



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Evaluación del mecanismo adyuvante antitumoral  
profiláctico de la protoxina Cry1Ac y su uso como terapia  
combinada con Doxorubicina en un modelo murino de  
cáncer de mama**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**PRESENTA:**

**ROBERTO RAÚL SERVIN GARRIDO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO FIERROS.** LABORATORIO DE INMUNIDAD EN MUCOSAS, UBIMED, FES IZTACALA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. PEDRO GUADALUPE ULISES OSTOA SALOMA.** DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROCÍO ANGELES GARCÍA BECERRA.** DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM.

Cd. Mx. Octubre, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradecimientos al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al CONACyT por la beca (CVU) 54588.

Proyecto financiado por proyectos:

- COMECYT FICDTEM-2021-085
- PAPCA FESI-2022-20
- CONACyT CB 283319
- UNAM PAPIIT IN202923.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Agradezco mucho a mi tutora, la Dra. Leticia Moreno Fierros quien ha sido muy importante en mi formación profesional y en mis estudios de posgrado. Muchas gracias por todo el apoyo, los consejos y la orientación.

Quiero agradecer al Dr. Pedro Guadalupe Ulises Ostoa Saloma y a la Dra. Rocío Angeles García Becerra por ser parte de mi comité tutor, por todo su apoyo y consejos durante mis estudios de doctorado.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicarle no solo esta tesis, sino todo el trabajo, las experiencias y el resto de mi vida a mi hermana Mónica, que, aunque ya no está en este plano físico, va a seguir en mi mente y en mi corazón hasta el último segundo de mi vida. Siempre vamos a seguir juntos bebecita. TE AMO.

A mis padres, quienes han sido los mejores padres en la vida, siempre me han apoyado a mí y a mis hermanas. Los volvería a elegir un millón de veces. Gracias a ustedes he podido estudiar, superarme y vivir muchas experiencias que me hacen ser la persona que actualmente soy. Muchas gracias por todo ese amor. Los amo mucho.

A mi hermana Tania y su bonita familia. Los quiero mucho a ti, a John, a Edgarcito y a Reginita. Espero que podamos estar juntos mucho tiempo apoyándonos, queriéndonos, creciendo y viviendo muchas experiencias nuevas. Los amo mucho.

También quiero dedicarle esta tesis al resto de mi familia, y a todos mis amigos y compañeros que han estado en estos años difíciles. Son grandes personas y aprecio mucho su cariño y amor. Siempre serán parte de mi vida y espero que podamos seguir conviviendo y acumulando nuevas experiencias. Los amo mucho

<b>ÍNDICE</b> .....	4
<b>Abreviaturas</b> .....	6
<b>Resumen</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	8
<b>Introducción</b> .....	9
<b>Justificación</b> .....	20
<b>Hipótesis</b> .....	20
<b>Objetivo general</b> .....	20
<b>Objetivos particulares</b> .....	20
<b>Metodología</b> .....	21
Toxina y protoxina Cry1Ac recombinante.....	21
Animales.....	21
Línea celular y lisados 4T1.....	21
Obtención de leucocitos de la cavidad peritoneal, Omentum, ganglio mesentérico y bazo.....	22
Ensayo de proliferación de linfocitos T.....	23
Inmunización profiláctica.....	23
Péptidos 4T1.....	24
Microambiente tumoral.....	25
Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad de linfocitos T en células 4T1.....	25
Análisis de la citometría de flujo.....	26
Viabilidad celular.....	26
Terapia de Doxorrubicina + protoxina Cry1Ac.....	27
Evaluación de citocinas en el tumor.....	27
Metástasis en pulmón.....	28
Análisis estadístico.....	28
<b>Resultados</b> .....	29
<i>La inmunización intraperitoneal con la protoxina Cry1Ac incrementa la expresión de CD80 en células dendríticas (CD11c+/MHCII+) del bazo</i> .....	29

<i>La inmunización intraperitoneal con protoxina Cry1Ac incrementa la cantidad de células dendríticas en el Omentum.....</i>	<i>31</i>
<i>El tratamiento con protoxina Cry1Ac incrementa la proliferación de linfocitos TCD4 y TCD8 en bazo y ganglio mesentérico.....</i>	<i>33</i>
<i>La protoxina Cry1Ac tiene efecto adyuvante antitumoral en un modelo in vivo.....</i>	<i>35</i>
<i>El tratamiento profiláctico de lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac como adyuvante previene la disminución de linfocitos TCD3 y TCD4+ en bazo.....</i>	<i>36</i>
<i>La inmunización con lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac incrementan la respuesta específica de linfocitos T citotóxicos.....</i>	<i>43</i>
<i>La coadministración de lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac activa células inmunes en el microambiente tumoral.....</i>	<i>44</i>
<i>La terapia combinada de Doxorubicina + protoxina Cry1Ac reduce el crecimiento de los tumores y disminuye la severidad de las metástasis.....</i>	<i>46</i>
<b>Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusión.....</b>	<b>53</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>54</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>
<b>Artículo.....</b>	<b>66</b>

## ABREVIATURAS

- APC** Célula presentadora de antígeno. Antigen-presenting cell (siglas en inglés).
- CFSE** Carboxifluoresceína succinimidil ester. Carboxyfluorescein succinimidyl ester (siglas en inglés).
- DCc** Células dendríticas convencionales.
- DCp** Células dendríticas plasmacitoides.
- GM-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
- GM** Ganglio mesentérico.
- HER-2** Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. Human epidermal growth factor receptor 2 (Siglas en inglés).
- IFA** Adyuvante incompleto de Freund. Incomplete Freund's adjuvant (Siglas en inglés).
- IMF** Intensidad media de fluorescencia.
- i.p.** Intraperitoneal
- i.v.** Intravenosa
- LPM** Large peritoneal macrophages (Siglas en inglés).
- LPS** Lipopolisacárido. Lipopolisaccharide (siglas en inglés).
- MDSC** Células supresoras derivadas mieloides. Myeloid-derived suppressor cells (siglas en inglés).
- MHC** Complejo principal de histocompatibilidad. Major histocompatibility complex (siglas en inglés).
- s.c.** Subcutánea
- SD** Desviación estándar
- SEM** Error estándar
- SFB** Suero fetal bovino.
- PBS** Buffer fosfato salino. Phosphate buffered saline (siglas en inglés).
- TAA** Antígeno asociado a tumor. Tumor-associated antigen (siglas en inglés).
- TLR** Receptor tipo toll. Toll-like receptor (siglas en inglés).
- TSA** Antígeno específico de tumor. Tumor-specific antigen (siglas en inglés).
- TME** Microambiente tumoral. Tumor microenvironment (siglas en inglés).
- TNBC** Cáncer de mama triple negativo. Triple negative breast cancer (siglas en inglés).

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad compleja que se caracteriza por la proliferación descontrolada de células malignas o tumorales. En mujeres, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y la principal causa de muerte por neoplasia. El cáncer de mama triple negativo es el más agresivo de los subtipos. La inmunoterapia es un tratamiento que modula el sistema inmunológico para atacar específicamente células tumorales. Un reto actual en la inmunoterapia del cáncer es el microambiente en el tumor y la poca inmunogenicidad que tienen los antígenos tumorales. El uso de adyuvantes se ha propuesto para mejorar la respuesta antitumoral en las vacunas. Además, la combinación de adyuvantes con terapias empleadas en la clínica como la radioterapia y/o quimioterapia podría mejorar la respuesta en los pacientes. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos adyuvantes, que sean seguros y capaces de inducir inmunidad antitumoral. La protoxina y la toxina Cry1Ac son capaces de activar células presentadoras de antígeno e incrementar la producción de citocinas pro-inflamatorias. La protoxina Cry1Ac puede inducir respuestas de tipo Th1 y de linfocitos TCD8+. Por lo tanto, evaluamos el efecto y el mecanismo conferido por las proteínas Cry1Ac en un modelo de cáncer de mama triple negativo inducido mediante la inoculación de la línea celular 4T1. Para evaluar si la protoxina y la toxina Cry1Ac tienen efecto adyuvante *in vivo*, ratones BALB/c fueron inmunizados con lisados 4T1 + protoxina Cry1Ac por la vía intraperitoneal e inducen un incremento en el número de células dendríticas en el Omentum y bazo con alta expresión de CD80 e incrementan la proliferación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ específicos a nivel local (ganglio mesentérico) y a nivel sistémico (bazo). Mientras que la toxina Cry1Ac solo fue capaz de incrementar la proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+ en el ganglio mesentérico. La protoxina Cry1Ac protege completamente a los ratones de desarrollar tumores en el esquema largo de inmunización profiláctica, mientras que en el esquema corto la protoxina y la toxina Cry1Ac como adyuvantes disminuyen el crecimiento de los tumores. El efecto protector y adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac estaría relacionado con la capacidad de prevenir la disminución de linfocitos TCD3+, TCD4+ y evitar el incremento de MDSC (células supresoras derivadas mieloides). Evaluamos la respuesta específica de linfocitos T citotóxicos *in vitro* en células 4T1. Sorprendentemente, la toxina Cry1Ac mostró una mejor capacidad que la protoxina Cry1Ac de generar citotoxicidad mediada por linfocitos T para eliminar células 4T1. Para evaluar si los tratamientos de lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac tenían efecto en las diferentes células del sistema inmune en el microambiente tumoral, evaluamos distintas poblaciones de leucocitos en los tumores. Los ratones inmunizados con protoxina Cry1Ac tuvieron un incremento de linfocitos T y macrófagos activados, además de presentar un bajo número de linfocitos T reguladores y MDSC. Dado el potencial de aplicación de la protoxina Cry1Ac en humanos, evaluamos un tratamiento terapéutico combinado con Doxorubicina. Los ratones que recibieron la terapia combinada mostraron menor tamaño en los tumores, disminución en la severidad de metástasis en pulmón e incremento en la producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los tumores. Podemos concluir que la protoxina Cry1Ac tiene potencial como adyuvante antitumoral y su uso combinado con Doxorubicina podría mejorar la terapia en el cáncer de mama triple negativo.



## ABSTRACT

The Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* is a systemic and mucosal adjuvant, able to confer protective immunity in different infection murine models and induce both Th1 and TCD8+ cytotoxic lymphocyte responses, which are required to induce anti-tumor immunity. The Cry1Ac toxin, despite having not being characterized as an adjuvant, has also proved to be immunogenic and able to activate macrophages. Here, we investigated the potential anti-tumor adjuvant effect conferred by the Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin in a triple negative breast cancer (TNBC) murine model. First, we evaluated the ability of Cry1Ac proteins to improve dendritic cell (DC) activation and cellular response through intraperitoneal coadministration with the 4T1 cellular lysate. Mice co-administered with the Cry1Ac protoxin showed an increase in the number and activation of CD11c+MHCII- and CD11c+MHCII+low in the peritoneal cavity and an increase in DC activation (CD11c+MHCII+) in the spleen. Cry1Ac protoxin increased the proliferation of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in the spleen and mesenteric lymph nodes (MLN), while the Cry1Ac toxin only increased the proliferation of TCD4+ and TCD8+ in the MLN. Remarkably, when tested in the in vivo TNBC mouse model, prophylactic immunizations with 4T1 lysates plus the Cry1Ac protoxin protected mice from developing tumors. The anti-tumor effect conferred by the Cry1Ac protoxin also increased specific cytotoxic T cell responses, and prevented the typical tumor-related decrease of T cells (TCD3+ and TCD4+) as well the increase of myeloid derived suppressor cells (MDSC) in spleen. Also in the tumor microenvironment of mice coadministered twice with Cry1Ac protoxin were found immunological improvements such as reductions in immunosuppressive populations (T regulatory lymphocytes and MDSC) along with increases in macrophages upregulating CD86. These results show a differential anti-tumor adjuvant capability of Cry1Ac proteins; highlighting the ability of Cry1Ac protoxin to enhance local and systemic tumor immunity in TNBC. Finally, using a therapeutic approach, we evaluated the co-administration of Cry1Ac protoxin with doxorubicin. A significant reduction in tumor volume and lung metastasis was found, with increased intratumoral levels of TNF $\alpha$  and IL-6 with respect to the vehicle group, further supporting its antitumor applicability.

## INTRODUCCIÓN

### **Cáncer**

El cáncer es una enfermedad compleja, que se caracteriza por un proceso de varios pasos en el cual una célula normal se transforma en una célula maligna o tumoral. En este proceso las células tumorales adquieren algunas capacidades como: la autosuficiencia de señales de crecimiento, evasión de señales supresoras de crecimiento, invasión y metástasis, inducción de angiogénesis, resistencia a la muerte celular, desregulación de la energía celular y evasión a la destrucción por el sistema inmunitario (Hanahan and Weinberg, 2011).

Un tejido normal tiene control de la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento y división de las células mediante el ciclo celular, por lo tanto, se asegura de mantener la homeostasis en el número, la arquitectura y función del tejido. Sin embargo, una célula tumoral puede adquirir señales de proliferación de maneras alternativas: pueden producir sus propios factores de crecimiento (estimulación autocrina), incrementan el número de receptores en la superficie celular, lo cual las hace hiperreactivas a los factores de crecimiento. También adquieren mutaciones que afectan la señalización constitutiva de vías relacionadas a la proliferación celular (Lemmon and Schlessinger, 2010, Witsch et al., 2010, Hynes and MacDonald, 2009).

La célula tumoral tiene que evadir procesos que regulan negativamente la proliferación, estos procesos dependen de genes supresores de tumores. Se han caracterizado la ganancia o pérdida de función por mutaciones en algunos de estos genes en modelos animales. Por ejemplo, el gen RB (Retinoblastoma) y el gen TP53, los cuales regulan la proliferación, activan senescencia y programas de apoptosis celular (Sherr and McCormick, 2002).

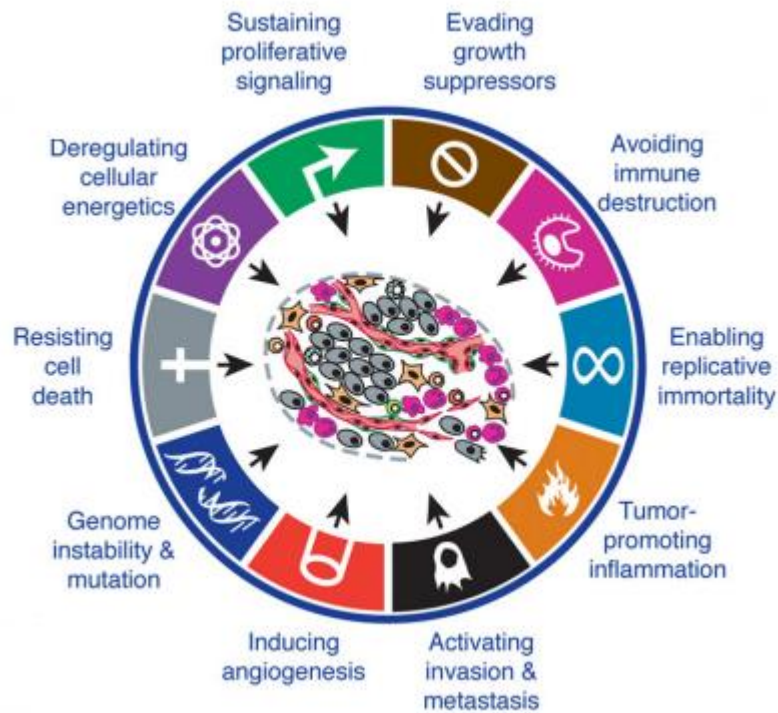
Debido al proceso descontrolado de proliferación de las células tumorales se generan ajustes en el metabolismo energético de las células para llevar a cabo el crecimiento y la división celular. En condiciones aeróbicas, las células normales procesan glucosa, a piruvato en el citosol a través de la glucólisis y después a dióxido de carbono en las mitocondrias; en condiciones anaerobias, se favorece la glucólisis y poco piruvato se envía a las mitocondrias consumidoras de oxígeno. Una célula tumoral reprograma el metabolismo debido a que tiene que compensar una menor eficiencia 18 veces menor producido por ATP, por lo tanto, las células tumorales captan y utilizan más glucosa que una célula normal (DeBerardinis et al., 2008).

La invasión a otros tejidos (metástasis) por parte de las células tumorales es otra característica de los tumores. Una de las alteraciones más caracterizadas en la metástasis es la pérdida de la expresión de moléculas de adhesión célula-célula. Por ejemplo, la disminución en la expresión de E-caderina, la cual ayuda a mantener la cohesividad y adhesividad del tejido epitelial (Berx and van Roy, 2009).

La evasión a la eliminación por parte del sistema inmunológico de las células tumorales son otra característica importante de los tumores. Las deficiencias en el desarrollo y/o función de linfocitos citotóxicos CD8+, linfocitos cooperadores CD4+ Th1 o células NK, incrementan la incidencia de tumores en ratones (Teng et al., 2008). La epidemiología clínica también ha demostrado la existencia de respuesta antitumoral en algunos tipos de cáncer en humanos (Bindea et al., 2010). Por ejemplo, en pacientes con cáncer de colon o

de ovario que tienen infiltrados de células NK y linfocitos citotóxicos tienen un mejor pronóstico que aquellos pacientes que no tienen abundante cantidad de linfocitos citotóxicos (Pages et al., 2010, Nelson, 2008). Las células tumorales pueden inhabilitar componentes del sistema inmune, por ejemplo, secretar TGF- $\beta$  para disminuir el infiltrado de linfocitos citotóxicos y células NK en los tumores, reclutar células que suprimen la acción de linfocitos citotóxicos como linfocitos T reguladores y células supresoras derivadas mieloides (MDSC) (Yang et al., 2010, Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009, Mougiakakos et al., 2010).

Estas y otras características de las células tumorales se encuentran actualmente en investigación y ayudan a establecer nuevos blancos terapéuticos para eliminar los diferentes tipos de tumores.

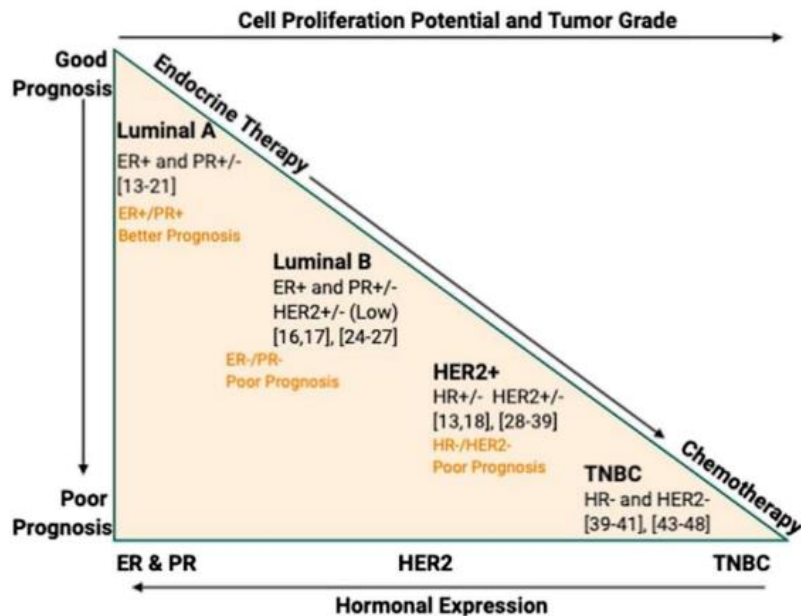


**Características de una célula tumoral.** Imagen modificada de Hanahan y Weinberg, 2011, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 144, 646-74.

## Cáncer de mama

El cáncer de mama es conocido como el tipo de cáncer más común y se convierte en una de las principales causas de muerte en mujeres (Forouzanfar et al., 2011). Es clasificado en diferentes subtipos, de acuerdo con la expresión de sus características moleculares, los cuales incluyen luminal A, luminal B, sobreexpresión de HER-2 y triple negativo. El cáncer de mama triple negativo (TNBC por sus siglas en inglés "Triple Negative Breast Cancer") es el más agresivo de todos los subtipos, tiene una rápida progresión, altas probabilidades de recurrencia temprana, y metástasis distante (Garrido-Castro et al., 2019). El TNBC es caracterizado por la falta de expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Este subtipo representa el 15%-20% de los pacientes con cáncer de mama (Kondov et al., 2018). La falta de terapias dirigidas y el bajo pronóstico de los pacientes con TNBC ha provocado un mayor esfuerzo en el descubrimiento de nuevas terapias para tratar a estos pacientes (Vidula and Bardia, 2017).

Entre otras características del TNBC, se conoce que entre 15-20% de todos los casos de TNBC están asociados con las mutaciones germinales en *BRC1* o *BCRA2* (Pohl-Rescigno et al., 2020). Los linfocitos infiltrantes de tumor en el estroma y los tumores han sido identificados como un marcador de mejor pronóstico y respuesta a la quimioterapia en el TNBC (Loi et al., 2019). El TNBC es sensible a la quimioterapia. La quimioterapia neoadyuvante en pacientes con TNBC temprano incluye la combinación de antraciclinas (Doxorrubicina), agentes alquilantes (ciclofosfamida), taxanos (paclitaxel) y anti metabolitos (5-FU), seguido por la cirugía. Para los pacientes con TNBC refractario, no hay un régimen de quimioterapia estándar. Las terapias disponibles para pacientes con TNBC avanzado incluye anti metabolitos (capecitabine y gemcitabine), eribulin y cisplatino (Won and Spruck, 2020).



**Clasificación molecular del cáncer de mama, requerimientos terapéuticos, grado y pronóstico.** Imagen modificada de Zubair M and Wang S, 2021, *Advanced approaches to breast cancer classification and diagnosis*, Frontiers in Pharmacology, 11, 632079.

### ***Doxorrubicina en el tratamiento de cáncer de mama***

Entre los agentes de la quimioterapia sistémica en el cáncer de mama se emplea el uso de doxorrubicina, la cual es una antraciclina y forma parte de la primera línea de tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyendo leucemia, linfoma de Hodgkin, cáncer de pulmón, cáncer de mama, etc. (Thorn et al., 2011, Nitiss and Nitiss, 2014). Induce la intercalación del ADN, inhibición de la topoisomerasa II y la formación de radicales libres (Tacar et al., 2013).

Los efectos combinados de la quimioterapia y la inmunoterapia han sido reportados con la mejora de la actividad citotóxica de la inmunoterapia contra células tumorales (Emens and Middleton, 2015). La sensibilización de células tumorales incluye incremento en la expresión de ligandos activadores, los cuales generan una mayor sensibilidad de las células tumorales para ser eliminadas por el sistema inmune. Se ha reportado que el tratamiento con dosis sub-letal de doxorrubicina mostro mayor susceptibilidad de las células tumorales a la eliminación por parte de células NK y linfocitos T (Wennerberg et al., 2013).

Se ha reportado que la terapia con doxorrubicina es capaz de inducir muerte celular inmunogénica, favoreciendo la liberación de antígenos en el microambiente tumoral (Krysko et al., 2012), disminuir MDSC y estimular la proliferación de linfocitos TCD8+ (Alizadeh et al., 2014, Tacar et al., 2013).

### ***Respuesta inmune en el cáncer***

Hace 65 años se conocía que los tumores expresaban antígenos que permitían al sistema inmune diferenciar entre una célula normal y una célula transformada. Basados en estos descubrimientos MacFarlane Burnet y Lewis Thomas propusieron que la respuesta inmune sería capaz de reconocer y eliminar células tumorales antes de su diagnóstico clínico, una hipótesis llamada "Inmunovigilancia del cáncer". (Burnet, 1957). Sin embargo, esta hipótesis fue puesta a prueba mediante algunos experimentos realizados por Osias Stutman, quien comparo tumores inducidos por carcinógenos y tumores espontáneos entre ratones inmunocompetentes y ratones inmunodeficientes, mostrando que los datos de la inmunovigilancia no eran los esperados. Posteriormente se desarrollaron mejores modelos de ratones inmunodeficientes, para estudiar la inmunidad anti tumoral e indiscutiblemente comenzó a incrementarse la evidencia que apoyaba la conclusión que el sistema inmune era capaz de prevenir el desarrollo de tumores (Dunn et al., 2002, Dunn et al., 2004). Estos experimentos llevaron a redefinir la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer a un concepto de "inmunoedición del cáncer", el cual enfatizaba la habilidad del sistema inmune no solamente de eliminar células tumorales altamente inmunogénicas, sino también de generar variantes de células tumorales con niveles muy bajos de inmunogenicidad (Dunn et al., 2006, Shankaran et al., 2001).

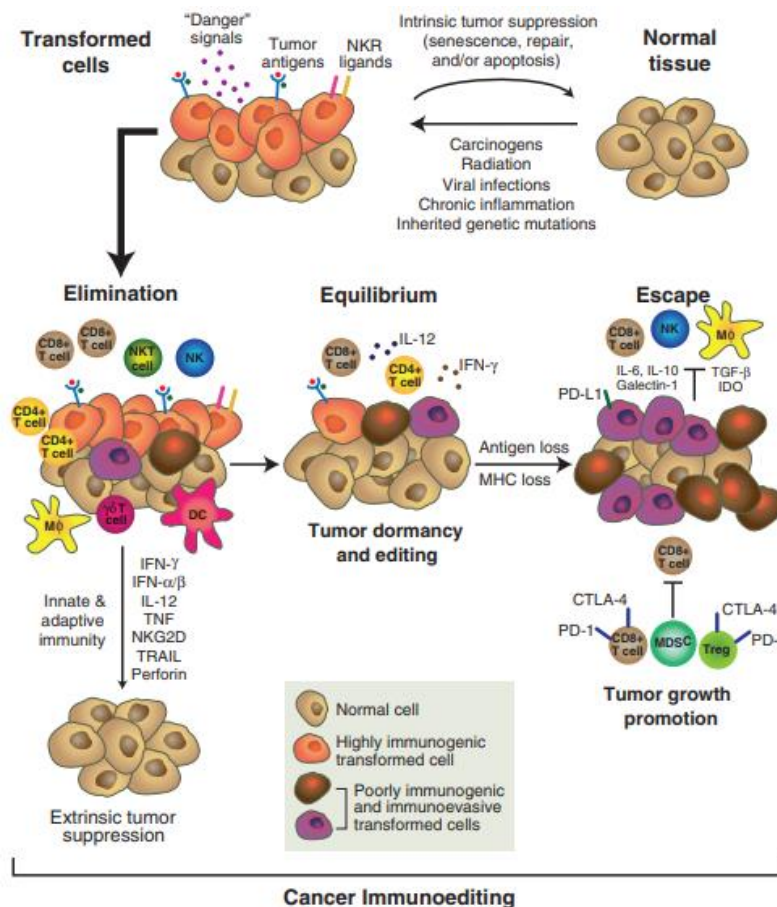
Schreiber describió un nuevo y extendido concepto para entender la dinámica entre los tumores y las células del sistema inmunológico, la "inmunoedición" la cual consta de 3 fases: eliminación, equilibrio y escape (Schreiber et al., 2011). En la fase de eliminación, las células tumorales con relativamente alta inmunogenicidad, son eliminadas antes de su detección clínica. La evidencia más convincente de este proceso viene a partir de los descubrimientos de la alta incidencia de tumores inducidos por carcinógenos o tumores

espontáneos en ratones inmunodeficientes en comparación con ratones inmunocompetentes (Dighe et al., 1994, Kaplan et al., 1998, Shankaran et al., 2001).

La segunda fase de la inmunoección del cáncer es la fase de equilibrio, en el cual el sistema inmune no es capaz de eliminar células residuales del tumor, pero puede mantenerlas en un periodo de inactividad

En la fase de escape, las células del tumor son poco inmunogénicas, y han proliferado para formar una masa tumoral clínicamente detectable. Existen algunos mecanismos por los cuales las células tumorales escapan al control de la respuesta inmune. Un ejemplo de estas características es que las células tumorales dejan de expresar moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por siglas en inglés), lo que las lleva a evadir la eliminación del sistema inmunológico. Estos mecanismos llevan a reducir el reconocimiento del sistema inmune y/o incrementar la inmunosupresión (Khong and Restifo, 2002, Zitvogel et al., 2006).

Por la capacidad que tiene el sistema inmunológico para eliminar las células tumorales de manera específica, la inmunoterapia ha surgido como un tratamiento para tratar pacientes con ciertos tipos de tumores.



Las 3 E´de la inmunoección del cáncer- Eliminación, Equilibrio y Escape. Schreiber et al. 2011, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*, Science, 331, 1565-70.

## **Inmunoterapia**

La inmunoterapia es definida como el uso de moléculas, anticuerpos, células, inhibidores, etc. que aumentan y/o reestablecen la habilidad para prevenir o eliminar enfermedades (Lizee et al., 2013). El objetivo de la inmunoterapia en el cáncer es lograr un balance del sistema inmune para eliminar células tumorales mientras no se induce una respuesta autoinmune no controlada que limite los resultados de la inmunoterapia (Chen and Mellman, 2013).

La inmunoterapia puede ser clasificada como activa o pasiva. La inmunoterapia pasiva no incrementa la respuesta inmunológica del hospedero e incluye la transferencia de anticuerpos monoclonales, moléculas pequeñas o. Al contrario, la inmunoterapia activa induce un incremento de la defensa del hospedero la cual se puede categorizar en específica y no específica. La inmunoterapia específica, como las vacunas profilácticas o terapéuticas, inducen inmunidad hacia antígenos otro ejemplo de terapia activa específica, es la transferencia adoptiva de células. La inmunoterapia no específica encontramos la administración de citocinas, inhibidores de puntos de control y adyuvantes, los cuales aumentan la respuesta inmunológica del hospedero (Paucek et al., 2019) (Galluzzi et al., 2014).

En el año 2013 la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer fue declarada por la revista *Science* como el descubrimiento del año (Couzin-Frankel, 2013). La historia de la inmunoterapia se remonta al año 1891, cuando el Dr. William Coley, ahora considerado “el padre de la inmunoterapia”, comenzó a investigar un tratamiento en los pacientes con sarcoma. El Dr. Coley descubrió algunos casos de pacientes diagnosticados con sarcoma que desarrollaban erisipelas causadas por *Treptococcus pyrogenes*, quienes presentaban una larga remisión de la enfermedad o incluso había pacientes que ya no presentaban la enfermedad. Posteriormente el Dr. Coley comenzó a inyectar los tumores de los pacientes con la “toxina mezclada de Coley”, que consistía en una mezcla viva e inactivada de *Streptococcus pyrogenes* y *Serratia mercerscens* (Coley, 1991). Fue capaz de respuesta e incluso remisión completa en pacientes con diferentes tipos de tumor que incluyen sarcoma, linfoma y cáncer de testículo (Coley, 1910).

Existen algunas estrategias que se han empleado en la inmunoterapia para combatir distintos tipos de cáncer. La interleucina 2 (IL-2) en altas dosis demostró eficacia clínica cuando se administró a pacientes con cáncer de riñón metastásico y melanoma. Sin embargo, debido a su alta toxicidad y desarrollo de nuevas terapias se dejó de emplear el uso de IL-2. En el año de 1998 la FDA aprobó el uso de rituximab, un anticuerpo monoclonal para el tratamiento de linfoma de no Hodgkin (Ribatti, 2014). Rituximab se une a CD20 en la superficie de células B inmaduras, posteriormente son eliminadas por células NK. En la actualidad se cuentan con más de 12 anticuerpos monoclonales para el tratamiento de distintos tumores como el linfoma de Hodgkin, colorrectal, pulmón y cáncer de mama. El descubrimiento de proteínas como CTLA-4 y PD-1 los cuales funcionan como un regulador (freno) del sistema inmune, llevo al desarrollo de inhibidores de estas proteínas para lograr que los linfocitos T fueran capaces de eliminar células tumorales (Leach et al., 1996). En 2011 la FDA aprueba el uso de ipilimumab, un inhibidor de CTLA-4 para el tratamiento de melanoma metastásico y también aprueba la terapia con PD-1 y PD-L1 para el tratamiento de cáncer de pulmón y melanoma.

### ***Inmunoterapia en cáncer de mama triple negativo***

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) suele ser el subtipo de cáncer de mama más agresivo. Debido a que el TNBC no expresa receptores de progesterona y tampoco HER-2, en la actualidad no hay tratamientos dirigidos y aprobados, por lo tanto, solamente existe la opción de la quimioterapia. Algunos estudios han revelado que los pacientes con TNBC tienen una disminución del 55% en el riesgo de recurrencia, 23% de supervivencia libre de enfermedad y 17% de supervivencia con la terapia adyuvante (terapia posterior a cirugía) (Berry et al., 2006). La quimioterapia, en especial con antraciclina (Doxorrubicina), no solamente tienen efecto citotóxico, sino que también es capaz de activar linfocitos TCD8+ para eliminar células tumorales, por lo tanto, los linfocitos infiltrados en el tumor responden bien a la quimioterapia. Se ha reportado que el TNBC tiene alta expresión de PDL-1. Algunos anticuerpos monoclonales han comenzado a ser estudiados, dirigidos contra PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab y Avelumab), y dirigidos contra PD-1 (Nivolumab y Pembrolizumab). También se ha comenzado a estudiar la aplicación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CTLA-4 (Tremelimumab) (Pardoll, 2012).

### ***Vacunas en cáncer de mama***

Otra estrategia para estimular la respuesta antitumoral es el uso de vacunas para el cáncer, su objetivo es inducir respuesta tipo TH1 de linfocitos TCD4+ y TCD8+ contra antígenos asociados a tumor (TAA) y antígenos específicos de tumor (TSA). La principal ventaja de las vacunas para el cáncer es su mínima toxicidad, la generación de respuesta inmune adaptativa altamente específica y el establecimiento de memoria inmunológica (Arab et al., 2020).

