido a que en ratones KO a Myd88 se observa una disminución en los efectos de GK-1 (R. Segura-Velázquez et al. 2006; René Segura-Velázquez et al. 2009; Snchez-Hernández et al. 2018b; Montero et al. 2020; Cervantes-torres et al. 2018). Esta activación podría favorecer la activación de los linfocitos y prevenir el agotamiento mediante la activación correcta de los linfocitos y la disminución de los ligandos a los receptores de

inhibición como PDL-1 en células dendríticas (Rodríguez-Rodríguez et al. 2019). Por otro lado, se ha descrito que el agotamiento puede ser favorecido por APC's supresoras como macrófagos tipo M2 y dendríticas tolerogénicas (Wherry and Kurachi 2015). GK-1 demostró disminuir la expresión de PDL-1 de células dendríticas tumorales en un modelo de cáncer de piel (Rodríguez-Rodríguez et al. 2019) y por otro lado ha mostrado perfilar a macrófagos derivados de peritoneo a un perfil similar a M1 (Sánchez-Hernández et al. 2018a), el cual puede favorecer la respuesta antitumoral (Pan 2012) y en conjunto podrían estar disminuyendo el agotamiento de linfocitos T.

Por otro lado, en el trabajo de Torres (Torres-García et al. 2017) se cuantificaron factores de crecimiento y quimiocinas que pueden favorecer la generación de células derivadas mieloides supresoras (Ostrand-Rosenberg and Fenselau 2018; Kumar et al. 2016). Estos factores se encontraron disminuidos, por lo que se podría suponer una disminución en las MDSC en los ratones tratados, células que han tomado gran relevancia en tumores sólidos por su participación en, metástasis, inmunosupresión y agotamiento (Zhu et al. 2017)(Safarzadeh et al. 2018).

En este sentido la segunda posibilidad se fundamenta en la disminución de factores de crecimiento como GM-CFS, al mayor índice TCD8/Treg (ya que las células MDSC favorecen la diferenciación de los LT en Treg (X. Sun and Kaufman 2018) y en la disminución de la esplenomegalia, lugar donde se desarrollan este tipo de células(Millrud, Bergenfelz, and Leandersson 2017). Tanto la esplenomegalia como factores de crecimiento como GM-CFS están vinculados con el desarrollo de MDSC, y además este tipo de células participan en el desarrollo y metástasis de los dos modelos utilizados; 4T1 (Ouzounova et al. 2017; Binnewies et al. 2018)(duPre' and Hunter 2007a) y B16 (Kamran et al. 2018; Youn et al. 2008; Schlecker et al. 2012). Además, durante el desarrollo de este proyecto, se realizó la cuantificación de MDSC a través de CD11b+ y Ly6C y Ly6G, (Anexo3), observando que los ratones tratados con GK-1 a los 28 días post tratamiento, tienen una menor cantidad de células en bazo, tanto la estirpe

monocítica como granulocítica. Por lo que este hallazgo fortalece esta segunda posibilidad.

Por lo que una investigación posterior podría enfocarse más al microambiente tumoral y en específico de las células presentadoras y las MDSC, lo cual serviría para continuar la descripción de GK-1 y formular un posible mecanismo, por el cual, este generando sus efectos inmunopotenciadores y antitumorales.

En conjunto este trabajo mostró que GK-1 potencia la respuesta inmunológica contra el cáncer de mama inducido por la línea celular 4T1, disminuyendo la expresión de PD-1, aumentando la citotoxicidad y producción de citocinas con funciones antitumorales, por lo que podemos concluir que GK-1 posiblemente disminuye el agotamiento de linfocitos T. Restará realizar estudios moleculares y transcriptómicos, buscando la expresión de factores de transcripción específicos de agotamiento de linfocitos T, así como ensayos de proliferación para completar la descripción del efecto de GK-1 sobre el agotamiento de linfocitos T.

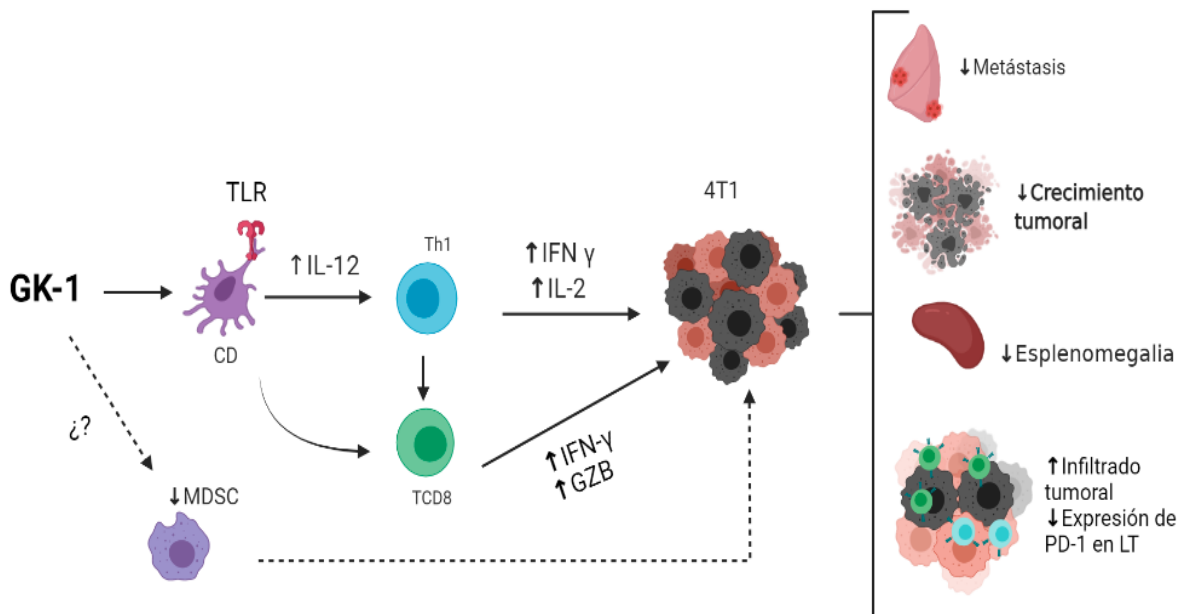


Figura 17. Efectos encontrados de GK-1. La administración de GK-1 por vía endovenosa genera una disminución del crecimiento tumoral, metástasis y esplenomegalia. Esto posiblemente mediante la activación de células dendríticas (CD) a través de un TLR. Estas CD pueden disminuir el agotamiento de linfocitos T (LT) a través de una activación efectiva y de esta manera los LT pueden tener mayor efecto antitumoral como se observó con el aumento en la citotoxicidad y producción de productos como IFN γ , IL-2 y GZB. Así mismo se encontró una disminución de células supresoras derivadas de mieloides, las cuales favorecen el desarrollo tumoral, sin embargo falta definir el papel que ejercen en este modelo. En línea continua se encuentra lo definido para GK-1, mientras que en línea punteada falta aún investigar más.

IX. Conclusiones

Este trabajo comprobó el efecto que tiene el péptido inmunopotenciador y antitumoral GK-1 en el agotamiento de linfocitos T, disminuyendo los principales parámetros observados en tal fenómeno. Así mismo, se encontró que GK-1 en comparación al vehículo (Control) disminuye la tasa de crecimiento tumoral, esplenomegalia, peso tumoral y la expresión de PD-1 en linfocitos T efectores en el modelo de cáncer de mama inducido por las células 4T1.

Además, los ratones tratados con GK-1, establecieron un ambiente antitumoral: con una mayor cantidad de linfocitos T CD4 y CD8 infiltrantes, una relación CD8+/Treg mayor a 1 así mismo estos linfocitos tienen una mayor capacidad citotóxica y producción de citocinas como IFN γ , GZB e IL-2.

En conclusión, la evidencia sugiere fuertemente que el tratamiento de GK-1 previene el agotamiento de linfocitos T en el modelo de cáncer de mama murino inducido por la línea celular 4T1 demostrando que fue cierta la hipótesis planteada para el proyecto.

X. Perspectivas

- Evaluar factores de transcripción asociados al agotamiento de linfocitos T, como EOMES, TCF1 o NFAT para definir de mejor manera el estado de los linfocitos T intratumorales.
- Estudiar el microambiente tumoral enfocándose en las células dendríticas y las MDSC, debido a que son participantes importantes en la propagación y metástasis; en busca de un posible mecanismo subyacente a la prevención del agotamiento de linfocitos T.
- Evaluar el contexto periférico de los ratones a través de estudios de citocinas en suero, en busca de cambios, principalmente entre los días 21 y 28 post tratamiento.
- Diseñar un tratamiento con terapia en conjunto a GK-1 en busca de potenciar la respuesta antitumoral y aumentar la sobrevivencia.
- Aumentar el tamaño de muestra para el ensayo de activación celular y producción de citocinas.

XI. Bibliografía

- Anderson, Kristin G., Ingunn M. Stromnes, and Philip D. Greenberg. 2017. "Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T Cell Activity: A Case for Synergistic Therapies." *Cancer Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.008>.
- Arbiser, Jack L., Michael Y. Bonner, and Linda C. Gilbert. 2017. "Targeting the Duality of Cancer." *Npj Precision Oncology* 1 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0026-x>.
- Austyn, Jonathan M. 2001. "Mobilization, Migration and Localization of Dendritic Cells." In *Dendritic Cells*, 131–49. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-012455851-9/50049-3>.
- Barriga, Vanessa, Nyanbol Kuol, Kulmira Nurgali, and Vasso Apostolopoulos. 2019. "The Complex Interaction between the Tumor Micro-Environment and Immune Checkpoints in Breast Cancer." *Cancers* 11 (8): 1205. <https://doi.org/10.3390/cancers11081205>.
- Batlle, Eduard, and Hans Clevers. 2017. "Cancer Stem Cells Revisited." *Nature Medicine* 23 (10): 1124–34. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>.
- Batlle, Eduard, and Joan Massagué. 2019. "Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer." *Immunity*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.
- Becker, Sven. 2015. "A Historic and Scientific Review of Breast Cancer: The next Global Healthcare Challenge." *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 131: S36–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.03.015>.
- Beth A. Pulaski, Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2000. "Mouse 4T1 Breast Tumor Model." In *Current Protocols in Immunology*, 1–16.
- Binnewies, Mikhail, Edward W Roberts, Kelly Kersten, Vincent Chan, Douglas F Fearon, Miriam Merad, Lisa M Coussens, et al. 2018. "Understanding the

Tumor Immune Microenvironment (TIME) for Effective Therapy.” *Nature Medicine* 24 (5): 541–50. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>.

Blackburn, Shawn D., Haina Shin, W. Nicholas Haining, Tao Zou, Creg J. Workman, Antonio Polley, Michael R. Betts, Gordon J. Freeman, Dario A.A. Vignali, and E. John Wherry. 2009. “Coregulation of CD8+ T Cell Exhaustion by Multiple Inhibitory Receptors during Chronic Viral Infection.” *Nature Immunology* 10 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1038/ni.1679>.

Bolouri, Hamid, Mary Young, Joshua Beilke, Rebecca Johnson, Brian Fox, Lu Huang, Cristina Costa Santini, et al. 2019. “Integrative Network Modeling Reveals Mechanisms Underlying T Cell Exhaustion.” *BioRxiv*, 582312. <https://doi.org/10.1101/582312>.

Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. “Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Buchan, Sarah L., Teresa Manzo, Barry Flutter, Anne Rogel, Noha Edwards, Lei Zhang, Shivajanani Sivakumaran, et al. 2015. “OX40- and CD27-Mediated Costimulation Synergizes with Anti-PD-L1 Blockade by Forcing Exhausted CD8 + T Cells To Exit Quiescence .” *The Journal of Immunology* 194 (1): 125–33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401644>.

Burugu, S., D. Gao, S. Leung, S. K. Chia, and Torsten O. Nielsen. 2017. “LAG-3+ Tumor Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Correlates and Association with PD-1/PD-L1+ Tumors.” *Annals of Oncology* 28 (12): 2977–84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx557>.

Bushmakin, Andrew G, Joseph C Cappelleri, Gergana Zlateva, and Alesia Sadosky. 2011. “Applying Area-under-the-Curve Analysis to Enhance Interpretation of Response Profiles: An Application to Sleep Quality Scores in Patients with Fibromyalgia.” *Quality of Life Research* 20 (4): 491–98.