El cáncer de mama representa el tercer tipo de tumor más estudiado, seguido del melanoma y el cáncer cervical (Migali et al., 2016). Los blancos terapéuticos más comunes en las vacunas para el cáncer de mama son HER-2, Mucin 1, antígeno carcinoembrionario (CEA) y la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT) (Dafni et al., 2021).

Existen varios tipos de vacunas que son estudiadas para el cáncer de mama, entre ellas encontramos vacunas con péptidos, los cuales pueden ser monovalentes o polivalentes. Un ejemplo de una vacuna monovalente que se ha estudiado es con el péptido E75, la cual se administra en combinación con GM-CSF (Mittendorf et al., 2012). Otro ejemplo de una vacuna monovalente que ha sido estudiada es "The sialyl TN" (STn) un péptido de MUC-1 (Miles et al., 2011).

Otro tipo de vacuna que se encuentra en estudio, son las basadas en DNA o en vectores virales. Algunas vacunas en fase clínica se han evaluado y demostrado que tienen la capacidad de inducir respuesta celular y humoral. Vacunas de plásmidos de ADN que codifican HER-2 o hTERT, son algunos ejemplos de este tipo de vacunas (Norell et al., 2010, Zhang et al., 2012).

Las vacunas basadas en células dendríticas han tomado gran interés entre los investigadores, debido a que son capaces de llevar a cabo presentación cruzada, la cual es necesaria para el desarrollo de linfocitos T citotóxicos específicos (Cintolo et al., 2012). La vacuna de células dendríticas HER-2 fue probada en 27 pacientes con carcinoma ductal en etapas tempranas de la enfermedad, y fue administrada antes de la cirugía. Obteniendo

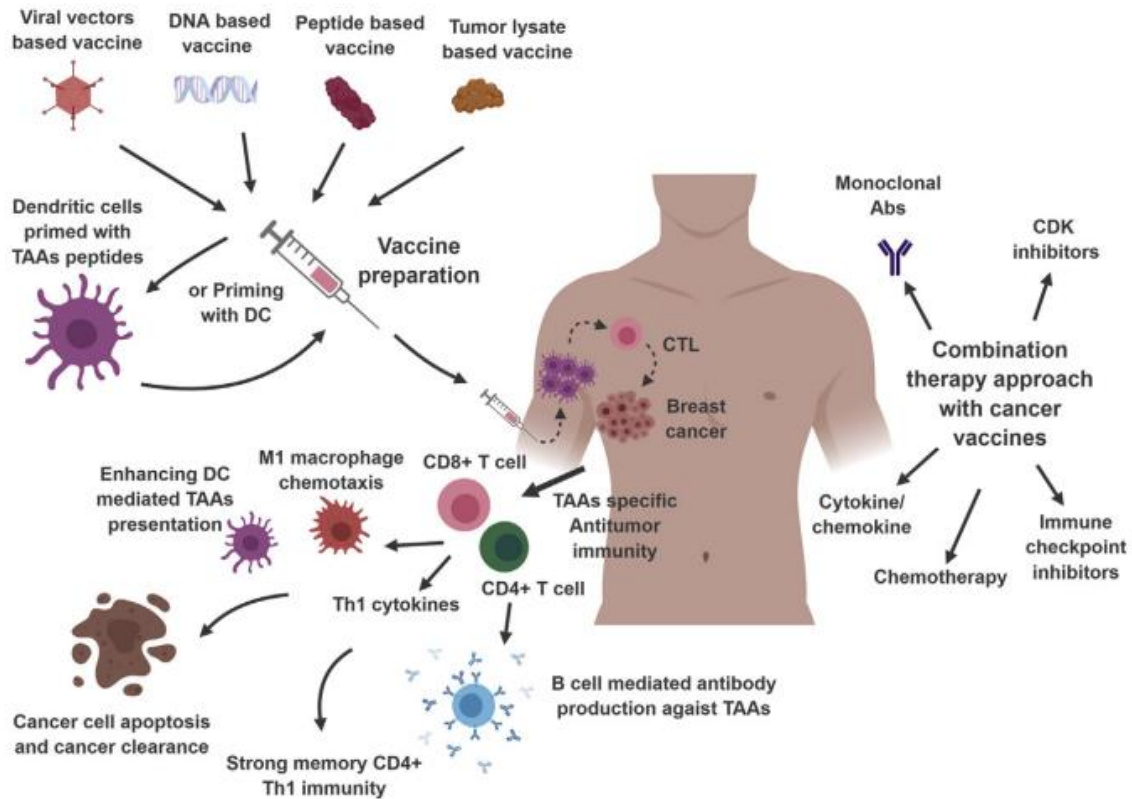


como resultado 18.5% de los pacientes no presentaron posteriormente carcinomas, mientras que el 50% de los pacientes que aun presentaban carcinoma dejaron de expresar HER-2 (Sharma et al., 2012).

Otras estrategias en las vacunas contra el cáncer, son las vacunas basadas en células completas o lisados de las células tumorales. Estas vacunas son capaces de inducir una respuesta del sistema inmune hacia una fuente exógena de células o componentes modificados de una célula tumoral que pueden provenir de un paciente o un donador. N ejemplo de este tipo de vacunas es una vacuna basada en células autólogas de cáncer de mama que son infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle para incrementar la expresión de interferón- $\beta$  (Kurtz et al., 2014). GVAX es otro ejemplo de una vacuna basada en células alogénicas de tumor de humano que expresa GM-SCF, se encuentra en fase 2 de estudio para pacientes con cáncer de mama metastásico (McArthur and Page, 2016).

Las vacunas profilácticas también son una estrategia en la búsqueda de prevenir el desarrollo de cáncer de mama, la principal dificultad que representa esta estrategia es el desarrollo de complicaciones autoinmunes.

La  $\alpha$ -lactoalbumina es una proteína específica de diferenciación en la mama que solamente se expresa durante la lactancia, pero no en el tejido de mama normal. Estudios han revelado que la  $\alpha$ -lactoalbumina incrementa su expresión en el 55-60% del cáncer de mama, y aproximadamente en el 75% de los TNBC (Jaini et al., 2017). Un estudio mostro que la vacunación con  $\alpha$ -lactoalbumina previene el desarrollo de cáncer de mama en un modelo de ratón que genera tumores espontáneos (ratones MMTV), se mejoró la infiltración de linfocitos Th1 TCD4+ productores de IFN- $\gamma$  y linfocitos TCD8+ citotóxicos (Jaini et al., 2010). Sin embargo, un reto en las vacunas contra el cáncer es el microambiente en el tumor (TME por sus siglas en inglés "Tumor Microenvironment") y la poca inmunogenicidad que tienen los TAA y TSA (Melero et al., 2014). Una propuesta para mejorar la inmunogenicidad de antígenos tumorales en la inmunoterapia, ha sido el uso de adyuvantes, para mejorar la habilidad de las células dendríticas de generar una respuesta inmune específica anti tumoral adecuada (Banday et al., 2015).



**Terapia para TNBC basado en vacunas para generar una fuerte respuesta específica a antígenos asociados a tumor.** Burkley E, 2019. *Vaccine Therapies for Breast Cancer. Surgical Oncology Clinics of North America.* Surgical Oncology Clinics (3). 353-367.

### **Adyuvantes en cáncer**

Un antígeno solo en una vacuna es poco inmunogénica y tiene una baja capacidad de inducir una respuesta inmune adaptativa. En la ausencia de un adyuvante antigénico dirigido a DC inmaduras en ausencia de inflamación cualquier estímulo microbiano induce tolerancia en lugar de una respuesta inmune potente (Mellman and Steinman, 2001). Tres maneras en las que un adyuvante puede incrementar el reconocimiento de antígenos tumorales, y por lo tanto una eficacia en las vacunas contra el cáncer, son incrementando la captación del antígeno, la presentación cruzada y la manera en que se esparce el antígeno (Bowen et al., 2018).

La activación de la respuesta inmune innata es vital en el desarrollo de una efectiva respuesta anti tumoral. La activación de receptores de reconocimiento a patógenos (PRRs), los cuales incluyen TLRs, receptores tipo NOD (NLRs), receptores tipo RIG (RLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs) que expresan las células epiteliales, neutrófilos, macrófagos o células dendríticas. Estos receptores se unen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que provienen de virus, bacterias u hongos, o a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) como proteínas de choque térmico (HMGB1) que se liberan después de daño en algún tejido (Bowen et al., 2018).

Un tipo de adyuvante que se ha estudiado en los últimos años son los agonistas del estimulador de genes de interferón (STING). STING es una proteína de transmembrana localizado en el retículo endoplasmático (Dubensky et al., 2013), su activación lleva a una respuesta de interferón de tipo I en respuesta al DNA intracelular (Ishikawa and Barber, 2008). Sin embargo, el uso de agonistas de STING puede inducir citotoxicidad sistémica por lo tanto se prefiere administrarlo en la inyección intratumoral (Conlon et al., 2013). El potencial tóxico de los agonistas STING y la falta de blancos específicos han limitado su uso como adyuvantes en las vacunas contra el cáncer.

Otros tipos de adyuvantes que han sido estudiados son los agonistas de los receptores tipo toll (TLR, por siglas en inglés), como CpG (agonista de TLR9) (Jie et al., 2018, Zhu et al., 2019), monofosforil lípido A (agonista de TLR2 y TLR4) (Srivastava et al., 2016), Imiquimod (agonista de TLR7) (Yue et al., 2019, Cho et al., 2017, Doorduijn et al., 2017) y poly I:C (agonista de TLR3) (Di et al., 2019, Glaffig et al., 2017). Se ha demostrado que tienen efecto antitumoral o que mejoran la inmunidad antitumoral. Sin embargo, el uso de agonistas de los TLR es limitado en la inmunoterapia del cáncer debido a que algunas células tumorales expresan TLR's y su estimulación lleva a la progresión del tumor (Peyret et al., 2018, Bugge et al., 2017, Pradere et al., 2014). Además, se ha reportado que algunos agonistas de los TLR tienen efectos tóxicos (Qin et al., 2007) y podrían generar inflamación crónica (Furi et al., 2013), la cual está relacionada con la carcinogénesis.

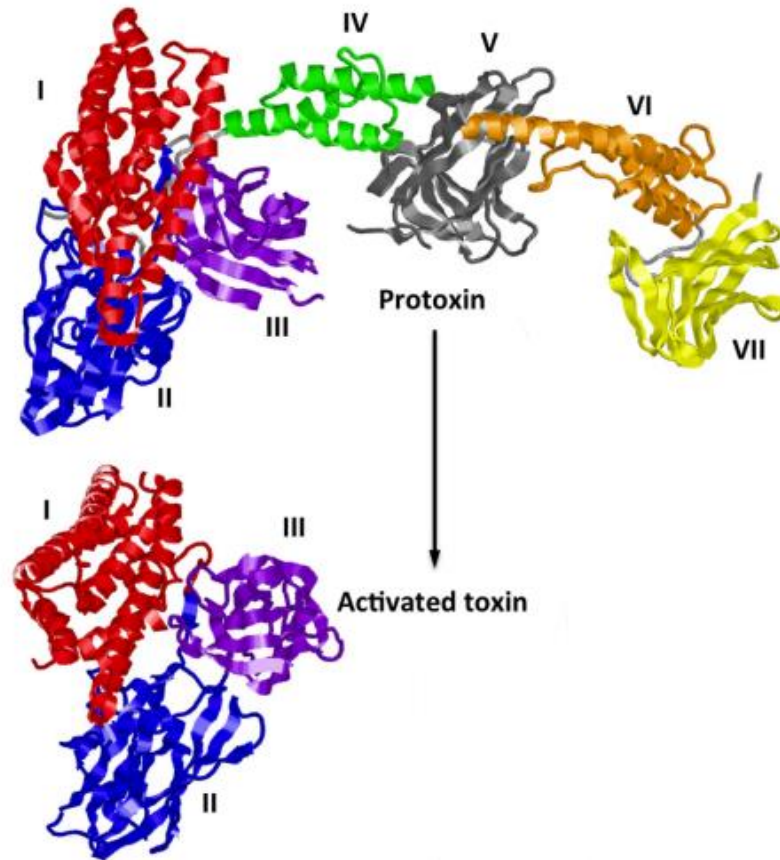
Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos y seguros adyuvantes, que sean capaces de inducir inmunidad antitumoral.

### ***Proteínas Cry1Ac***

Nosotros proponemos a la protoxina Cry1Ac como un adyuvante alternativo, la protoxina Cry1Ac es una delta-endotoxina producida durante la fase de esporulación de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, que ha sido utilizada como bioinsecticida y pesa entre 70-130 kDa. Cuando el insecto blanco ingiere los cristales de la proteína, son solubilizados y procesados proteolíticamente, generando la toxina Cry1Ac activa, la cual se une a receptores del intestino medio del insecto provocando la muerte (Gomez et al., 2014). Esta activación remueve aproximadamente 40 aminoácidos del amino terminal y 500 aminoácidos del carboxilo terminal, convirtiendo la protoxina de 130 kDa en la toxina Cry1Ac activa de 65 kDa (Pardo-Lopez et al., 2013, Gill et al., 1992).

La protoxina Cry1Ac recombinante es inmunogénica y adyuvante, tanto a nivel sistémico y de mucosas (Vazquez et al., 1999, Moreno-Fierros et al., 2003, Moreno-Fierros et al., 2000), es capaz de activar células presentadoras de antígeno (APC, por siglas en inglés) mediante la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y el incremento de la producción de citocinas proinflamatorias (Rubio-Infante et al., 2018, Moreno-Fierros et al., 2013). También, puede conferir inmunidad contra distintos modelos de infección (Legorreta-Herrera et al., 2010, Rojas-Hernandez et al., 2004, Ibarra-Moreno et al., 2014). En un modelo murino de brucelosis se ha demostrado que la protoxina Cry1Ac induce respuestas de tipo Th1 y de linfocitos TCD8+ (Gonzalez-Gonzalez et al., 2015).

La toxina Cry1Ac a pesar de no haber sido caracterizado su efecto adyuvante, es inmunogénica (Guerrero et al., 2004) y capaz de activar macrófagos que inducen la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras e incrementan la producción de citocinas proinflamatorias (Torres-Martinez et al., 2016). El potencial efecto adyuvante antitumoral de las proteínas Cry1Ac es desconocido. Por lo tanto, evaluamos el efecto y el mecanismo conferido por las proteínas Cry1Ac en un modelo murino TNBC inducido con la línea celular 4T1.



**Estructura de la protoxina y toxina Cry1Ac.** Tabashnik B.E., 2015, *Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects.*, Science Reports, 5:15107.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la falta de blancos terapéuticos específicos en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, es importante encontrar nuevos tratamientos y herramientas en la inmunoterapia, como los adyuvantes, para mejorar la respuesta antitumoral, además de que sean seguros, no tóxicos y efectivos para eliminar células tumorales.

## HIPÓTESIS

La protoxina y la toxina Cry1Ac tienen efecto adyuvante antitumoral mediado por su capacidad de incrementar la activación de células presentadoras de antígeno y en combinación con Doxorubicina pueden incrementar el efecto antitumoral.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el mecanismo adyuvante antitumoral profiláctico de la protoxina Cry1Ac y su uso como terapia combinada con Doxorubicina en un modelo murino de cáncer de mama

## OBJETIVOS PARTICULARES

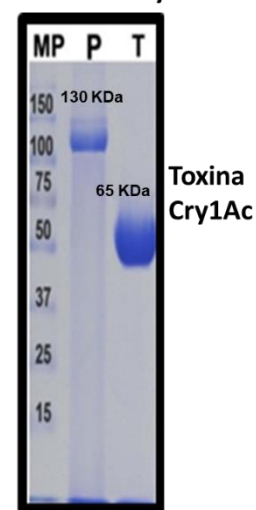
- Evaluar la activación de células dendríticas ante la coadministración por vía intraperitoneal de lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac
- Evaluar la proliferación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ en la coadministración de lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac ante un re-estímulo *in vitro* con péptidos tumorales
- Evaluar en un modelo *in vivo* de cáncer de mama triple negativo si la coadministración de lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac induce inmunidad antitumoral
- Evaluar la citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vitro* en ratones inmunizados con lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac
- Evaluar el microambiente tumoral en el tratamiento profiláctico de lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac
- Evaluar el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac en la terapia combinada con Doxorubicina

## METODOLOGIA

### **Protoxina y toxina Cry1Ac recombinante**

La protoxina Cry1Ac recombinante fue purificada a partir de cultivos de *Escherichia coli* (Pos9300) (Rojas-Hernandez et al., 2004). Las bacterias se cultivaron en medio "Luria Broth" (US Biological Swampscott, MA 01907) adicionado con ampicilina (100 µg/mL). Fueron incubadas a 37 °C por 48hrs a 300 rpm en agitación constante. Las bacterias son centrifugadas a 10,000 rpm a 4 °C por 15 min, las bacterias son tratadas 2 veces con buffer (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 1Mm, pH 8.0). Posteriormente, las bacterias son lisadas e incubadas a 37 °C durante 1 h con lisozima + sacarosa al 15% por ciclos de 5 min a una amplitud de 100Hz. Los cuerpos de inclusión se recuperan mediante centrifugación a 10,000 rpm, posteriormente se lavan 5 veces con 50 mL de NaCl 0.5M + Triton X-100 al 1% y sonicada entre cada uno de los lavados. La pastilla es suspendida en 30 mL de agua bidestilada 4 °C. Para obtener la protoxina Cry1Ac, la pastilla se solubiliza en 5 mL de buffer de carbonatos (carbonato de sodio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1M, pH 9.6, 10 Mm de DTT) por 30 min a 37 °C en agitación constante (300 rpm). La protoxina Cry1Ac solubilizada se obtiene por centrifugación a 10,000 rpm a 4 °C por 15 min y posteriormente recuperando el sobrenadante. La toxina Cry1Ac se obtiene mediante la tripsinización de la protoxina Cry1Ac (Torres-Martinez et al., 2016). Las proteínas Cry1Ac fueron tratadas con una resina de Polimixina B (Bio-Rad, Hercules, CA.) para eliminar endotoxinas, los niveles de endotoxinas (LPS) fueron evaluados mediante el uso del kit E-toxate, encontrando niveles inferiores a 0.1 EU/mL. Finalmente, las proteínas se evaluaron mediante SDS-PAGE y la concentración total de proteína fue determinada mediante el método de Bradford.

Protoxina Cry1Ac



### **Animales**

Ratones hembra BALB/c (6 a 8 semanas de edad) se utilizaron en este estudio. Los animales se mantuvieron en cajas con filtro, alimentados con comida estéril (2019 Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet, Harlan Laboratories Inc. Indianapolis, IN), agua *ad libitum* y cuidados de acuerdo con los lineamientos del reglamento Federal de Experimentación y Cuidado Animal (NOM-062-ZOO-1999; Secretaría de Agricultura, México). El número (n) de ratones utilizados por grupo experimental se indica en el pie de cada figura. Solicitud:283319 a la Comisión de Ética con Oficio: CE/FESI/0920117/1197.

### **Línea celular y lisado 4T1**

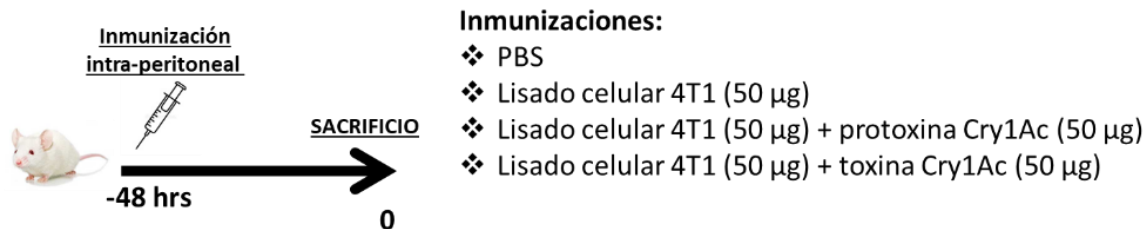
Las células de carcinoma mamario 4T1 de ratón (ATCC, Manassas, Virginia, USA) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 con penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL), fungicida (0.75 µg/mL) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Gaithersburg, MD). Las células 4T1 en cultivo se obtuvieron y fueron lavadas mediante

centrifugación con medio RPMI y PBS. La pastilla de células 4T1, con  $5 \times 10^7$  células, fue suspendidas en 3 mL de PBS estéril con 5mM de ácido *p*-hroxymmercuribenzenoico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para evitar la proteólisis, y sonicada por 1 minuto (Sonic Dismembrator Model 300 Fisher, Pittsburgh, PA) en hielo. Los lisados fueron alicuotados y guardados a -80 °C. Las proteínas fueron evaluadas mediante SDS-PAGE y la concentración de proteína fue determinada mediante el método de Bradford.

### ***Obtención de leucocitos de cavidad peritoneal, omentum, ganglio mesentérico y bazo.***

Para evaluar la activación de células dendríticas, una aplicación intraperitoneal (i.p.) con protoxina o toxina Cry1Ac (50 µg) + lisado de células 4T1 (50µg), en un volumen total de 100 µL. 48 hrs después se obtuvieron distintos ganglios. Los ratones que recibieron las inmunizaciones por vía i.p. con los lisados de células 4T1 y coadministrados con las proteínas Cry1Ac, fueron sacrificados bajo anestesia 48 hrs. o 10 días después de la primera o la segunda inyección para obtener leucocitos de los distintos ganglios para el análisis de la activación de células dendríticas y la proliferación de linfocitos, respectivamente. Los leucocitos del exudado del peritoneo fueron recuperados mediante lavados del peritoneo con 5 mL de solución salina (PBS) frío con 5% de suero fetal bovino (SFB), la cavidad peritoneal fue ligeramente agitada por 3 minutos antes de remover el fluido peritoneal. El bazo y el ganglio mesentérico (GM) fueron obtenidos y disgregados con un filtro estéril de malla de nylon usando 5 mL de medio RPMI-1640 suplementado con 5% SFB, L-Glutamina y aminoácidos esenciales (GIBCO BRL NY14072, Grand Island, NY). El omentum fue obtenido como fue reportado por Carlow *et al* (Carlow *et al.*, 2009). Brevemente, el omentum fue obtenido mecánicamente y disgregado con un filtro estéril de malla de nylon, lavado y filtrado 2 veces con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB.

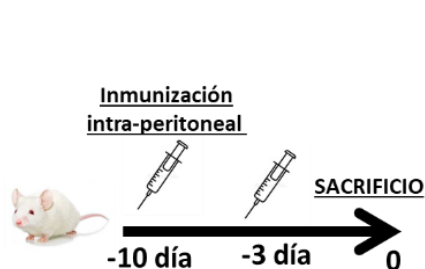
## **Activación de células dendríticas**



## Ensayo de proliferación de linfocitos T

Para la evaluación de respuesta proliferativa de linfocitos T en bazo y ganglio mesentérico (GM), los ratones fueron inmunizados con las mismas concentraciones de lisado y protoxina o toxina Cry1Ac, con 2 inmunizaciones, una cada semana y fueron sacrificados 48 hrs. después de la segunda inmunización. El ensayo de proliferación de linfocitos T se realizó en el 15<sup>o</sup> día, mediante el marcaje de células del GM y del bazo con CFSE (5 $\mu$ M) (Molecular probes, Eugene, OR, cat\_#:11524217). La densidad de células fue ajustada a 2x10<sup>6</sup> células/mL, las células fueron cultivadas en placas de 12 pozos y estimuladas con 10  $\mu$ g/mL de una mezcla de péptidos sintéticos expresados por la línea tumoral 4T1 (Tmte2, Gprc5a, Qars and survivina) por 72 hrs, 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron obtenidas y teñidas para el análisis mediante citometría de flujo.

## Proliferación de linfocitos T



### Inmunizaciones:

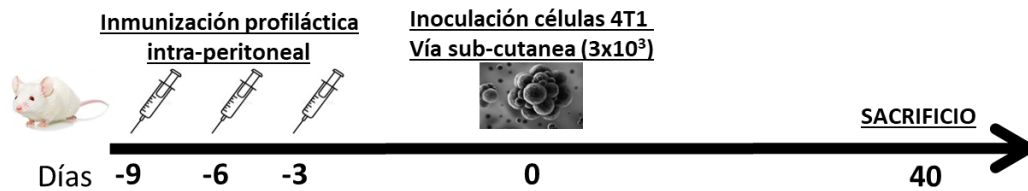
- ❖ PBS
- ❖ Lisado celular 4T1 (50  $\mu$ g)
- ❖ Lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac (50  $\mu$ g)
- ❖ Lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac (50  $\mu$ g)

### ***Inmunización profiláctica***

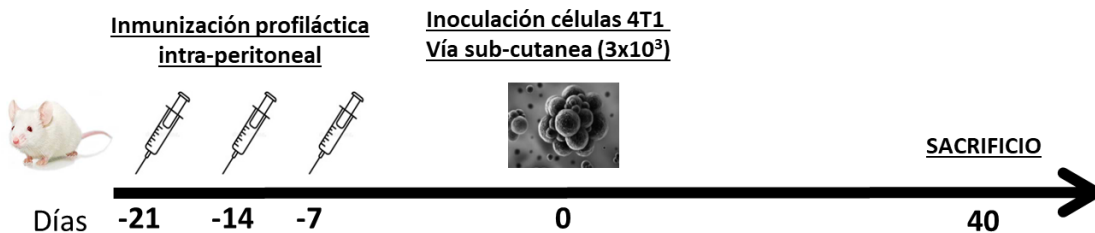
Para evaluar el efecto antitumoral de las proteínas Cry1Ac en el modelo *in vivo* con la línea tumoral 4T1, se utilizaron 2 esquemas de inmunización, consistieron en 3 inmunizaciones profilácticas por la vía i.p. con protoxina o toxina Cry1Ac (50  $\mu$ g) + lisado de células 4T1 (50  $\mu$ g) en un volumen final de 100  $\mu$ L. El grupo control se le administró solamente PBS. En el primer esquema, la inmunización fue aplicada cada tercer día, mientras que en el segundo esquema las inmunizaciones fueron cada séptimo día. Siete días después de la última inmunización, los tumores fueron inducidos mediante la inyección subcutánea de 3 x 10<sup>3</sup> células 4T1 en la mama de las ratonas BALB/c. El crecimiento de los tumores fue monitoreado cada tercer día con un Vernier digital y el volumen fue obtenido de acuerdo a la siguiente formula:  $V=0.52 (A^2 \times L)$ , (A=ancho, L=largo) (Kij et al., 2018, Nigjeh et al., 2019). Todos los ratones fueron sacrificados 40 días después de la inoculación de las células 4T1. Un esquema de inmunización profiláctico similar (aplicaciones cada séptimo día) fue usado para evaluar el efecto en el crecimiento del tumor solamente al aplicar las proteínas Cry1Ac, este esquema consistió en 3 inyecciones subcutáneas peritumorales, aplicadas a partir de la segunda semana de haber inducido los tumores con 3 x 10<sup>3</sup> células 4T1.



## ESQUEMA PROFILACTICO CORTO



## ESQUEMA PROFILACTICO LARGO



### Inmunizaciones:

- ❖ PBS
- ❖ Lisado celular 4T1 (50  $\mu$ g)
- ❖ Lisado celular 4T1 + protoxina Cry1Ac (50  $\mu$ g)
- ❖ Lisado celular 4T1 + toxina Cry1Ac (50  $\mu$ g)

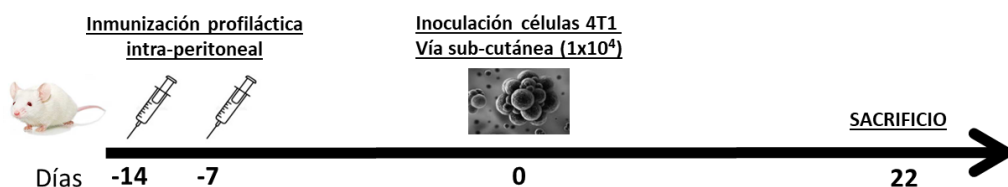
### Péptidos 4T1

Los péptidos corresponden a epítomos identificados en las células 4T1 mediante la secuenciación, **Tmtc2** (QGVTVLAVSAVYDIFVFHRLKMKQILP), **GPRC5a** (FAICFSCLLAHALNLIKLVGRKPLSW) y **Qars** (FPPDAINNF) los cuales fueron identificados como neoepítomos para TCD8+ y **Survivin** (GWEPDDNPI). La mezcla de péptidos fue utilizada para evaluar la respuesta de células específica en el bazo y el GM.

## Microambiente tumoral

Los tumores de ratones que recibieron inmunización de lisado 4T1 + pCry1Ac cada 7<sup>mo</sup> día, fueron obtenidos 3 semanas después de haber inducido los tumores. Los tumores fueron extirpados, disgregados en un filtro estéril de nylon y lavados dos veces con medio de cultivo RPMI, y finalmente, la solución se filtró con la malla de nylon estéril. La suspensión de células fue contada y dividida para la evaluación de poblaciones inmunológicas como linfocitos, macrófagos y células supresoras derivadas mieloides (MDSC, siglas en inglés, Myeloid-derived suppressor cells), las cuales han sido relacionadas con la inmunidad tumoral.

## EVALUACIÓN MICROAMBIENTE TUMORAL



### Inmunizaciones:

- ❖ PBS
- ❖ Lisado celular 4T1 (50 µg)
- ❖ Lisado celular 4T1 (50 µg) + protoxina Cry1Ac (50 µg)
- ❖ Lisado celular 4T1 (50 µg) + toxina Cry1Ac (50 µg)

## Ensayo *in vitro* de citotoxicidad de linfocitos T en células 4T1

El análisis de citotoxicidad de células mediado por linfocitos T fue realizado como se describió anteriormente (Jimenez-Chavez et al., 2019). Los leucocitos de bazo fueron obtenidos el día 21 posterior a la inducción de los tumores con las células 4T1, de los ratones que recibieron 2 inmunizaciones i.p. profilácticas (aplicadas cada 7<sup>mo</sup> día) con lisados de células 4T1 solo o coadministrados con la protoxina o toxina Cry1Ac. Las células no adherentes de bazo de ratones inmunizados y sanos se utilizaron para enriquecer la población de linfocitos T mediante una selección negativa con micro-perlas MACS CD19 (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany, cat # 130-121-301), las células T fueron contadas y co-cultivadas a diferentes proporciones con  $2 \times 10^4$  células 4T1 teñidas con CFSE por 4 hrs en tubos de cultivo. Las células fueron recuperadas, teñidas con Anexina V-APC y analizadas mediante citometría de flujo (FACS Calibur), se registraron 50,000 eventos, de la región 4T1 CFSE+.

## **Análisis de la citometría de flujo**

Los leucocitos obtenidos para la proliferación de linfocitos T y el ensayo de activación de células dendríticas fueron contados mediante un contador de células automatizado, (Bio-Rad TC10™) y fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 min a 4 °C. Para evitar la unión inespecífica de inmunoglobulinas al receptor Fc y II/III, la pastilla de células fue tratada por 30 min con 1µg/mL del anticuerpo monoclonal anti-CD16/32 (Biolegend, San Diego, CA, Cat#101302) en PBS-BSA al 0.5%. Las células fueron lavadas con PBS-BSA 0.5% e incubadas con los siguientes anticuerpos conjugados contra las moléculas indicadas (anti-CD4-PeCy5, anti-CD8-APC y anti-CD19-PE) para la proliferación de linfocitos T y (anti-CD11c-FITC, anti-MHCII-APC, anti-CD80-PeCy5 y anti-CD86-APC) para el ensayo de la activación de células dendríticas por 30 min a 4 °C en oscuridad. Para evaluar el efecto de la inmunización en el microambiente tumoral, los tumores fueron disgregados mecánicamente y filtrados con una maya de nylon por 3 ocasiones. Posteriormente las células de los tumores fueron incubadas con la siguiente tinción: 1) anti-CD3-APC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE y anti-CD69-PeCy5, 2) anti-CD3-APC, anti-CD4-PeCy5, anti-CD25-FITC, anti-FoxP3-PE, 3) anti-CD11b-PeCy5, anti-F4/80-FITC, anti-Gr1-PE, anti-CD86-APC. Las células fueron lavadas con PBS-BSA y suspendidas en 300 µL de paraformaldehído en PBS al 1%. Todos los datos fueron analizados usando el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) y el software BD CellQuest Pro.5.1.1. A menos que se especifique otra cantidad de eventos registrados en general, se registraron 100 000 eventos por muestra.

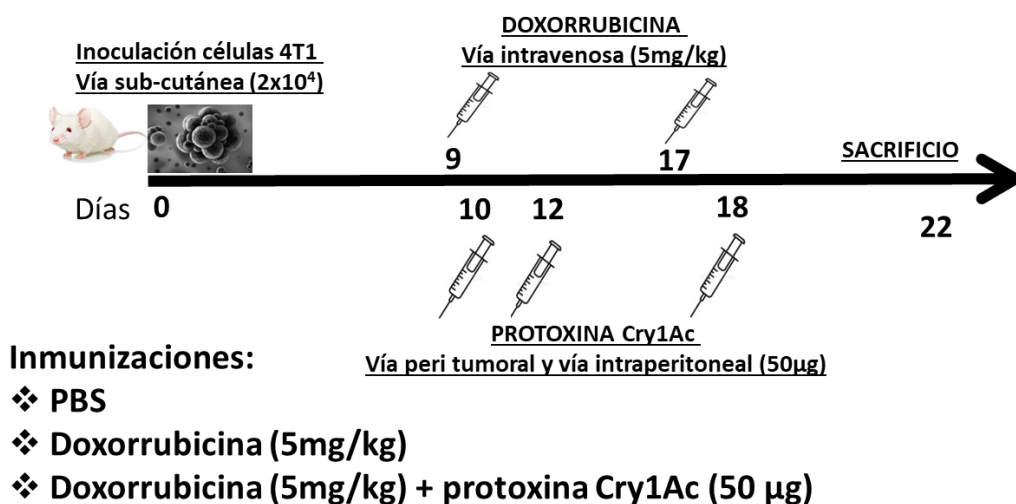
## **Viabilidad celular**

Para determinar si la protoxina y la toxina Cry1Ac tienen efecto citotóxico en las células 4T1, se llevaron a cabo ensayos de MTT (Sigma-Aldrich), el cual fue descrito previamente (Bautista-Jacobo et al., 2021). Las células 4T1 ( $1 \times 10^4$ ) células/pozo fueron incubadas con diferentes concentraciones de las proteínas Cry1Ac, lavadas con PBS e incubadas después con MTT (0.5 mg/mL en el medio de cultivo sin suero fetal bovino) por 4 hrs a 37° C. Posteriormente, se agregaron 100 µL/pozo de MTT, la placa se mezcló por 2 minutos para disolver el MTT. La densidad óptica fue registrada a 570 nm, con referencia a 655 nm (EL800Bio-Tek Instruments, Inc.). La actividad mitocondrial de las células tratadas fue normalizada con la de las células del control negativo (células incubadas con el vehículo). Para evaluar si la protoxina o toxina Cry1Ac podrían provocar apoptosis en células 4T1, la incorporación de Anexina V fue determinada en células incubadas por 24 hrs con distintas concentraciones de las proteínas Cry1Ac. El control positivo de apoptosis fueron células 4T1 incubadas con peróxido de hidrógeno 500 µM ( $H_2O_2$ ); células no tratadas sirvieron como control negativo. Después de 24 hrs de estímulo, las células fueron incubadas con 25 µL de Anexina V (Sigma-Aldrich-A9460; diluido 1:50 en buffer de unión: 0.1M HEPES, 0.14M NaCl, y 0.0025M  $CaCl_2$ ) por 25 minutos en oscuridad, las células fueron registradas con el uso de un citómetro de flujo (FACS Calibur).

## Terapia de Doxorrubicina + protoxina Cry1Ac

Ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inyectados con  $2 \times 10^4$  células 4T1 para inducir el crecimiento tumoral, cuando los tumores fueron palpables, los ratones fueron separados en 3 grupos: no tratados (PBS, grupo vehículo), Doxorrubicina (sola), Doxorrubicina + protoxina Cry1Ac, (5 ratones por grupo). La Doxorrubicina fue administrada por vía intravenosa (i.v.) a una concentración de 5 mg/kg in 100  $\mu$ L en los días 9 y 17 después de la inoculación de las células 4T1. La protoxina Cry1Ac fue administrada después de la terapia con doxorrubicina en los días 10, 12 y 18 después de la inducción de los tumores mediante la ruta peri tumoral a una concentración de 50  $\mu$ g en 50  $\mu$ L y también se administró por la vía i.p. a una concentración de 50  $\mu$ g en 100  $\mu$ L. El crecimiento de los tumores fue monitoreado cada 3er día. Los ratones fueron sacrificados el día 24 posterior a la inoculación de las células tumorales.

## Terapia combinada protoxina Cry1Ac + Doxorrubicina



## Evaluación de citocinas en el tumor

Los tumores de los ratones que recibieron los diferentes tratamientos (terapia solamente con doxorrubicina, terapia combinada de doxorrubicina + protoxina Cry1Ac y ratones control sin tratamiento) fueron obtenidos el día 24 posterior a la inoculación de las células tumorales 4T1. Los tumores fueron pesados y sonicados con pulsos de 10s y 50% de amplitud (Sonic Dismembrator Model 300 Fisher, Pittsburg, PA) para obtener lisados. Se realizó una relación entre el peso del tumor y el volumen del medio agregado al lisado, tomando en cuenta la heterogeneidad en el tamaño de los tumores (0.58gr de tumor/300  $\mu$ L de medio suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas complete<sup>TM</sup> (*mini protease inhibitor tablets*) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Los lisados de los tumores fueron centrifugados por 10 min a 10,000 rpm, los sobrenadantes se recuperaron, fueron alicuotados y guardados a -70 °C hasta su uso. Los niveles de MCP1, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-6 fueron medidos usando BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse inflammatory

Kit (BD Bioscience, cat # 552364 BD) acorde a las instrucciones del fabricante: Comenzamos la curva estándar a una concentración de 5 pg/mL para determinar concentraciones por debajo de la curva recomendada por el fabricante. La concentración de citocinas fue medida mediante citometría de flujo (FACS Calibur) y el software CB BDA.

### **Metástasis en pulmón**

Para el análisis de macro-metástasis en los pulmones se evaluaron en los ratones que recibieron los diferentes tratamientos (terapia solamente con doxorrubicina, terapia combinada de doxorrubicina + protoxina Cry1Ac y ratones sin tratamiento). Durante el sacrificio, los pulmones fueron rellenados con 1 mL de una solución de tinta india al 10% (Winsor & Newton, London, UK), en PBS, a través de la tráquea con ayuda de una cánula. La tráquea fue bloqueada mediante hilo quirúrgico y los pulmones fueron extraídos y lavados 3 veces con 10 mL de solución Fekete (85 mL etanol al 70%, 10 mL paraformaldehído al 10% y 5 mL de ácido acético) y los pulmones fueron fijados en la misma solución durante la noche. Los focos de metástasis fueron contados con un microscopio estereoscopio, OLYMPUS SZ CTV (Olimpus, Tokyo, Japan). El índice de metástasis fue calculado con el número de nodos metástasis en el pulmón.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con Graphpad Prism software versión 7.0. ANOVA de 1 vía fue aplicada para la comparación múltiple y una post-prueba de comparación múltiple de Dunnett fue utilizada para comparar el resto de los grupos, los cuales fueron indicados cuando *p-value* \* $<0.1$ , \*\* $<0.005$ , \*\*\* $<0.01$ , \*\*\*\* $<0.001$ . Los resultados son mostrados como la media  $\pm$  error estándar (SEM) o desviación estándar (SD).

## RESULTADOS

### ***La inmunización intraperitoneal con la protoxina Cry1Ac incrementa la expresión de CD80 en células dendríticas (CD11c+/MHCII+) del bazo***

Es necesaria la activación y maduración de APC para inducir linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos tumorales capaces de eliminar las células de los tumores. Por lo tanto, decidimos evaluar si la inmunización por la vía i.p. con lisado de la línea tumoral 4T1 como fuente de antígenos tumorales coadministrado con la protoxina o la toxina Cry1Ac como adyuvantes, eran capaces de incrementar la activación de células dendríticas en la cavidad del peritoneo y el bazo de ratones BALB/c. La población de células dendríticas maduras fue considerada como aquella en la que la expresión de los marcadores CD11c+/MHCII+ fue alta (Merad et al., 2013). Después de 48 horas de la inmunización analizamos la activación de células dendríticas, elegimos evaluarlo a este tiempo debido a que en previos reportes se ha observado la activación de células dendríticas y macrófagos en la cavidad del peritoneo después de la inmunización i.p. con protoxina Cry1Ac (Moreno-Fierros et al., 2013).

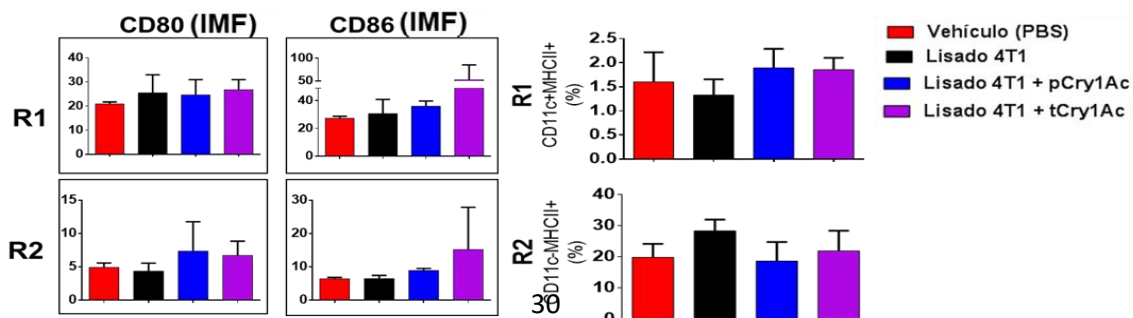
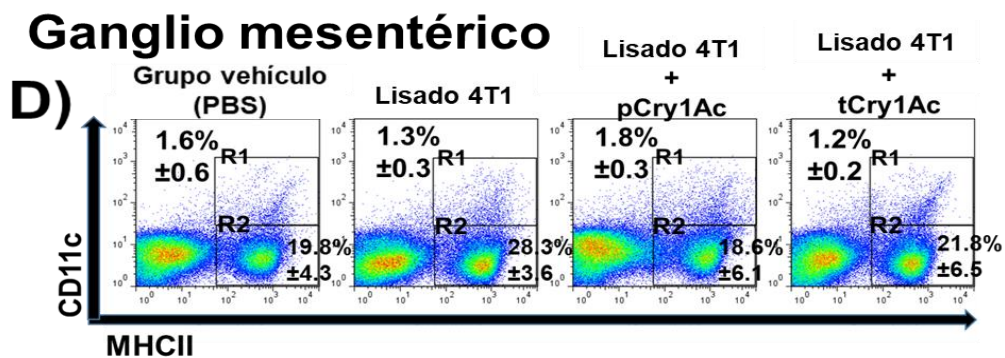
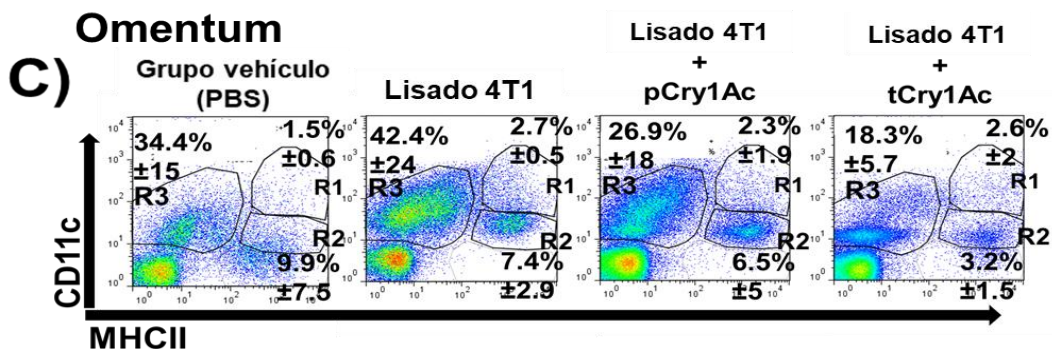
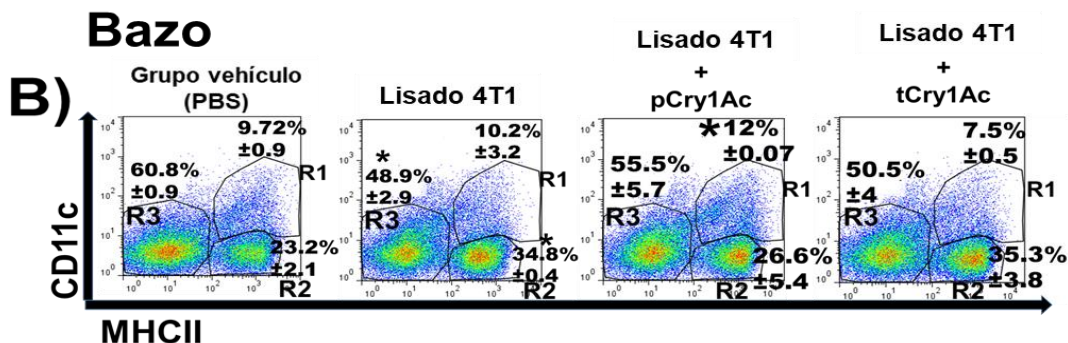
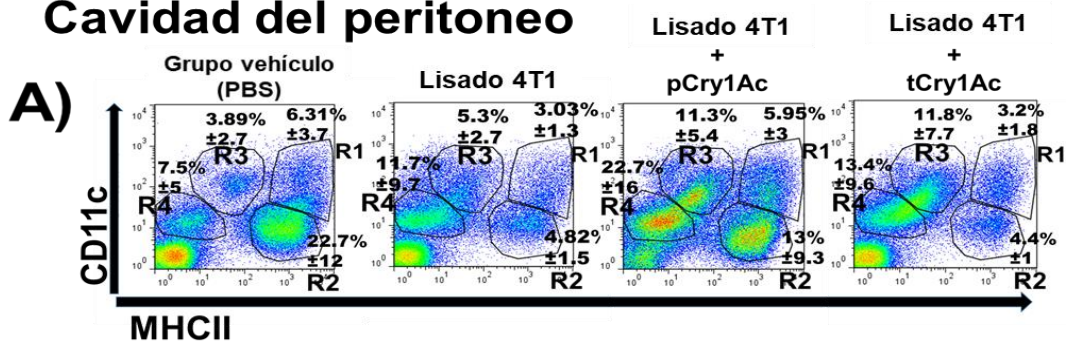
Los “dotplots” representativos de las regiones analizadas para cada tratamiento que fue analizado en la cavidad del peritoneo, bazo, Omentum y ganglio mesentérico, se muestran en la figura 1. No observamos diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en la activación y número de células dendríticas en el GM (Figura 1D). Usando los marcadores CD11c y MHCII, distinguimos 4 poblaciones de células en la cavidad del peritoneo con diferente expresión de estos marcadores: (CD11c+/MHCII+ **(R1)**, CD11c-/MHCII+ **(R2)**, CD11c+/MHCII<sup>low</sup> **(R3)** y CD11c<sup>low</sup>/MHCII- **(R4)**); también la expresión de los marcadores de activación CD80 y CD86 fueron analizados por separado (Figura 2), para determinar con precisión los cambios en la activación después de los diferentes tratamientos.

En los ratones inmunizados con protoxina Cry1Ac como adyuvante, la cantidad de células dendríticas (CD11c+/MHCII+) no incrementaron en la cavidad del peritoneo. Sin embargo, se observó un incremento en la proporción de células que expresan CD11c+/MHCII<sup>low</sup> (R3) y CD11c<sup>low</sup>/MHCII- (R4), en los cuales CD80 tiene una baja expresión y una sobreexpresión, respectivamente, comparados al grupo control (vehículo, PBS) (Figura 2A y 2B). Mientras que los ratones que recibieron la toxina Cry1Ac como adyuvante tuvieron una sobreexpresión de CD80 en las células CD11c<sup>low</sup>/MHCII- (R4), y una baja expresión de CD86 en R3 y R4 con respecto al vehículo (Figura 2B).

De manera notoria, los ratones que habían recibido los lisados 4T1+ la protoxina Cry1Ac mostraron un incremento en la expresión de CD80 en células dendríticas del bazo (CD11c+/MHCII+ (R1)) y en las regiones R2 y R3 en comparación al grupo control (vehículo, PBS) (Figura 2D). En contraste, los ratones que recibieron la inmunización con el lisado 4T1 + la toxina Cry1Ac mostraron una disminución en la expresión de CD86 en la población R1 (células dendríticas) (Figura 2D).

Estos resultados indican que la inmunización con la protoxina Cry1Ac incrementa la proporción de CD11c+/MHCII<sup>low</sup> y CD11c<sup>low</sup>/MHCII- (con alta expresión de CD80) de manera local en la cavidad del peritoneo e induce un incremento en el número y activación de células dendríticas a nivel sistémico (bazo). Es importante tener en cuenta que las diferentes poblaciones analizadas pueden tener una función distinta en cada uno de los sitios analizados.

# Cavidad del peritoneo



**Figura 1. Inmunización con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac no incrementa el número de células dendríticas (CD11c+/MHCII+) en el ganglio mesentérico.** Los ratones BALB/c fueron inyectados por la vía i.p. con una dosis de lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac o toxina Cry1Ac. Después de 48 hrs. Los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron leucocitos de la cavidad del peritoneo, bazo, Omentum y ganglio mesentérico. Las células fueron tratadas para su análisis mediante citometría de flujo como se describe en el apartado de material y métodos con anticuerpos anti-CD11c, anti-MHCII, anti-CD80 y anti-CD86 para evaluar la activación de células dendríticas. **A)** “Dot Plots” representativos muestran la expresión diferencial de CD11c y MHCII en la cavidad del peritoneo, bazo **B)**, Omentum **C)**, y ganglio mesentérico **D)**. Los valores mostrados representan la media  $\pm$ SD expresados como la intensidad media de fluorescencia (IMF). En la figura se muestran datos representativos de dos experimentos independientes.

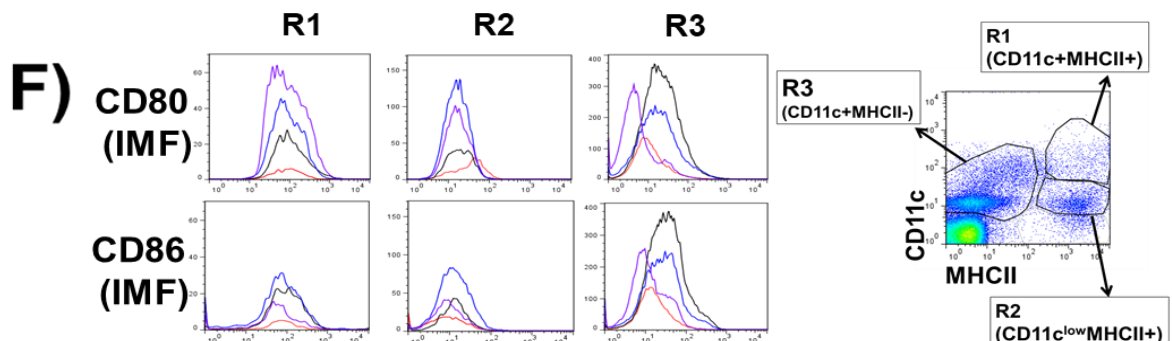
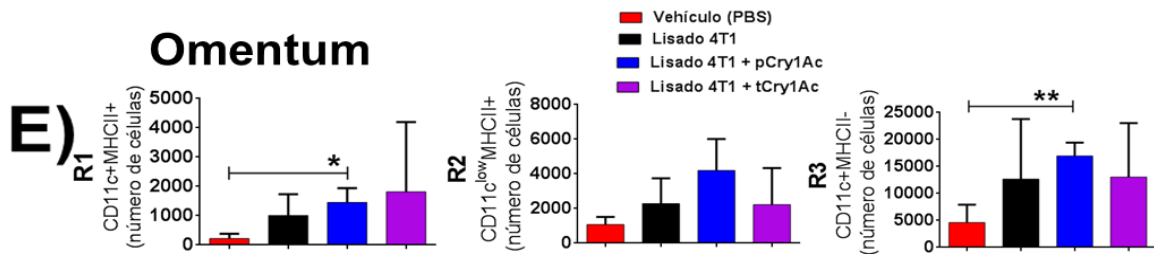
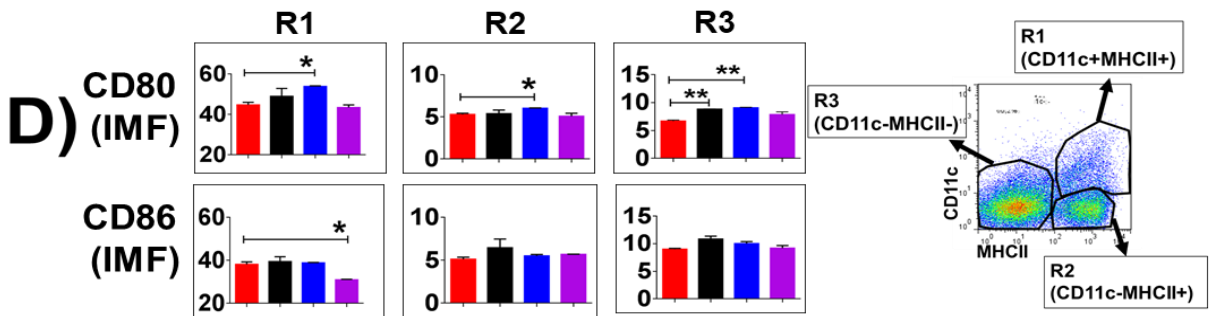
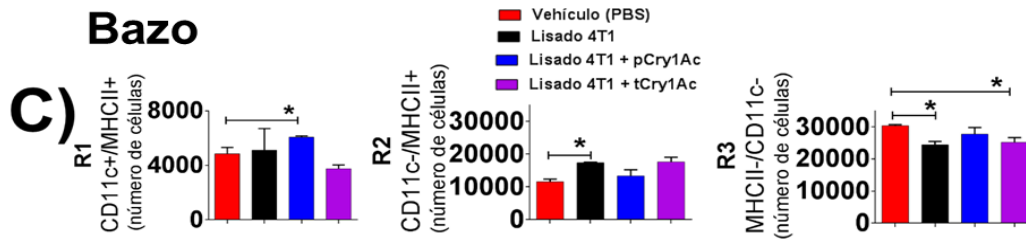
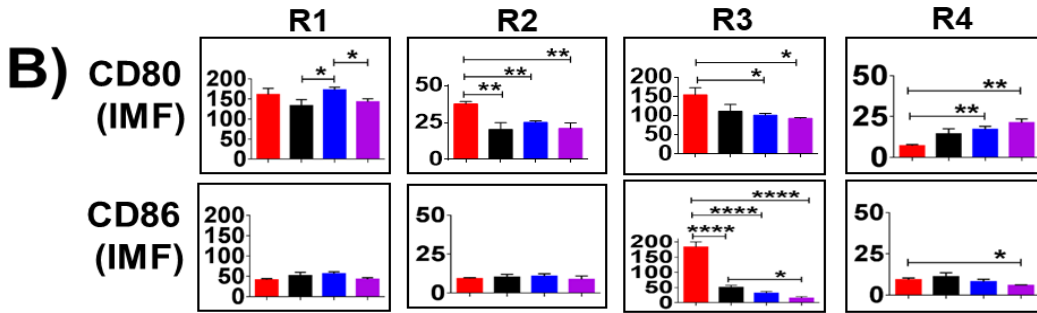
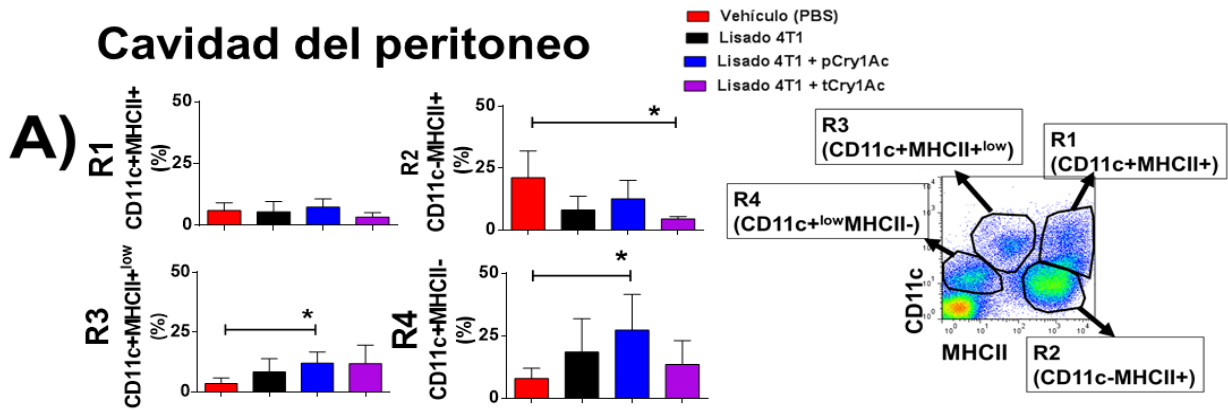
### ***La inmunización intraperitoneal con protoxina Cry1Ac incrementa la cantidad de células dendríticas en el Omentum***

Para determinar si la activación de células dendríticas ocurre con mayor magnitud en otros sitios cercanos al de la inmunización intraperitoneal (lisados 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac), decidimos analizar la población de células dendríticas en el Omentum y el ganglio mesentérico (GM). Estos sitios fueron elegidos debido a que se ha descrito que posterior a la inmunización intraperitoneal con un estímulo inflamatorio, como LPS, el tioglicolato, o incluso con la misma protoxina Cry1Ac, parece inducir la migración de la población de macrófagos residentes del peritoneo hacia el Omentum (Rubio-Infante et al., 2018) (Ghosn et al., 2010). Observamos que los ratones que recibieron la protoxina Cry1Ac mostraron un incremento en el número de células dendríticas en el Omentum comparado al grupo control (PBS) y a los ratones que recibieron solamente el lisado 4T1 (Figura 1C y Figura 2E) (Figura complementaria 1 muestra las gráficas de las proporciones obtenidas en cada uno de los sitios analizados). En los ratones inmunizados con lisado 4T1 + toxina Cry1Ac no encontramos diferencias significativas (Figura 2E).

Estos resultados muestran la activación de células dendríticas inducida por la protoxina Cry1Ac, en la cavidad del peritoneo, bazo y omentum, por lo que nos llevó a proponer el uso de la protoxina Cry1Ac como un posible adyuvante que podría inducir una respuesta antitumoral mediado por linfocitos T.



# Cavidad del peritoneo



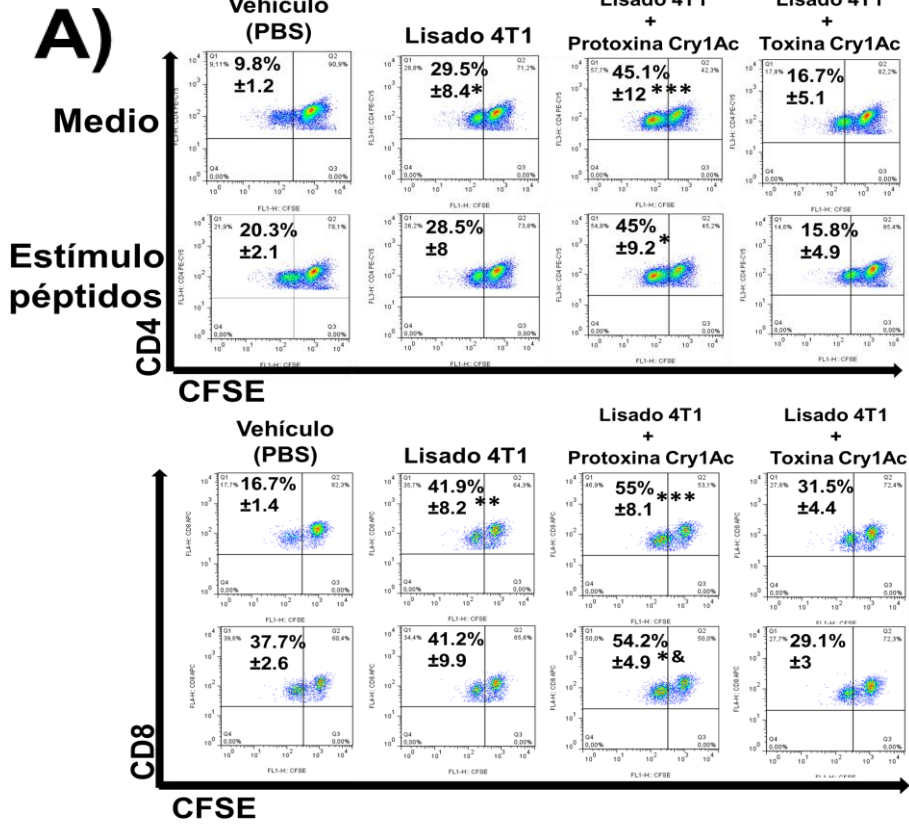
**Figura 2. Inmunización con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac incrementa la activación de células dendríticas (CD11c+/MHCII+) y la cantidad de células CD11c+ en Omentum y bazo.** Ratones BALB/c fueron inyectados por la vía i.p. con una sola dosis de lisado 4T1 solo o coadministrado con protoxina o toxina Cry1Ac. El lisado 4T1 y las proteínas fueron administrados a una concentración de 50 µg cada una. Después de 48 hrs., los ratones fueron sacrificados, y se obtuvieron leucocitos de la cavidad del peritoneo **A) y B)**, bazo **C) y D)** y del Omentum **E) y F)**. Las células fueron teñidas para ser analizadas mediante citometría de flujo, como se describe en el apartado de materiales y métodos, con anti-CD11c, anti-MHCII, anti-CD80 y anti-CD86 para determinar la activación de células dendríticas. Cien mil eventos (100,000) fueron registrados en cada muestra. Los "Dot Plots" representativos de la diferente expresión de CD11c y MHCII se muestran en la figura 1. En el peritoneo, cuatro regiones fueron distinguidas (**R1, R2, R3 y R4**), mientras que en el bazo y el Omentum se definieron tres poblaciones (**R1, R2 y R3**). Estas regiones fueron analizadas por separado para evaluar la expresión de CD80 y CD86. Las gráficas de barra en **A, C y E** muestran el porcentaje de células en cada región, expresados como la media ± SD ("standar deviation"). Los valores mostrados en B y D representan la intensidad media de fluorescencia (IMF), expresada como media ± SD. Se utilizaron ANOVA, prueba múltiple de Dunnett y prueba de t. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001 contra el grupo indicado.

### ***El tratamiento con protoxina Cry1Ac incrementa la proliferación de linfocitos TCD4 y TCD8 en bazo y ganglio mesentérico***

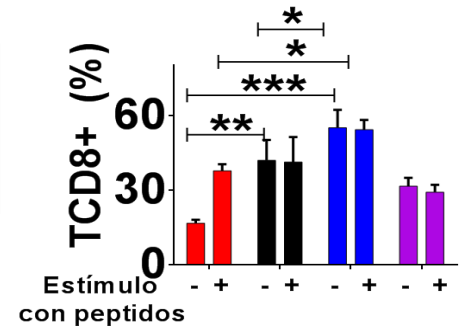
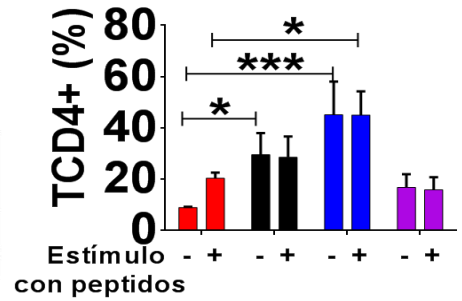
La generación de respuesta celular por linfocitos TCD4+ y TCD8+ es requerida para inducir una adecuada respuesta antitumoral, ya que los linfocitos T mejoran la producción de citocinas y eliminan las células tumorales, respectivamente. Para determinar si la protoxina o la toxina Cry1Ac como adyuvantes coadministradas con lisados 4T1 son capaces de inducir un incremento en la respuesta celular después de la inmunización, evaluamos la proliferación sistémica y local de linfocitos TCD4+ y TCD8+ en el bazo y el ganglio mesentérico, los cuales fueron re-estimulados *in vitro* con una mezcla de péptidos correspondientes a epítomos expresados por la línea tumoral 4T1 (Kreiter et al., 2015).

Observamos que los ratones inmunizados con lisado 4T1 + protoxina Cr1Ac induce un incremento en la proliferación de linfocitos TCD4+ (45.1%) en el bazo en comparación a los ratones que fueron inmunizados solo con el lisado 4T1 (29.5%) y el grupo control PBS (9.8%). La alta proporción de proliferación registrada posiblemente se deba a que las células de bazo de ratones habían recibido la segunda inmunización dos días antes del sacrificio. Por consiguiente, no se observó un incremento en la proliferación después del re-estímulo *in vitro* con los péptidos expresados por la línea tumoral 4T1, con respecto a las células que no recibieron el estímulo, posiblemente debido a que los linfocitos T estaban ya en proliferación (Figura 3A). Notablemente, la proliferación de linfocitos TCD8+ en el bazo fue más alta en los ratones que recibieron el tratamiento con el lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac (55%) en comparación con los ratones que recibieron la inmunización solamente con el lisado 4T1 (41.9%) y los que recibieron el vehículo PBS (16.7%), aunque no se observaron diferencias con respecto al lisado solo, es necesaria la presencia del adyuvante para observar los cambios observados (Figura 3A). Además de evaluar la respuesta celular en el bazo, evaluamos la proliferación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ en el ganglio mesentérico, el cual es un ganglio linfoide localizado al sitio de inmunización (vía intraperitoneal). Encontramos que los ratones que recibieron el lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac o toxina Cry1Ac tuvieron un incremento en la proliferación de linfocitos TCD8+ (18.7% y 11%, respectivamente) y linfocitos TCD4+ (2% y 1.6%, respectivamente) en comparación con los ratones inmunizados solamente con el lisado 4T1 (Figura 3B).