<http://www.jstor.org/stable/41488099>.

Catakovic, Kemal, Eckhard Klieser, Daniel Neureiter, and Roland Geisberger.

2017. "T Cell Exhaustion: From Pathophysiological Basics to Tumor Immunotherapy." *Cell Communication and Signaling* 15 (1): 1–16.

<https://doi.org/10.1186/s12964-016-0160-z>.

Cervantes-torres, Jacquelynne, Laura Montero, Noé Rodríguez-rodríguez, Edda

Sciutto, Gladis Fragoso, and Diana Torres-garcía. 2018. "Understanding the Anti-Tumor Properties Mediated by the Synthetic Peptide GK-1," 1–22.

Chen, Zeyu, Zhicheng Ji, Shin Foong Ngiow, Sasikanth Manne, Zhangying Cai,

Alexander C. Huang, John Johnson, et al. 2019. "TCF-1-Centered Transcriptional Network Drives an Effector versus Exhausted CD8 T Cell-Fate Decision." *Immunity* 51 (5): 840-855.e5.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.013>.

Clinical Trials NCI. 2019. "Clinical Trials Using Anti-TIM-3 Monoclonal Antibody

TSR-022 - National Cancer Institute." 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/intervention/anti-tim-3-monoclonal-antibody-tsr-022>.

Cohen, Ivan J., and Ronald Blasberg. 2017. "Impact of the Tumor

Microenvironment on Tumor-Infiltrating Lymphocytes: Focus on Breast Cancer." *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 11 (1).

<https://doi.org/10.1177/1178223417731565>.

Coulie, Pierre G., Benoît J. Van den Eynde, Pierre van der Bruggen, and Thierry

Boon. 2014. "Tumour Antigens Recognized by T Lymphocytes: At the Core of Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Cancer* 14 (2): 135–46.

<https://doi.org/10.1038/nrc3670>.

Crespo, Joel, Haoyu Sun, Theodore H. Welling, Zhigang Tian, and Weiping Zou.

2013. "T Cell Anergy, Exhaustion, Senescence, and Stemness in the Tumor Microenvironment." *Current Opinion in Immunology*. *Curr Opin Immunol*.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.12.003>.

- D'Agostini, Cartesio, Francesca Pica, Giuseppe Febbraro, Sandro Grelli, Carlo Chiavaroli, and Enrico Garaci. 2005. "Antitumour Effect of OM-174 and Cyclophosphamide on Murine B16 Melanoma in Different Experimental Conditions." *International Immunopharmacology* 5 (7–8): 1205–12.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.02.013>.
- D'Amico, Elizabeth J., Torsten B. Neilands, and Robert Zambarano. 2001. "Power Analysis for Multivariate and Repeated Measures Designs: A Flexible Approach Using the SPSS MANOVA Procedure." *Behavior Research Methods, Instruments, and Computers* 33 (4): 479–84.
<https://doi.org/10.3758/BF03195405>.
- David, A. Rosalie, and Michael R. Zimmerman. 2010. "Cancer: An Old Disease, a New Disease or Something in Between?" *Nature Reviews Cancer* 10 (10): 728–33. <https://doi.org/10.1038/nrc2914>.
- DeNardo, David G., Jairo B. Barreto, Pauline Andreu, Lesley Vasquez, David Tawfik, Nikita Kolhatkar, and Lisa M. Coussens. 2009. "CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages." *Cancer Cell* 16 (2): 91–102.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.018>.
- Didierlaurent, Arnaud M., Sandra Morel, Laurence Lockman, Sandra L. Giannini, Michel Bisteau, Harald Carlsen, Anders Kielland, et al. 2009. "AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity." *The Journal of Immunology* 183 (10): 6186–97.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901474>.
- Dillekås, Hanna, Michael S. Rogers, and Oddbjørn Straume. 2019. "Are 90% of Deaths from Cancer Caused by Metastases?" *Cancer Medicine* 8 (12): 5574–76. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>.
- Doering, Travis A., Alison Crawford, Jill M. Angelosanto, Michael A. Paley, Carly G. Ziegler, and E. John Wherry. 2012. "Network Analysis Reveals Centrally

Connected Genes and Pathways Involved in CD8+ T Cell Exhaustion versus Memory." *Immunity* 37 (6): 1130–44.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.021>.

duPre', Sally A., and Kenneth W. Hunter. 2007a. "Murine Mammary Carcinoma 4T1 Induces a Leukemoid Reaction with Splenomegaly: Association with Tumor-Derived Growth Factors." *Experimental and Molecular Pathology* 82 (1): 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.06.007>.

Edechi, Chidalu A., Nnamdi Ikeogu, Jude E. Uzonna, and Yvonne Myal. 2019. "Regulation of Immunity in Breast Cancer." *Cancers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11081080>.

Egelston, Colt A., Christian Avalos, Travis Y. Tu, Diana L. Simons, Grecia Jimenez, Jae Y. Jung, Laleh Melstrom, et al. 2018. "Human Breast Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells Retain Polyfunctionality despite PD-1 Expression." *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06653-9>.

Elezov, Dmitry S., and Igor V. Kudryavtsev. 2019. "PD-1 Receptor on Immune Cells, Its Expression and Potential Role in Cancer Therapy." *Cellular Therapy and Transplantation* 8 (2): 8–16. <https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2019-8-2-8-16>.

Emeche, Chineye D., Pratima Sinha, and Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2006. "The Role of Perforin in Providing Resistance to 4T1 Metastatic Mammary Carcinoma in STAT6-Deficient Mice." *Cancer Research* 66 (8 Supplement).

Emory Winship University. 2017. "Historical Cancer Highlights | CancerQuest." 2017. <https://www.cancerquest.org/es/cancer-biology/historical-cancer-highlights>.

Fan, Xiyang, and Alexander Y. Rudensky. 2016. "Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes." *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.048>.

Farhood, Bagher, Masoud Najafi, and Keywan Mortezaee. 2019. "CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Immunotherapy: A Review." *Journal of Cellular*

Physiology. Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.27782>.

Fasoulakis, Zacharias, George Kolios, Valentinos Papamanolis, and Emmanuel N Kontomanolis. 2018. "Interleukins Associated with Breast Cancer." *Cureus* 10 (11). <https://doi.org/10.7759/cureus.3549>.

Feng, Yixiao, Mia Spezia, Shifeng Huang, Chengfu Yuan, Zongyue Zeng, Linghuan Zhang, Xiaojuan Ji, et al. 2018. "Breast Cancer Development and Progression: Risk Factors, Cancer Stem Cells, Signaling Pathways, Genomics, and Molecular Pathogenesis." *Genes and Diseases* 5 (2): 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.

Fidler, Miranda M., and Freddie Bray. 2018. "Global Cancer Inequalities." *Frontiers in Oncology* 8 (AUG): 10–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00293>.

Fowlkes, Natalie, Kelli Clemons, Paul Jf Rider, Ramesh Subramanian, Nobuko Wakamatsu, Ingeborg Langohr, and Konstantin G. Kousoulas. 2019. "Factors Affecting Growth Kinetics and Spontaneous Metastasis in the B16F10 Syngeneic Murine Melanoma Model." *Comparative Medicine* 69 (1): 48–54. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000036>.

Galluzzi, Lorenzo, Erika Vacchelli, José-manuel Bravo-san Pedro, Aitziber Buqué, Laura Senovilla, Elisa Elena Baracco, Norma Bloy, et al. 2014. "Classification of Current Anticancer Immunotherapies." *Oncotarget* 5 (24): 12472–508.

Galon, J., B. A. Fox, C. B. Bifulco, G. Masucci, T. Rau, G. Botti, F. M. Marincola, et al. 2016. "Immunoscore and Immunoprofiling in Cancer: An Update from the Melanoma and Immunotherapy Bridge 2015." *Journal of Translational Medicine* 14 (1): 273. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1029-z>.

Gao, Jian Li, Xing Ji, Tong Chuan He, Qi Zhang, Kai He, Yan Zhao, Su Hong Chen, and Gui Yuan Lv. 2013. "Tetrandrine Suppresses Cancer Angiogenesis and Metastasis in 4T1 Tumor Bearing Mice." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/265061>.

Gevorkian, G., K. Manoutcharian, C. Larralde, M. Hernandez, J. C. Almagro, M.

- Viveros, J. Sotelo, E. Garcia, and E. Sciutto. 1996. "Immunodominant Synthetic Peptides of *Taenia Crassiceps* in Murine and Human Cysticercosis." *Immunology Letters* 49 (3): 185–89. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(96\)02503-5](https://doi.org/10.1016/0165-2478(96)02503-5).
- Ghoneim HE, Fan Y, Moustaki A, Abdelsamed HA, Dash P, Dograp, et al. 2017. "De Novo Methylation Halts PD-1 Blockade–Mediated T-Cell Revitalization." *Cancer Discovery* 7 (8): 792.1-792. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-rw2017-121>.
- Gilad, Yosi, Yossi Eliaz, Yang Yu, Sang Jun Han, Bert W. O'Malley, and David M. Lonard. 2019. "Drug-Induced PD-L1 Expression and Cell Stress Response in Breast Cancer Cells Can Be Balanced by Drug Combination." *Scientific Reports* 9 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51537-7>.
- GLOBOCAN.OMS. 2018. "Age Standardized (World) Incidence Rates, Breast, All Ages." <http://gco.iarc.fr/today>.
- Gluz, O., C. Liedtke, N. Gottschalk, L. Pusztai, U. Nitz, and N. Harbeck. 2009. "Triple-Negative Breast Cancer - Current Status and Future Directions." *Annals of Oncology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp492>.
- Gonçalves, Homero, Maximiliano Ribeiro Guerra, Jane Rocha Duarte Cintra, Vívian Assis Fayer, Igor Vilela Brum, and Maria Teresa Bustamante Teixeira. 2018. "Survival Study of Triple-Negative and Non–Triple-Negative Breast Cancer in a Brazilian Cohort." *Clinical Medicine Insights: Oncology* 12 (July). <https://doi.org/10.1177/1179554918790563>.
- Gorodetska, Ielizaveta, Iryna Kozeretska, and Anna Dubrovska. 2019. "BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance." *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/jca.30410>.
- Gregg, Kelsey A., Erin Harberts, Francesca M. Gardner, Mark R. Pelletier, Corinne Cayatte, Li Yu, Michael P. McCarthy, Jason D. Marshall, and Robert K. Ernst. 2017. "Rationally Designed TLR4 Ligands for Vaccine Adjuvant Discovery."

MBio 8 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00492-17>.

- Gregório, Ana C., Nuno A. Fonseca, Vera Moura, Manuela Lacerda, Paulo Figueiredo, Sérgio Simões, Sérgio Dias, and João Nuno Moreira. 2016. "Inoculated Cell Density as a Determinant Factor of the Growth Dynamics and Metastatic Efficiency of a Breast Cancer Murine Model." *PLoS ONE* 11 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165817>.
- Hamaï, A., H. Benlalam, F. Meslin, M. Hasmim, T. Carré, I. Akalay, B. Janji, G. Berchem, M. Z. Noman, and S. Chouaib. 2010. "Immune Surveillance of Human Cancer: If the Cytotoxic T-Lymphocytes Play the Music, Does the Tumoral System Call the Tune?" *Tissue Antigens*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01401.x>.
- Han, Yanyan, Dandan Liu, and Lianhong Li. 2020. "PD-1/PD-L1 Pathway: Current Researches in Cancer." *American Journal of Cancer Research* 10 (3): 727–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32266087>.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2011. "Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hassane, M. 2017. "Reversing T-Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer Hassane." *Clinical Cancer Research* 22 (8): 1856–64. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1849.Reversing>.
- He, Yayi, Jie Cao, Chao Zhao, Xuefei Li, Caicun Zhou, and Fred R. Hirsch. 2018. "TIM-3, a Promising Target for Cancer Immunotherapy." *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170385>.
- Hilchie, A. L., D. W. Hoskin, and M. R. Power Coombs. 2019. "Anticancer Activities of Natural and Synthetic Peptides." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1117:131–47. Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_9.
- Hoskin, David W., and Ayyalusamy Ramamoorthy. 2008. "Studies on Anticancer

Activities of Antimicrobial Peptides.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. *Biochim Biophys Acta*.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>.