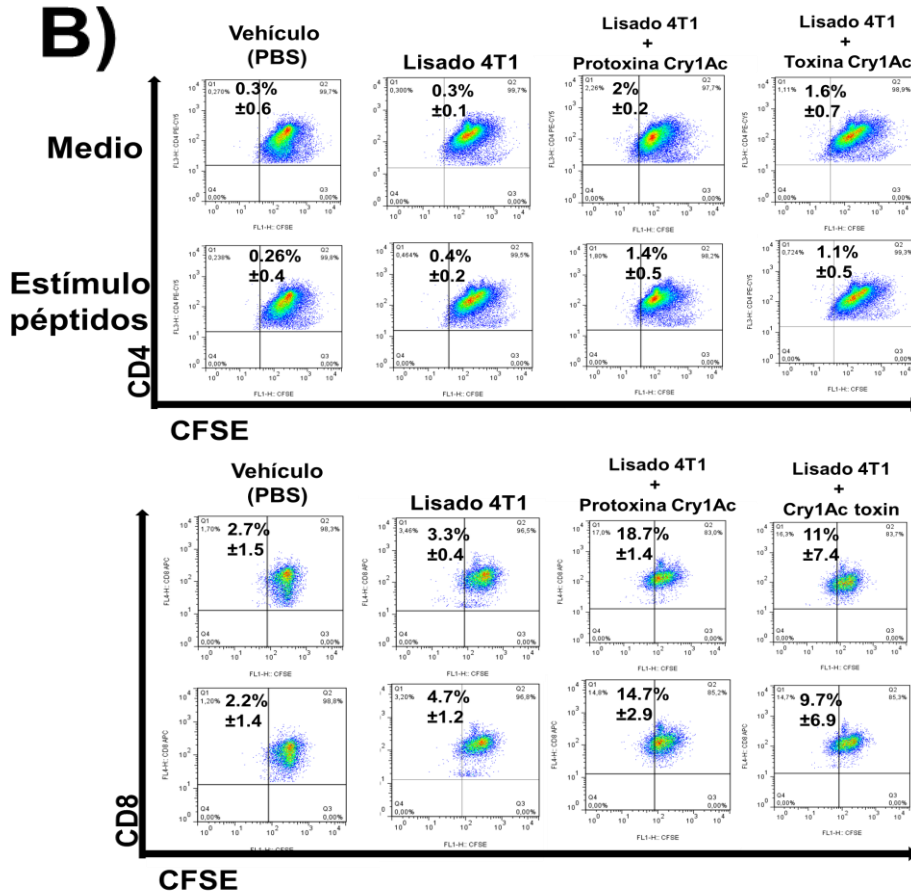
# Bazo



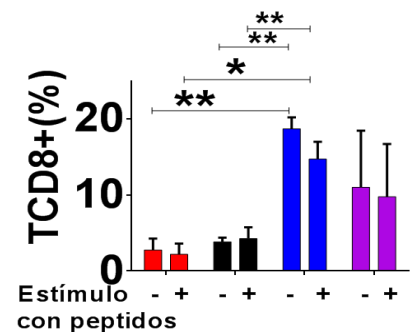
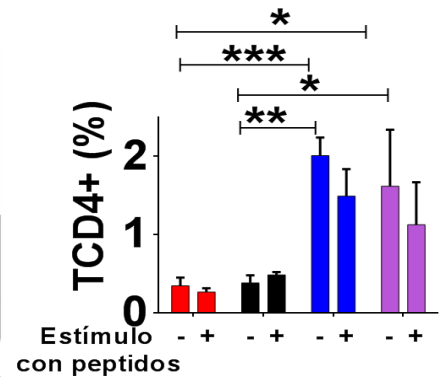
- Vehículo (PBS)
- Lisado 4T1
- Lisado 4T1 + pCry1Ac
- Lisado 4T1 + tCry1Ac



# Ganglio mesentérico



- Vehículo (PBS)
- Lisado 4T1
- Lisado 4T1 + pCry1Ac
- Lisado 4T1 + tCry1Ac



**Figura 3. La inmunización con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac induce incremento en la proliferación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ en el bazo y ganglio mesentérico.** R ratones BALB/c fueron inmunizados con lisado 4T1 o coadministrado con protoxina o toxina Cry1Ac (a una concentración de 50 µg cada dosis) por la vía i.p., las inmunizaciones fueron aplicadas una vez a la semana, por dos semanas. Los ratones fueron sacrificados 2 días después de la segunda inmunización, se obtuvieron linfocitos del **A)** bazo y **B)** ganglio mesentérico y teñidos con CFSE. Para analizar la proliferación, los linfocitos fueron cultivados en placas de 96 pozos y estimulados con una mezcla de péptidos (10 µg/1mL) (como se describe en el apartado de material y métodos), 72 hrs después los linfocitos fueron obtenidos y teñidos con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 y analizados mediante citometría de flujo. Cien mil (100,000) eventos fueron registrados por muestra. n= 3 por grupo. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 contra el grupo indicado. “Dot Plots” que se muestran corresponden a los representativos para cada tratamiento con la media expresada en porcentaje ±SD. Los valores mostrados en la gráfica de barras indican la media expresada en porcentaje ± SD.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que los ratones que reciben la protoxina o toxina como adyuvantes incrementan la proliferación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ a nivel local (GM) y a nivel sistémico (bazo).

### ***La protoxina Cry1Ac tiene efecto adyuvante antitumoral en un modelo in vivo***

Para evaluar si la protoxina y la toxina Cry1Ac tienen efecto adyuvante *in vivo*, usamos un modelo triple negativo de cáncer de mama inducido por la inyección de la línea tumoral 4T1; y medimos el tamaño de los tumores en los ratones que recibieron un tratamiento profiláctico mediante la inmunización de lisados 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac, evaluando dos diferentes esquemas de inmunización. El esquema corto, consistió en tres inmunizaciones cada 3er día, que fue basado en reportes en la literatura en el cual evaluaron la respuesta antitumoral de algunos adyuvantes (Soliman et al., 2015) (Yin et al., 2016) (Figura 4A, 4B y 4C). El esquema largo, en el cual las inmunizaciones fueron cada 7<sup>mo</sup> día, fue evaluado para mejorar la respuesta adaptativa (Figura 4D, 4E y 4F).

En el esquema profiláctico corto, observamos que los ratones que recibieron el lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac mostro 60% de ratones libres de tumor (6 de 10) y los ratones que desarrollaron tumores fueron más pequeños comparados a los ratones que solamente recibieron el lisado 4T1, el cual tuvo 20% de ratones libres de tumor (2 de 10) (Figura 4A, 4B). Interesantemente, con el esquema profiláctico largo, los ratones que recibieron el lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac se protegieron completamente al desarrollo de tumores. Los ratones que recibieron el lisado 4T1 + toxina Cry1Ac en el esquema largo tuvieron 20% de ratones libres de tumor y el tamaño de los tumores fue similar al de los ratones que solamente recibieron el lisado 4T1 (Figura 4D, 4E, 4F). Es importante mencionar que los ratones que recibieron solamente el lisado 4T1 mostraron tumores más pequeños en el esquema largo de inmunización en comparación con el esquema corto, sugiriendo que el espaciamiento de las inmunizaciones mejoró la respuesta inmune adaptativa.

La inmunización profiláctica intraperitoneal de la protoxina Cry1Ac o toxina Cry1Ac solas (sin ser coadministradas con el lisado 4T1) no tuvo efecto en el crecimiento de los tumores, confirmando el efecto adyuvante de ambas proteínas (Figura 4G).

Es importante mencionar que el potencial *in vivo* terapéutico del efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac fue evaluado mediante la inyección de 3 dosis solamente con la protoxina Cry1Ac por la vía peritumoral (50µg/100 µL, una vez a la semana por 3

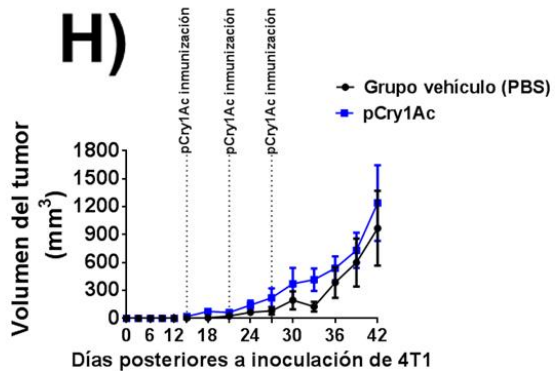
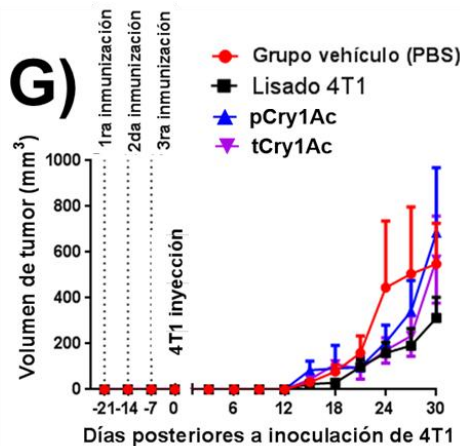
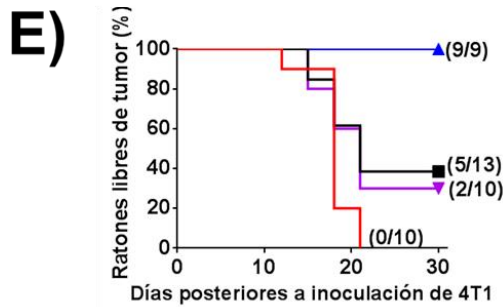
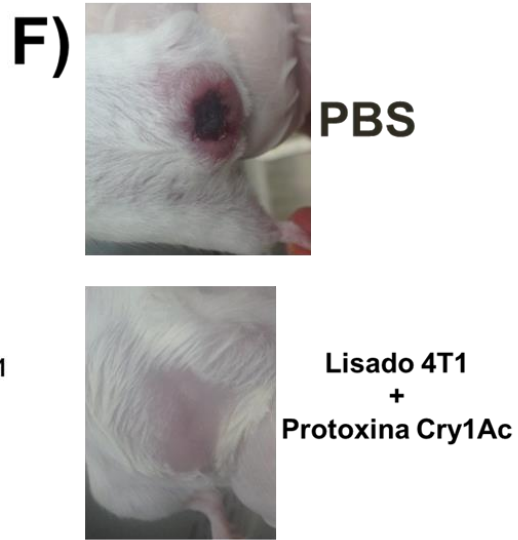
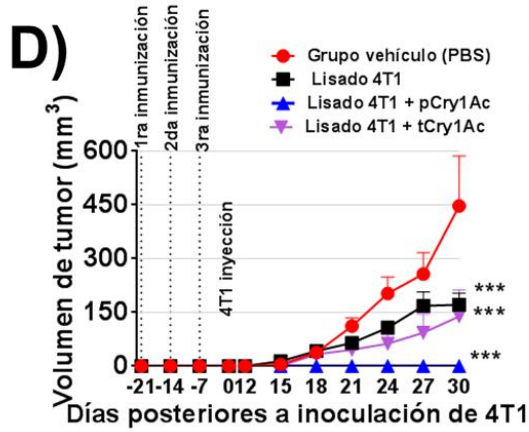
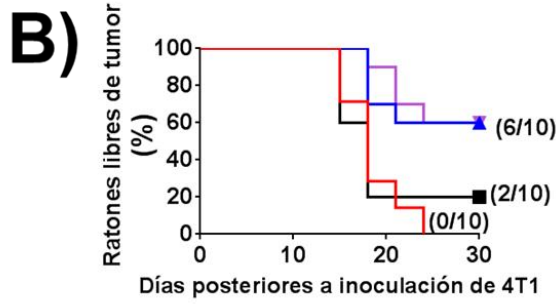
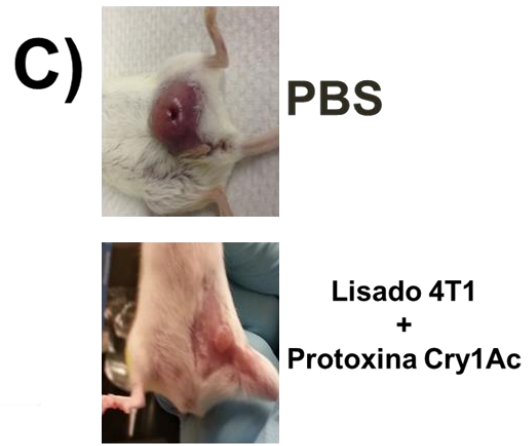
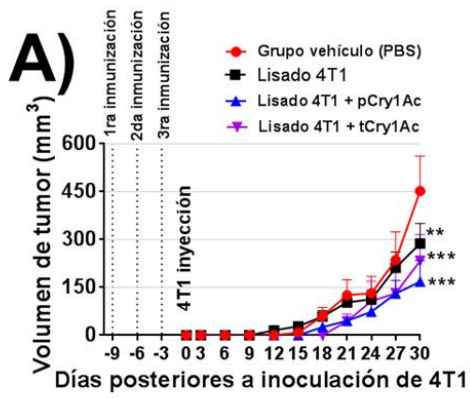
semanas), sin embargo, no observamos alguna disminución en el crecimiento de los tumores (Figura 4H), Solamente observamos efecto en el crecimiento del tumor después de la coadministración profiláctica con la protoxina Cry1Ac, pero no cuando estas proteínas fueron administradas solas, sugiriendo que por sí solas no tienen efecto terapéutico. El nulo efecto de las proteínas podría ser explicado por las características del modelo de cáncer de mama 4T1, el cual es muy agresivo, ya que representa un estado avanzado de la enfermedad, donde la respuesta inmune en el microambiente tumoral y a nivel sistémico está disminuido.

También evaluamos si las proteínas Cry1Ac tenían algún efecto tóxico para las células tumorales 4T1 como se ha reportado el efecto citotóxico en otras líneas tumorales (Mendoza-Almanza et al., 2019). El resultado del ensayo de viabilidad celular mediante MTT mostró un mínimo o nulo efecto citotóxico de la protoxina y toxina Cry1Ac, respectivamente, sobre las células 4T1. Mediante un ensayo de Anexina V, la protoxina y toxina Cry1Ac no inducen apoptosis sobre las células tumorales 4T1 (Figura 5).

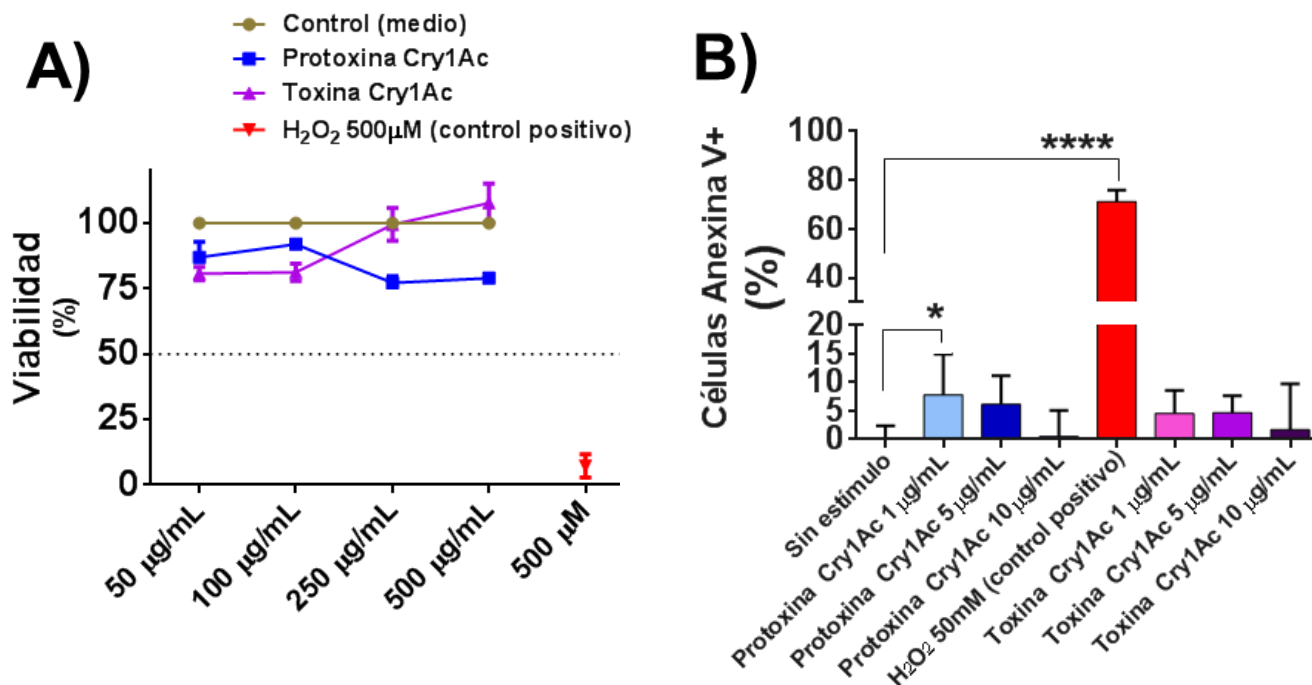
#### ***El tratamiento profiláctico de lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac como adyuvante previene la disminución de linfocitos TCD3+ y TCD4+ en bazo***

Una característica bien descrita del modelo triple negativo de cáncer de mama con la línea tumoral 4T1, es la marcada reducción de linfocitos T en los ganglios y sangre periférica (Tao et al., 2008). Por lo tanto, para conocer cómo se encontraban las poblaciones de linfocitos T en los ratones que se protegieron del desarrollo de tumores, evaluamos cambios en las poblaciones de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en el bazo de los ratones que recibieron el esquema largo de inmunización profiláctica.

Observamos que los ratones que recibieron la protoxina Cry1Ac como adyuvante, no presentaron disminución en la proporción de linfocitos TCD3+ (38%) en el bazo, en comparación a los ratones que desarrollaron tumores, el grupo control PBS (16.3%), lisado 4T1 (37.1%), y lisado 4T1 + toxina Cry1Ac (19%) (Figura 6A). También, analizamos el número total de linfocitos TCD3+ y las subpoblaciones de TCD4+ y TCD8+. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en los ratones que recibieron la inmunización con la protoxina Cry1Ac como adyuvante, ya que no mostraron una disminución en el número de linfocitos TCD3+ y TCD4+, en comparación con los ratones que recibieron el vehículo PBS, mientras que los ratones que reciben la toxina Cry1Ac como adyuvante mostraron una disminución en el porcentaje y número de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ (Figura 6B).



**Figura 4. La protoxina Cry1Ac tiene efecto adyuvante antitumoral en dos diferentes esquemas de inmunización profiláctica.** En ambos esquemas (corto y largo), los ratones BALB/c recibieron tres inmunizaciones con lisado 4T1 (50 µg) solo, lisado 4T1 coadministrado con protoxina Cry1Ac o toxina Cry1Ac como adyuvantes y el grupo administrado con vehículo (PBS). Las proteínas fueron administradas a una concentración de 50 µg cada dosis, como se especifica en el apartado de materiales y método. En el esquema corto se administraron tres inmunizaciones, una cada tercer día (**A y B**); mientras que, en el esquema largo, se administraron tres inmunizaciones, una cada séptimo día (**C y D**). Posteriormente, los tumores de mama fueron inducidos mediante la inyección de  $3 \times 10^3$  células 4T1 por la vía subcutánea (s.c.), el crecimiento de los tumores fue medido cada tercer día. Crecimiento del tumor **A**), y el porcentaje de ratones libres de tumor **B**) del esquema corto de inmunización, cada punto representa la media del volumen del tumor ( $\text{mm}^3$ )  $\pm$ SEM. ANOVA y prueba múltiple de Dunnett fueron realizadas.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  indican diferencias significativas con respecto al grupo PBS. Fotos de los tumores de ratones que recibieron la inmunización en el esquema corto, grupo control (PBS) y lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac 30 días después de haber sido inyectadas las células tumorales 4T1 **C**). Crecimiento del tumor **D**) y porcentaje de ratones libres de tumor **E**) en el esquema de inmunización largo, cada punto representa la media del volumen del tumor ( $\text{mm}^3$ )  $\pm$  SEM. **F**) Foto del tumor de los ratones que recibieron el esquema largo de inmunización, grupo control (PBS) y lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac 30 días después de haber sido inyectadas las células tumorales 4T1. **G**) Crecimiento de los tumores en ratones con tratamiento profiláctico que recibieron la protoxina o toxina Cry1Ac solas (esquema largo), vehículo (PBS) o lisado 4T1. **H**) Crecimiento del tumor en ratones que recibieron terapia con protoxina Cry1Ac, 14 días después de haber sido inyectadas las células tumorales 4T1. La protoxina Cry1Ac fue aplicada una vez por semana durante tres semanas. Crecimiento del tumor incluye solo las mediciones de los ratones que desarrollaron tumores. ANOVA y prueba múltiple de Dunnett fueron realizadas.  $***p < 0.001$ . \* Indica diferencias significativas con respecto al grupo PBS.



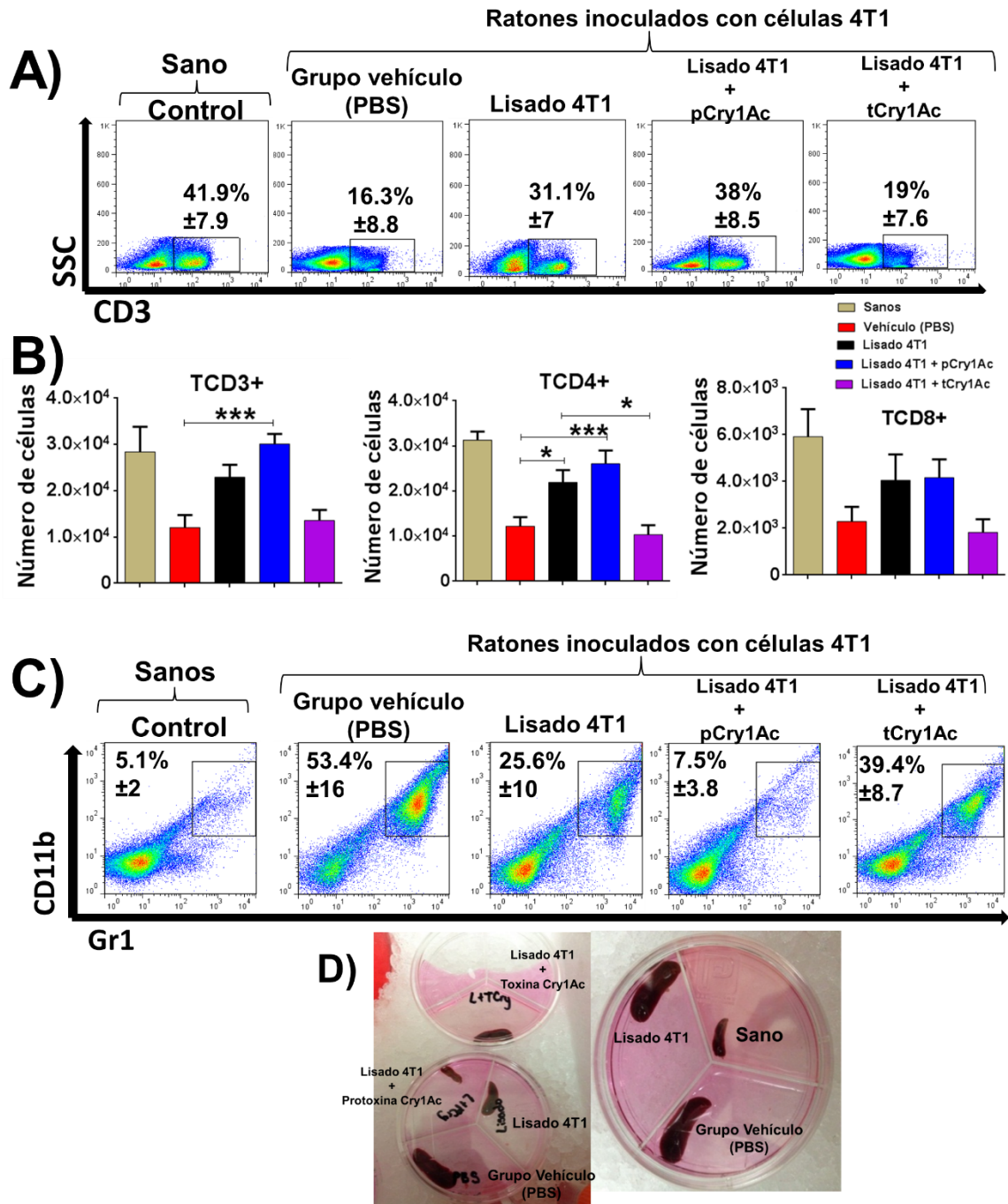
**Figura 5. La protoxina y la toxina Cry1Ac tienen un ligero y nulo efecto citotóxico, respectivamente, sobre las células tumorales 4T1.** Para analizar el efecto citotóxico de las proteínas Cry1Ac sobre las células tumorales 4T1, se realizaron ensayos de MTT y de Anexina V, como se describe en el apartado de material y métodos. Para el ensayo de MTT, las células tumorales 4T1 ( $1 \times 10^4$  células/pozo) fueron incubadas durante 24 hrs con diferentes concentraciones de las proteínas Cry1Ac. El control positivo de citotoxicidad y apoptosis fueron células incubadas con 500 µM de peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); **A**) Ensayo de MTT. La gráfica representa el porcentaje de viabilidad de las células 4T1 incubadas con protoxina o toxina Cry1Ac. **B**) Apoptosis

en células 4T1 incubadas con proteínas Cry1Ac. La incorporación de Anexina V fue determinada en células 4T1 incubadas por 24 hrs con distintas concentraciones de las proteínas Cry1Ac. La gráfica de barras muestra el porcentaje de células 4T1 positivas para Anexina V+. Para este ensayo, tres experimentos independientes fueron realizados con la técnica de duplicado para cada tratamiento.

Evaluamos una población de células conocidas como células supresoras derivadas mieloides (MDSC), las cuales tienen un rol importante en el mantenimiento de inmunosupresión en el microambiente tumoral. Las MDSC son una población heterogénea de células progenitoras de origen mieloides, los cuales comprenden granulocitos inmaduros, macrófagos y células dendríticas (Filipazzi et al., 2007). En ratones, las MDSC expresan marcadores de linaje mieloides, como Gr1+ y CD11b+ (Youn et al., 2008). En el modelo triple negativo de cáncer de mama, las MDSC se incrementan en la sangre periférica, bazo, ganglios linfoides, el tumor, mejorando el crecimiento de los tumores y la metástasis, y favorecen la evasión del reconocimiento por parte del sistema inmunológico (Hsu et al., 2019). Notablemente, observamos que los ratones que habían recibido el lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac, no mostraron incremento de MDSC (7.5%) comparado con los ratones que desarrollaron tumores, grupo control PBS (53.4%), lisado 4T1 (25.6%), y lisado 4T1 + toxina Cry1Ac (39.4%) (Figura 6C). El incremento en el número de MDSC está relacionado al incremento en el tamaño del bazo, el cual fue observado en día del sacrificio (Figura 6D).

Estos resultados sugieren que el efecto protector y adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac estaría relacionado con su habilidad de mejorar la respuesta inmune celular, con la capacidad de prevenir la disminución de linfocitos TCD3+ y TCD4+ y evitar el incremento de MDSC a nivel sistémico.



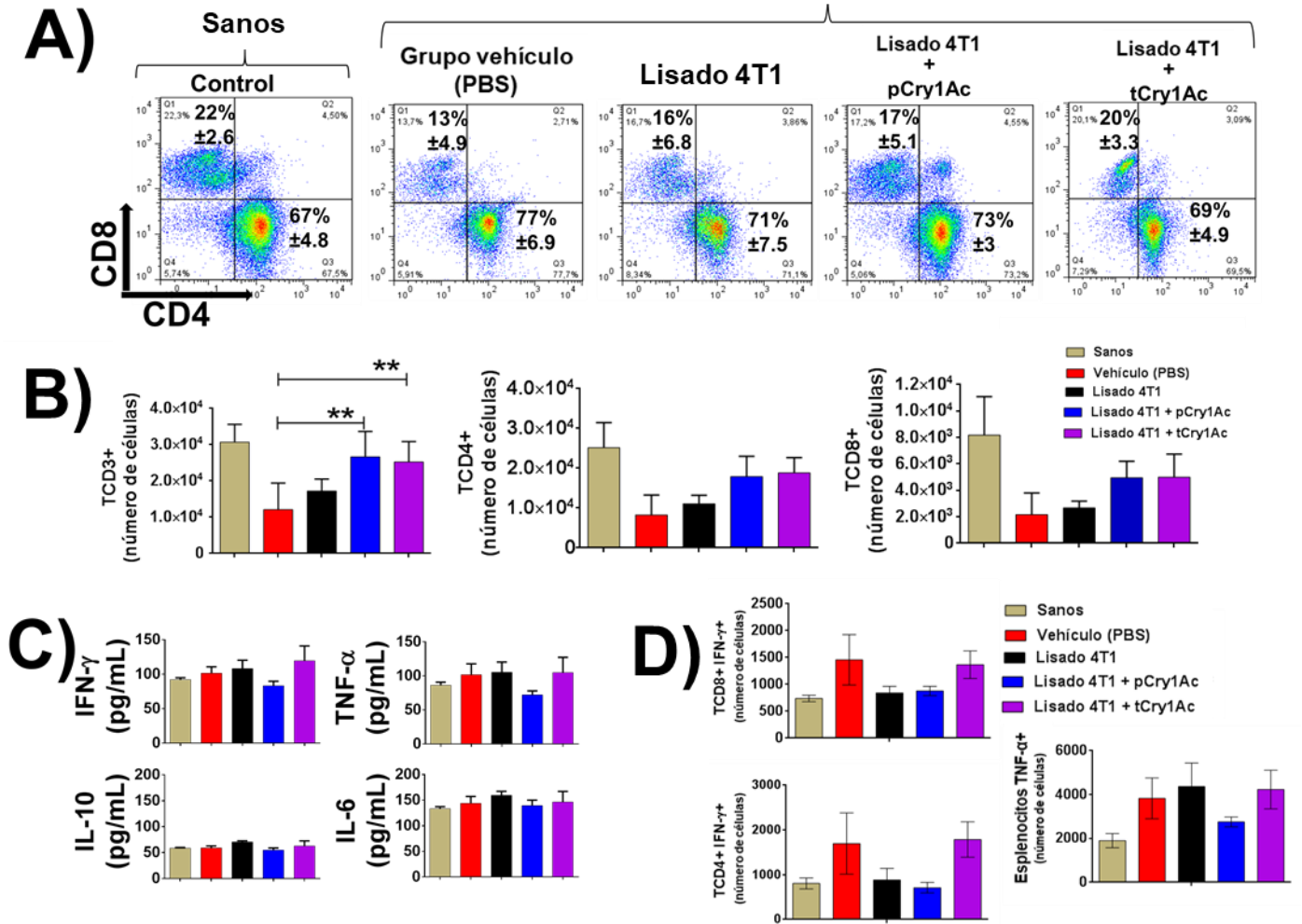


**Figura 6.** El esquema largo del tratamiento profiláctico *in vivo* con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac evita la disminución de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ y el incremento de MDSC en el bazo. Las poblaciones de linfocitos en bazo fueron obtenidas de ratones sanos, ratones que recibieron el vehículo (PBS) y de los que fueron inmunizados con el esquema largo profiláctico (una inmunización cada semana, durante tres semanas) con lisado 4T1 o coadministrado con toxina o protoxina Cry1Ac (50 µg cada dosis). **A)** “Dot Plots” representativos del porcentaje de linfocitos TCD3+ en el bazo de ratones que recibieron los diferentes tratamientos. **B)** número total de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ obtenidos del bazo, media ±SEM. Conteo total de células fue estimado mediante el análisis de cien mil (100,000) eventos registrados para cada muestra. **C)** “Dot Plots” representativos del porcentaje de células supresoras derivadas mieloides (MDSC) en el bazo. **D)** Tamaño de los bazos obtenidos de los ratones que recibieron los diferentes tratamientos. Linfocitos TCD3+ fueron obtenidos de la región correspondiente a linfocitos definido en base a los parámetros de tamaño y granularidad. Linfocitos TCD4+ y TCD8+ fueron calculados de la región de linfocitos TCD3+. La región de MDSC fue definida como Gr1+/CD11b+. Gráfica de barras muestra la media del porcentaje o del número total ±SEM correspondientes a

la región CD3+ o a la población de MDSC. ANOVA y prueba múltiple de Dunnett fueron realizadas. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . n= 7-10.

Los ratones que fueron inmunizados con lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac en el esquema de inmunización corto, mostraron una ligera disminución en la cantidad de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en comparación con los ratones que recibieron solamente el lisado 4T1 y el grupo control PBS (los cuales desarrollaron tumores de mayor tamaño) (Figura 7B). Los niveles de citocinas (TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) fueron mayor en los ratones con tumor (de cualquier tratamiento) mientras que los ratones que recibieron la protoxina Cry1Ac como adyuvante (los cuales desarrollaron tumores de menor tamaño), tuvieron una baja producción de estas citocinas, mostrando niveles similares a ratones sanos (Figura 7C). Por lo tanto, falta caracterizar el perfil de citocinas para determinar si el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac está relacionado con el incremento de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o de alguna otra citocina. Las condiciones experimentales usadas en el presente estudio podrían no haber sido las óptimas, posiblemente la evaluación de las citocinas debería realizarse en un punto más temprano, antes o después de inducir los tumores, o quizá utilizar un estímulo con péptidos tumorales, o algún ensayo que incluya la activación de linfocitos mediante anti-CD3/anti-CD28, o con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA).

Ratones inoculados con células 4T1

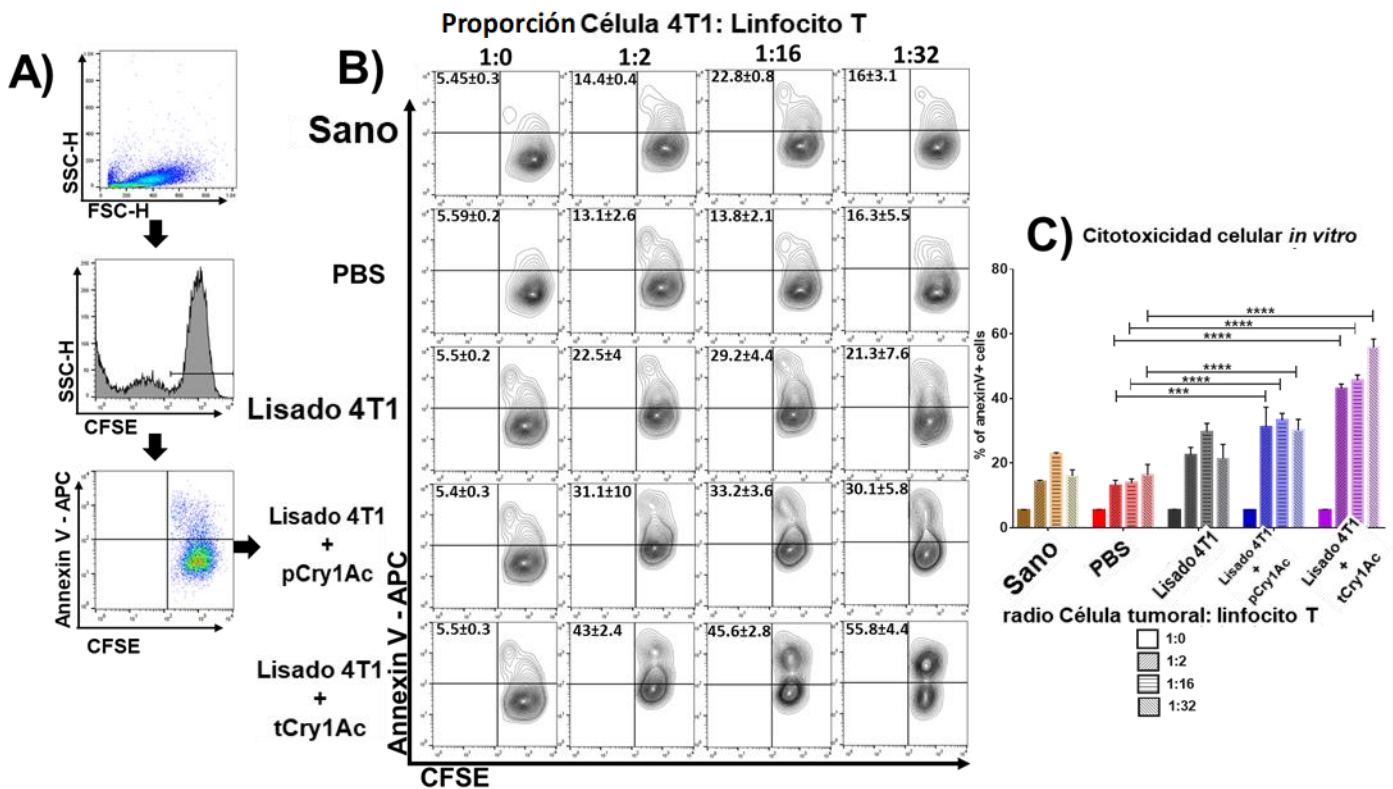


**Figura 7. Esquema corto profiláctico *in vivo* de lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac evita la disminución de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ en el bazo.** A) “Dot Plots” representativos del porcentaje de linfocitos TCD4+ y TCD8+ en el bazo de los ratones que recibieron los diferentes tratamientos. B) Número total de linfocitos TCD3+, TCD4+ y TCD8+ obtenidos del bazo  $\pm$ SD. ANOVA y prueba múltiple de Dunnett fueron realizadas. C) La grafica de barras representa la cantidad de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 del sobrenadante de leucocitos obtenidos del bazo de los ratones con los diferentes tratamientos que recibieron el esquema corto de inmunización por el método de ELISA. D) La gráfica de barras representa el número de linfocitos TCD4+ y TCD8+ productores de IFN- $\gamma$ , así como de los leucocitos de bazo productores de TNF- $\alpha$  evaluado mediante citometría de flujo. ANOVA y prueba múltiple de Dunnett fueron realizadas. \*\* $p < 0.01$ . n=7-10.

**La inmunización con lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac incrementa la respuesta específica de linfocitos T citotóxicos**

Evaluamos la respuesta específica de linfocitos T citotóxicos *in vitro* en células 4T1 marcadas con Carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE, siglas en inglés), en el cual confirmamos un incremento de linfocitos T citotóxicos específicos aislados de los bazo de ratones que recibieron la inmunización profiláctica de lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac en comparación con linfocitos T de ratones no inmunizados o inmunizados solamente con el lisado 4T1 (Figura 8B y 8C).

Sorprendentemente, la toxina Cry1Ac mostró una mejor capacidad de activar linfocitos T para eliminar células 4T1 *in vitro*, que la protoxina Cry1Ac. El incremento de apoptosis fue evaluado mediante la expresión de Anexina V en células 4T1 marcadas con CFSE incubadas con distintas proporciones de linfocitos T obtenidos de ratones con los diferentes tratamientos y de linfocitos de ratones no inmunizados (Figura 8B y 8C).



**Figura 8. La protoxina Cry1Ac y la toxina Cry1Ac coadministradas con lisado 4T1 inducen citotoxicidad mediada por células T de bazo *in vitro*.** Para el análisis de citotoxicidad mediada por linfocitos T, los ratones fueron inmunizados con lisado 4T1 solo o coadministrado con protoxina o toxina Cry1Ac (50 µg cada dosis). Los ratones recibieron dos inmunizaciones, una cada semana y fueron sacrificados el día 21. Los leucocitos de bazo de ratones sanos o de ratones inmunizados fueron recuperados y los linfocitos T fueron aislados por selección negativa con perlas magnéticas y fueron co-cultivados con células 4T1 teñidas con CFSE durante cuatro horas. Las células fueron recuperadas y tratadas con Anexina V-APC y analizadas mediante citometría de flujo, en el cual se registraron cien mil (100,000) eventos por muestra. **A)** estrategia de región mediante citometría de flujo, la figura muestra las regiones usadas para aislar células 4T1 CFSE+ para el análisis mostrado en B. **B)** “Dot Plots” representativos de células 4T1 CFSE+ para Anexina V con diferentes

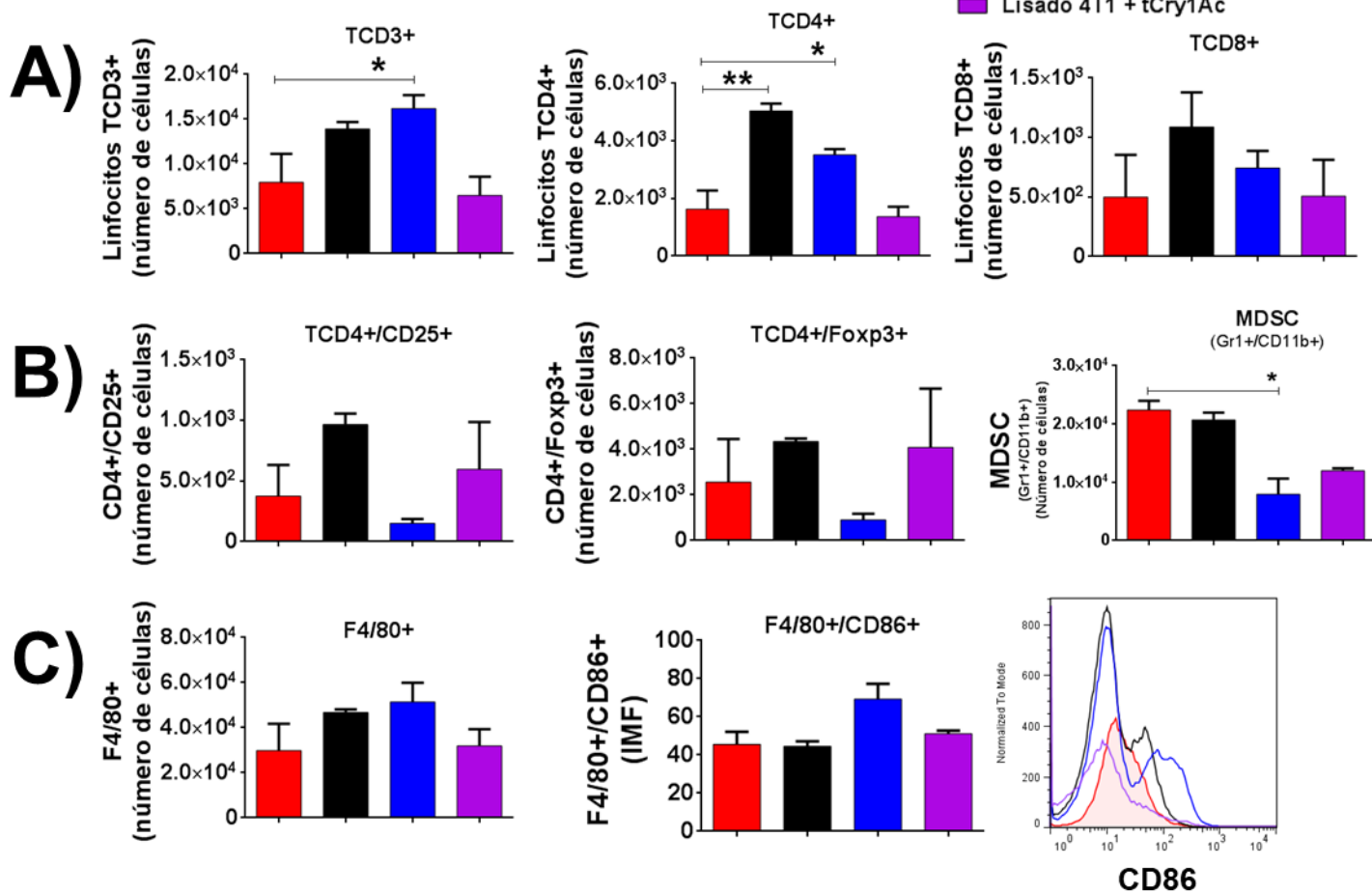
proporciones de linfocitos T, media de los cuadrantes CFSE+ - Anexina V+ son mostrados. C) Porcentaje de citotoxicidad de células 4T1, los datos en la gráfica de barras son representativos de la media  $\pm$ SEM. n=3. \*\*\*p<0.01 y p<0.001\*\*\*\* muestran diferencias significativas.

### ***La coadministración de lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac activa células inmunes en el microambiente tumoral***

Para evaluar si el tratamiento de lisado 4T1 + protoxina o toxina Cry1Ac tenía efecto en las diferentes células del sistema inmune implicados en el microambiente tumoral, evaluamos distintas poblaciones de leucocitos asociados con el mejoramiento en la capacidad para inducir inmunidad antitumoral. Para este objetivo se utilizó un protocolo de inmunización diferente en el que se administraron solamente 2 inmunizaciones profilácticas (con la finalidad de que el grupo anteriormente inmunizados con protoxina Cry1Ac, los cuales no desarrollaron tumores, en esta vez pudieran crecer con este esquema), se inmunizó con lisado 4T1 o coadministrado con la protoxina o la toxina Cry1Ac, posteriormente, inducimos los tumores, y tres semanas después, se analizaron en los tumores los siguientes parámetros inmunológicos: el número de linfocitos T y su activación, la cantidad de linfocitos T reguladores, el número de macrófagos F4/80, su activación y el número de MDSC. Los ratones no inmunizados presentaron una baja cantidad de linfocitos T, mientras que los ratones inmunizados con protoxina Cry1Ac presentaron una alta cantidad de linfocitos T, seguidos por los ratones que recibieron solamente el lisado 4T1. Los ratones que recibieron el lisado 4T1 + toxina Cry1Ac mostraron cantidades bajas de linfocitos T, similares a los ratones que recibieron el vehículo PBS (Figura 9A). Sin embargo, la cantidad de linfocitos TCD4+ fue alta en los ratones inmunizados solamente con el lisado 4T1, seguidos de los ratones que recibieron el lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac, mientras que los ratones no inmunizados y los que recibieron el lisado 4T1 + toxina mostraron las cantidades más bajas de linfocitos TCD4+ (Figura 9A). No encontramos diferencias significativas en cuanto a linfocitos TCD8+ de los diferentes tratamientos, sin embargo, es importante estudiar el fenotipo que tienen los linfocitos TCD8+ de los diferentes tratamientos (linfocitos T residentes de memoria, centrales de memoria, efectores de memoria, etc.). Interesantemente, los ratones que recibieron la protoxina Cry1Ac tuvieron bajo número de linfocitos T reguladores (CD4+/FoxP3+ y CD4+/CD25+) (Figura 9B), los cuales están relacionados con la inmunosupresión en el microambiente tumoral (Quail and Joyce, 2013). Los linfocitos T reguladores se encuentra en altas cantidades en los demás tratamientos (ratones no inmunizados, inmunizados solamente con los lisados 4T1 o inmunizados con lisado 4T1 + toxina Cry1Ac), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas, aunque se observa una tendencia a incrementarse en los ratones que solamente recibieron el lisado 4T1. El número de MDSC también ha sido relacionado con efectos de inmunosupresión en los tumores, los ratones que recibieron la protoxina Cry1Ac y la toxina Cry1Ac como adyuvantes mostraron una reducida cantidad de MDSC (Figura 9B). En contraste, los ratones que recibieron el vehículo PBS y los inmunizados solamente con el lisado 4T1 presentaron un marcado incremento de MDSC en los tumores. Interesantemente, los ratones que fueron inmunizados con el lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac como adyuvante presentaron alta cantidad de macrófagos con una sobreexpresión de CD80 en relación con el resto de los tratamientos (Figura 9C).

# Microambiente tumoral

■ Vehículo (PBS)  
■ Lisado 4T1  
■ Lisado 4T1 + pCry1Ac  
■ Lisado 4T1 + tCry1Ac



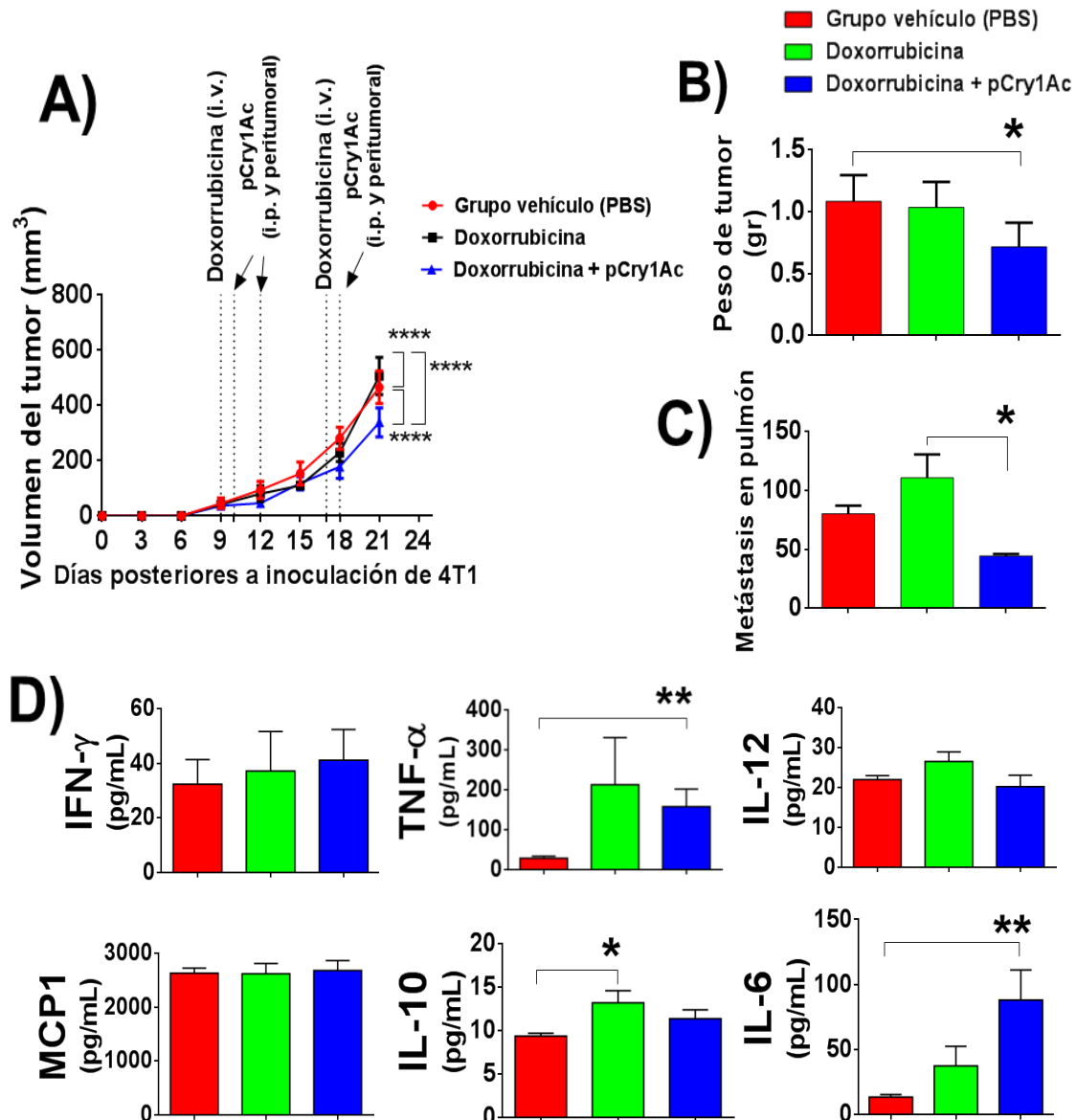
**Figura 9. Inmunización con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac activa células inmunes en el microambiente tumoral.** El efecto de la inmunización en las poblaciones de leucocitos del microambiente tumoral fue evaluado mediante citometría de flujo. Los ratones fueron inmunizados con el esquema largo, el cual consistió en una inmunización cada semana durante tres semanas con lisado 4T1 solo, o coadministrado con protoxina o toxina Cry1Ac, siete días después de la última inmunización, los ratones fueron inyectados con  $1 \times 10^4$  células 4T1 por vía s.c. y los ratones fueron sacrificados 3 semanas después para obtener los tumores. La población analizada fue la cantidad de linfocitos **A)** TCD3+, TCD4+, TCD8+, **B)** Treg TCD4+/CD25+, TCD4+/FoxP3+, MDSC (Gr1+/CD11b+), **C)** macrófagos (F4/80+) y la expresión de CD86 en macrófagos. Los valores mostrados corresponden a la media  $\pm$ SD expresados como número de células o intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD86 en el histograma representativo de la región de macrófagos F4/80+. En la figura se representan datos de dos experimentos independientes. Número de células totales de cada población analizada fueron estimados mediante el registro de cien mil (100,000) eventos por muestra.

***La terapia combinada de Doxorubicina + protoxina Cry1Ac reduce el crecimiento de los tumores y disminuye la gravedad de las metástasis***

Dado el potencial de aplicación de la protoxina Cry1Ac en humanos, en un enfoque profiláctico podría ser limitado, debido a la heterogeneidad de los tumores entre los pacientes y la falta de antígenos específicos de cáncer de mama. Por lo tanto, decidimos evaluar un tratamiento terapéutico para determinar si el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac puede mejorar la terapia con Doxorubicina, la cual es una antraciclina usada en pacientes con cáncer de mama triple negativo. Ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inyectados con  $2 \times 10^4$  células tumorales 4T1. Cuando los tumores fueron palpables, los ratones fueron separados en tres grupos: sin tratamiento (Vehículo, PBS), solamente doxorubicina y doxorubicina + protoxina Cry1Ac. Los ratones que recibieron la terapia combinada de doxorubicina + protoxina Cry1Ac mostraron un menor crecimiento y peso de los tumores (Figura 10A y 10B) y disminución de la incidencia de metástasis en pulmón (Figura 10C), comparado con los ratones que solamente recibieron la doxorubicina o el vehículo. Por lo tanto, el efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac en combinación con la terapia con doxorubicina ofrece un beneficio terapéutico en un modelo triple negativo de cáncer de mama.

No observamos efecto terapéutico en los ratones que recibieron la terapia solamente con doxorubicina; en efecto, este grupo mostró un alto número de metástasis en pulmón. La ausencia de efecto antitumoral, podría estar relacionado con la agresividad del modelo y/o posiblemente al número elevado de células 4T1 inyectadas en el experimento para inducir los tumores.

El microambiente tumoral tiene un papel muy importante en la terapia y en la eliminación de las células tumorales. Por lo tanto, evaluamos la producción de citocinas en los tumores de los ratones que recibieron la terapia combinada de doxorubicina + protoxina Cry1Ac. Los ratones que recibieron la terapia de doxorubicina + protoxina Cry1Ac mostraron una alta producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los tumores, comparado a los ratones que solamente recibieron doxorubicina y los que no recibieron tratamiento (Figura 10D).



**Figura 10. La terapia combinada con Doxorubicina + protoxina Cry1Ac reduce el crecimiento de los tumores y disminuye la gravedad de la metástasis en pulmón.** Los ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron inyectados con  $2 \times 10^4$  células 4T1 por la vía s.c. para inducir el crecimiento de los tumores. Cuando los tumores fueron palpables los ratones fueron separados en tres grupos: sin tratamiento (Vehículo PBS), Doxorubicina y Doxorubicina + protoxina Cry1Ac. La Doxorubicina fue administrada por la vía i.v. a una concentración de 5mg/Kg en 100  $\mu$ L los días 9 y 17 después de la inducción del tumor. La protoxina Cry1Ac fue administrada después de la terapia con Doxorubicina los días 10, 12 y 18 después de la inducción del tumor, por la vía peri tumoral a una concentración de 50  $\mu$ g en 50  $\mu$ L y por la vía intraperitoneal a una concentración de 50  $\mu$ g en 100  $\mu$ L. El crecimiento de los tumores fue monitoreado cada tercer día. Los ratones fueron sacrificados el día 24 después de la inducción del tumor. Los tumores fueron obtenidos de los ratones que recibieron los diferentes tratamientos y procesados como se describe en el apartado de material y métodos para evaluar la producción de citocinas en el tumor. El volumen fue normalizado de acuerdo con la masa tumoral, revisar material y métodos. Los pulmones de los ratones fueron obtenidos y teñidos con tinta de la India para evaluar la metástasis. **A)** Crecimiento de los tumores en la terapia combinada. Cada punto representa la media del volumen del tumor (mm<sup>3</sup>)  $\pm$  SEM. ANOVA de 2 vías y prueba múltiple de Dunnett fueron realizadas. \*\*\* $p < 0.0001$ . n=5 **B)** Peso de los tumores. **C)** Metástasis en el pulmón. **D)** Producción de citocinas en el tumor (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 y MCP1). ANOVA y prueba múltiple de Dunnett fueron realizadas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . n=5



## DISCUSIÓN

El principal hallazgo del presente estudio es la evidencia que muestra el significativo efecto adyuvante antitumoral conferido por la coadministración profiláctica de la protoxina Cry1Ac con lisado 4T1 en un modelo triple negativo de cáncer de mama. Este efecto está relacionado con su capacidad de mejorar la inmunidad antitumoral y es mayor su efecto en comparación con el que confiere la toxina Cry1Ac.

Estos hallazgos son relevantes porque, aunque existen varias estrategias para mejorar la inmunidad tumoral, como los agonistas de TLR, anticuerpos monoclonales anti-CD40, citocinas, como IL-2, interferones, o factores de crecimiento como GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), que han sido investigados (Berinstein, 2007), en general, han mostrado limitaciones en su capacidad, seguridad, costos o estabilidad (Geller et al., 2010, Dillon et al., 2017). Una condición deseada para un adyuvante capaz de mejorar la inmunidad antitumoral es la capacidad de activar a las APCs.

Debido a que el peritoneo cuenta con numerosos vasos sanguíneos, la cavidad del peritoneo se usa a menudo como una vía de inyección sistémica en ratones de laboratorio. Después de la inyección i.p., las DC del peritoneo son las responsables de capturar, procesar y presentar los antígenos a los linfocitos T (Schmidt et al., 2016). La cavidad del peritoneo es un compartimento especializado cerrado que alberga múltiples tejidos y células inmunes. Los macrófagos y las células B1 constituyen la mayoría de las células inmunes del peritoneo, y otras como los linfocitos T, neutrófilos, células NK y DC se encuentran en menor número (Ghosn et al., 2010). En estado basal, las células dendríticas representan el 1% de células residentes en la cavidad del peritoneo en rata (van Vugt et al., 1991), mientras que en ratones, los macrófagos pueden representar más del 50% de células, y la mayoría corresponde a una población de macrófagos denominados “large peritoneal macrophages” (LPM) (Ghosn et al., 2010).

En el presente estudio, pudimos distinguir cuatro poblaciones con diferente expresión de MHCII y CD11c en la cavidad del peritoneo. Las poblaciones que incrementaron con el tratamiento de lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac fueron CD11c<sup>+</sup>MHC<sup>+</sup>low (R3) y CD11c<sup>+</sup>lowMHCII<sup>-</sup> (R4) con un aumento en la expresión de CD80 en la población R4, la cual podría corresponder a células dendríticas inmaduras. Sin embargo, podrían ser macrófagos, ya que algunos macrófagos en la cavidad del peritoneo también expresan CD11c (Bain et al., 2016, Kim et al., 2016).

Las DC son un grupo heterogéneo de células con varias subpoblaciones que son diferenciadas por su ontogenia, localización y funciones inmunológicas. Las DC pueden ser divididas en 3 poblaciones principales: las DCc (células dendríticas convencionales), las cuales procesan y presentan antígenos en estado basal. Las DC derivadas de monocitos, se desarrollan y funcionan bajo condiciones inflamatorias; y las DCp (células dendríticas plasmacitoides), que producen interferones de tipo I para facilitar la respuesta inmune contra virus. Dentro de las DCc podemos encontrar dos subpoblaciones, DCc1 y DCc2. Las DCc1, son mejores para la presentación cruzada de antígenos para inducir respuestas de linfocitos TCD8<sup>+</sup>, mientras que las DCc2 son eficientes para promover la proliferación y diferenciación de linfocitos TCD4<sup>+</sup>. Las distintas subpoblaciones de DC han sido identificadas en varios tejidos bajo diferentes condiciones y por lo tanto pueden realizar funciones especializadas (Merad et al., 2013). La DCc1 son requerida para la

diferenciación de una respuesta tipo Th1 (Maldonado-Lopez et al., 1999, Igyarto et al., 2011, Reis e Sousa et al., 1997). Las CDc1 migratorias y residentes de ganglios linfáticos se localizan en la zona de linfocitos T (ganglio linfoide), que es un lugar donde se activan los linfocitos TCD8+ (Igyarto et al., 2011, Schlitzer et al., 2013).

Aunque nosotros pensamos que la activación de células dendríticas podría ser mejor apreciada en el GM, considerado un determinante clave en el flujo de la cavidad del peritoneo, los efectos generados por la inyección de la protoxina Cry1Ac no fueron detectados en el ganglio mesentérico, pero si fueron observados en el Omentum. Después de la administración intraperitoneal de un estímulo inflamatorio, como LPS, thioglicolato, o incluso con la protoxina Cry1Ac, se incrementa principalmente la cantidad de monocitos en la cavidad del peritoneo, pero la principal población de macrófagos residentes en el peritoneo parece migrar al Omentum (Rubio-Infante et al., 2018, Ghosn et al., 2010). Los leucocitos encontrados en el Omentum de ratón están concentrados en “milky spots”, compuestas de células mieloides y linfoides; estos “milky spots” incrementan en tamaño y número después de un estímulo inflamatorio. El bajo número de células dendríticas encontradas en el Omentum de un ratón que no ha recibido un estímulo inflamatorio ha llevado a proponer que el Omentum es una estructura linfoide inducida por inflamación (Van Vugt et al., 1996, Platell et al., 2000).

Observamos cuatro poblaciones con diferente expresión de MHCII y CD11c en el Omentum, los ratones inmunizados con la protoxina Cry1Ac mostraron un incremento en el número de leucocitos en el Omentum de las 4 regiones analizadas, entre ellas células dendríticas (MHCII+. CD11c+) (R1). Se ha reportado que el omentum tiene células dendríticas capaces de llevar a cabo la presentación cruzada de antígenos, la cual promueve una rápida activación temprana de linfocitos T. Además, existe un constante flujo de linfocitos T y B que van desde la cavidad del peritoneo hasta el Omentum (Carlow et al., 2009). De manera similar, observamos un incremento en el número de células dendríticas en el omentum, pero solamente en los ratones que recibieron lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac; es posible que estas células dendríticas realicen presentación cruzada de antígenos tumorales y contribuyan a una mejor respuesta antitumoral. Interesantemente, en el bazo, también observamos que solamente los ratones que habían recibido la protoxina Cry1Ac como adyuvante, tenían un incremento en la expresión de CD80 en células dendríticas, comparado al grupo PBS.

El incremento en el número de células y activación de DC en el bazo de los ratones inmunizados con protoxina Cry1Ac como adyuvante podría sugerir la presencia de células especializadas para inducir un tipo de respuesta Th1 y la presentación cruzada de antígenos. Sin embargo, hace falta una mejor caracterización de las células dendríticas de bazo que incrementaron su activación después de la inmunización i.p con la protoxina Cry1Ac como adyuvante. Las DCs/CD8 $\alpha$ + en el bazo están especializadas en inducir la activación de linfocitos TCD8+ citotóxicos específicos. Mientras que las DCs/CD8- del bazo promueven una respuesta sistémica de tipo Th1 (Cohn and Delamarre, 2014, Lirussi et al., 2017).

Es importante mencionar que las poblaciones analizadas en los diferentes tejidos (Cavidad del peritoneo, GM, omentum y bazo) pueden tener distinto papel al momento de inducir una respuesta de tipo antitumoral. Por lo tanto, la caracterización y función de las células dendríticas y otras posibles células presentadoras de antígeno, que muestran un

incremento en número y activación después de la inmunización con la protoxina y toxina Cry1Ac como adyuvante, es de vital importancia para entender cuál de ellas podría tener un rol clave en la respuesta de tipo antitumoral que generaron cada una de ellas.

Algunas evidencias indican que, para lograr una efectiva inmunidad antitumoral, no solamente se requiere una respuesta inmune local en el tumor, también es requerida una respuesta a nivel sistémico (sangre periférica, órganos linfoides secundarios y médula ósea) de linfocitos TCD4+ y TCD8+ (Spitzer et al., 2017, Ostroumov et al., 2018). Notablemente, observamos que solamente los ratones que recibieron lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac como adyuvante incrementaron la respuesta de linfocitos TCD4+ y TCD8+, obtenidos tanto del tejido sistémico y local (bazo y GM, respectivamente). Estos resultados mostraron que la protoxina Cry1Ac promueve el incremento en la activación de células dendríticas, acompañado con una mejor respuesta proliferativa de linfocitos T, lo cual nos sugirió que la protoxina Cry1Ac podría conferir una apropiada respuesta antitumoral, como fue demostrado en el presente estudio. Ciertamente, la protoxina Cry1Ac a diferencia de la toxina Cry1Ac, confiere un mayor efecto adyuvante, previniendo el desarrollo de tumores cuando fue evaluado el efecto en un modelo murino de cáncer de mama inducido por la línea tumoral 4T1. Estos resultados son muy interesantes, debido a que el modelo de cáncer de mama 4T1, evaluado en ratones BALB/c inmunocompetentes, asemeja el estadio IV del cáncer triple negativo de mama en humanos, el cual es el responsable de la mayoría de muertes por cáncer de mama debido a la agresividad de la enfermedad y la falta de terapias disponibles (Vidula and Bardia, 2017). En este modelo de cáncer inducido por la línea tumoral 4T1, de manera similar como ocurre en humano, el tumor triple negativo de cáncer de mama crece *in situ* y genera metástasis al pulmón, hígado, hueso y cerebro (Eckhardt et al., 2005, Aslakson and Miller, 1992). Debido a su agresividad, no existen muchas estrategias de vacunas capaces de prevenir el desarrollo de cáncer de mama triple negativo, usando un esquema de inmunización profiláctico. Dos de los principales factores conocidos para contribuir en la eficacia de las vacunas contra el cáncer son el tipo de antígeno asociado a tumor (TAA) y el adyuvante empleado (Schijns et al., 2014, Khong and Overwijk, 2016). En este trabajo, elegimos el lisado de la línea tumoral 4T1 como fuente de antígenos debido a que el modelo de tumores con la línea 4T1 son considerados poco inmunogénicos y en algunos enfoques terapéuticos el uso de lisados de tumor ha sido efectivo para inducir una fuerte respuesta antitumoral y prevenir el escape de las células tumorales al reconocimiento del sistema inmunológico, en comparación con el uso de algunas vacunas basadas en péptidos. El efecto de esta estrategia ha sido atribuido a la gran cantidad de TAA presentes en los lisados de tumor. El efecto antitumoral logrado en el esquema largo de inmunización en comparación en el esquema corto puede ser atribuido a la efectiva inducción de la inmunidad adaptativa. La toxina Cry1Ac mostró un efecto adyuvante antitumoral parcial en ambos esquemas de inmunización, mientras que el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac fue parcial solamente en el esquema corto de inmunización ya que en el esquema largo los ratones se protegieron completamente al desarrollo de tumores. Estos resultados apoyan el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac y son relevantes debido a que es complicado lograr una completa inmunidad en un modelo de cáncer de mama triple negativo. Por ejemplo, en el mismo modelo TNBC, se evaluó una vacuna de DNA dirigida hacia la cadena 2 de la interleucina-13 como un antígeno tumoral, esta vacuna no logró una completa protección contra el desarrollo de los tumores, pero fue capaz de reducir el crecimiento de los tumores comparado con el grupo control. En este estudio la vacuna fue

coadministrada con IFA (Incomplete Freund's adjuvant) y CpG como adyuvantes en un esquema terapéutico y profiláctico (Nakashima et al., 2010). De manera similar, se estudió el efecto profiláctico de una vacuna heterogénea (vacuna de DNA multiepitópica y vacuna basada en péptidos) coadministrada con IFA con adyuvante, en el cual observaron una disminución en el crecimiento de los tumores, pero no observaron una completa protección al desarrollo de los tumores (Safavi et al., 2020).