House, Imran G., Peter Savas, Junyun Lai, Amanda X.Y. Chen, Amanda J. Oliver, Zhi L. Teo, Kirsten L. Todd, et al. 2020. “Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 Are Required for Antitumor Immune Responses Following Immune Checkpoint Blockade.” *Clinical Cancer Research* 26 (2): 487–504.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1868>.

Huang, Yi, Chunling Ma, Qunyuan Zhang, Jian Ye, and Fang Wang. 2017. “CD4 + and CD8 + T Cells Have Opposing Roles in Breast Cancer Progression and Outcome.” *Oncotarget* 6 (19).

Huppa, Johannes B., and Mark M. Davis. 2003. “T-Cell-Antigen Recognition and the Immunological Synapse.” *Nature Reviews Immunology*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nri1245>.

Ibrahim, Ezzeldin M., Meteb E. Al-Foheidi, Mubarak M. Al-Mansour, and Ghieth A. Kazkaz. 2014. “The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis.” *Breast Cancer Research and Treatment*. Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3185-2>.

INEGI. México . 2018. “COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 61/18 2 DE FEBRERO DE 2018 ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER. DATOS NACIONALES.”
http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf.

Inés Vargas-rojas, María, Luis Jiménez-álvarez, Gustavo Ramírez, Diana Torres-garcía, Rodrigo Barquera, Aurora Alicia Gastelum-martínez, and Joaquín Zúñiga. 2008. “REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS PD-1 y Sus Ligandos Como Reguladores de La Respuesta Inmune.” Vol. 21. www.iner.gob.mx272www.medigraphic.com.

- Ingber, Donald E. 2002. "Cancer as a Disease of Epithelial-Mesenchymal Interactions and Extracellular Matrix Regulation." *Differentiation*. Blackwell Verlag GmbH Berlin. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700908.x>.
- International Agency for Research on Cancer. WHO. 2018. "PRESS RELEASE N° 263. Latest Global Cancer Data." <http://gco.iarc.fr/>,.
- Jang, Youn-Young, Duck Cho, Sang-Ki Kim, Dong-Jun Shin, Min-Ho Park, Je-Jung Lee, Myung-Geun Shin, Jong-Hee Shin, Soon-Pal Suh, and Dong-Wook Ryang. 2012. "An Improved Flow Cytometry-Based Natural Killer Cytotoxicity Assay Involving Calcein AM Staining of Effector Cells." *Annals of Clinical and Laboratory Science* 42 (1): 42–49.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22371909>.
- Kaech, Susan M., and Weiguo Cui. 2012. "Transcriptional Control of Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation." *Nature Reviews Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/nri3307>.
- Kahan, Shannon M., E. John Wherry, and Allan J. Zajac. 2015. "T Cell Exhaustion during Persistent Viral Infections." *Virology*. Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.033>.
- Kakaradov, Boyko, Janilyn Arsenio, Christella E. Widjaja, Zhaoren He, Stefan Aigner, Patrick J. Metz, Bingfei Yu, et al. 2017. "Early Transcriptional and Epigenetic Regulation of CD8 + T Cell Differentiation Revealed by Single-Cell RNA Sequencing." *Nature Immunology* 18 (4): 422–32.
<https://doi.org/10.1038/ni.3688>.
- Kamran, Neha, Youping Li, Maria Sierra, Mahmoud S. Alghamri, Padma Kadiyala, Henry D. Appelman, Marta Edwards, Pedro R. Lowenstein, and Maria G. Castro. 2018. "Melanoma Induced Immunosuppression Is Mediated by Hematopoietic Dysregulation." *Oncot Immunology* 7 (3).
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1408750>.
- Kim, Ryungsa, Manabu Emi, and Kazuaki Tanabe. 2006. "Cancer Immunosuppression and Autoimmune Disease: Beyond Immunosuppressive

Networks for Tumour Immunity.” *Immunology* 119 (2): 254–64.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02430.x>.

Kontani, K., S. Sawai, J. Hanaoka, N. Tezuka, S. Inoue, and S. Fujino. 2001. “Involvement of Granzyme B and Perforin in Suppressing Nodal Metastasis of Cancer Cells in Breast and Lung Cancers.” *European Journal of Surgical Oncology* 27 (2): 180–86. <https://doi.org/10.1053/ejso.2000.1060>.

Kruger, Jorg A., Charles D. Kaplan, Yunping Luo, He Zhou, Dorothy Markowitz, Rong Xiang, and Ralph A. Reisfeld. 2006. “Characterization of Stem Cell-like Cancer Cells in Immune-Competent Mice.” *Blood* 108 (12): 3906–12.
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024687>.

Kumagai, Shogo, Yosuke Togashi, Takahiro Kamada, Eri Sugiyama, Hitomi Nishinakamura, Yoshiko Takeuchi, Kochin Vitaly, et al. 2020. “The PD-1 Expression Balance between Effector and Regulatory T Cells Predicts the Clinical Efficacy of PD-1 Blockade Therapies.” *Nature Immunology* 21 (11): 1346–58. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0769-3>.

Kumar, Vinit, Sima Patel, Evgenii Tcyganov, and Dmitry I. Gabrilovich. 2016. “The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment.” *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>.

Lambert, Jérôme, and Sylvie Chevret. 2016. “Summary Measure of Discrimination in Survival Models Based on Cumulative/Dynamic Time-Dependent ROC Curves.” *Statistical Methods in Medical Research* 25 (5): 2088–2102.
<https://doi.org/10.1177/0962280213515571>.

Lanitis, E., D. Dangaj, M. Irving, and George Coukos. 2017. “Mechanisms Regulating T-Cell Infiltration and Activity in Solid Tumors.” *Annals of Oncology* 28 (September): xii18–32. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx238>.

Lauder, Sarah Nicol, Kathryn Smart, Veerle Kersemans, Danny Allen, Jake Scott, Ana Pires, Stefan Milutinovic, et al. 2020. “Enhanced Antitumor Immunity through Sequential Targeting of PI3K δ and LAG3.” *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 8 (2). <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000693>.

- Law, Andrew M. K., Fatima Valdes-Mora, and David Gallego-Ortega. 2020. "Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer." *Cells* 9 (3): 561. <https://doi.org/10.3390/cells9030561>.
- Lechner, Melissa G., Saman S. Karimi, Keegan Barry-Holson, Trevor E. Angell, Katherine A. Murphy, Connor H. Church, John R. Ohlfest, Peisheng Hu, and Alan L. Epstein. 2013. "Immunogenicity of Murine Solid Tumor Models as a Defining Feature of in Vivo Behavior and Response to Immunotherapy." *Journal of Immunotherapy* 36 (9): 477–89. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000436722.46675.4a>.
- Lee, Junghwa, Eunseon Ahn, Haydn T Kissick, and Rafi Ahmed. 2015. "Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway." *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics* 6 (1–2): 7–17. <https://doi.org/10.1615/forumimmundisther.2015014188>.
- Lehmann, Brian D, Bojana Jovanović, Xi Chen, Monica V Estrada, Kimberly N Johnson, Yu Shyr, Harold L Moses, Melinda E Sanders, and Jennifer A Pietenpol. 2016. "Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection." *PloS One* 11 (6): e0157368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368>.
- Lewis, Steven M., Adam Williams, and Stephanie C. Eisenbarth. 2019. "Structure and Function of the Immune System in the Spleen." *Science Immunology*. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau6085>.
- Li, Chunlin, Nengpan Zhang, Jundong Zhou, Chen Ding, Yaqing Jin, Xueyuan Cui, Kefeng Pu, and Yimin Zhu. 2018. "Peptide Blocking of PD-1/PD-L1 Interaction for Cancer Immunotherapy." *Cancer Immunology Research* 6 (2): 178–88. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0035>.
- Li, Dan, Xue Li, Wei-Lin Zhou, Yong Huang, Xiao Liang, Lin Jiang, Xiao Yang, et al. 2019. "Genetically Engineered T Cells for Cancer Immunotherapy." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019->

0070-9.

- Lindau, Dennis, Paul Gielen, Michiel Kroesen, Pieter Wesseling, and Gosse J. Adema. 2013. "The Immunosuppressive Tumour Network: Myeloid-Derived Suppressor Cells, Regulatory T Cells and Natural Killer T Cells." *Immunology*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/imm.12036>.
- Liu, Min, Xing Jin, Xigan He, Ling Pan, Xiumei Zhang, and Yunxue Zhao. 2015. "Macrophages Support Splenic Erythropoiesis in 4T1 Tumor-Bearing Mice." *PLoS ONE* 10 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121921>.
- Liu, Zhixian, Mengyuan Li, Zehang Jiang, and Xiaosheng Wang. 2018. "A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-Negative Breast Cancer." *Translational Oncology* 11 (2): 311–29. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.01.011>.
- Loi, Sherene, Damien Drubay, Sylvia Adams, Giancarlo Pruneri, Prudence A. Francis, Magali Lacroix-Triki, Heikki Joensuu, et al. 2019. "Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers." *Journal of Clinical Oncology* 37 (7): 559–69. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01010>.
- Loi, Sherene, Nicolas Sirtaine, Fanny Piette, Roberto Salgado, Giuseppe Viale, Françoise Van Eenoo, Ghizlane Rouas, Prudence Francis, John P.A. Crown, Erika Hitre, Evandro de Azambuja, et al. 2013. "Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98." *Journal of Clinical Oncology* 31 (7): 860–67. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>.
- Loi, Sherene, Nicolas Sirtaine, Fanny Piette, Roberto Salgado, Giuseppe Viale, Françoise Van Eenoo, Ghizlane Rouas, Prudence Francis, John P.A. Crown, Erika Hitre, Evandro De Azambuja, et al. 2013. "Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant

Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin with Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98.” *Journal of Clinical Oncology* 31 (7): 860–67.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>.

Lopez, Carolina B., T. Dharma Rao, Helen Feiner, Richard Shapiro, Jeffrey R. Marks, and Alan B. Frey. 1998. “Repression of Interleukin-2 mRNA Translation in Primary Human Breast Carcinoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes.” *Cellular Immunology* 190 (2): 141–55. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1390>.

MacCalli, Cristina, Andrea Volontè, Carolina Cimminiello, and Giorgio Parmiani. 2014. “Immunology of Cancer Stem Cells in Solid Tumours. A Review.” *European Journal of Cancer*. Pergamon.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.11.014>.

Madera, Laurence, and Robert E.W. Hancock. 2012. “Synthetic Immunomodulatory Peptide IDR-1002 Enhances Monocyte Migration and Adhesion on Fibronectin.” *Journal of Innate Immunity* 4 (5–6): 553–68.
<https://doi.org/10.1159/000338648>.

Mahdavi, Manijeh, and Violaine Moreau. 2016. “In Silico Designing Breast Cancer Peptide Vaccine for Binding to MHC Class I and II: A Molecular Docking Study.” *Computational Biology and Chemistry* 65 (December): 110–16.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.10.007>.

Maimela, Nomathamsanqa Resegofetse, Shasha Liu, and Yi Zhang. 2019. “Fates of CD8+ T Cells in Tumor Microenvironment.” *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.004>.

Malekian, Saba, Marveh Rahmati, Soyar Sari, Monireh Kazemimanesh, Raheleh Kheirbakhsh, Ahad Muhammadnejad, and Saeid Amanpour. 2020. “Expression of Diverse Angiogenesis Factor in Different Stages of the 4T1 Tumor as a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancer.” *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 10 (2): 323–28.

<https://doi.org/10.34172/apb.2020.039>.

Maman, Shelly, and Isaac P. Witz. 2018. "A History of Exploring Cancer in Context." *Nature Reviews Cancer* 18 (6): 359–76.

<https://doi.org/10.1038/s41568-018-0006-7>.

Manrique, Soraya Zorro, Ana L. Dominguez, Noweeda Mirza, Christopher D. Spencer, Judy M. Bradley, James H. Finke, James J. Lee, Larry R. Pease, Sandra J. Gendler, and Peter A. Cohen. 2016. "Definitive Activation of Endogenous Antitumor Immunity by Repetitive Cycles of Cyclophosphamide with Interspersed Tolllike Receptor Agonists." *Oncotarget* 7 (28): 42919–42.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10190>.

Marra, Antonio, Giulia Viale, and Giuseppe Curigliano. 2019. "Recent Advances in Triple Negative Breast Cancer: The Immunotherapy Era." *BMC Medicine*.

BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1326-5>.

Martinez-Usatorre, Amaia, Lorenzo F. Sempere, Santiago J. Carmona, Laura Carretero-Iglesia, Gwennaëlle Monnot, Daniel E. Speiser, Nathalie Rufer, et al. 2019. "MicroRNA-155 Expression Is Enhanced by T-Cell Receptor Stimulation Strength and Correlates with Improved Tumor Control in Melanoma." *Cancer Immunology Research* 7 (6): 1013–24.

<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0504>.

Martins, Filipe, Latifyan Sofiya, Gerasimos P. Sykiotis, Faiza Lamine, Michel Maillard, Montserrat Fraga, Keyvan Shabafrouz, et al. 2019. "Adverse Effects of Immune-Checkpoint Inhibitors: Epidemiology, Management and Surveillance." *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group.

<https://doi.org/10.1038/s41571-019-0218-0>.

McLane, Laura M., Mohamed S. Abdel-Hakeem, and E. John Wherry. 2019. "CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer." *Annual Review of Immunology* 37 (1): 457–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055318>.

Millrud, Camilla Rydberg, Caroline Bergenfelz, and Karin Leandersson. 2017. "On

the Origin of Myeloid-Derived Suppressor Cells.” *Oncotarget*. Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12278>.

Miura, Kouichi, Mitsuaki Ishioka, Shinichiro Minami, Yasuo Horie, Shigetoshi Ohshima, Takashi Goto, and Hirohide Ohnishi. 2016. “Toll-like Receptor 4 on Macrophage Promotes the Development of Steatohepatitis-Related Hepatocellular Carcinoma in Mice.” *Journal of Biological Chemistry* 291 (22): 11504–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709048>.

Miyashita, Minoru, Hironobu Sasano, Kentaro Tamaki, Hisashi Hirakawa, Yayoi Takahashi, Saki Nakagawa, Gou Watanabe, et al. 2015. “Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating CD8+ and FOXP3+ Lymphocytes in Residual Tumors and Alterations in These Parameters after Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer: A Retrospective Multicenter Study.” *Breast Cancer Research* 17 (1): 124. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0632-x>.

Moharil, Rohit, Alka Dive, Shubhangi Khandekar, and Ashish Bodhade. 2017. “Cancer Stem Cells: An Insight.” *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_132_16.

Montero Laura, Jacquelynne Cervantes-Torres, Edda Sciutto, and Gladis Fragoso. 2020. “Helminth-Derived Peptide GK-1 Induces Myd88-Dependent pro-Inflammatory Signaling Events in Bone Marrow-Derived Antigen-Presenting Cells.” *Molecular Immunology* 128 (December): 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.09.015>.

Mrass, Paulus, Hajime Takano, Lai Guan Ng, Sachin Daxini, Marcio O. Lasaro, Amaya Iparraguirre, Lois L. Cavanagh, et al. 2006. “Random Migration Precedes Stable Target Cell Interactions of Tumor-Infiltrating T Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 203 (12): 2749–61. <https://doi.org/10.1084/jem.20060710>.

Nahta, Rita, Gabriel N. Hortobágyi, and Francisco J. Esteva. 2003. “Growth Factor Receptors in Breast Cancer: Potential for Therapeutic Intervention.” *The*

Oncologist 8 (1): 5–17. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-1-5>.

Nanni, Patrizia, Giordano Nicoletti, Arianna Palladini, Stefania Croci, Annalisa Murgo, Marianna L. Ianzano, Valentina Grosso, et al. 2012. “Multiorgan Metastasis of Human HER-2+ Breast Cancer in Rag2^{-/-};Il2rg^{-/-} Mice and Treatment with PI3K Inhibitor.” *PLoS ONE* 7 (6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039626>.

NCI. National cancer institute. 2015. “What Is Cancer?” NIH. 2015.
<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

Neri, Simona, Erminia Mariani, Alessandra Meneghetti, Luca Cattini, and Andrea Facchini. 2001. “Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants.” *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY* 8 (6): 1131–35. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001>.

Noci, Valentino Le, Monica Tortoreto, Alessandro Gulino, Chiara Storti, Francesca Bianchi, Nadia Zaffaroni, Claudio Tripodo, Elda Tagliabue, Andrea Balsari, and Lucia Sfondrini. 2015. “Poly(I:C) and CpG-ODN Combined Aerosolization to Treat Lung Metastases and Counter the Immunosuppressive Microenvironment.” *OncImmunology* 4 (10): e1040214.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1040214>.

Organización Mundial de la Salud. 2018. “Las 10 Principales Causas de Defunción.” 2018. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Ostrand-Rosenberg, Suzanne, and Catherine Fenselau. 2018. “Their Environment Antitumor Immunity and Are Sculpted by Immune-Suppressive Cells That Impair Myeloid-Derived Suppressor Cells.”
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701019>.

Otano, Rafael, and Sihem Ait-oudhia. 2017. “Understanding the Role of PD-L1 / PD1 Pathway Blockade and Autophagy in Cancer Therapy,” 1803–7.

- Ouzounova, Maria, Eunmi Lee, Raziye Piranlioglu, Abdeljabar El Andaloussi, Ravindra Kolhe, Mehmet F. Demirci, Daniela Marasco, et al. 2017. "Monocytic and Granulocytic Myeloid Derived Suppressor Cells Differentially Regulate Spatiotemporal Tumour Plasticity during Metastatic Cascade." *Nature Communications* 8: 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms14979>.
- Paduch, Roman. 2015. "Theories of Cancer Origin." *European Journal of Cancer Prevention* 24 (1): 57–67. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000024>.
- Pan, Xing Qing. 2012. "The Mechanism of the Anticancer Function of M1 Macrophages and Their Use in the Clinic." *Chinese Journal of Cancer*. BioMed Central. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10046>.
- Papaccio, Federica, Francesca Paino, Tarik Regad, Gianpaolo Papaccio, Vincenzo Desiderio, and Virginia Tirino. 2017. "Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development." *Stem Cells Translational Medicine* 6 (12): 2115–25. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0138>.
- Papavramidou, Niki, Theodossis Papavramidis, and Thespis Demetriou. 2010. "Ancient Greek and Greco-Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer." *Annals of Surgical Oncology*. Springer. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0886-6>.
- Paschall, Amy V., and Kebin Liu. 2016. "An Orthotopic Mouse Model of Spontaneous Breast Cancer Metastasis." *Journal of Visualized Experiments* 2016 (114): 54040. <https://doi.org/10.3791/54040>.
- Pauken, Kristen E, and E John Wherry. 2015. "Overcoming T Cell Exhaustion in Infection and Cancer." *Trends in Immunology*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>.
- Peoples, George E., Peter S. Goedegebuure, Roy Smith, David C. Linehan, Ichiro Yoshino, and Timothy J. Eberlein. 1995. "Breast and Ovarian Cancer-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Recognize the Same HER2/Neu-Derived Peptide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America 92 (2): 432–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.2.432>.

Pérez-Torres, Armando, Jesús Vera-Aguilera, Juan Carlos Hernaiz-Leonardo, Eduardo Moreno-Aguilera, Diego Monteverde-Suarez, Carlos Vera-Aguilera, and Daniel Estrada-Bárceñas. 2013. “The Synthetic Parasite-Derived Peptide GK1 Increases Survival in a Preclinical Mouse Melanoma Model.” *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 28 (9): 682–90. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1438>.

Plummer, Martyn, Catherine de Martel, Jerome Vignat, Jacques Ferlay, Freddie Bray, and Silvia Franceschi. 2016. “Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2012: A Synthetic Analysis.” *The Lancet Global Health* 4 (9): e609–16. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7).

Pulaski, Beth A., and Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2000. “Mouse 4T1 Breast Tumor Model.” *Current Protocols in Immunology* 39 (1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.

Qian, Bin Zhi, Jiufeng Li, Hui Zhang, Takanori Kitamura, Jinghang Zhang, Liam R. Campion, Elizabeth A. Kaiser, Linda A. Snyder, and Jeffrey W. Pollard. 2011. “CCL2 Recruits Inflammatory Monocytes to Facilitate Breast-Tumour Metastasis.” *Nature* 475 (7355): 222–25. <https://doi.org/10.1038/nature10138>.

Reunanen, Niina, and VeliMatti Kähäri. 2013. “Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>.

Reynoso-Noverón, Nancy, and Juan Alejandro Torres-Domínguez. 2018. “Epidemiología Del Cáncer En México : Carga Global y Proyecciones 2000-2020 Epidemiology of Cancer in México : Global Burden and Projections 2000-2020.” *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual* 8 (1): 9–15.

Ribas, Antoni, Theresa Medina, Shivaani Kummar, Asim Amin, Anusha Kalbasi, Joseph J. Drabick, Minal Barve, et al. 2018. “Sd-101 in Combination with Pembrolizumab in Advanced Melanoma: Results of a Phase Ib, Multicenter Study.” *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0280>.

- Ribatti, Domenico. 2017. "The Concept of Immune Surveillance against Tumors. The First Theories." *Oncotarget*. Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12739>.
- Rodríguez-Rodríguez, Noé, Iris K. Madera-Salcedo, Emmanuel Bugarin-Estrada, Elizabeth Sánchez-Miranda, Diana Torres-García, Jacquelynne Cervantes-Torres, Gladis Fragoso, Florencia Rosetti, José C. Crispín, and Edda Sciutto. 2019. "The Helminth-Derived Peptide GK-1 Induces an Anti-Tumoral CD8 T Cell Response Associated with Downregulation of the PD-1/PD-L1 Pathway." *Clinical Immunology*, July. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.07.006>.
- Rogers, Laura M., Alicia K. Olivier, David K. Meyerholz, and Adam J. Dupuy. 2013. "Adaptive Immunity Does Not Strongly Suppress Spontaneous Tumors in a Sleeping Beauty Model of Cancer." *The Journal of Immunology* 190 (8): 4393–99. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203227>.
- Rognoni, Emanuel, and Gernot Walko. 2019. "The Roles of YAP/TAZ and the Hippo Pathway in Healthy and Diseased Skin." *Cells* 8 (5): 411. <https://doi.org/10.3390/cells8050411>.
- Roufas, Constantinos, Dimitrios Chasiotis, Anestis Makris, Christodoulos Efstathiades, Christos Dimopoulos, and Apostolos Zaravinos. 2018. "The Expression and Prognostic Impact of Immune Cytolytic Activity-Related Markers in Human Malignancies: A Comprehensive Meta-Analysis." *Frontiers in Oncology* 8 (FEB): 27. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00027>.
- Rožanov, Dmitri V., Nikita D. Rožanov, Kami E. Chiotti, Ashok Reddy, Phillip A. Wilmarth, Larry L. David, Seung W. Cha, et al. 2018. "MHC Class I Loaded Ligands from Breast Cancer Cell Lines: A Potential HLA-I-Typed Antigen Collection." *Journal of Proteomics* 176 (March): 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.004>.
- Rycaj, Kiera, and Dean G. Tang. 2015. "Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations." *Cancer Research* 75 (19): 4003–11. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0798>.

- Saeidi, Alireza, Keivan Zandi, Yi Ying Cheok, Hamidreza Saeidi, Won Fen Wong, Chalystha Yie Qin Lee, Heng Choon Cheong, Yean Kong Yong, Marie Larsson, and Esaki Muthu Shankar. 2018a. "T-Cell Exhaustion in Chronic Infections: Reversing the State of Exhaustion and Reinvigorating Optimal Protective Immune Responses." *Frontiers in Immunology* 9 (NOV): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02569>.
- Safarzadeh, Elham, Mona Orangi, Hamed Mohammadi, Farhad Babaie, and Behzad Baradaran. 2018. "Myeloid-Derived Suppressor Cells: Important Contributors to Tumor Progression and Metastasis." *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.26075>.
- Sakuishi, Kaori, Lionel Apetoh, Jenna M Sullivan, Bruce R Blazar, Vijay K Kuchroo, and Ana C Anderson. 2010. "Targeting Tim-3 and PD-1 Pathways to Reverse T Cell Exhaustion and Restore Anti-Tumor Immunity." *Journal of Experimental Medicine* 207 (10): 2187–94. <https://doi.org/10.1084/jem.20100643>.
- Salazar, Lupe G., Hailing Lu, Jessica L. Reichow, Jennifer S. Childs, Andrew L. Coveler, Doreen M. Higgins, James Waisman, Kimberly H. Allison, Yushe Dang, and Mary L. Disis. 2017. "Topical Imiquimod plus Nab-Paclitaxel for Breast Cancer Cutaneous Metastases: A Phase 2 Clinical Trial." *JAMA Oncology* 3 (7): 969–73. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6007>.
- Sánchez-Hernández, L., L. Montero, R. Mojica-Espinosa, J. P. Reyes-Grajeda, J. Cervantes-Torres, R. M. Parkhouse, G. Fragoso, and E. Sciutto. 2018a. "Impact of the GK-1 Adjuvant on Peritoneal Macrophages Gene Expression and Phagocytosis." *Immunology Letters* 201 (September): 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.010>.
- Schietinger, Andrea, and Philip D Greenberg. 2014. "Tolerance and Exhaustion: Defining Mechanisms of T Cell Dysfunction." *Trends in Immunology* 35 (2): 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.001>.
- Schlecker, Eva, Ana Stojanovic, Christian Eisen, Christian Quack, Christine S. Falk, Viktor Umansky, and Adelheid Cerwenka. 2012. "Tumor-Infiltrating

Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth.” *The Journal of Immunology* 189 (12): 5602–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201018>.