Una característica del modelo TNBC con las células 4T1 es la disminución sistémica de linfocitos en los ratones que desarrollan tumores (Tao et al., 2008). Un mecanismo que se ha propuesto para explicar esta disminución es la atrofia del timo, la cual causa una rápida disminución de linfocitos TCD4+ y TCD8+ en órganos periféricos, como el bazo (Fu et al., 1989, Wang et al., 2020). El timo es un órgano linfoide primario del cuerpo humano, es el sitio de diferenciación de células mieloides y linfoides. Anteriormente se pensaba que el timo se degeneraba gradualmente después de la pubertad y se reemplazaba por tejido adiposo, sin embargo, en estudios se ha encontrado que el timo en adultos todavía tiene la función de reconstrucción de linfocitos T (Douek and Koup, 2000). Se ha sugerido que factores liberados por células tumorales son capaces de directamente o indirectamente afectar el desarrollo de linfocitos T en el timo (Fu et al., 1989).

Notablemente, observamos que los ratones inmunizados con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac, previene la disminución en el porcentaje y número de linfocitos TCD3+ y TCD4+ en el bazo, comparado al grupo control PBS. Estos resultados sugieren que la inmunización con antígenos tumorales mejora la inmunidad antitumoral, seguido del mantenimiento normal en el funcionamiento y número de linfocitos. Igualmente, la inducción de una respuesta específica de linfocitos citotóxicos capaz de inducir apoptosis de células 4T1 se logró particularmente después de la coadministración de la protoxina y toxina Cry1Ac. El análisis de las células inmunes obtenidas en el microambiente tumoral refuerza esta propuesta, particularmente después de la inmunización con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac se encontraron cambios en las poblaciones que han sido asociadas con un mejoramiento de la inmunidad antitumoral, como el incremento de macrófagos que sobre expresan CD86, y una reducción en el número de células inmunes con función supresora, como las MDSC y linfocitos T reguladores.

El marcado efecto en la reducción de la población inmunosupresora de MDSC, observada después de la coadministración del lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac, es un efecto relevante que requiere de una mayor investigación, ya que la eliminación de MDSC es considerado una estrategia eficiente para poder inducir una respuesta antitumoral (Alizadeh et al., 2014, Geng et al., 2020). Es importante mencionar que a pesar de que ambas proteínas (protoxina y toxina Cry1Ac) tengan una capacidad similar para activar macrófagos (Rubio-Infante et al., 2018, Moreno-Fierros et al., 2013, Torres-Martinez et al., 2016), solamente la protoxina Cry1Ac tiene la capacidad de evitar el desarrollo de tumores mediante una mejor respuesta antitumoral. A pesar de que la toxina Cry1Ac usada como adyuvante, mostró un efecto adyuvante antitumoral parcial *in vivo*, la inducción de la respuesta de citotoxicidad mediada por linfocitos T fue mejor que la observada con la protoxina Cry1Ac, estas diferencias posiblemente se deban a que los efectos en la activación de APC son distintos para cada proteína (Ibarra-Moreno et al., 2021).

Los resultados indican que la protoxina Cry1Ac confiere un mejor efecto adyuvante antitumoral en comparación con la toxina Cry1Ac en un modelo TNBC con la línea tumoral

4T1, ya que los ratones inmunizados de manera profiláctica con el lisado 4T1 se protegieron completamente al desarrollo de los tumores. Este efecto protector se correlaciona con el mantenimiento del número normal de linfocitos, evitar el incremento de MDSC, una mejor capacidad para activar células dendríticas, la inducción de una respuesta proliferativa de linfocitos, un mejoramiento inmunológico en el microambiente tumoral y una baja cantidad de células supresoras en los tumores. Las distintas capacidades entre la protoxina y la toxina Cry1Ac para mejorar la respuesta antitumoral podrían también ser explicadas debido a la diferente capacidad para inducir respuesta a nivel local y a nivel sistémico. La protoxina Cry1Ac es capaz de inducir activación de células dendríticas a nivel local (cavidad del peritoneo, Omentum y GM) y a nivel sistémico (en bazo), acompañado con una mejor respuesta de linfocitos T, de manera diferente a la toxina Cry1Ac, la cual solamente induce activación local en la respuesta de linfocitos T (ganglio mesentérico).

Una limitación de los resultados obtenidos, es el no haber determinado el alcance del efecto antitumoral prominente conferido por la coadministración del lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac, este punto crítico debería ser examinado con estudios de memoria inmunológica llevado a cabo mediante la inoculación de células 4T1 a distintos tiempos en ratones que no desarrollan tumor, los cuales resistieron la primera inoculación de  $3 \times 10^3$  células 4T1. Se requerirá de más estudios para validar si el efecto adyuvante antitumoral observado en el modelo TNBC con la línea 4T1, se puede observar con un modelo distinto de cáncer de mama, como el modelo EMT6, el cual es menos invasivo y ligeramente metastásico (Erin et al., 2015).

El potencial uso profiláctico de la protoxina Cry1Ac administrado con lisados de tumores en humanos es limitado, ya que existen algunas dificultades, como la heterogeneidad de los tumores entre los pacientes, o la falta de antígenos específicos para el cáncer de mama. Por lo tanto, decidimos evaluar en un enfoque terapéutico si el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina Cry1Ac podría mejorar la terapia con doxorrubicina, una antraciclina que se usa en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama triple negativo. Los resultados indican que la protoxina Cry1Ac posiblemente podría conferir un beneficio para la inmunoterapia del cáncer, ya que los ratones que recibieron la terapia combinada de doxorrubicina + protoxina Cr1Ac mostraron menor crecimiento de los tumores y menor incidencia en la metástasis en pulmón. Una posible explicación para este efecto podría ser debido al efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac, la cual podría mejorar la presentación de antígenos tumorales, tanto en el microambiente tumoral como a nivel sistémico, ya que se ha reportado que la terapia con doxorrubicina es capaz de inducir la liberación de antígenos en el microambiente tumoral (Krysko et al., 2012). A pesar de los resultados positivos obtenidos, se necesitan más estudios para describir los mecanismos específicos por los cuales la protoxina es capaz de mejorar la respuesta antitumoral en la terapia combinada con doxorrubicina.

La presencia de citocinas en el microambiente tumoral tiene un rol importante para inducir respuesta antitumoral. Los ratones que recibieron la terapia combinada de doxorrubicina + protoxina Cry1Ac tuvieron una alta producción de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los tumores. Aunque TNF- $\alpha$  y particularmente IL-6 están ampliamente descritos como citocinas involucradas en promover el crecimiento del tumor y favorecer la metástasis (Gopinathan et al., 2015, Isobe et al., 2015, Cruceriu et al., 2020, Ma et al., 2017), también se ha reportado que la presencia de IL-6 puede provocar una respuesta inflamatoria "aguda" que favorece la eliminación de

las células tumorales (Liu et al., 2018). La IL-6 podría contribuir a la inmunidad antitumoral mediante la movilización de la respuesta de linfocitos T, promoviendo supervivencia, diferenciación, señales de reclutamiento y proliferación para algunas poblaciones de leucocitos (Fisher et al., 2014). Se ha reportado que la presencia de TNF- $\alpha$  en tumores puede tener un efecto vasomodulador que mejora la concentración de diferentes fármacos en el tejido tumoral, favoreciendo la eliminación de los tumores (Greish et al., 2018). La evaluación de la producción de citocinas en el tumor en diferentes etapas del crecimiento podría ayudarnos a describir mejor el efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac en combinación con la terapia de doxorrubicina.

Los ratones que recibieron solamente la terapia con doxorrubicina mostraron incluso una mayor cantidad de metástasis que los ratones que no recibieron ningún tratamiento, una posible explicación de este efecto puede ser que la doxorrubicina tiene algunos efectos que favorecen la metástasis mediante la liberación de vesículas extracelulares que favorecen nichos de pre-metástasis en el pulmón (Karagiannis et al., 2017, Keklikoglou et al., 2019). Estos resultados en conjunto sugieren que la terapia combinada de doxorrubicina con protoxina Cry1Ac puede retrasar el crecimiento de los tumores y disminuir la metástasis en los pulmones.

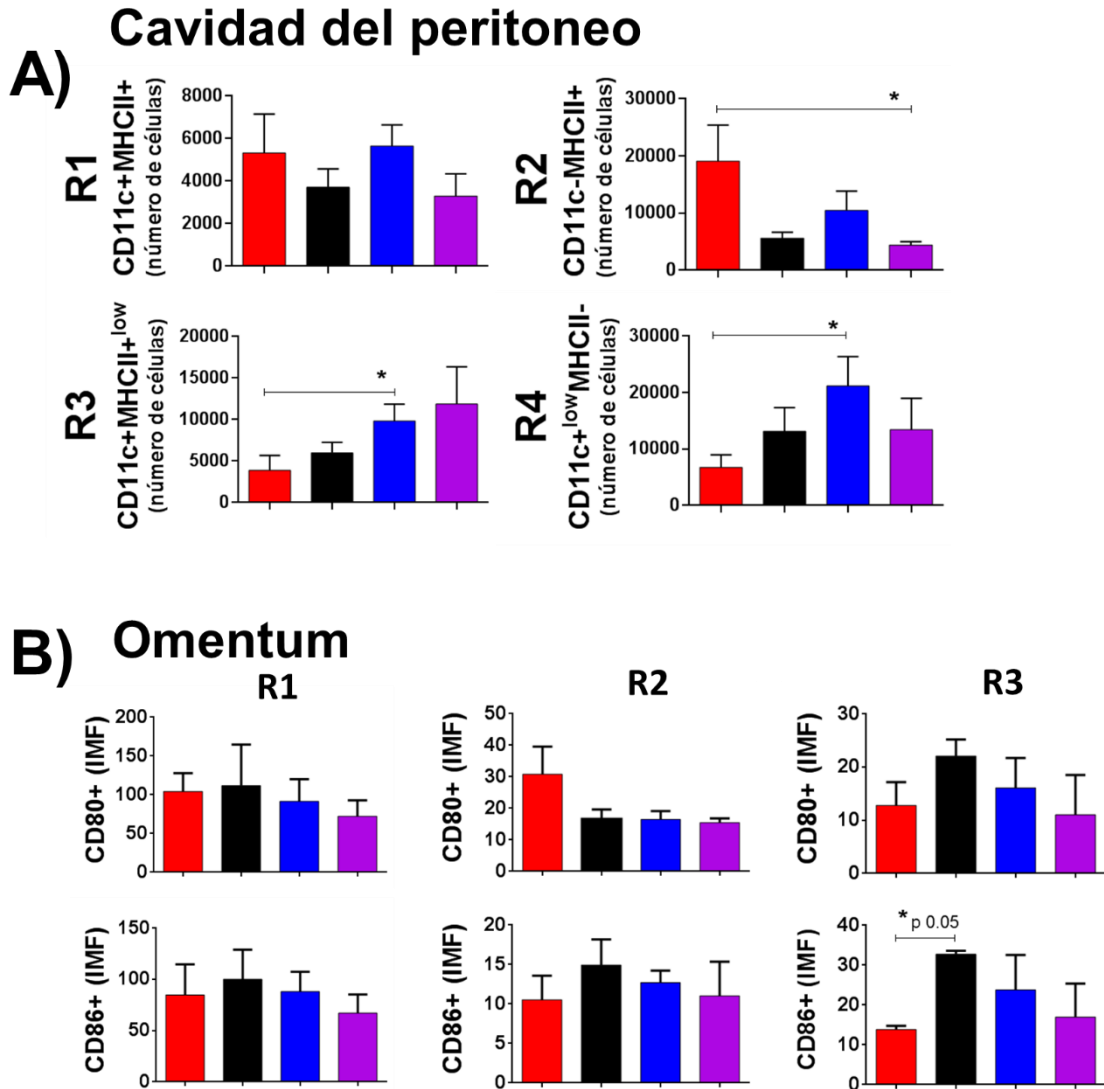
## CONCLUSIÓN

La protoxina Cry1Ac tiene efecto adyuvante antitumoral en ambos esquemas de inmunización profiláctica en el modelo de cáncer de mama triple negativo, el posible mecanismo de la protoxina Cry1Ac para conferir este efecto, es debido a su capacidad de incrementar la cantidad y activación de células dendríticas y otras células presentadoras (monocitos) tanto a nivel local (Omentum y cavidad del peritoneo) como sistémico (bazo). Estos datos concuerdan con la capacidad de la protoxina Cry1Ac como adyuvante para incrementar la proliferación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ específicos y la citotoxicidad mediada por linfocitos T. Mientras que la toxina Cry1Ac muestra un efecto adyuvante antitumoral parcial, posiblemente debido a que solamente tuvo efecto a nivel local, en el cual se observó un ligero aumento en la cantidad y activación de células dendríticas y monocitos en el Omentum y el incremento en la respuesta de linfocitos TCD4+ y TCD8+ específicos solo se observó en el ganglio mesentérico.

La protoxina Cry1Ac en la terapia combinada con Doxorrubicina mostró tener mejor efecto que la terapia solamente con Doxorrubicina, en la cual los ratones tuvieron un retraso en el crecimiento de los tumores y una disminución en la gravedad de la metástasis a los pulmones. Es importante continuar los estudios del mecanismo de acción que la protoxina Cry1Ac confiere su efecto antitumoral, además de evaluarlo en diferentes modelos de cáncer de mama y otros tipos de tumor.

## PERSPECTIVAS

- Caracterizar y evaluar las diferentes poblaciones de células en la cavidad del peritoneo, Omentum y bazo, para conocer qué tipos de células tiene mayor relevancia en el desarrollo de la respuesta antitumoral.
- Evaluar la dinámica de la producción de citocinas en suero de los ratones inmunizados con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac como adyuvante.
- Analizar los diferentes fenotipos de linfocitos TCD8+ en los ratones que se protegen al desarrollo de tumores.
- Adecuar la terapia combinada con doxorrubicina, otros fármacos y la administración de protoxina Cry1Ac con una menor cantidad de células tumorales inyectadas.
- Evaluar el efecto adyuvante antitumoral de la protoxina y toxina Cry1Ac en un modelo de cáncer de mama menos agresivo y de algún estadio más temprano.



**Figura suplementaria 1. Inmunización con lisado 4T1 + protoxina Cry1Ac incrementa el número de células CD11c+MHCII+<sup>low</sup> (R3) y CD11c+<sup>low</sup>MHCII- (R4) en la cavidad del peritoneo.** Ratones BALB/c fueron inyectados por la vía i.p. con una sola dosis de lisado 4T1 solo o coadministrado con protoxina o toxina Cry1Ac. El lisado 4T1 y las proteínas fueron administrados a una concentración de 50 µg cada una. Después de 48 hrs., los ratones fueron sacrificados, y se obtuvieron leucocitos de la **A)** cavidad del peritoneo. Las células fueron teñidas para ser analizadas mediante citometría de flujo, como se describe en el apartado de materiales y métodos, con anti-CD11c, anti-MHCII, anti-CD80 y anti-CD86 para determinar la activación de células dendríticas. Cien mil eventos (100,000) fueron registrados en cada muestra. En el peritoneo, cuatro regiones fueron distinguidas (**R1, R2, R3 y R4**), mientras que en **B)** el omentum se definieron tres poblaciones (**R1, R2 y R3**). Estas regiones fueron analizadas por separado para evaluar la expresión de CD80 y CD86. Las gráficas de barra en **A)** muestran el número de células en cada región, expresados como la media ± SEM ("standard error of the mean"). Los valores mostrados en **B)** representan la intensidad media de fluorescencia (IMF), expresada como media ± SEM. Se utilizaron ANOVA, prueba múltiple de Dunnett. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes. \*p<0.05 contra el grupo indicado.



## BIBLIOGRAFIA

- ALIZADEH, D., TRAD, M., HANKE, N. T., LARMONIER, C. B., JANIKASHVILI, N., BONNOTTE, B., KATSANIS, E. & LARMONIER, N. 2014. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res*, 74, 104-18.
- ARAB, A., YAZDIAN-ROBATI, R. & BEHRAVAN, J. 2020. HER2-Positive Breast Cancer Immunotherapy: A Focus on Vaccine Development. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 68, 2.
- ASLAKSON, C. J. & MILLER, F. R. 1992. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res*, 52, 1399-405.
- BAIN, C. C., HAWLEY, C. A., GARNER, H., SCOTT, C. L., SCHRIDDE, A., STEERS, N. J., MACK, M., JOSHI, A., GUILLIAMS, M., MOWAT, A. M., GEISSMANN, F. & JENKINS, S. J. 2016. Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nat Commun*, 7, ncomms11852.
- BANDAY, A. H., JEELANI, S. & HRUBY, V. J. 2015. Cancer vaccine adjuvants--recent clinical progress and future perspectives. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 37, 1-11.
- BAUTISTA-JACOBO, I., RUBIO-INFANTE, N., ILHUICATZI-ALVARADO, D. & MORENO-FIERROS, L. 2021. Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin and protoxin do not provoke acute or chronic cytotoxicity on macrophages and leukocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 57, 42-52.
- BERINSTEIN, N. L. 2007. Enhancing cancer vaccines with immunomodulators. *Vaccine*, 25 Suppl 2, B72-88.
- BERRY, D. A., CIRINCIONE, C., HENDERSON, I. C., CITRON, M. L., BUDMAN, D. R., GOLDSTEIN, L. J., MARTINO, S., PEREZ, E. A., MUSS, H. B., NORTON, L., HUDIS, C. & WINER, E. P. 2006. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*, 295, 1658-67.
- BERX, G. & VAN ROY, F. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a003129.
- BINDEA, G., MLECNIK, B., FRIDMAN, W. H., PAGES, F. & GALON, J. 2010. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol*, 22, 215-22.
- BOWEN, W. S., SVRIVASTAVA, A. K., BATRA, L., BARSOUMIAN, H. & SHIRWAN, H. 2018. Current challenges for cancer vaccine adjuvant development. *Expert Rev Vaccines*, 17, 207-215.
- BUGGE, M., BERGSTROM, B., EIDE, O. K., SOLLI, H., KJONSTAD, I. F., STENVIK, J., ESPEVIK, T. & NILSEN, N. J. 2017. Surface Toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness. *J Biol Chem*, 292, 15408-15425.
- BURNET, M. 1957. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*, 1, 779-86.
- CARLOW, D. A., GOLD, M. R. & ZILTENER, H. J. 2009. Lymphocytes in the peritoneum home to the omentum and are activated by resident dendritic cells. *J Immunol*, 183, 1155-65.
- CINTOLO, J. A., DATTA, J., MATHEW, S. J. & CZERNIECKI, B. J. 2012. Dendritic cell-based vaccines: barriers and opportunities. *Future Oncol*, 8, 1273-99.
- COHN, L. & DELAMARRE, L. 2014. Dendritic cell-targeted vaccines. *Front Immunol*, 5, 255.
- COLEY, W. B. 1910. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc R Soc Med*, 3, 1-48.
- COLEY, W. B. 1991. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 3-11.
- CONLON, J., BURDETTE, D. L., SHARMA, S., BHAT, N., THOMPSON, M., JIANG, Z., RATHINAM, V. A., MONKS, B., JIN, T., XIAO, T. S., VOGEL, S. N., VANCE, R. E. & FITZGERALD, K. A. 2013. Mouse,

- but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *J Immunol*, 190, 5216-25.
- COUZIN-FRANKEL, J. 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*, 342, 1432-3.
- CRUCERIU, D., BALDASICI, O., BALACESCU, O. & BERINDAN-NEAGOE, I. 2020. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol (Dordr)*, 43, 1-18.
- CHEN, D. S. & MELLMAN, I. 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39, 1-10.
- CHO, J. H., LEE, H. J., KO, H. J., YOON, B. I., CHOE, J., KIM, K. C., HAHN, T. W., HAN, J. A., CHOI, S. S., JUNG, Y. M., LEE, K. H., LEE, Y. S. & JUNG, Y. J. 2017. The TLR7 agonist imiquimod induces anti-cancer effects via autophagic cell death and enhances anti-tumoral and systemic immunity during radiotherapy for melanoma. *Oncotarget*, 8, 24932-24948.
- DAFNI, U., MARTIN-LLUESMA, S., BALINT, K., TSOURTI, Z., VERVITA, K., CHENAL, J., COUKOS, G., ZAMAN, K., SARIVALASIS, A. & KANDALAFI, L. E. 2021. Efficacy of cancer vaccines in selected gynaecological breast and ovarian cancers: A 20-year systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 142, 63-82.
- DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G. & THOMPSON, C. B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7, 11-20.
- DI, S., ZHOU, M., PAN, Z., SUN, R., CHEN, M., JIANG, H., SHI, B., LUO, H. & LI, Z. 2019. Combined Adjuvant of Poly I:C Improves Antitumor Effects of CAR-T Cells. *Front Oncol*, 9, 241.
- DIGHE, A. S., RICHARDS, E., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1, 447-56.
- DILLON, P. M., PETRONI, G. R., SMOLKIN, M. E., BRENNIN, D. R., CHIANESE-BULLOCK, K. A., SMITH, K. T., OLSON, W. C., FANOUS, I. S., NAIL, C. J., BRENNIN, C. M., HALL, E. H. & SLINGLUFF, C. L., JR. 2017. A pilot study of the immunogenicity of a 9-peptide breast cancer vaccine plus poly-ICLC in early stage breast cancer. *J Immunother Cancer*, 5, 92.
- DOORDUIJN, E. M., SLUIJTER, M., SALVATORI, D. C., SILVESTRI, S., MAAS, S., ARENS, R., OSSENDORP, F., VAN DER BURG, S. H. & VAN HALL, T. 2017. CD4(+) T Cell and NK Cell Interplay Key to Regression of MHC Class I(low) Tumors upon TLR7/8 Agonist Therapy. *Cancer Immunol Res*, 5, 642-653.
- DOUEK, D. C. & KOUP, R. A. 2000. Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine*, 18, 1638-41.
- DUBENSKY, T. W., JR., KANNE, D. B. & LEONG, M. L. 2013. Rationale, progress and development of vaccines utilizing STING-activating cyclic dinucleotide adjuvants. *Ther Adv Vaccines*, 1, 131-43.
- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991-8.
- DUNN, G. P., KOEBEL, C. M. & SCHREIBER, R. D. 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, 6, 836-48.
- DUNN, G. P., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21, 137-48.
- ECKHARDT, B. L., PARKER, B. S., VAN LAAR, R. K., RESTALL, C. M., NATOLI, A. L., TAVARIA, M. D., STANLEY, K. L., SLOAN, E. K., MOSELEY, J. M. & ANDERSON, R. L. 2005. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res*, 3, 1-13.
- EMENS, L. A. & MIDDLETON, G. 2015. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res*, 3, 436-43.

- ERIN, N., PODNOS, A., TANRIOVER, G., DUYMUS, O., COTE, E., KHATRI, I. & GORCZYNSKI, R. M. 2015. Bidirectional effect of CD200 on breast cancer development and metastasis, with ultimate outcome determined by tumor aggressiveness and a cancer-induced inflammatory response. *Oncogene*, 34, 3860-70.
- FILIPAZZI, P., VALENTI, R., HUBER, V., PILLA, L., CANESE, P., IERO, M., CASTELLI, C., MARIANI, L., PARMIANI, G. & RIVOLTINI, L. 2007. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol*, 25, 2546-53.
- FISHER, D. T., APPENHEIMER, M. M. & EVANS, S. S. 2014. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol*, 26, 38-47.
- FOROUZANFAR, M. H., FOREMAN, K. J., DELOSSANTOS, A. M., LOZANO, R., LOPEZ, A. D., MURRAY, C. J. & NAGHAVI, M. 2011. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 378, 1461-84.
- FU, Y., PAUL, R. D., WANG, Y. & LOPEZ, D. M. 1989. Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas. *J Immunol*, 143, 4300-7.
- FURI, I., SIPOS, F., GERMANN, T. M., KALMAR, A., TULASSAY, Z., MOLNAR, B. & MUZES, G. 2013. Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: clinico-pathogenic aspects. *World J Gastroenterol*, 19, 4119-26.
- GALLUZZI, L., VACCHELLI, E., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., BUQUE, A., SENOVILLA, L., BARACCO, E. E., BLOY, N., CASTOLDI, F., ABASTADO, J. P., AGOSTINIS, P., APTE, R. N., ARANDA, F., AYYOUB, M., BECKHOVE, P., BLAY, J. Y., BRACCI, L., CAIGNARD, A., CASTELLI, C., CAVALLO, F., CELIS, E., CERUNDOLO, V., CLAYTON, A., COLOMBO, M. P., COUSSENS, L., DHODAPKAR, M. V., EGGERMONT, A. M., FEARON, D. T., FRIDMAN, W. H., FUCIKOVA, J., GABRILOVICH, D. I., GALON, J., GARG, A., GHIRINGHELLI, F., GIACCONE, G., GILBOA, E., GNJATIC, S., HOOS, A., HOSMALIN, A., JAGER, D., KALINSKI, P., KARRE, K., KEPP, O., KIESSLING, R., KIRKWOOD, J. M., KLEIN, E., KNUTH, A., LEWIS, C. E., LIBLAU, R., LOTZE, M. T., LUGLI, E., MACH, J. P., MATTEI, F., MAVILIO, D., MELERO, I., MELIEF, C. J., MITTENDORF, E. A., MORETTA, L., ODUNSI, A., OKADA, H., PALUCKA, A. K., PETER, M. E., PIENTA, K. J., PORGADOR, A., PRENDERGAST, G. C., RABINOVICH, G. A., RESTIFO, N. P., RIZVI, N., SAUTES-FRIDMAN, C., SCHREIBER, H., SELIGER, B., SHIKU, H., SILVA-SANTOS, B., SMYTH, M. J., SPEISER, D. E., SPISEK, R., SRIVASTAVA, P. K., TALMADGE, J. E., TARTOUR, E., VAN DER BURG, S. H., VAN DEN EYNDE, B. J., VILE, R., WAGNER, H., WEBER, J. S., WHITESIDE, T. L., WOLCHOK, J. D., ZITVOGEL, L., ZOU, W. & KROEMER, G. 2014. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*, 5, 12472-508.
- GARRIDO-CASTRO, A. C., LIN, N. U. & POLYAK, K. 2019. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov*, 9, 176-198.
- GELLER, M. A., COOLEY, S., ARGENTA, P. A., DOWNS, L. S., CARSON, L. F., JUDSON, P. L., GHEBRE, R., WEIGEL, B., PANOSKALTSIS-MORTARI, A., CURTSINGER, J. & MILLER, J. S. 2010. Toll-like receptor-7 agonist administered subcutaneously in a prolonged dosing schedule in heavily pretreated recurrent breast, ovarian, and cervix cancers. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 1877-1884.
- GENG, F., BAO, X., DONG, L., GUO, Q. Q., GUO, J., XIE, Y., ZHOU, Y., YU, B., WU, H., WU, J. X., ZHANG, H. H., YU, X. H. & KONG, W. 2020. Doxorubicin pretreatment enhances FAPalpha/survivin co-targeting DNA vaccine anti-tumor activity primarily through decreasing peripheral MDSCs in the 4T1 murine breast cancer model. *Oncoimmunology*, 9, 1747350.
- GHOSN, E. E., CASSADO, A. A., GOVONI, G. R., FUKUHARA, T., YANG, Y., MONACK, D. M., BORTOLUCI, K. R., ALMEIDA, S. R., HERZENBERG, L. A. & HERZENBERG, L. A. 2010. Two physically,

- functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 2568-73.
- GILL, S. S., COWLES, E. A. & PIETRANTONIO, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol*, 37, 615-36.
- GLAFFIG, M., STERGIOU, N., SCHMITT, E. & KUNZ, H. 2017. Immunogenicity of a Fully Synthetic MUC1 Glycopeptide Antitumor Vaccine Enhanced by Poly(I:C) as a TLR3-Activating Adjuvant. *ChemMedChem*, 12, 722-727.
- GOMEZ, I., SANCHEZ, J., MUNOZ-GARAY, C., MATUS, V., GILL, S. S., SOBERON, M. & BRAVO, A. 2014. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochem J*, 459, 383-96.
- GONZALEZ-GONZALEZ, E., GARCIA-HERNANDEZ, A. L., FLORES-MEJIA, R., LOPEZ-SANTIAGO, R. & MORENO-FIERROS, L. 2015. The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Vet Microbiol*, 175, 382-8.
- GOPINATHAN, G., MILAGRE, C., PEARCE, O. M., REYNOLDS, L. E., HODIVALA-DILKE, K., LEINSTER, D. A., ZHONG, H., HOLLINGSWORTH, R. E., THOMPSON, R., WHITEFORD, J. R. & BALKWILL, F. 2015. Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Res*, 75, 3098-107.
- GREISH, K., TAURIN, S. & MORSY, M. A. 2018. The effect of adjuvant therapy with TNF-alpha on animal model of triple-negative breast cancer. *Ther Deliv*, 9, 333-342.
- GUERRERO, G. G., DEAN, D. H. & MORENO-FIERROS, L. 2004. Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: role of the N-terminal region. *Mol Immunol*, 41, 1177-83.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HSU, Y. L., YEN, M. C., CHANG, W. A., TSAI, P. H., PAN, Y. C., LIAO, S. H. & KUO, P. L. 2019. CXCL17-derived CD11b(+)Gr-1(+) myeloid-derived suppressor cells contribute to lung metastasis of breast cancer through platelet-derived growth factor-BB. *Breast Cancer Res*, 21, 23.
- HYNES, N. E. & MACDONALD, G. 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 177-84.
- IBARRA-MORENO, C. D., ILHUICATZI-ALVARADO, D. & MORENO-FIERROS, L. 2021. Differential capability of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin and toxin to induce in vivo activation of dendritic cells and B lymphocytes. *Dev Comp Immunol*, 121, 104071.
- IBARRA-MORENO, S., GARCIA-HERNANDEZ, A. L. & MORENO-FIERROS, L. 2014. Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite Immunol*, 36, 266-70.
- IGYARTO, B. Z., HALEY, K., ORTNER, D., BOBR, A., GERAMI-NEJAD, M., EDELSON, B. T., ZURAWSKI, S. M., MALISSEN, B., ZURAWSKI, G., BERMAN, J. & KAPLAN, D. H. 2011. Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity*, 35, 260-72.
- ISHIKAWA, H. & BARBER, G. N. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 455, 674-8.
- ISOBE, A., SAWADA, K., KINOSE, Y., OHYAGI-HARA, C., NAKATSUKA, E., MAKINO, H., OGURA, T., MIZUNO, T., SUZUKI, N., MORII, E., NAKAMURA, K., SAWADA, I., TODA, A., HASHIMOTO, K., MABUCHI, S., OHTA, T., MORISHIGE, K., KURACHI, H. & KIMURA, T. 2015. Interleukin 6 receptor is an independent prognostic factor and a potential therapeutic target of ovarian cancer. *PLoS One*, 10, e0118080.
- JAINI, R., KESARAJU, P., JOHNSON, J. M., ALTUNTAS, C. Z., JANE-WIT, D. & TUOHY, V. K. 2010. An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination. *Nat Med*, 16, 799-803.