Schreiber, Robert D., Lloyd J. Old, and Mark J. Smyth. 2011. “Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s Roles in Cancer Suppression and Promotion.” *Science* 331 (6024): 1565–70. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.

Schultze, Joachim L., and Robert H. Vonderheide. 2001. “From Cancer Genomics to Cancer Immunotherapy: Toward Second-Generation Tumor Antigens.” *Trends in Immunology*. Trends Immunol. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02015-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02015-4).

Segura-Velázquez, R., A. Pérez-Torres, G. Rosas, A. Toledo, M. Restelli, E. Acosta, R. Corral, et al. 2006a. “A Novel Synthetic Adjuvant Effectively Enhances the Immunogenicity of the Influenza Vaccine.” *Vaccine* 24 (8): 1073–80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.014>.

Segura-Velazquez, René, Gladis Fragoso, Edda Sciutto, and Adelaida Sarukhan. 2009. “Towards Identification of the Mechanisms of Action of Parasite-Derived Peptide GK1 on the Immunogenicity of an Influenza Vaccine □.” *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY* 16 (9): 1338–43. <https://doi.org/10.1128/CVI.00106-09>.

Segura-Velázquez, René, Gladis Fragoso, Edda Sciutto, and Adelaida Sarukhan. 2009. “Towards Identification of the Mechanisms of Action of Parasite-Derived Peptide GK1 on the Immunogenicity of an Influenza Vaccine.” *Clinical and Vaccine Immunology* 16 (9): 1338–43. <https://doi.org/10.1128/CVI.00106-09>.

Seo, A. N., H. J. Lee, E. J. Kim, H. J. Kim, M. H. Jang, H. E. Lee, Y. J. Kim, J. H. Kim, and S. Y. Park. 2013. “Tumour-Infiltrating CD8+ Lymphocytes as an Independent Predictive Factor for Pathological Complete Response to Primary Systemic Therapy in Breast Cancer.” *British Journal of Cancer* 109 (10): 2705–13. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.634>.

- Shah, Ali Mujtaba, Zhisheng Wang, and Jian Ma. 2020. "Glutamine Metabolism and Its Role in Immunity, a Comprehensive Review." *Animals*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10020326>.
- Shankaran, Vijay, Hiroaki Ikeda, Allen T. Bruce, J. Michael White, Paul E. Swanson, Lloyd J. Old, and Robert D. Schreiber. 2001. "IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity." *Nature* 410 (6832): 1107–11. <https://doi.org/10.1038/35074122>.
- Shi, Feng, Hong Chang, Quan Zhou, Yan Jie Zhao, Guang Jiang Wu, and Qing Kun Song. 2018. "Distribution of CD4 + and CD8 + Exhausted Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Molecular Subtypes of Chinese Breast Cancer Patients." *OncoTargets and Therapy* 11: 6139–45. <https://doi.org/10.2147/OTT.S168057>.
- Shoombuatong, Watshara, Nalini Schaduangrat, and Chanin Nantasenamat. 2018. "Unraveling the Bioactivity of Anticancer Peptides as Deduced from Machine Learning." *EXCLI Journal* 17 (July): 734–52. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1447>.
- Simon, Sylvain, and Nathalie Labarriere. 2018. "PD-1 Expression on Tumor-Specific T Cells: Friend or Foe for Immunotherapy?" *OncolImmunology*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1364828>.
- Sistrunk, W E, and W C Maccarty. 1922. "LIFE EXPECTANCY FOLLOWING RADICAL AMPUTATION FOR CARCINOMA OF THE BREAST: A CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDY OF 218 CASES." *Annals of Surgery* 75 (1): 61–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17864583>.
- Skriver, Signe Korsgaard, Maj Britt Jensen, Ann Soegaard Knoop, Bent Ejlersen, and Anne Vibeke Laenkholm. 2020. "Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Letrozole in Patients with Early Oestrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Analysis from a Nationwide Phase II DBCG Trial." *Breast Cancer Research* 22 (1): 46. <https://doi.org/10.1186/s13058-020->

01285-8.

- Slingluff, Craig L. 2011. "The Present and Future of Peptide Vaccines for Cancer: Single or Multiple, Long or Short, Alone or in Combination?" *Cancer Journal*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318233e5b2>.
- Smyth, Mark J, Shin Foong Ngiow, Antoni Ribas, and Michele W L Teng. 2016. "Combination Cancer Immunotherapies Tailored to the Tumour Microenvironment." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 13 (3): 143–58. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.209>.
- Snell, Laura M., Tracy L. McGaha, and David G. Brooks. 2017. "Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer." *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.05.005>.
- Soman, Neelesh R., Steven L. Baldwin, Grace Hu, Jon N. Marsh, Gregory M. Lanza, John E. Heuser, Jeffrey M. Arbeit, Samuel A. Wickline, and Paul H. Schlesinger. 2009. "Molecularly Targeted Nanocarriers Deliver the Cytolytic Peptide Melittin Specifically to Tumor Cells in Mice, Reducing Tumor Growth." *Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2830–42. <https://doi.org/10.1172/JCI38842>.
- Somanchi, Srinivas S, Kelsey J Mcculley, Anitha Somanchi, Leo L Chan, and Dean A Lee. 2015. "A Novel Method for Assessment of Natural Killer Cell Cytotoxicity Using Image Cytometry." <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141074>.
- Souza Albernaz, Marta de, Fagner Santos do Carmo, Edward Helal-Neto, Sofia dos Santos Nascimento, and Ralph Santos-Oliveira. 2017. "Breast Cancer: Carcinogenesis, Diagnosing and Treatment." *European Journal of Oncology* 22 (2): 53–64.
- Standish, Leanna J., Erin S. Sweet, Jeffrey Novack, Cynthia A. Wenner, Carly Bridge, Ana Nelson, Mark Martzen, and Carolyn Torkelson. 2008. "Breast Cancer and the Immune System." *Journal of the Society for Integrative Oncology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.2310/7200.2008.0027>.

- Stanton, Sasha E., and Mary L. Disis. 2016. "Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>.
- Stoner, Gary D, and Michael B Shimkin. 1982. *STRAIN A MOUSE LUNG TUMOR BIOASSAY OH 43614*.
- Sun, Jiali, Gianpietro Dotti, Leslie E. Huye, Aaron E. Foster, Barbara Savoldo, Maria M. Gramatges, David M. Spencer, and Cliona M. Rooney. 2010. "T Cells Expressing Constitutively Active Akt Resist Multiple Tumor-Associated Inhibitory Mechanisms." *Molecular Therapy* 18 (11): 2006–17. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.185>.
- Sun, Ting, Wenjia Zhang, Yuan Li, Zhengyu Jin, Yang Du, Jie Tian, and Huadan Xue. 2020. "Combination Immunotherapy with Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Antigen-4 and Programmed Death Protein-1 Inhibitors Prevents Postoperative Breast Tumor Recurrence and Metastasis." *Molecular Cancer Therapeutics* 19 (3): 802–11. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0495>.
- Sun, Xiaoming, and Paul D. Kaufman. 2018. "Ki-67: More than a Proliferation Marker." *Chromosoma*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>.
- Swann, Jeremy B., and Mark J. Smyth. 2007. "Immune Surveillance of Tumors." *Journal of Clinical Investigation*. J Clin Invest. <https://doi.org/10.1172/JCI31405>.
- Teng, Michele W L, and Mark J Smyth. 2017. "Cancer Immunoediting and Resistance." *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>.
- Terranova-Barberio, Manuela, Nela Pawlowska, Mallika Dhawan, Mark Moasser, Amy J. Chien, Michelle E. Melisko, Hope Rugo, et al. 2020. "Exhausted T Cell Signature Predicts Immunotherapy Response in ER-Positive Breast Cancer." *Nature Communications* 11 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020->

17414-y.

Torres-García, D., A. Pérez-Torres, K. Manoutcharian, U. Orbe, R. Servín-Blanco, G. Fragoso, and E. Sciutto. 2017. "GK-1 Peptide Reduces Tumor Growth, Decreases Metastatic Burden, and Increases Survival in a Murine Breast Cancer Model." *Vaccine* 35 (42): 5653–61.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.060>.

Turnis, Meghan E., Lawrence P. Andrews, and Dario A.A. Vignali. 2015. "Inhibitory Receptors as Targets for Cancer Immunotherapy." *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/eji.201344413>.

Turnis, Meghan E, Lawrence P Andrews, and Dario A A Vignali. n.d. "Inhibitory Receptors as Targets for Cancer Immunotherapy."

<https://doi.org/10.1002/eji.201344413>.

University of Groningen. 2015. "A Review of Common Characteristics of Complex Systems." Future Learn. 2015.

<https://www.futurelearn.com/courses/complexity-and-uncertainty/0/steps/1836>.

Vera-Aguilera, Jesus, Armando Perez-Torres, Diego Beltran, Cynthia Villanueva-Ramos, Mitchell Wachtel, Eduardo Moreno-Aguilera, Carlos Vera-Aguilera, Gary Ventolini, Raul Martínez-Zaguilán, and Souad R. Sennoune. 2017.

"Novel Treatment of Melanoma: Combined Parasite-Derived Peptide GK-1 and Anti-Programmed Death Ligand 1 Therapy." *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 32 (2): 49–56. <https://doi.org/10.1089/cbr.2016.2123>.

Verma, Mukesh. 2012. "Personalized Medicine and Cancer." *Journal of Personalized Medicine*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jpm2010001>.

Viana, Kelvinson Fernandes, Rodrigo Dian Oliveira Aguiar-Soares, Henrique Gama Ker, Lucilene Aparecida Resende, Elaine Maria Souza-Fagundes, Walderez Ornelas Dutra, Ricardo Toshio Fujiwara, et al. 2015. "Setting the Proportion of CD4+ and CD8+ T-Cells Co-Cultured with Canine Macrophages Infected with *Leishmania Chagasi*." *Veterinary Parasitology* 211 (3–4): 124–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.025>.

- Vigneron, Nathalie. 2015. "Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy." *BioMed Research International* 2015: 948501. <https://doi.org/10.1155/2015/948501>.
- Visvader, Jane E. 2011. "Cells of Origin in Cancer." *Nature* 469 (7330): 314–22. <https://doi.org/10.1038/nature09781>.
- Wahba, Hanan Ahmed, and Hend Ahmed El-Hadaad. 2015. "Current Approaches in Treatment of Triple-Negative Breast Cancer." *Cancer Biology and Medicine*. *Cancer Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0030>.
- Wang, Hongyan, Daina Lim, and Christopher E. Rudd. 2010. "Immunopathologies Linked to Integrin Signalling." *Seminars in Immunopathology*. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0202-3>.
- Wang, Jin Cheng, Yong Xu, Zheng Ming Huang, and Xiao Jie Lu. 2018. "T Cell Exhaustion in Cancer: Mechanisms and Clinical Implications." *Journal of Cellular Biochemistry* 119 (6): 4279–86. <https://doi.org/10.1002/jcb.26645>.
- Wang, Xin Rong, Bao En Shan, Jun Ai, Li Hua Liu, Yue Cai Liu, Chao Zhang, Hai Pu Zhang, and Deng Xiang Liu. 2010. "Enrichment and Identification of Cancer Stem Cell-like Cells in Mouse Breast Cancer Cell Line 4T1." *Chinese Journal of Cancer Biotherapy* 17 (4): 381–85. <https://doi.org/10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.004>.
- Wang, Yifei, Jianjun Hu, Yiding Li, Minglu Xiao, Haoqiang Wang, Qin Tian, Zhirong Li, et al. 2019. "The Transcription Factor TCF1 Preserves the Effector Function of Exhausted CD8 T Cells During Chronic Viral Infection." *Frontiers in Immunology* 10 (February). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00169>.
- Wherry, E. John. 2011. "T Cell Exhaustion." *Nature Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>.
- Wherry, E. John, Sang Jun Ha, Susan M. Kaech, W. Nicholas Haining, Surojit Sarkar, Vandana Kalra, Shruti Subramaniam, Joseph N. Blattman, Daniel L.