- JAINI, R., LOYA, M. G. & ENG, C. 2017. Immunotherapeutic target expression on breast tumors can be amplified by hormone receptor antagonism: a novel strategy for enhancing efficacy of targeted immunotherapy. *Oncotarget*, 8, 32536-32549.
- JIE, J., ZHANG, Y., ZHOU, H., ZHAI, X., ZHANG, N., YUAN, H., NI, W. & TAI, G. 2018. CpG ODN1826 as a Promising Mucin1-Maltose-Binding Protein Vaccine Adjuvant Induced DC Maturation and Enhanced Antitumor Immunity. *Int J Mol Sci*, 19.
- JIMENEZ-CHAVEZ, A. J., MORENO-FIERROS, L. & BUSTOS-JAIMES, I. 2019. Therapy with multi-epitope virus-like particles of B19 parvovirus reduce tumor growth and lung metastasis in an aggressive breast cancer mouse model. *Vaccine*, 37, 7256-7268.
- KAPLAN, D. H., SHANKARAN, V., DIGHE, A. S., STOCKERT, E., AGUET, M., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7556-61.
- KARAGIANNIS, G. S., PASTORIZA, J. M., WANG, Y., HARNEY, A. S., ENTENBERG, D., PIGNATELLI, J., SHARMA, V. P., XUE, E. A., CHENG, E., D'ALFONSO, T. M., JONES, J. G., ANAMPA, J., ROHAN, T. E., SPARANO, J. A., CONDEELIS, J. S. & OKTAY, M. H. 2017. Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism. *Sci Transl Med*, 9.
- KEKLIKOGLOU, I., CIANCIARUSO, C., GUC, E., SQUADRITO, M. L., SPRING, L. M., TAZZYMAN, S., LAMBEIN, L., POISSONNIER, A., FERRARO, G. B., BAER, C., CASSARA, A., GUICHARD, A., IRUELA-ARISPE, M. L., LEWIS, C. E., COUSSENS, L. M., BARDIA, A., JAIN, R. K., POLLARD, J. W. & DE PALMA, M. 2019. Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models. *Nat Cell Biol*, 21, 190-202.
- KHONG, H. & OVERWIJK, W. W. 2016. Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J Immunother Cancer*, 4, 56.
- KHONG, H. T. & RESTIFO, N. P. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*, 3, 999-1005.
- KIJ, A., KUS, K., SMEDA, M., ZAKRZEWSKA, A., PRONIEWSKI, B., MATYJASZCZYK, K., JASZTAL, A., STOJAK, M., WALCZAK, M. & CHLOPICKI, S. 2018. Differential effects of nitric oxide deficiency on primary tumour growth, pulmonary metastasis and prostacyclin/thromboxane A2 balance in orthotopic and intravenous murine models of 4T1 breast cancer. *J Physiol Pharmacol*, 69.
- KIM, K. W., WILLIAMS, J. W., WANG, Y. T., IVANOV, S., GILFILLAN, S., COLONNA, M., VIRGIN, H. W., GAUTIER, E. L. & RANDOLPH, G. J. 2016. MHC II+ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. *J Exp Med*, 213, 1951-9.
- KONDOV, B., MILENKOVIKJ, Z., KONDOV, G., PETRUSHEVSKA, G., BASHESKA, N., BOGDANOVSKA-TODOROVSKA, M., TOLEVSKA, N. & IVKOVSKI, L. 2018. Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. *Open Access Maced J Med Sci*, 6, 961-967.
- KREITER, S., VORMEHR, M., VAN DE ROEMER, N., DIKEN, M., LOWER, M., DIEKMANN, J., BOEGEL, S., SCHRORS, B., VASCOTTO, F., CASTLE, J. C., TADMOR, A. D., SCHOENBERGER, S. P., HUBER, C., TURECI, O. & SAHIN, U. 2015. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*, 520, 692-6.
- KRYSKO, D. V., GARG, A. D., KACZMAREK, A., KRYSKO, O., AGOSTINIS, P. & VANDENABEELE, P. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 860-75.
- KURTZ, S. L., RAVINDRANATHAN, S. & ZAHAROFF, D. A. 2014. Current status of autologous breast tumor cell-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 13, 1439-45.
- LEACH, D. R., KRUMMEL, M. F. & ALLISON, J. P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271, 1734-6.

- LEGORRETA-HERRERA, M., MEZA, R. O. & MORENO-FIERROS, L. 2010. Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 198921.
- LEMMON, M. A. & SCHLESSINGER, J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-34.
- LIRUSSI, D., EBENSEN, T., SCHULZE, K., TRITTEL, S., DURAN, V., LIEBICH, I., KALINKE, U. & GUZMAN, C. A. 2017. Type I IFN and not TNF, is Essential for Cyclic Di-nucleotide-elicited CTL by a Cytosolic Cross-presentation Pathway. *EBioMedicine*, 22, 100-111.
- LIU, K., HE, K., XUE, T., LIU, P. & XU, L. X. 2018. The cryo-thermal therapy-induced IL-6-rich acute pro-inflammatory response promoted DCs phenotypic maturation as the prerequisite to CD4(+) T cell differentiation. *Int J Hyperthermia*, 34, 261-272.
- LIZEE, G., OVERWIJK, W. W., RADVANYI, L., GAO, J., SHARMA, P. & HWU, P. 2013. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu Rev Med*, 64, 71-90.
- LOI, S., DRUBAY, D., ADAMS, S., PRUNERI, G., FRANCIS, P. A., LACROIX-TRIKI, M., JOENSUU, H., DIECI, M. V., BADVE, S., DEMARIA, S., GRAY, R., MUNZONE, E., LEMONNIER, J., SOTIRIOU, C., PICCART, M. J., KELLOKUMPU-LEHTINEN, P. L., VINGIANI, A., GRAY, K., ANDRE, F., DENKERT, C., SALGADO, R. & MICHIELS, S. 2019. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol*, 37, 559-569.
- MA, Y., REN, Y., DAI, Z. J., WU, C. J., JI, Y. H. & XU, J. 2017. IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med*, 26, 421-426.
- MALDONADO-LOPEZ, R., DE SMEDT, T., MICHEL, P., GODFROID, J., PAJAK, B., HEIRMAN, C., THIELEMANS, K., LEO, O., URBAIN, J. & MOSER, M. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha-subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*, 189, 587-92.
- MCARTHUR, H. L. & PAGE, D. B. 2016. Immunotherapy for the treatment of breast cancer: checkpoint blockade, cancer vaccines, and future directions in combination immunotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, 14, 922-933.
- MELERO, I., GAUDERNACK, G., GERRITSEN, W., HUBER, C., PARMIANI, G., SCHOLL, S., THATCHER, N., WAGSTAFF, J., ZIELINSKI, C., FAULKNER, I. & MELLSTEDT, H. 2014. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol*, 11, 509-24.
- MELLMAN, I. & STEINMAN, R. M. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106, 255-8.
- MENDOZA-ALMANZA, G., ROCHA-ZAVALA, L., AGUILAR-ZACARIAS, C., AYALA-LUJAN, J. & OLMOS, J. 2019. Cry1A Proteins are Cytotoxic to HeLa but not to SiHa Cervical Cancer Cells. *Curr Pharm Biotechnol*, 20, 1018-1027.
- MERAD, M., SATHE, P., HELFT, J., MILLER, J. & MORTHA, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, 31, 563-604.
- MIGALI, C., MILANO, M., TRAPANI, D., CRISCITIELLO, C., ESPOSITO, A., LOCATELLI, M., MINCHELLA, I. & CURIGLIANO, G. 2016. Strategies to modulate the immune system in breast cancer: checkpoint inhibitors and beyond. *Ther Adv Med Oncol*, 8, 360-74.
- MILES, D., ROCHE, H., MARTIN, M., PERREN, T. J., CAMERON, D. A., GLASPY, J., DODWELL, D., PARKER, J., MAYORDOMO, J., TRES, A., MURRAY, J. L., IBRAHIM, N. K. & THERATOPE STUDY, G. 2011. Phase III multicenter clinical trial of the sialyl-TN (STn)-keyhole limpet hemocyanin (KLH) vaccine for metastatic breast cancer. *Oncologist*, 16, 1092-100.
- MITTENDORF, E. A., CLIFTON, G. T., HOLMES, J. P., CLIVE, K. S., PATIL, R., BENAVIDES, L. C., GATES, J. D., SEARS, A. K., STOJADINOVIC, A., PONNIAH, S. & PEOPLES, G. E. 2012. Clinical trial results

- of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer*, 118, 2594-602.
- MORENO-FIERROS, L., GARCIA-HERNANDEZ, A. L., ILHUICATZI-ALVARADO, D., RIVERA-SANTIAGO, L., TORRES-MARTINEZ, M., RUBIO-INFANTE, N. & LEGORRETA-HERRERA, M. 2013. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-alpha cytokines. *Int Immunopharmacol*, 17, 1051-66.
- MORENO-FIERROS, L., GARCIA, N., GUTIERREZ, R., LOPEZ-REVILLA, R. & VAZQUEZ-PADRON, R. I. 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes Infect*, 2, 885-90.
- MORENO-FIERROS, L., RUIZ-MEDINA, E. J., ESQUIVEL, R., LOPEZ-REVILLA, R. & PINA-CRUZ, S. 2003. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol*, 57, 45-55.
- MOUGIAKAKOS, D., CHOUDHURY, A., LLADSER, A., KIESSLING, R. & JOHANSSON, C. C. 2010. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res*, 107, 57-117.
- NAKASHIMA, H., FUJISAWA, T., HUSAIN, S. R. & PURI, R. K. 2010. Interleukin-13 receptor alpha2 DNA prime boost vaccine induces tumor immunity in murine tumor models. *J Transl Med*, 8, 116.
- NELSON, B. H. 2008. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev*, 222, 101-16.
- NIGJEH, S. E., YEAP, S. K., NORDIN, N., RAHMAN, H. & ROSLI, R. 2019. In Vivo Anti-Tumor Effects of Citral on 4T1 Breast Cancer Cells via Induction of Apoptosis and Downregulation of Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Molecules*, 24.
- NITISS, K. C. & NITISS, J. L. 2014. Twisting and ironing: doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clin Cancer Res*, 20, 4737-9.
- NORELL, H., POSCHKE, I., CHARO, J., WEI, W. Z., ERSKINE, C., PIECHOCKI, M. P., KNUTSON, K. L., BERGH, J., LIDBRINK, E. & KIESSLING, R. 2010. Vaccination with a plasmid DNA encoding HER-2/neu together with low doses of GM-CSF and IL-2 in patients with metastatic breast carcinoma: a pilot clinical trial. *J Transl Med*, 8, 53.
- OSTRAND-ROSENBERG, S. & SINHA, P. 2009. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*, 182, 4499-506.
- OSTROUMOV, D., FEKETE-DRIMUSZ, N., SABOROWSKI, M., KUHNEL, F. & WOLLER, N. 2018. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci*, 75, 689-713.
- PAGES, F., GALON, J., DIEU-NOSJEAN, M. C., TARTOUR, E., SAUTES-FRIDMAN, C. & FRIDMAN, W. H. 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29, 1093-102.
- PARDO-LOPEZ, L., SOBERON, M. & BRAVO, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 3-22.
- PARDOLL, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-64.
- PAUCEK, R. D., BALTIMORE, D. & LI, G. 2019. The Cellular Immunotherapy Revolution: Arming the Immune System for Precision Therapy. *Trends Immunol*, 40, 292-309.
- PEYRET, V., NAZAR, M., MARTIN, M., QUINTAR, A. A., FERNANDEZ, E. A., GEYSSELS, R. C., FUZIWARA, C. S., MONTESINOS, M. M., MALDONADO, C. A., SANTISTEBAN, P., KIMURA, E. T., PELLIZAS, C. G., NICOLA, J. P. & MASINI-REPISO, A. M. 2018. Functional Toll-like Receptor 4



- Overexpression in Papillary Thyroid Cancer by MAPK/ERK-Induced ETS1 Transcriptional Activity. *Mol Cancer Res*, 16, 833-845.
- PLATELL, C., COOPER, D., PAPADIMITRIOU, J. M. & HALL, J. C. 2000. The omentum. *World J Gastroenterol*, 6, 169-176.
- POHL-RESCIGNO, E., HAUKE, J., LOIBL, S., MOBUS, V., DENKERT, C., FASCHING, P. A., KAYALI, M., ERNST, C., WEBER-LASSALLE, N., HANUSCH, C., TESCH, H., MULLER, V., ALTMULLER, J., THIELE, H., UNTCH, M., LUBBE, K., NURNBERG, P., RHIEM, K., FURLANETTO, J., LEDERER, B., JACKISCH, C., NEKLJUDOVA, V., SCHMUTZLER, R. K., SCHNEEWEISS, A. & HAHNEN, E. 2020. Association of Germline Variant Status With Therapy Response in High-risk Early-Stage Breast Cancer: A Secondary Analysis of the GeparOcto Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 6, 744-748.
- PRADERE, J. P., DAPITO, D. H. & SCHWABE, R. F. 2014. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*, 33, 3485-95.
- QIN, L., WU, X., BLOCK, M. L., LIU, Y., BREESE, G. R., HONG, J. S., KNAPP, D. J. & CREWS, F. T. 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, 55, 453-62.
- QUAIL, D. F. & JOYCE, J. A. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 19, 1423-37.
- REIS E SOUSA, C., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T., JANKOVIC, D., CHAREST, H., GERMAIN, R. N. & SHER, A. 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*, 186, 1819-29.
- RIBATTI, D. 2014. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal. *Immunol Lett*, 161, 96-9.
- ROJAS-HERNANDEZ, S., RODRIGUEZ-MONROY, M. A., LOPEZ-REVILLA, R., RESENDIZ-ALBOR, A. A. & MORENO-FIERROS, L. 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun*, 72, 4368-75.
- RUBIO-INFANTE, N., ILHUICATZI-ALVARADO, D., TORRES-MARTINEZ, M., REYES-GRAJEDA, J. P., NAVA-ACOSTA, R., GONZALEZ-GONZALEZ, E. & MORENO-FIERROS, L. 2018. The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70. *J Cell Biochem*, 119, 580-598.
- SAFAVI, A., KEFAYAT, A., MAHDEVAR, E., GHAREMANI, F., NEZAFAT, N. & MODARRESSI, M. H. 2020. Efficacy of co-immunization with the DNA and peptide vaccines containing SYCP1 and ACRBP epitopes in a murine triple-negative breast cancer model. *Hum Vaccin Immunother*, 1-13.
- SCHIJNS, V., TARTOUR, E., MICHALEK, J., STATHOPOULOS, A., DOBROVOLSKIENE, N. T. & STRIOGA, M. M. 2014. Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *Cytotherapy*, 16, 427-39.
- SCHLITZER, A., MCGOVERN, N., TEO, P., ZELANTE, T., ATARASHI, K., LOW, D., HO, A. W., SEE, P., SHIN, A., WASAN, P. S., HOEFFEL, G., MALLERET, B., HEISEKE, A., CHEW, S., JARDINE, L., PURVIS, H. A., HILKENS, C. M., TAM, J., POIDINGER, M., STANLEY, E. R., KRUG, A. B., RENIA, L., SIVASANKAR, B., NG, L. G., COLLIN, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., HONDA, K., HANIFFA, M. & GINHOUX, F. 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity*, 38, 970-83.
- SCHMIDT, S. T., KHADKE, S., KORSHOLM, K. S., PERRIE, Y., RADES, T., ANDERSEN, P., FOGED, C. & CHRISTENSEN, D. 2016. The administration route is decisive for the ability of the vaccine



- adjuvant CAF09 to induce antigen-specific CD8(+) T-cell responses: The immunological consequences of the biodistribution profile. *J Control Release*, 239, 107-17.
- SCHREIBER, R. D., OLD, L. J. & SMYTH, M. J. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565-70.
- SHANKARAN, V., IKEDA, H., BRUCE, A. T., WHITE, J. M., SWANSON, P. E., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2001. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410, 1107-11.
- SHARMA, A., KOLDOVSKY, U., XU, S., MICK, R., ROSES, R., FITZPATRICK, E., WEINSTEIN, S., NISENBAUM, H., LEVINE, B. L., FOX, K., ZHANG, P., KOSKI, G. & CZERNIECKI, B. J. 2012. HER-2 pulsed dendritic cell vaccine can eliminate HER-2 expression and impact ductal carcinoma in situ. *Cancer*, 118, 4354-62.
- SHERR, C. J. & MCCORMICK, F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2, 103-12.
- SOLIMAN, H., MEDIAVILLA-VARELA, M. & ANTONIA, S. J. 2015. A GM-CSF and CD40L bystander vaccine is effective in a murine breast cancer model. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 7, 389-97.
- SPITZER, M. H., CARMÍ, Y., RETICKER-FLYNN, N. E., KWEK, S. S., MADHIREDDY, D., MARTINS, M. M., GHERARDINI, P. F., PRESTWOOD, T. R., CHABON, J., BENDALL, S. C., FONG, L., NOLAN, G. P. & ENGLEMAN, E. G. 2017. Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168, 487-502 e15.
- SRIVASTAVA, A. K., YOLCU, E. S., DINC, G., SHARMA, R. K. & SHIRWAN, H. 2016. SA-4-1BBL/MPL as a novel immune adjuvant platform to combat cancer. *Oncoimmunology*, 5, e1064580.
- TACAR, O., SRIAMORNSAK, P. & DASS, C. R. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, 65, 157-70.
- TAO, K., FANG, M., ALROY, J. & SAHAGIAN, G. G. 2008. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, 8, 228.
- TENG, M. W., SWANN, J. B., KOEBEL, C. M., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J. 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol*, 84, 988-93.
- THORN, C. F., OSHIRO, C., MARSH, S., HERNANDEZ-BOUSSARD, T., MCLEOD, H., KLEIN, T. E. & ALTMAN, R. B. 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21, 440-6.
- TORRES-MARTINEZ, M., RUBIO-INFANTE, N., GARCIA-HERNANDEZ, A. L., NAVA-ACOSTA, R., ILHUICATZI-ALVARADO, D. & MORENO-FIERROS, L. 2016. Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 78, 106-115.
- VAN VUGT, E., ARKEMA, J. M., VERDAASDONK, M. A., BEELEN, R. H. & KAMPERDIJK, E. W. 1991. Morphological and functional characteristics of rat steady state peritoneal dendritic cells. *Immunobiology*, 184, 14-24.
- VAN VUGT, E., VAN RIJTHOVEN, E. A., KAMPERDIJK, E. W. & BEELEN, R. H. 1996. Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats. *Anat Rec*, 244, 235-45.
- VAZQUEZ, R. I., MORENO-FIERROS, L., NERI-BAZAN, L., DE LA RIVA, G. A. & LOPEZ-REVILLA, R. 1999. Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol*, 49, 578-84.
- VIDULA, N. & BARDIA, A. 2017. Targeted therapy for metastatic triple negative breast cancer: The next frontier in precision oncology. *Oncotarget*, 8, 106167-106168.
- WANG, W., THOMAS, R., SIZOVA, O. & SU, D. M. 2020. Thymic Function Associated With Cancer Development, Relapse, and Antitumor Immunity - A Mini-Review. *Front Immunol*, 11, 773.

- WENNERBERG, E., SARHAN, D., CARLSTEN, M., KAMINSKY, V. O., D'ARCY, P., ZHIVOTOVSKY, B., CHILDS, R. & LUNDQVIST, A. 2013. Doxorubicin sensitizes human tumor cells to NK cell- and T-cell-mediated killing by augmented TRAIL receptor signaling. *Int J Cancer*, 133, 1643-52.
- WITSCH, E., SELA, M. & YARDEN, Y. 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*, 25, 85-101.
- WON, K. A. & SPRUCK, C. 2020. Triplenegative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*, 57, 1245-1261.
- YANG, L., PANG, Y. & MOSES, H. L. 2010. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*, 31, 220-7.
- YIN, P., LIU, X., MANSFIELD, A. S., HARRINGTON, S. M., LI, Y., YAN, Y. & DONG, H. 2016. CpG-induced antitumor immunity requires IL-12 in expansion of effector cells and down-regulation of PD-1. *Oncotarget*, 7, 70223-70231.
- YOUN, J. I., NAGARAJ, S., COLLAZO, M. & GABRILOVICH, D. I. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 181, 5791-802.
- YUE, W., CHEN, L., YU, L., ZHOU, B., YIN, H., REN, W., LIU, C., GUO, L., ZHANG, Y., SUN, L., ZHANG, K., XU, H. & CHEN, Y. 2019. Checkpoint blockade and nanosonosensitizer-augmented noninvasive sonodynamic therapy combination reduces tumour growth and metastases in mice. *Nat Commun*, 10, 2025.
- ZHANG, Y., TOH, L., LAU, P. & WANG, X. 2012. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/beta-catenin pathway in human cancer. *J Biol Chem*, 287, 32494-511.
- ZHU, S., LV, X., ZHANG, X., LI, T., ZANG, G., YANG, N., WANG, X., WU, J., CHEN, W., LIU, Y. J. & CHEN, J. 2019. An effective dendritic cell-based vaccine containing glioma stem-like cell lysate and CpG adjuvant for an orthotopic mouse model of glioma. *Int J Cancer*, 144, 2867-2879.
- ZITVOGEL, L., TESNIERE, A. & KROEMER, G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*, 6, 715-27.

# Cry1Ac Protoxin Confers Antitumor Adjuvant Effect in a Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model by Improving Tumor Immunity

Servin-Garrido Roberto Raúl, Ilhuicatzí-Alvarado Damaris, Jiménez-Chávez Ángel de Jesús  and Moreno-Fierros Leticia 

Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1 Los Reyes Iztacala CP 54090, Tlalnepantla, Estado de México, México.

Breast Cancer: Basic and Clinical Research  
Volume 16: 1–19  
© The Author(s) 2022  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/11782234211065154



**ABSTRACT:** The Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* is a systemic and mucosal adjuvant, able to confer protective immunity in different infection murine models and induce both Th1 and TCD8+ cytotoxic lymphocyte responses, which are required to induce antitumor immunity. The Cry1Ac toxin, despite having not being characterized as an adjuvant, has also proved to be immunogenic and able to activate macrophages. Here, we investigated the potential antitumor adjuvant effect conferred by the Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin in a triple negative breast cancer (TNBC) murine model. First, we evaluated the ability of Cry1Ac proteins to improve dendritic cell (DC) activation and cellular response through intraperitoneal (i.p.) coadministration with the 4T1 cellular lysate. Mice coadministered with the Cry1Ac protoxin showed an increase in the number and activation of CD11c+MHCII- and CD11c+MHCII+<sup>low</sup> in the peritoneal cavity and an increase in DC activation (CD11c+MHCII+) in the spleen. Cry1Ac protoxin increased the proliferation of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in the spleen and mesenteric lymph nodes (MLN), while the Cry1Ac toxin only increased the proliferation of TCD4+ and TCD8+ in the MLN. Remarkably, when tested in the in vivo TNBC mouse model, prophylactic immunizations with 4T1 lysates plus the Cry1Ac protoxin protected mice from developing tumors. The antitumor effect conferred by the Cry1Ac protoxin also increased specific cytotoxic T cell responses, and prevented the typical tumor-related decrease of T cells (TCD3+ and TCD4+) as well the increase of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in spleen. Also in the tumor microenvironment of mice coadministered twice with Cry1Ac protoxin immunological improvements were found such as reductions in immunosuppressive populations (T regulatory lymphocytes and MDSC) along with increases in macrophages upregulating CD86. These results show a differential antitumor adjuvant capability of Cry1Ac proteins, highlighting the ability of Cry1Ac protoxin to enhance local and systemic tumor immunity in TNBC. Finally, using a therapeutic approach, we evaluated the coadministration of Cry1Ac protoxin with doxorubicin. A significant reduction in tumor volume and lung metastasis was found, with increased intratumoral levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and IL-6 with respect to the vehicle group, further supporting its antitumor applicability.

**KEYWORDS:** Adjuvants, breast cancer, Cry1Ac protoxin, immunotherapy, omentum, doxorubicin

**RECEIVED:** November 22, 2021. **ACCEPTED:** November 17, 2021.

**TYPE:** Original Research

**FUNDING:** The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by grants from PAPIIT (IN223310), CONACYT (CB283310), and COMECYT EDOMEX FICDTEM-2021-085.

**DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS:** The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

**CORRESPONDING AUTHOR:** Moreno-Fierros Leticia, Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla CP 54090, Estado de México, México. Email: letiof@unam.mx

## Acknowledgements

Servin-Garrido Roberto Raúl is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACYT fellowship (CVU) 545848. Jiménez-Chávez Ángel de Jesús received a postdoctoral fellowship from COMECYT Estado de México.

## Author Contributions

Conception or design of the work: LMF and RRS; methodological standardization: RRS, DIA, and JCA; experimental design: RRS, LMF, DIA, and JCA; experimentation and data collection: RRS, DIA, and JCA; data analysis and interpretation: RRS, LMF, and JCA; drafting the article: RRS; critical revision of the article: LMF and RRS; final approval of the version to be published: LMF, DIA, RRS, and JCA.

- Yue W, Chen L, Yu L, et al. Checkpoint blockade and nanosensitizer-augmented noninvasive sonodynamic therapy combination reduces tumour growth and metastases in mice. *Nat Commun*. 2019;10:2025. doi:10.1038/s41467-019-09760-3.
- Cho JH, Lee HJ, Ko HJ, et al. The TLR7 agonist imiquimod induces anti-cancer effects via autophagic cell death and enhances anti-tumoral and systemic immunity during radiotherapy for melanoma. *Oncotarget*. 2017;8:24932-24948. doi:10.18632/oncotarget.15326.
- Doorduijn EM, Slijter M, Salvatore DC, et al. CD4(+) T cell and NK cell interplay key to regression of MHC class I(low) tumors upon TLR7/8 agonist therapy. *Cancer Immunol Res*. 2017;5:642-653. doi:10.1158/2326-6066.CCR-16-0334.
- Di S, Zhou M, Pan Z, et al. Combined adjuvant of poly I:C improves antitumor effects of CAR-T cells. *Front Oncol*. 2019;9:241. doi:10.3389/fonc.2019.00241.
- Glaifig M, Stergion N, Schmitt E, Kunz H. Immunogenicity of a fully synthetic MUC1 glycopeptide antitumor vaccine enhanced by poly(I:C) as a TLR3-activating adjuvant. *ChemMedChem*. 2017;12:722-727. doi:10.1002/cmdc.201700254.
- Peyre V, Nazari M, Martin M, et al. Functional toll-like receptor 4 overexpression in papillary thyroid cancer by MAPK/ERK-induced ETS1 transcriptional activity. *Mol Cancer Res*. 2018;16:833-845. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0000.
- Bagge M, Bergstrom B, Eide OK, et al. Surface toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness. *J Biol Chem*. 2017;292:15408-15425. doi:10.1074/jbc.M117.784090.
- Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of toll-like receptors in cancer. *Oncogene*. 2014;33:3485-3495. doi:10.1038/onc.2013.302.

# Cry1Ac Protoxin Confers Antitumor Adjuvant Effect in a Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model by Improving Tumor Immunity

Servin-Garrido Roberto Raúl, Ilhuicatzí-Alvarado Damaris, Jiménez-Chávez Ángel de Jesús<sup>ID</sup> and Moreno-Fierros Leticia<sup>ID</sup>

Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1 Los Reyes Iztacala CP 54090, Tlalnepantla, Estado de México, México.

Breast Cancer: Basic and Clinical Research  
Volume 16: 1–19  
© The Author(s) 2022  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/11782234211065154



**ABSTRACT:** The Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* is a systemic and mucosal adjuvant, able to confer protective immunity in different infection murine models and induce both Th1 and TCD8+ cytotoxic lymphocyte responses, which are required to induce antitumor immunity. The Cry1Ac toxin, despite having not been characterized as an adjuvant, has also proved to be immunogenic and able to activate macrophages. Here, we investigated the potential antitumor adjuvant effect conferred by the Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin in a triple negative breast cancer (TNBC) murine model. First, we evaluated the ability of Cry1Ac proteins to improve dendritic cell (DC) activation and cellular response through intraperitoneal (i.p.) coadministration with the 4T1 cellular lysate. Mice coadministered with the Cry1Ac protoxin showed an increase in the number and activation of CD11c+MHCII- and CD11c+MHCII+<sup>low</sup> in the peritoneal cavity and an increase in DC activation (CD11c+MHCII+) in the spleen. Cry1Ac protoxin increased the proliferation of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in the spleen and mesenteric lymph nodes (MLN), while the Cry1Ac toxin only increased the proliferation of TCD4+ and TCD8+ in the MLN. Remarkably, when tested in the in vivo TNBC mouse model, prophylactic immunizations with 4T1 lysates plus the Cry1Ac protoxin protected mice from developing tumors. The antitumor effect conferred by the Cry1Ac protoxin also increased specific cytotoxic T cell responses, and prevented the typical tumor-related decrease of T cells (TCD3+ and TCD4+) as well the increase of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in spleen. Also in the tumor microenvironment of mice coadministered twice with Cry1Ac protoxin immunological improvements were found such as reductions in immunosuppressive populations (T regulatory lymphocytes and MDSC) along with increases in macrophages upregulating CD86. These results show a differential antitumor adjuvant capability of Cry1Ac proteins, highlighting the ability of Cry1Ac protoxin to enhance local and systemic tumor immunity in TNBC. Finally, using a therapeutic approach, we evaluated the coadministration of Cry1Ac protoxin with doxorubicin. A significant reduction in tumor volume and lung metastasis was found, with increased intratumoral levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  and IL-6 with respect to the vehicle group, further supporting its antitumor applicability.

**KEYWORDS:** Adjuvants, breast cancer, Cry1Ac protoxin, immunotherapy, omentum, doxorubicin

**RECEIVED:** November 22, 2021. **ACCEPTED:** November 17, 2021.

**TYPE:** Original Research

**FUNDING:** The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by grants from PAPIIT (IN223319), CONACyT (CB283319), and COMECYT EDOMEX FICDTEM-2021-085.

**DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS:** The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

**CORRESPONDING AUTHOR:** Moreno-Fierros Leticia, Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla CP 54090, Estado de México, México. Email: lemofi@unam.mx

## Introduction

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by a lack of expression of the estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), accounting for approximately 15% to 20% of breast cancer patients.<sup>1</sup> The lack of specific targeted therapies and poor prognosis of patients with TNBC has fostered a major effort to discover new therapies to treat these patients.<sup>2</sup>

Immunotherapy has emerged as an attractive therapy for some types of cancer. Active immunotherapy broadly refers to stimulation of the immune system against cancer cells. However, a current challenge in cancer immunotherapy is the immunosuppressive tumor microenvironment (TME) and poor immunogenicity to tumor-associated antigens (TAAs).<sup>3</sup> One approach is tumor antigen-based vaccines administered with appropriate adjuvants that can induce specific T-cell responses against TAAs. A key component of these vaccines is an effective adjuvant to enhance the ability of dendritic cells (DC) to generate specific immune responses.<sup>4</sup> Nevertheless, classical approved adjuvants, such as aluminum hydroxide,

mainly induces Th2-type responses but have not been effective in producing Th1-type and TCD8+ cytotoxic responses, the kind of immune responses required for the removal of tumors. Other types of adjuvants that have been studied are TLR agonists, such as CpG (TLR9 agonist),<sup>5,6</sup> monophosphoryl lipid A (MPL, TLR2, and TLR4 agonists),<sup>7</sup> Imiquimod (TLR 7 agonist),<sup>8-10</sup> and poly I:C (TLR 3 agonist),<sup>11,12</sup> which have been shown to enhance or have antitumor effects by themselves. Nonetheless, the use of Toll like receptor (TLR) agonists is a limitation in cancer immunotherapy because the expression of TLRs in many tumors and their stimulation might result in tumor progression.<sup>13-15</sup> In addition, it has been reported that some TLR agonists have toxic effects<sup>16</sup> and could generate chronic inflammation,<sup>17</sup> which is related to carcinogenesis. Therefore, it is necessary to find new, safe adjuvants capable of inducing tumor immunity.

The Cry1Ac protoxin, which is a delta-endotoxin produced during the sporulation phase of *Bacillus thuringiensis*, has been proposed as an effective and safe alternative adjuvant. When ingested by susceptible larvae, the crystal protein is solubilized



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

and proteolitically processed, generating the Cry1Ac toxin, which has been widely used as a bioinsecticide.<sup>18</sup> The recombinant Cry1Ac protoxin is immunogenic and adjuvant at the systemic and mucosal level<sup>19-21</sup> and is able to activate antigen presenting cells (APCs) by upregulating costimulatory molecules and increasing the production of pro-inflammatory cytokines.<sup>22,23</sup> It is able to confer protective immunity against distinct infection models<sup>24-26</sup> and remarkably in a murine brucellosis model, it showed the capacity to induce both Th1 and TCD8+ cytotoxic lymphocyte responses,<sup>27</sup> suggesting a potential utility to improve tumor immunity. The Cry1Ac toxin, despite having not being characterized as an adjuvant, is immunogenic<sup>28</sup> and able to activate macrophages, inducing upregulation of costimulatory molecules and increasing the production of pro-inflammatory cytokines.<sup>29</sup> The potential antitumor adjuvant effect of Cry1Ac proteins has not been explored before. Therefore, here we investigated the potential of Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin to confer antitumor adjuvant effect in the TNBC murine model induced with the breast cancer cell line 4T1. To this aim, first we evaluated the capacity to induce activation of DC and to improve cellular responses. Afterward, we tested whether the coadministration of Cry1Ac proteins with 4T1 lysates in prophylactic immunization schemes could improve tumor immunity TNBC mouse model. Later, we evaluated the influence of immunization treatments on immunological populations within tumor environment. Finally, we performed a therapeutic approach, to evaluate the coadministration of Cry1Ac protoxin with doxorubicin in TNBC mouse model. The outcomes indicate a differential adjuvant capacity of Cry1Ac proteins to improve tumor immunity, being the effect of Cry1Ac protoxin outstanding compared with that of Cry1Ac toxin. In addition, Cry1Ac protoxin may confer therapeutic benefit when coadministered with doxorubicin.

## Material and Methods

### Materials

Fetal bovine serum (FBS), L-Glutamine, and essential amino acids were obtained from GIBCO BRL (NY14072) (Grand Island, NY). Polymyxin B resin was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Sodium chloride (NaCl), sodium carbonate, sodium bicarbonate, and sodium phosphate were purchased from J.T. Baker Corp (South Plainfield, NJ). RPMI-1640 medium, E-toxate, penicillin, streptomycin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and all other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co (St Louis, MO).

### Recombinant Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin

The recombinant Cry1Ac protoxin was purified from Isopropil  $\beta$ -D-1-thiogalactopiranosido (IPTG)-induced *Escherichia coli* (pOS9300) cultures as previously described.<sup>25</sup> The Cry1Ac protoxin was solubilized and the Cry1Ac toxin was activated with

trypsin, performed as previously described.<sup>29</sup> Endotoxin levels of Cry1Ac proteins were tested using the E-toxate kit and were found to be below 0.1 EU/mL. The Cry1Ac proteins were then treated with a polymyxin resin to remove any possible endotoxin remnants and finally examined by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the total protein concentration was determined by the Bradford method.