- Barber, and Rafi Ahmed. 2007. "Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection." *Immunity* 27 (4): 670–84.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.006>.
- Wherry, E John, and Makoto Kurachi. 2015. "Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion." *Nature Reviews. Immunology* 15 (8): 486–99.
<https://doi.org/10.1038/nri3862>.
- Witsch, Esther, Michael Sela, and Yosef Yarden. 2010. "Roles for Growth Factors in Cancer Progression." *Physiology*. American Physiological Society.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>.
- Wu, Jiazhu, and Huidong Shi. 2017. "Unlocking the Epigenetic Code of T Cell Exhaustion." *Translational Cancer Research* 6: 384–87.
<https://doi.org/10.21037/tcr.2017.03.02>.
- Yang, Shengyu, J. Jillian Zhang, and Xin-Yun Huang. 2012. "Mouse Models for Tumor Metastasis." In *Rational Drug Design*, 928:221–28. Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-008-3_17.
- Yang, Xiaojing, Hanru Ren, Yi Sun, Yuhui Shao, Lihua Zhang, Hongling Li, Xiulong Zhang, Xinmiao Yang, Weiwei Yu, and Jie Fu. 2017. "Prognostic Significance of CD4/CD8 Ratio in Patients with Breast Cancer." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 10 (4): 4787–93.
- Yao, Han, Huanbin Wang, Chushu Li, Jing-yuan Fang, and Jie Xu. 2018. "Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy." *Frontiers in Immunology* 9 (July): 1774–81.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01774>.
- Yi, John S., Maureen A. Cox, and Allan J. Zajac. 2010. "T-Cell Exhaustion: Characteristics, Causes and Conversion." *Immunology* 129 (4): 474–81.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03255.x>.
- Youn, Je-In, Srinivas Nagaraj, Michelle Collazo, and Dmitry I. Gabrilovich. 2008. "Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice." *The*

Journal of Immunology 181 (8): 5791–5802.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5791>.

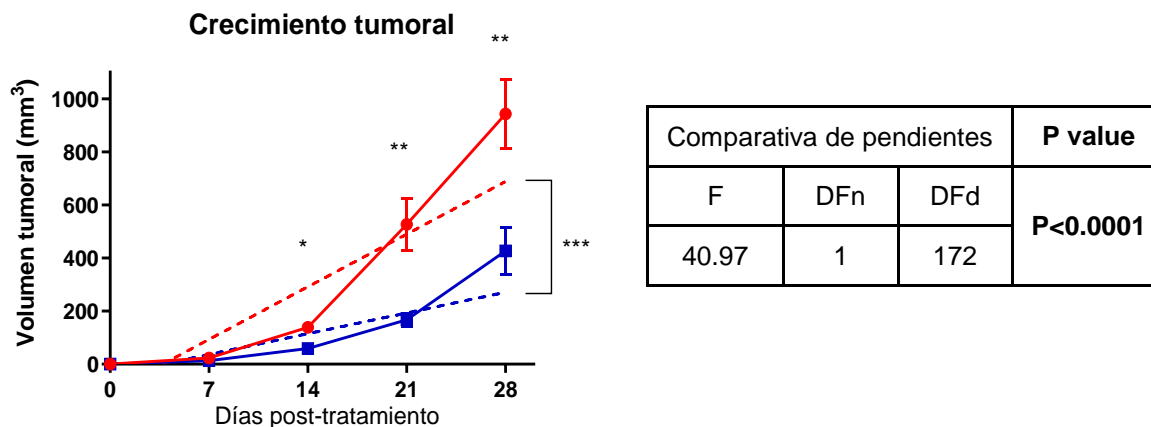
- Zarour, Hassane M. 2016. “Reversing T-Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer.” <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1849>.
- Zeng, Xianke, and Douglas Yee. 2013. “Insulin-Like Growth Factors and Breast Cancer Therapy.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6394/>.
- Zgura, Anca, Laurentia Galesa, Elvira Bratila, and Rodica Anghel. 2018. “Relationship between Tumor Infiltrating Lymphocytes and Progression in Breast Cancer.” *Maedica* 13 (4): 317–20.
<https://doi.org/10.26574/maedica.2018.13.4.317>.
- Zhang, Meng, Dian Gao, Yanmei Shi, Yifan Wang, Rakesh Joshi, Qiongfang Yu, Daheng Liu, et al. 2019. “MiR-149-3p Reverses CD8+ T-Cell Exhaustion by Reducing Inhibitory Receptors and Promoting Cytokine Secretion in Breast Cancer Cells.” *Open Biology* 9 (10): 190061.
<https://doi.org/10.1098/rsob.190061>.
- Zhang, Meng, Yanmei Shi, Yujuan Zhang, Yifan Wang, Faizah Alotaibi, Li Qiu, Hongmei Wang, et al. 2020. “MiRNA-5119 Regulates Immune Checkpoints in Dendritic Cells to Enhance Breast Cancer Immunotherapy.” *Cancer Immunology, Immunotherapy* 69 (6): 951–67. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02507-w>.
- Zhang, Qiang, Lorenzo Gerrata, Lisa Flaum, Ami N. Shah, Brian Helfand, Youbin Zhang, William John Gradishar, Leonidas C. Plataniias, and Massimo Cristofanilli. 2018. “Dynamic Changes of Interleukin 2 (IL-2) and Circulating Tumor Cells (CTCs) in Patients with Advanced Breast Cancer (BCa) after Systemic Therapies.” *Journal of Clinical Oncology* 36 (15_suppl): 1090–1090.
https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.15_suppl.1090.
- Zhang, Zhen, Shasha Liu, Bin Zhang, Liang Qiao, Yi Zhang, and Yi Zhang. 2020. “T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (February). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00017>.

-
- Zhao, By G., John P. Vasilakos, Debra Tross, Dmitri Smirnov, and Dennis M. Klinman. 2014. "Combination Therapy Targeting Toll like Receptors 7, 8 and 9 Eliminates Large Established Tumors." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-12>.
- Zhu, Ha, Yan Gu, Yiquan Xue, Ming Yuan, Xuetao Cao, and Qiuyan Liu. 2017. "CXCR2+ MDSCs Promote Breast Cancer Progression by Inducing EMT and Activated T Cell Exhaustion." *Oncotarget* 8 (70): 114554–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23020>.
- Zou, Fan, Lijuan Lu, Jun Liu, Baijin Xia, Wanying Zhang, Qifei Hu, Weiwei Liu, et al. 2019. "Engineered Triple Inhibitory Receptor Resistance Improves Anti-Tumor CAR-T Cell Performance via CD56." *Nature Communications* 10: 4109. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11893-4>.

XIII. ANEXOS

A1. Suplementarias

Análisis de regresión lineal del crecimiento tumoral



Regresión lineal		
	Control	GK-1 100µg
Pendiente	28.32	11.17
Intercepto Y	-105	-41.54
Intercepto X	3.707	3.720
R	0.779	0.745
Ecuación	$Y = 28.32 \cdot X - 105.0$	$Y = 11.17 \cdot X - 41.54$

Suplementaria 1. Regresión lineal del crecimiento tumoral del modelo 4T1. El tratamiento de GK-1 i.v. disminuyó el crecimiento tumoral de manera significativa desde el día 14 post-tratamiento, por otro lado, al realizar un análisis de regresión lineal para conocer la tasa de crecimiento, podemos observar que el tratamiento reduce a la mitad la tasa en comparación al control. Además, las pendientes son estadísticamente diferentes a través de una prueba F.

Producción de citocinas de linfocitos en bazo y tumor

Se cuantificó la producción de IL-2, IFN γ y granzima B de linfocitos T extraídos de tumor o bazo, después de la estimulación con PMA/ionomicina *in-vitro*. Se analizaron 3 ratones por grupo, con un total de 12 animales; se detectaron las proteínas a través de citometría de flujo.

Suplementaria 2. Activación de linfocitos extraídos de tumor. GK-1 aumenta la capacidad de producción y la cantidad de células positivas CD4 para IFN- γ e IL-2, mientras que las células CD8 existió un aumento de IFN γ e GZB. El análisis se realizó a partir de un gate (CD3+CD4+) o (CD3+CD8+). Se realizó un análisis multivariable para evaluar en conjunto la cantidad de células positivas como la producción de las moléculas. Se muestra la media y el error estándar. Se utilizó una MANOVA- T cuadrada de Hotelling. Por grupo fueron N=3. *p<0.05; **p<0.01.

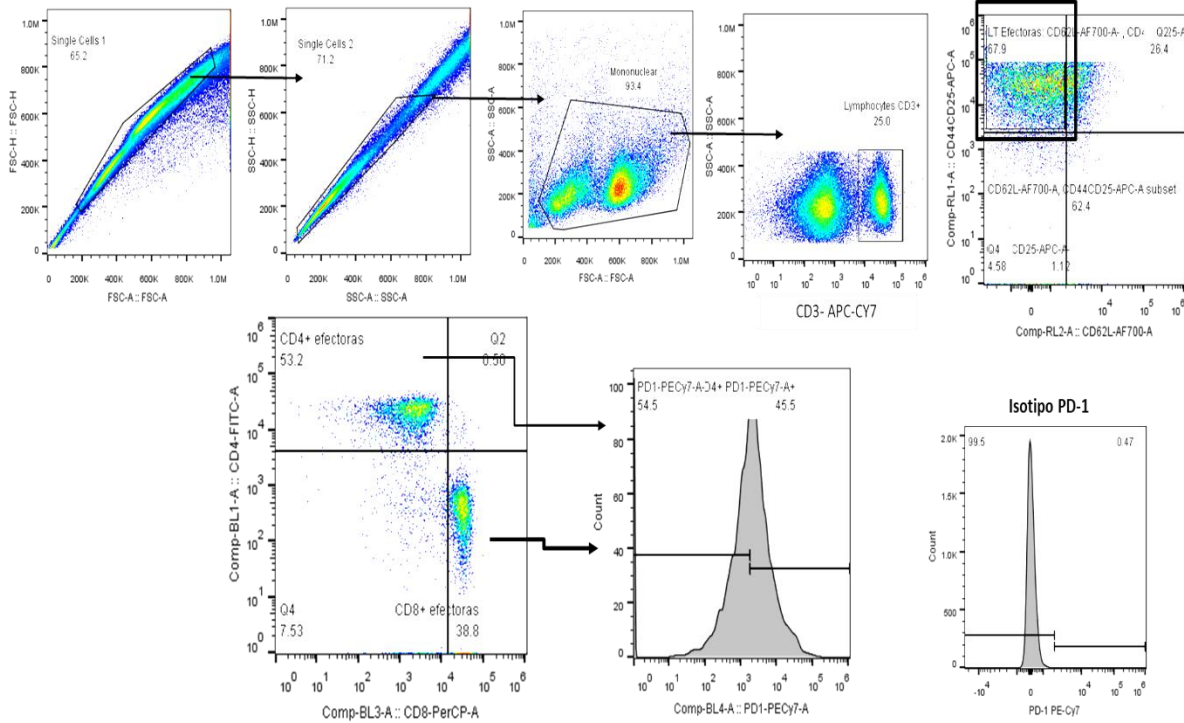
TUMOR			IFN- γ		GZB		IL-2	
			% Relativo	gMFI	% Relativo	gMFI	% Relativo	gMFI
21 Días post tratamiento	CD4+	GK-1	68.86±4.69	303.33±17.32	12.15±1.96	132.0±23.89	43.60±4.40	220.3±13.30
		Control	59.7±1.85	252.0±3.78	10.90±2.26	198.66±36.71	39.6±4.04	153.33±0.838
	CD8+	GK-1	56.86±3.09*	404.66±30.89*	43.66±3.08**	848.66±58.52**	59.96±1.98	279.33±12.23
		Control	39.86±1.68	331.66±3.71	11.76±3.67	596.66±14.25	59.96±1.98	218.66±10.69
28 Días post tratamiento	CD4+	GK-1	68.08±4.23*	369.33±10.52*	16.16±1.69	132.0±12.58	51.63±0.16*	298.33±6.94*
		Control	57.03±1.24	270.33±17.27	19.26±2.24	102.52±35.12	35.53±5.1	176.4 ±8.83
	CD8+	GK-1	68.1±3.69*	458.66±9.33*	61.7±3.21**	819.66±65.50**	61.66±1.41	231.0±635.95
		Control	39.46±1.05	325.66±13.59	45.26±1.14	417.0±7.535	61.66±1.41	197.07±8.02

Suplementaria 2 Activación de linfocitos extraídos de bazo. GK-1 parece no tener un efecto significativo en los linfocitos de bazo, manteniendo los niveles prácticamente iguales. El análisis se realizó a partir de un gate (CD3+CD4+) o (CD3+CD8+). Se realizó un análisis multivariable para evaluar en conjunto la cantidad de células positivas como la producción de las moléculas. Se muestra la media y el error estándar. Se utilizó una MANOVA- T cuadrada de Hotelling. Por grupo fueron N=3. *p<0.05; **p<0.01.

BAZO			IFN- γ		GZB		IL-2	
			% Relativo	gMFI	% Relativo	gMFI	% Relativo	gMFI
21 Días post tratamiento	CD4+	GK-1	68.86±4.69	303.33±17.32	13.2±1.23	108.66±28.80	37.26±4.26	186±7.68
		Control	54.1±1.46	308.0±17.387	12.9±1.23	180±17.94	39.4±2.05	187.33±684
	CD8+	GK-1	62.2±3.65	440.33±18.08	62.9±3.73	701.66±55.37	64.16±1.72	323.66±5.89
		Control	59.00±2.96	369.33±6.84	60.03±3.31	660.66±78	52.06±0.47	272.33±16.46
28 Días post tratamiento	CD4+	GK-1	81.53±2.46	350.0±7.26	18±1.76	523.0±22.45	45.43±1.80	202.33±5.014
		Control	60.86±2.19	311.66±12.23	13.2±0.76	564.66±13.19	39.30±1.50	197.0±2.84
	CD8+	GK-1	64.56±1.56	461.0±11.55	60.16±1.35	870.33±26.28	62.83±1.48	301.33±5.71
		Control	52.13±1.6	384.66±12.65	55.05±1.63	582.33±23.14	58.13±0.67	254.0±6.51

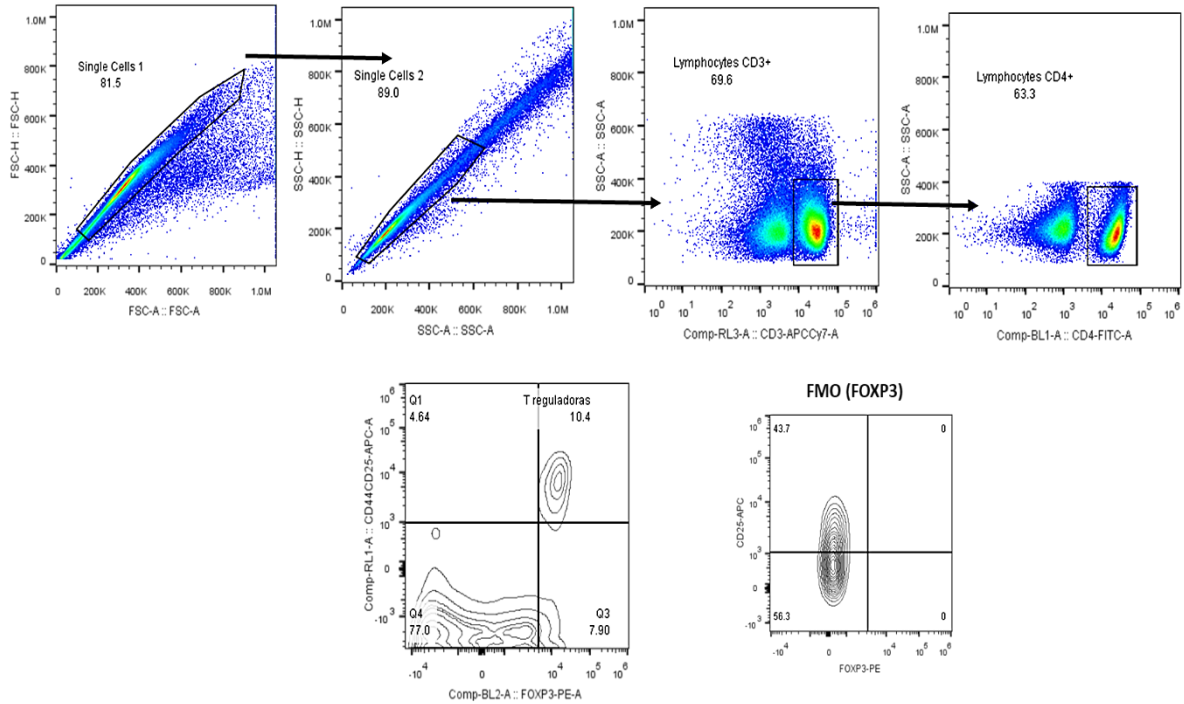
Estrategias de análisis

Imunofenotipo: Expresión de PD-1



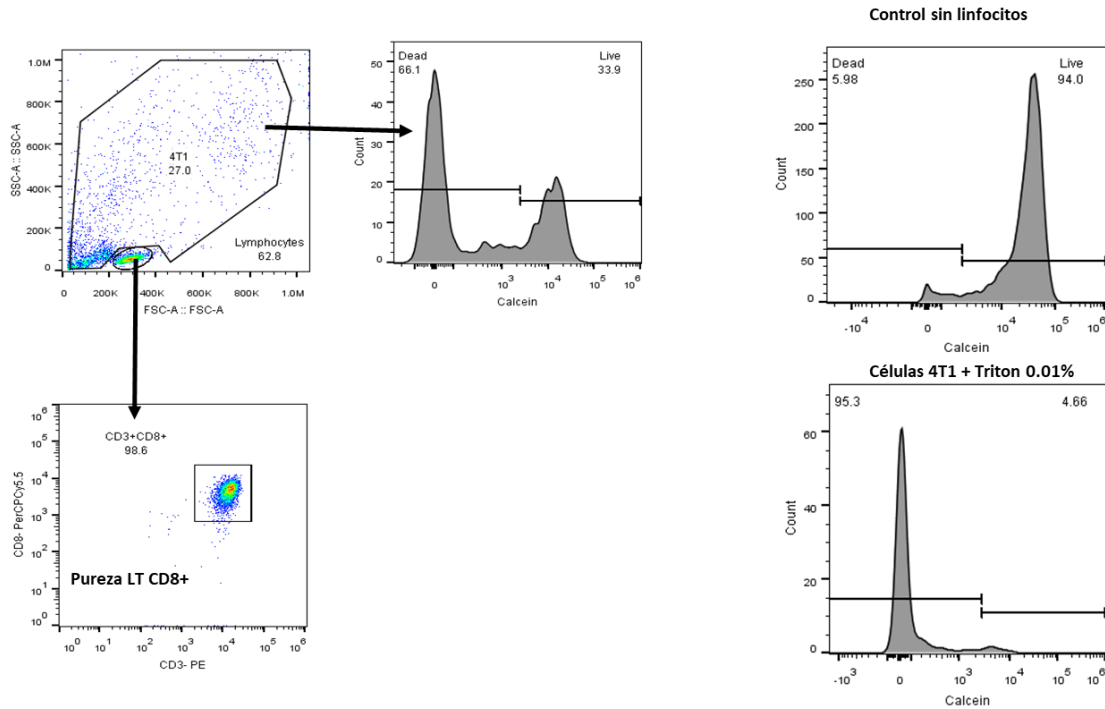
Suplementaria 2. Estrategia de análisis para determinar la cantidad de linfocitos T en bazo, linfonodo y tumor, así como su expresión de PD-1. Se utilizó una estrategia de dobles eventos sencillos ante la carencia de un control de viabilidad para citometría, cabe señalar que la viabilidad fue verificada a través del método de azul tripan y en todos los casos superaba el 95%. Se eligió las poblaciones francamente positivas, en los casos donde no se visualizaba una población clara, se pasó a usar el control de isotipo y el de tinción sencilla para determinar el corte para determinar si una población era positiva para el marcador o no. Se pasaron entre 100,000- 1,000,000 de eventos para obtener la mayor cantidad de linfocitos T, en todos los casos se normalizó con el conteo celular y el peso de los tejidos.

Inmunofenotipo: Linfocitos T reguladores



Estrategia de análisis para determinar la cantidad de linfocitos T reguladores en bazo, linfonodo y tumor. Los linfocitos T reguladores se describen como células con expresión de FOXP3 y CD25. Se utilizó una estrategia de dobles eventos sencillos ante la carencia de un control de viabilidad para citometría, cabe señalar que la viabilidad fue verificada a través del método de azul tripan y en todos los casos superaba el 95%. Se eligió las poblaciones francamente positivas, en los casos donde no se visualizaba una población clara, se pasó a usar el control de isotipo o en el caso de FOXP3 se utilizó un FMO (FLuorescence minus one) para determinar el corte y así definir si una población era positiva para el marcador o no. Se pasaron entre 100,000- 1,000,000 de eventos para obtener la mayor cantidad de linfocitos T, en todos los casos se normalizó con el conteo celular y el peso de los tejidos.

Citotoxicidad mediada por células en cultivo celular

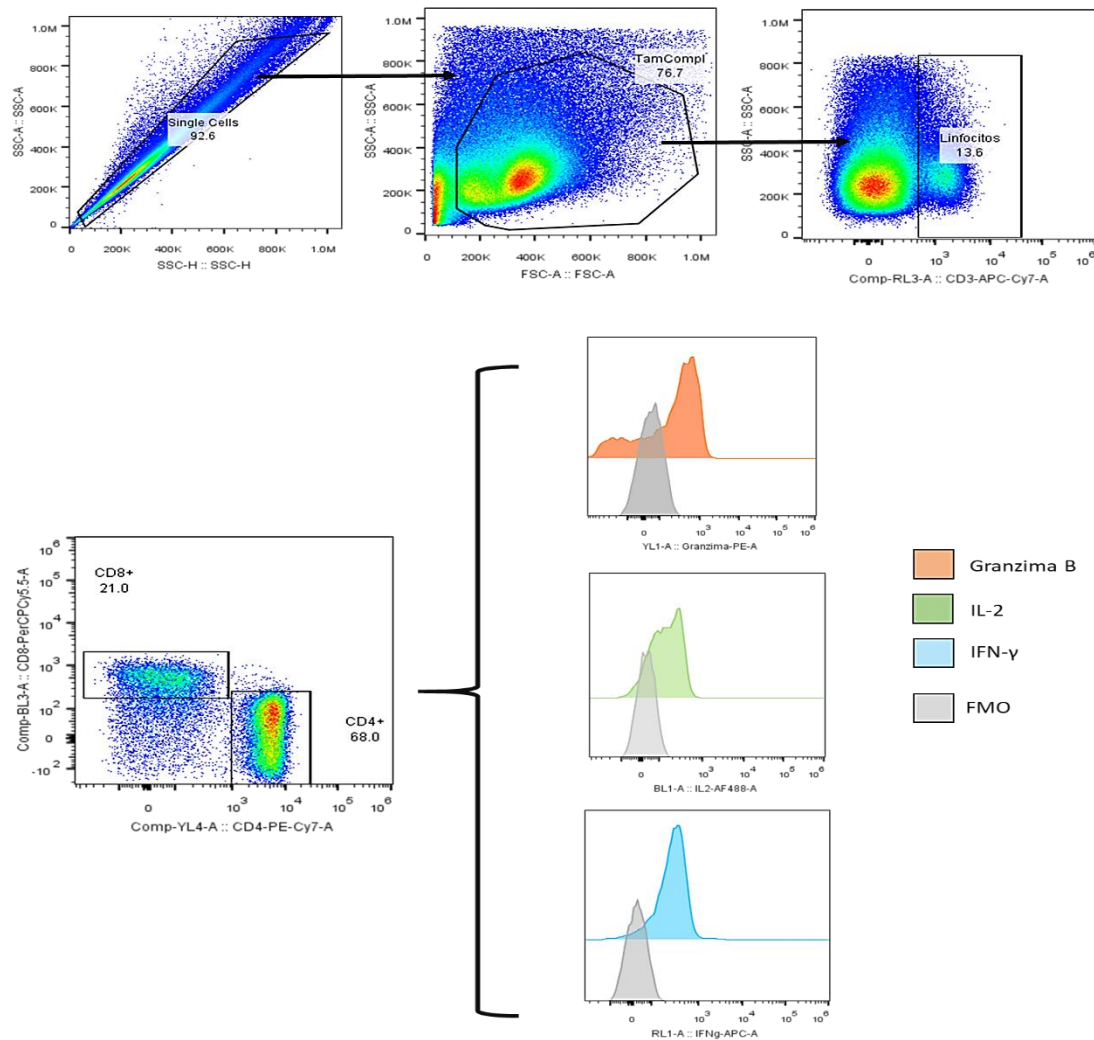


Estrategia de análisis para determinar la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+ frente a la línea 4T1. Se cultivaron linfocitos T purificados de tumor o bazo y se evaluó la capacidad citotóxica ejercida. Se identificaron las células 4 T1 teñidas con calceína en el citómetro a través de una tinción sencilla, estas células tienen gran diversidad en tamaño y complejidad, así mismo se identificaron los linfocitos T CD8 y se identificó una pureza mayor al 98%, pureza similar al muestra realizado durante el sorting. Con el gate de células 4T1 se cuantifico el % de células vivas y muertas y apartir del control sin linfocitos se cuantificó la citotoxicidad como muestra la siguiente formula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{(CF \text{ CLE}) - (CF \text{ P})}{(CF \text{ CLE})} \times 100$$

Donde: CF-CLE: Células fluorescentes en el control de liberación espontánea o también llamado *control sin linfocitos.*, CFP: Células fluorescentes en la prueba. En el caso del control de células 4T1 + Tritón 0.01%, se utilizó para la liberación máxima para el método de fluorimetría. En esta imagen se observa que al menos el 95% de células perdieron la tinción de calceína y si es correcto usarlo como un control de liberación máxima.

Tinción intracelular para citocinas



Estrategia de análisis para la cuantificación de IL-2, IFN γ y GZB de linfocitos T extraídos de tumor o bazo. Se estimularon linfocitos T extraídos de bazo o tumor durante 6 h con PMA/Ionomicina + Brefeldina. Una vez estimulados se tiñeron superficialmente e intracelularmente. La expresión de las proteínas se hizo en CD3+CD4+ y en CD3+CD8+, en todos los casos el corte de células positivas se realizó con base al control FMO (marcado en gris). De este análisis se obtuvo el % de células positivas a IL-2, IFN γ y GZB, así como la gMFI de este porcentaje, ambos valores fueron utilizados para hacer el análisis estadístico. Para cada grupo N= 6 ratones, 3 por 21 dpt y 3 por 28dpt. N=12 en total.

A2. Reactivos y soluciones

- PBS (1x) (Buffer de Fosfatos) pH= 7.4
 - NaCl (JT Baker) 138mM
 - KCl (JT Baker) 3mM
 - Na₂HPO₄ (JT Baker) 8mM
 - KH₂PO₄ (JT Baker) 1.5mM
 - dH₂O c.b.p. 1.0L
- Solución de lisis de eritrocitos
 - NH₄Cl (JT Baker) 160mM
 - EDTA (Thermo) 0.1mM
 - KHCO₃ (JT Baker) 7mM
 - PBS + 5% SFB
 - PBS 1x
- Suero fetal bovino (SFB) 5%
- Solución salina isotónica CS-PISA
 - NaCl 0.9%*m/v*
 - dH₂O c.b.p 1.0L
- Paraformaldehído 4%
 - Paraformaldehído JT Baker 4g
 - PBS 1x 100mL
 - Preparar en campana de extracción hasta ebullición del líquido, agitar y filtrar al finalizar.*
- Solución de Verseno
 - PBS 1x
 - EDTA 0.53mM
- Conjunto de tampones de tinción Foxp3/Transcription Factor eBioscience. Cat. 00552300
 - Buffer de permeabilización 10x . Diluir con ddH₂O a 1x
 - Contiene Saponina
 - Buffer de fijación y permeabilización 4x. Diluir con diluyente a 1x

Contiene paraformaldehído

Diluyente para el buffer de permeabilización

- BD Cytofix/Cytoperm Plus Kit . Cat. 555028

Buffer de fijación y permeabilización

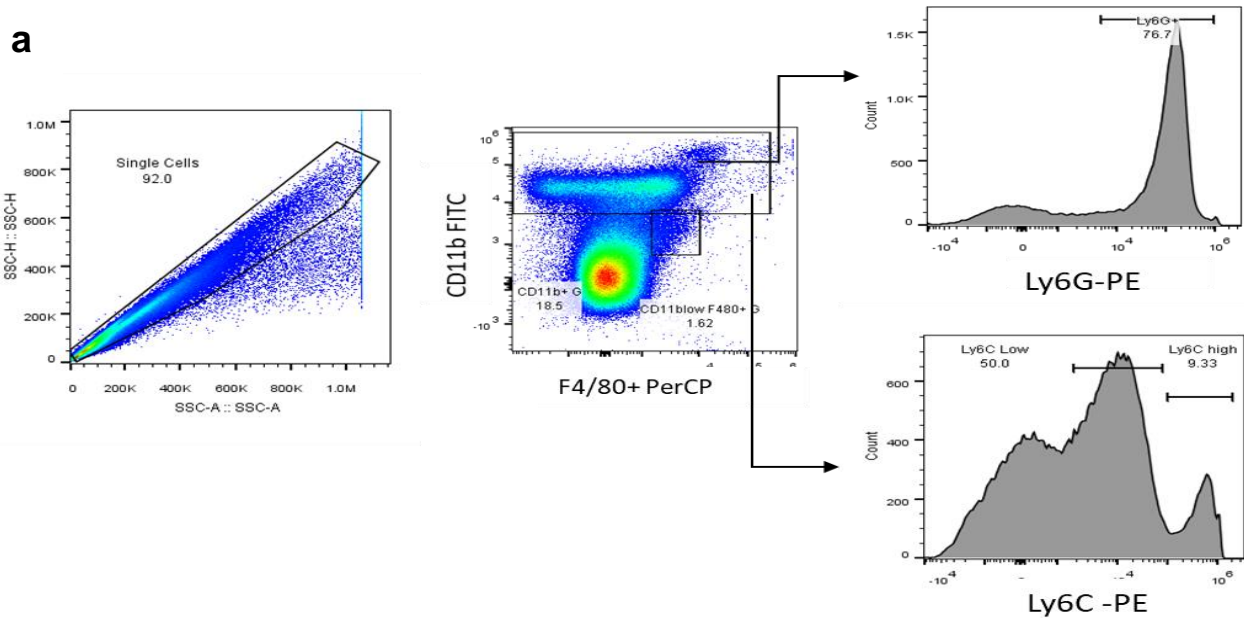
Buffer de lavado y permeabilización 10x. Diluir con ddH₂O a 1x

- Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ Cat. 550583
- Medio de cultivo RPMI 1640- GIBCO™. Cat. 11875101
- Suero Fetal Bovino GIBCO™ Cat. 10082139
- Línea celular 4T1. ATCC CRL-2539
- Ficoll Plaque Plus (GE) Healthcare. Cat. GE17-144002
- Azul Tripano 0.4% GIBCO™ Cat. 15250061
- Tripsina 0.05% con EDTA 0.53mM Corning®. Cat. 25051CI

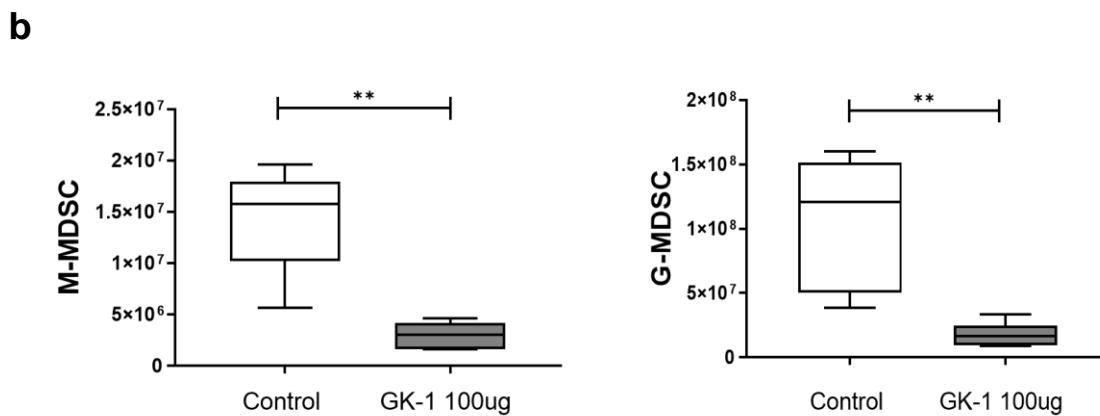
Anticuerpo/Compuesto	Fluorocromo/ acoplado	Clona	Marca	Título utilizado
aCD3	APCCy-7	17A2	Biolegend	1:100
aCD4	FITC	GK1.5	Biolegend	1:100
aCD8	PerCP	53-6.7	Biolegend	1:50
aCD44	APC	IM7	Biolegend	1:100
aCD62	AF700	MEL-14	Biolegend	1:50
aPD-1	PECy-7	29F.1A12	Biolegend	1:100
aCD25	Biotina	7D4	Biolegend	1:100
Estreptoavidina	APC		Biolegend	1:200
aFOXP3	PE	FJK-16s	ThermoFisher	1:50
aIL2	AF 488	JES6-5H4	Biolegend	1:100
aIFN γ	APC	XMG1.2	Biolegend	1:150
aGZB	PE	QA16A02	Biolegend	1:150

En las tinciones extracelulares en placa se utilizaron 20uL, mientras que las tinciones intracelulares se utilizaron 50uL.

A3. Efecto de GK-1 en células mieloides supresoras (MDSC)



Bazo 28 días post tratamiento



Cuantificación de células mieloides derivadas supresoras (MDSC) en bazo a 28 días post tratamiento. GK-1 disminuyó la cantidad de células mieloides en bazo de manera significativa, tanto a la estirpe monocítica como a la granulocítica. Este hallazgo se correlaciona con la disminución de GM-CSF encontrado en el trabajo de (Torres-García et al. 2017). **a.** Estrategia de análisis utilizada para identificar a las MDSC, se partió de un gate CD11b⁺ para determinar la expresión de Ly6G⁺ para la estirpe granulocítica (G-MDSC), y la expresión de Ly6C^{high} para la estirpe monocítica (M-MDSC). **b.** Gráfica de cajas de la cantidad de M-MDSC y G-MDSC, se graficó mínimo, máximo y media. Se analizó con una prueba de U de Mann Whitney a dos colas con un $\alpha=0.05$. * $p<0.05$ ** $p<0.01$. Control (n=6); GK-1 (n=6).

A4. Formato de observaciones

Fecha			Experimento							
Ratón	Caja	Peso (g)	Tamaño tumoral (mmx mm)	Pelo erizado	Movilidad	Ojos	Bigotes erizados	Distención abdominal	Observaciones	Fecha de sacrificio

Notas:

Sin marca significa normal. Si la suma de signos supera 6, debe evaluarse la posibilidad de retirar al ratón del experimento.

Pelo erizado: + ligeramente, ++ moderadamente, +++ severamente

Movilidad: + ligeramente disminuido, ++ moderadamente disminuido, +++ severamente disminuido

Ojos: + ligeramente cerrados ++ medianamente cerrados, +++ severamente cerrados

Bigotes erizados: +ligeramente erizado, ++ medianamente erizado, +++ severamente erizado

Distención abdominal: +ligeramente distendido, ++medianamente distendido, +++ severamente