### Animals

Female BALB/c mice (6-8 weeks old) were used throughout this study. Animals were maintained in filter-topped cages, provided with sterile food (2019 Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet; Harlan Laboratories Inc, Indianapolis, IN) and water ad libitum and cared for according to the guidelines of the Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-1999; Ministry of Agriculture, Mexico). The number (n) of mice used per group is indicated in each figure legend.

### Cell line and 4T1 lysate

The 4T1 mouse mammary carcinoma cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured in RPMI-1640 medium containing penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), fungicide (0.75  $\mu$ g/mL), and supplemented with 10% FBS (Gibco, Gaithersburg, MD). The 4T1 cells in culture were obtained and washed by centrifugation with RPMI medium and phosphate buffered saline (PBS). The pellet containing  $5 \times 10^7$  cells were suspended in 3 mL of sterile PBS containing 5 mM *p*-hydroxymercuribenzoic acid (Sigma Chemical Co) to prevent proteolysis and sonicated (Sonic Dismembrator Model 300 Fisher, Pittsburgh, PA) for 1 minute in ice. The lysates were stored in aliquots and stored at  $-80^\circ\text{C}$  and examined by SDS-PAGE, and the protein concentration was determined by the Bradford method.

### Prophylactic immunizations

Single i.p. application with the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin (at 50  $\mu$ g doses each) + 4T1 cell lysate (50  $\mu$ g), in 100  $\mu$ L volumes were used to evaluate the activation of DC in distinct tissues which were recovered after 48 hour. For the evaluation of proliferative T-cell responses in spleen and MLN, mice were immunized at the same antigen doses twice at 1 week intervals and killed 48 hours after the second immunization. For the evaluation antitumor effects, we used 2 immunization schemes that consisted of 3 prophylactic immunizations via i.p. application with the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin (at 50  $\mu$ g doses each) + 4T1 cell lysate (50  $\mu$ g), in 100  $\mu$ L volumes, as well as control groups administered with only the vehicle (PBS). In the first scheme, immunizations were applied every third day and in the second scheme, immunizations were applied every seventh day. Seven days after the last immunization, the tumors were

induced by subcutaneous injection, into the breast of BALB/c mice with  $3 \times 10^3$  4T1 cells that were freshly obtained from cell cultures. The tumors were measured every third day with a digital caliper, and the tumor volume was obtained according to the formula  $V=0.52 (A2 \times L)$  ( $L$ =length  $\times$   $A$ =width).<sup>30,31</sup> All mice were killed 40 days after 4T1 cell inoculation. A similar prophylactic immunization scheme (applied every seventh day) was used to evaluate the effect on tumor growth of administration of the Cry1Ac proteins alone (at 50  $\mu$ g doses each). We also evaluated a therapeutic immunization scheme at the same doses of Cry1Ac protoxin; this scheme consisted of 3 peritumoral subcutaneous injections applied every week from the second week after tumor induction with  $3 \times 10^3$  4T1 cells.

Finally, to be able to evaluate immunological tumor environment, we tested a 2 subcutaneous immunization scheme, (spatiated by a week) at the same antigen doses (50  $\mu$ g doses each), and then to ensure tumor induction, we injected on day 21 a larger number of 4T1 cells ( $1 \times 10^4$  cells).

#### *Leukocyte isolation from the peritoneal cavity, omentum, mesenteric lymph nodes, and spleen*

The mice i.p. injected with the 4T1 lysate alone or coadministered with the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin were killed under anesthesia 48 hours or the 10th day after the first or second injection of each treatment to collect leukocytes from distinct tissues for analysis of the activation of DC and the proliferation of lymphocytes, respectively. Peritoneal exudate cells were collected by peritoneal lavage with 5 mL of ice-cold PBS containing 5% FBS; the peritoneal cavity was gently agitated for 3 minutes before retrieval of the peritoneal fluid. The spleen and mesenteric lymph nodes (MLN) were excised and disaggregated through a sterile nylon mesh filter using 5 mL of RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS. Omentum was obtained as reported by Carlow et al.<sup>32</sup> Briefly, Omentum were mechanically excised and disaggregated through a sterile nylon mesh filter and washed twice in culture media, and finally the suspension was passed through a nylon mesh filter.

#### *4T1 peptides*

The peptides corresponding to epitopes identified in 4T1 cells were synthesized in Tmtc2 (QGVTVLAVSAVYDIFVFHRLK MKQILP), GPRC5a (FAICFSCLLAHALNLIKLVGRK PLSW), and Qars (FPPDAINNF), in which sequences were identified as neoepitopes for CD8 by next generation sequencing of the 4T1 line<sup>33</sup> and surviving tumor-associated antigen (GWEPDDNPI). The pooled peptides were used to evaluate specific cellular responses in the spleen and mesenteric lymph nodes.

#### *T cell proliferation assay*

A T cell proliferation assay was performed on the 15th day (24 hours after the second immunization of mice that were weekly immunized) by labeling  $4 \times 10^6$  mesenteric lymph

node cells and splenocytes with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (5  $\mu$ M) (Molecular probes, Eugene, OR, Cat#: 11524217). The cell density was adjusted to  $2 \times 10^6$  cells/mL, and cells were cultivated in 12-well plates and stimulated with 10  $\mu$ g/mL of a pool of synthetic peptides expressed by the tumor line 4T1 (Tmtc2, Gprc5a, Qars, and surviving)<sup>35</sup> for 72 hours, 37°C, and 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, the cells were recovered and stained for analysis by flow cytometry.

#### *Tumor microenvironment*

Tumors from mice receiving a 2 immunization scheme every seventh day, were collected 3 weeks after tumor induction. Tumors were mechanically disaggregated through a sterile nylon mesh filter and washed twice in culture media and finally the suspension was passed through a nylon mesh filter. Cell suspensions were counted and divided for the evaluation of immunological parameters on lymphocyte populations, macrophages, and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) which had been linked with tumor immunity.

#### *Flow cytometry analysis*

Leukocytes obtained for T cell proliferation and the DC activation assay were counted by a Bio-Rad TC10 automated cell counter (Hercules, CA). Cells ( $1 \times 10^6$ ) were centrifuged at 400 g for 5 minutes at 4°C. To prevent the nonspecific binding of immunoglobulins, the pellet cells were treated for 30 minutes with 1  $\mu$ g/mL of the anti-CD16/32 monoclonal antibody to the Fc  $\gamma$  II/III receptor (Fc block) (Biolegend, San Diego, CA, Cat#:101302) in 0.5% BSA-PBS. The cells were washed with BSA-PBS and incubated with (CD4-PeCy5, CD8-APC, and CD19-PE) for T cell proliferation and (CD11c-FITC, MHCII-APC, CD80-PeCy5, and CD86-PE) for the DC activation assay at an appropriate dilution for 30 minutes at 4°C in the dark. To evaluate the effect of immunization on immune cells in tumor environment, tumors cells were incubated with one of the following stainings: (1) CD3-APC, CD4-FITC, CD8-PE, and CD69-PeCy5; (2) CD3-APC, CD4-PeCy5, CD25-FITC, and FoxP3-PE; (3) CD11b-PeCy5, F4/80-FITC, Gr1-PE, and CD86-APC. The cells were washed with BSA-PBS and suspended in 300  $\mu$ L of 1% paraformaldehyde in PBS. All dates were analyzed using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and (BD CellQuest Pro .5.1.1 software, 2000, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA). Unless other thing specified in general, 100 000 events per sample were recorded.

#### *Cell viability*

To determine whether Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin have cytotoxic effects on 4T1 cells, the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used as previously described.<sup>34</sup> The 4T1 cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were incubated with different

concentrations of Cry1Ac proteins, washed with PBS, and incubated with MTT (0.5 mg/mL in the cell culture medium without FBS) for 4 hours at 37°C. Subsequently, isopropanol (100 µL/well) was added and mixed the plate for 2 minutes to dissolve the MTT. The optical density was read on a microplate reader at 570 nm, with a reference at 655 nm (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, VT). The mitochondrial activity of treated cells to that of the negative control (cells incubated with vehicle) was normalized. To test whether Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin could provoke apoptosis in 4T1 cells, the incorporation of Annexin V was determined in cells incubated for 24 hours with distinct concentrations of Cry1Ac proteins. The positive control for apoptosis was 500 µM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); untreated cells served as a negative control. After 24 hours of stimulation, the cells were incubated with 25 µL of Annexin V (Sigma-Aldrich-A9460; diluted 1:50 in binding buffer: 0.1 M HEPES, 0.14 M NaCl, and 0.0025 M CaCl<sub>2</sub>) for 25 minutes in the dark, then the cells were acquired (counting 30 000 events per sample) using a flow cytometer (FACSCalibur). For these assays, 3 independent experiments were performed with technical duplicates for each treatment.

#### *In vitro cytotoxicity assay of 4T1 cells by T lymphocytes*

The analysis of cell cytotoxicity mediated by T cells was assayed as described previously.<sup>35</sup> The spleens were collected on the 21th day post tumor induction with 4T1 cells, of animals that had received two i.p. prophylactic immunizations (applied every seventh day) with the 4T1 lysate alone or coadministered with the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin. Nonadherent cells from the spleen of immunized or healthy mice were used to isolate T lymphocytes by negative selection with MACS CD19 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany, cat no 130-121-301); T cells were counted and cocultured at different ratios with  $2 \times 10^4$  4T1 cells stained with CFSE for 4 hours in culture tubes. Cells were recovered, stained with Annexin V-APC, and analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur cytometer, in which 50 000 events, from 4T1 CFSE + region, were obtained.

#### *Doxorubicin + Cry1Ac protoxin therapy*

BALB/c mice 6 to 8 weeks of age were injected with  $2 \times 10^4$  4T1 cells to induce tumor growth, when tumors were palpable; the mice were separated into 3 groups: no treatment (PBS vehicle group), doxorubicin, and doxorubicin + Cry1Ac protoxin (5 mice per group). Doxorubicin was administered intravenously (i.v.) at a concentration of 5 mg/kg in 100 µL on days 9 and 17 after tumor induction. Cry1Ac protoxin was administered after doxorubicin therapy on days 10, 12, and 18 after tumor induction by intratumoral route at a concentration of 50 µg in 50 µL and intraperitoneally at a concentration of 50 µg

in 100 µL. The growth of the tumors was monitored every third day. Mice were killed on day 24 after tumor induction.

#### *Cytokine measurements in tumor*

The tumor of the mice that received the combined therapy of doxorubicin + Cry1Ac protoxin was obtained on day 24 after the induction of the tumors. The tumors were weighed and sonicated to obtain lysates with a pulse 10 s and 50% amplitude (Sonic Dismembrator Model 300 Fisher, Pittsburgh, PA). A relationship was made of the weight of the tumor and the volume of medium to be added, taking into account the heterogeneity of tumor sizes (0.58 g of tumor / 300 µL medium supplemented with cComplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The tumor lysates were centrifuged for 10 minutes at 4000 g and the supernatants recovered were aliquoted and stored at -70°C until use. The levels of, MCP1, IL-12, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL)-10, and IL-6 were measured using the BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Bioscience, San Jose, CA) cat. No. 552364 BD) according to the manufacturer's instructions: We started the standard curve at a concentration of 5 pg/mL to determine concentrations below the curve recommended by the manufacturer. Concentration of cytokines was measured using a FACSCalibur cytometer and BD CBA software (Cytometric Bead Array software © 1999–2003, Becton, Dickinson and Company, San José, CA).

#### *Lung metastasis*

For the analysis of the macro-metastases in the lungs, the therapeutic doxorubicin + Cry1Ac protoxin scheme described above was used. During killing, the lungs were filled with 1 mL of a 10% India ink solution (Winsor & Newton, London, UK), in PBS, through the trachea with the help of a cannula. The trachea was blocked by surgical thread and the lungs were extracted and washed 3 times with 10 mL of Fekete's solution (85 mL 70% ethanol, 10 mL 10% paraformaldehyde, and 5 mL acetic acid), and the lungs were fixed in the same solution overnight. The macroscopic foci were counted with a stereoscopic microscope, OLYMPUS SZ CTV (Olympus, Tokyo, Japan). Metastatic index was calculated with the number of lung metastatic nodes.

#### *Statistical analyses*

Data were analyzed with Graphpad Prism software version 7.0, San Diego, CA. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied for multiple comparisons, and post multiple comparison Dunnett's and *t* test were used to compare all other groups, which were indicated when the *P* value  $* < .1$ ,  $** < .05$ ,  $*** < .01$ ,  $**** < .001$ . The results are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

**Results**

*Intraperitoneal immunization with the Cry1Ac protoxin increases CD80 expression in dendritic cells (CD11c+/MHCII+) of the spleen*

To induce tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes capable of killing tumor cells, the maturation and activation of APCs capable of activating T lymphocytes is required. Therefore, we evaluated whether the i.p. immunization of the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin as adjuvants with 4T1 lysates as a source of tumor antigens were capable of increasing the amount and activation of DC in the peritoneal cavity and spleen in BALB/c mice. The population CD11c+/MHCII+ was considered mature DC

because of high levels of expression in these markers.<sup>36</sup> We chose 48 hours after injection as an adequate time point to analyze the activation of DC because in previous reports significant activation of peritoneal DC<sup>37</sup> and peritoneal cavity macrophages (PeC)<sup>23</sup> was detected following Cry1Ac protoxin i.p. injection.

Using CD11c and MHCII markers, 4 populations with differential expression of these markers were distinguished in peritoneal cavity cells: CD11c+/MHCII+(R1), CD11c+/MHCII+<sup>low</sup> (R3), CD11c-MHCII+(R2), and CD11c+<sup>low</sup>MHCII-(R4); so the expression of CD80 and CD86 activation markers was analyzed separately (Figure 1), to determine more precisely the changes in activation elicited by the injection treatments. Representative dot plots of the analyzed

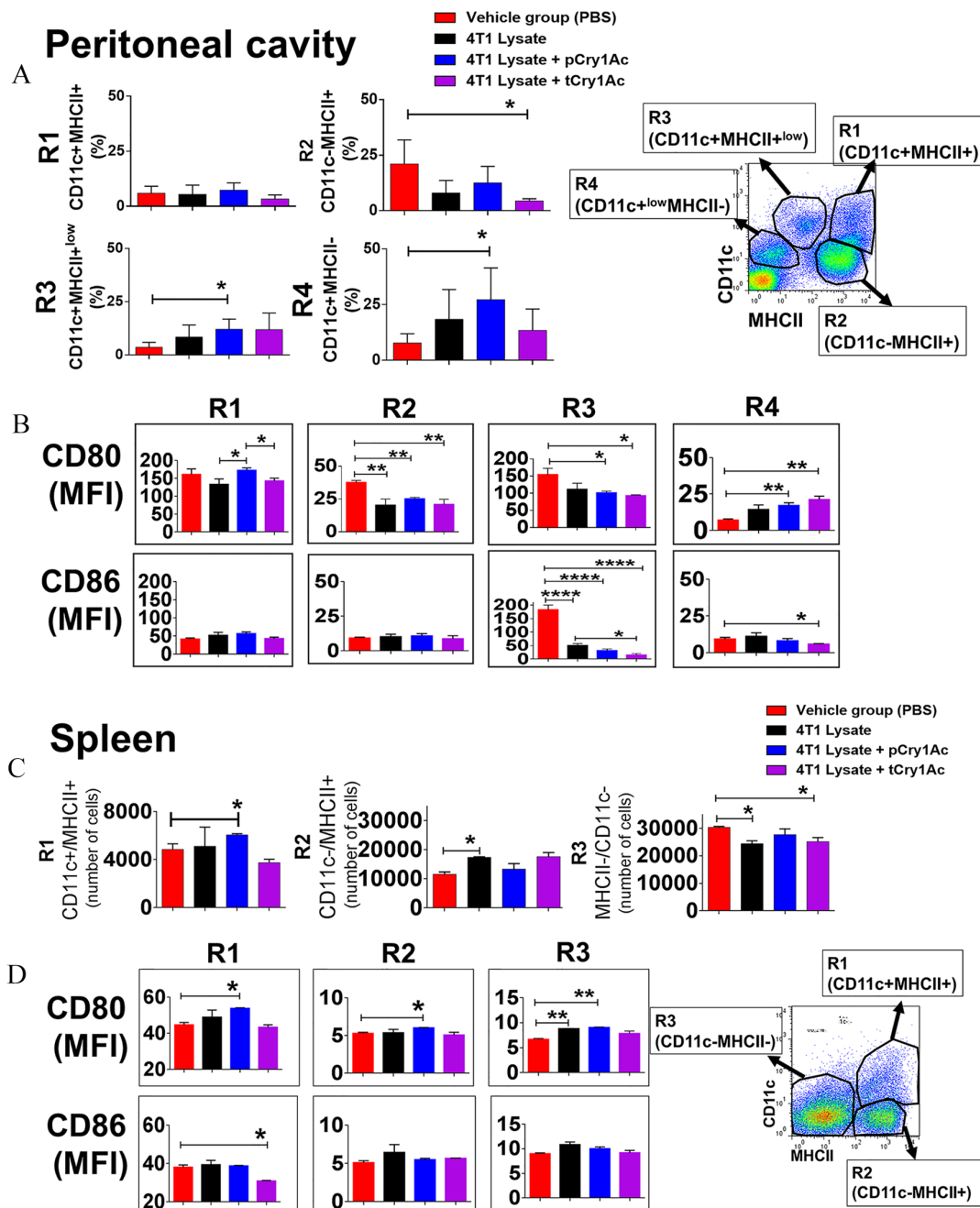
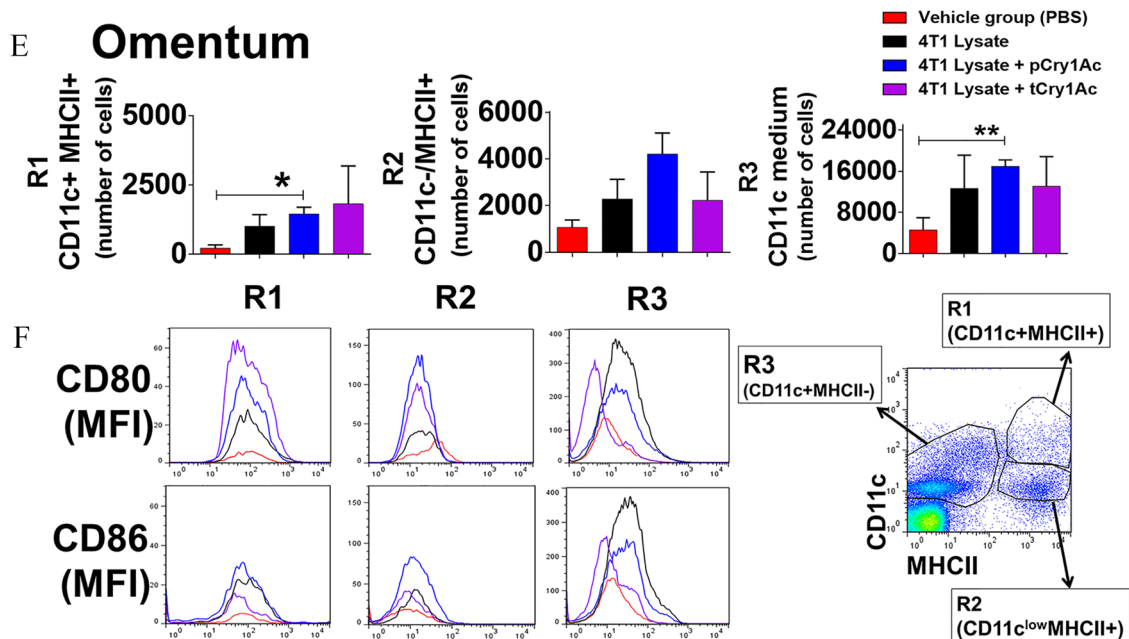


Figure 1. (Continued)





**Figure 1.** Immunization with 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin increases the activation of dendritic cells (CD11c+MHCII+) and the amount of CD11c+ in omentum. BALB/c mice were intraperitoneally (i.p.) injected with a single administration of 4T1 lysate alone or with Cry1Ac protoxin (pCry1Ac) or Cry1Ac toxin (tCry1Ac). Lysates and proteins were administered at 50  $\mu$ g doses each. After 48 hours, mice were killed, and leukocytes were obtained from the peritoneal cavity (A and B), spleen (C and D), and omentum (E and F). Cells were stained for flow cytometry analysis as described in the material and methods section with anti-CD11c, anti-MHCII, anti-CD80, and anti-CD86 antibodies to determine activation of dendritic cells (DC). One hundred thousand events per sample were recorded. Representative dot plots showing the regions displaying differential expression of CD11c and MHCII are shown in Supplementary Figure 2. In the peritoneum, 4 regions were distinguished, while in the spleen and omentum 3 main populations were defined. These regions were analyzed separately to evaluate CD80 and CD86 expression. The values in the bar plots in A, C, and E show the percentage of cells in each region, expressed as mean  $\pm$  SD. Values shown in the bar plots (B and D) represent the mean fluorescence intensities, expressed as the means  $\pm$  SD. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test and *t* test were used. Representative data of 2 independent experiments are shown. \**P* < .05, \*\**P* < .01, \*\*\*\**P* < .0001 versus the indicated group.

regions for each treatment in the distinct tissues analyzed are shown in Supplementary Figure 1.

In mice immunized with the Cry1Ac protoxin as an adjuvant, the amount of DC (CD11c+MHCII+) did not increase in the peritoneal cavity. However, we observed an increase in the proportion of cells expressing CD11c+MHCII<sup>low</sup> (R3) and CD11c<sup>low</sup>MHCII- (R4), in which CD80 was low and upregulated, respectively, compared with the vehicle control group PBS (Figure 1A and B). Whereas, mice that received the Cry1Ac toxin as an adjuvant showed upregulation of CD80 in CD11c<sup>low</sup>MHCII- (R4) cells.

Notably, the mice that received the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin showed an increase in the expression of CD80 in DC CD11c+MHCII+ (R1) in the spleen compared with the control group (Figure 1D). In contrast, mice that were immunized with 4T1 lysate + Cry1Ac toxin showed a decrease in CD86 expression (Figure 1D).

These results indicate that mice immunized with the Cry1Ac protoxin showed an increase in the number of CD11c+MHCII<sup>low</sup> and CD11c<sup>low</sup>MHCII- (with upregulation of CD80) locally in the peritoneal cavity and an increase in the activation of DC at the systemic level in the spleen.

#### *Intraperitoneal immunization with the Cry1Ac protoxin increases dendritic cells (CD11c+MHCII+) of the omentum*

To determine whether the activation of DC occurred in major magnitude in other nearby sites following i.p. injection with tumor lysate plus Cry1Ac proteins, the population of DC in the omentum and MLN was analyzed. These sites were chosen because it has been described that following i.p. injection with diverse inflammatory stimuli, such as lipopolysaccharide (LPS), thioglycolate, or even with Cry1Ac protoxin, monocytes are recruited but the main resident population of macrophages appear to migrate mainly to the omentum.<sup>22,38</sup> It was observed that mice that received the Cry1Ac protoxin showed an increase in the number of DC in the omentum compared with the control group PBS and with the mice that received only 4T1 lysate. In mice immunized with 4T1 lysate + Cry1Ac toxin, we did not find any significant differences (Figure 1E). No differences were found in the number and activation of DC recorder in the MLN by any experimental treatment (Supplementary Figure 1D).

Altogether, these results showing protoxin-induced DC activation, in the peritoneal cavity, spleen, and omentum, led us to propose the use of the Cry1Ac protoxin as an adjuvant that could activate the prime-T cell antitumor response.

*Cry1Ac protoxin treatment increases the proliferation of TCD4+ and TCD8+ in spleen and MLN*

The induction of cellular responses of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes is required to induce adequate antitumor immune responses, as these T lymphocytes improve cytokine production and eliminate tumor cells, respectively. To determine whether the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin used as adjuvants coadministered with 4T1 lysate were able to induce an increase in the cellular response after immunization, we evaluated local and systemic proliferation of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in the spleen and MLN, which were re-stimulated *in vitro* with a pool of peptides corresponding to tumor epitopes described in the 4T1 tumor line.<sup>33</sup>

It was observed that mice immunized with 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin induced a marked increase in the proliferation of TCD4+ lymphocytes (45.1%) in the spleen in comparison with mice that were immunized only with 4T1 lysate (29.5%) and control group PBS (9.8%) treatment. The high proliferative rate recorded was probably due to the *in vivo* stimulus as spleen cells were collected from mice receiving the second immunization 2 days before the killing. Consequently, no further increase in proliferation was observed after re-stimulation with the pool peptides corresponding to tumor epitopes described in 4T1 cells, possibly because the specific T cells were already proliferating (Figure 2A). Notably, proliferation of TCD8+ lymphocytes in the spleen was higher in mice that received the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin treatment (55%) in comparison with mice immunized only with the 4T1 lysate (41.9%) and those that received the vehicle (PBS) (16.7%) (Figure 2A).

In addition to evaluating the cellular response in the spleen, we evaluated proliferation of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in mesenteric lymph nodes (MNL), as these lymphoid nodules are located near the immunization site (*i.e.* immunization). It was observed that mice immunized with both the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin had increased proliferation of TCD8+ lymphocytes (18.7% and 11%, respectively) in comparison with immunization of 4T1 lysate alone (3.4%) (Figure 2B). Therefore, these results show that mice immunized with the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin as adjuvants increase the local (MLN) and systemic (spleen) proliferation of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes.

*Cry1Ac protoxin has a significant antitumor adjuvant effect in vivo*

To evaluate whether the Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin had an adjuvant antitumor effect *in vivo*, we used the TNBC model induced by injection of 4T1 cells and measured the size of tumors in mice that received prophylactic immunization of the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin with 2 different immunization schemes. The first scheme, a short prophylactic scheme in which immunizations were administered

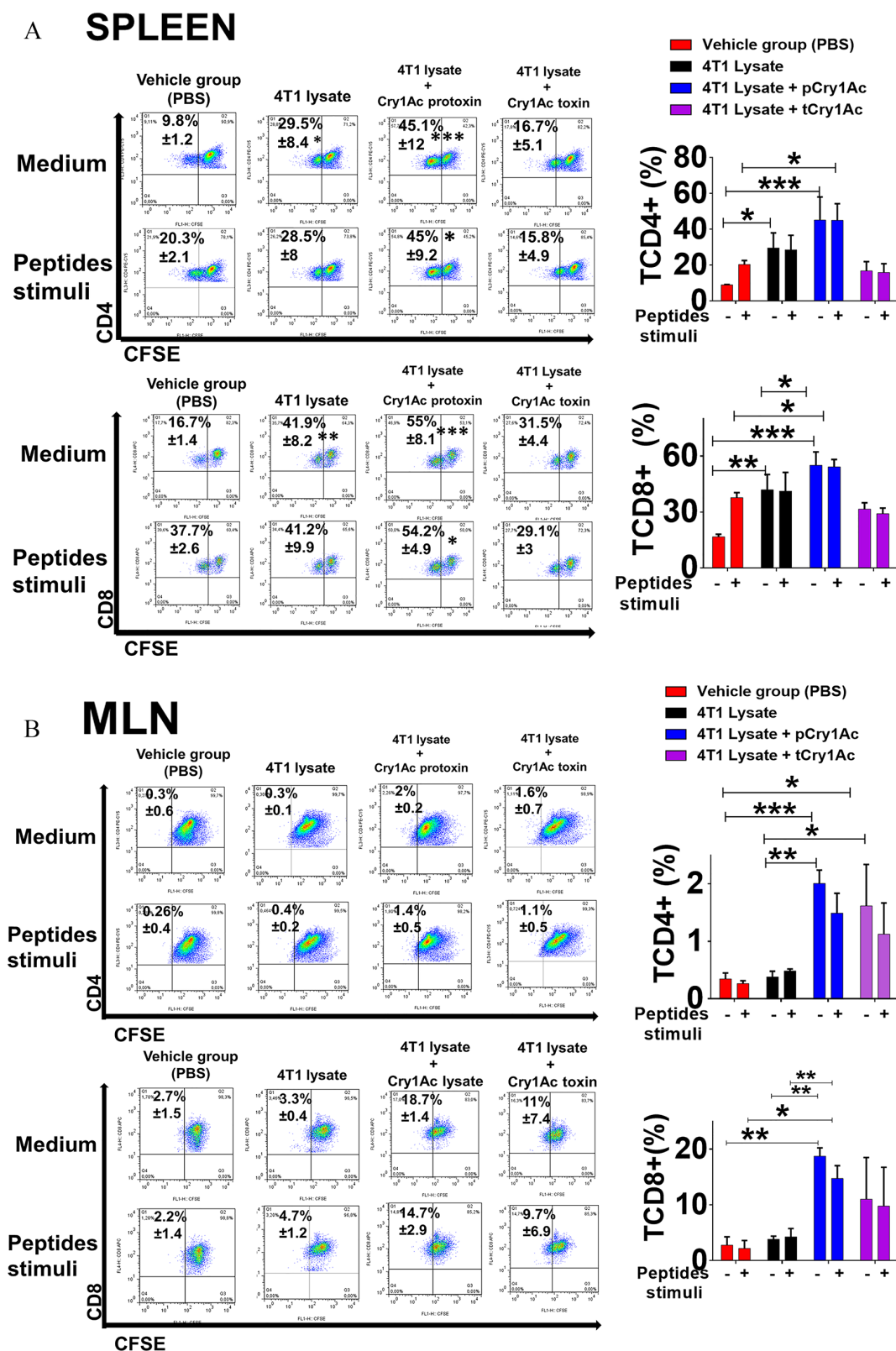
every 3 days, was based on the reported literature in which the antitumor response of some adjuvants<sup>39,40</sup> was evaluated (Figure 3A to C). The second scheme, a long prophylactic scheme in which immunizations were administered every 7 days, was evaluated to improve the adaptive response (Figure 3D to F).

In the short prophylactic immunization scheme, we observed that mice that received the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin showed 60% tumor-free mice (6 out of 10) and the mice that developed tumors were smaller compared with the mice that only received the 4T1 lysate, which had 20% tumor-free mice (2 out of 10) (Figure 3A and B). Interestingly, with the long prophylactic immunization scheme, mice that received the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin were completely protected from the development of tumors (Figure 3D to F).

Mice that received the 4T1 lysate + Cry1Ac toxin had 20% tumor-free mice and the size of the tumors was similar to mice that only received the 4T1 lysate (Figure 3D to F). It is important to mention that the mice that received only the 4T1 lysate showed lower tumor growth compared with the short immunization scheme, indicating that the extended immunization allowed the development of adaptive immune responses. Intraperitoneal prophylactic immunization of the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin alone (without coadministration of the 4T1 lysate) had no effect on tumor growth, confirming the adjuvant effect of both proteins (Figure 3G).

In addition, the potential *in vivo* therapeutic antitumor effect of the Cry1Ac protoxin was also evaluated by injection of 3 peritumoral doses (50 µg/100 µL, once a week for 3 weeks); however, we did not observe any decrease in the growth of tumors (Figure 3H). The null therapeutic effect observed could be explained by the characteristics of the 4T1 breast cancer model, which is very aggressive, since it represents an advanced stage, in which the TME and the antitumor response at a systemic level are diminished.

We also tested whether these proteins had any cytotoxic effect on 4T1 cells as this antitumor activity has been reported<sup>41</sup> in other tumor cell lines. The results of MTT assay show slight or null cytotoxic effects of Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin, respectively, on 4T1 cells. While by MTT viability assay and Annexin V assay, no significant effects on apoptosis were induced by Cry1Ac toxin nor by Cry1Ac protoxin (Supplementary Figure 2). In these assays, relative high doses of Cry1Ac proteins from 50 to 500 µg/mL were tested. Although with the protoxin at the higher doses a reduction of mitochondrial succinate dehydrogenase activity of 4T1 cells by the MTT assay was observed, this activity was unaffected by the toxin even at the highest doses tested. Notwithstanding, we consider that no direct cytotoxic effects of the protoxin on 4T1 cells, might participate on the antitumor adjuvant effect observed, since these antitumor effects were only observed by the prophylactic coadministration of Cry1Ac protoxin, that was long before the inoculation of 4T1 cells.



**Figure 2.** Immunization with the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin induces an increase in the proliferation of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in the spleen and MLN. BALB/c mice were immunized with 4T1 lysate alone or with Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin (at 50  $\mu$ g doses each) by intraperitoneal (i.p.) route; immunizations were applied once a week for 2 weeks. Mice were killed 2 days after the second immunization and leukocytes were obtained from the (A) spleen and (B) mesenteric lymph node (MLN) and stained with CFSE. To analyze proliferation, lymphocytes were cultivated in 96-well plates and stimulated with a pool of peptides (10  $\mu$ g/1 mL) (as described in the materials and methods), 72 hours after the lymphocytes were obtained and stained with anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 antibodies and analyzed by flow cytometry. One hundred thousand events per sample were recorded.  $n=3$  per group. \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$  versus the indicated group. Representative dot plots are shown. Values shown in the right bar graphs indicate the means  $\pm$  SD, expressed as percentages.

*Prophylactic treatment of the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin as an adjuvant prevents the decrease of TCD3+ and TCD4+ lymphocytes in the spleen*

A well-described characteristic of the 4T1 breast tumor model is the marked reduction of T lymphocytes.<sup>42</sup> Therefore, to know how the populations of T lymphocytes were found in the mice protected from the development of tumors, we evaluated

changes in population of TCD3+, TCD4+, and TCD8+ lymphocytes in the spleens of mice that received the long (Figure 4) or short (Supplementary Figure 3) prophylactic immunization schemes.

With the long scheme, the mice that received the Cry1Ac protoxin as an adjuvant did not present a decrease in the proportion of TCD3+ lymphocytes (38%) in the spleen, in

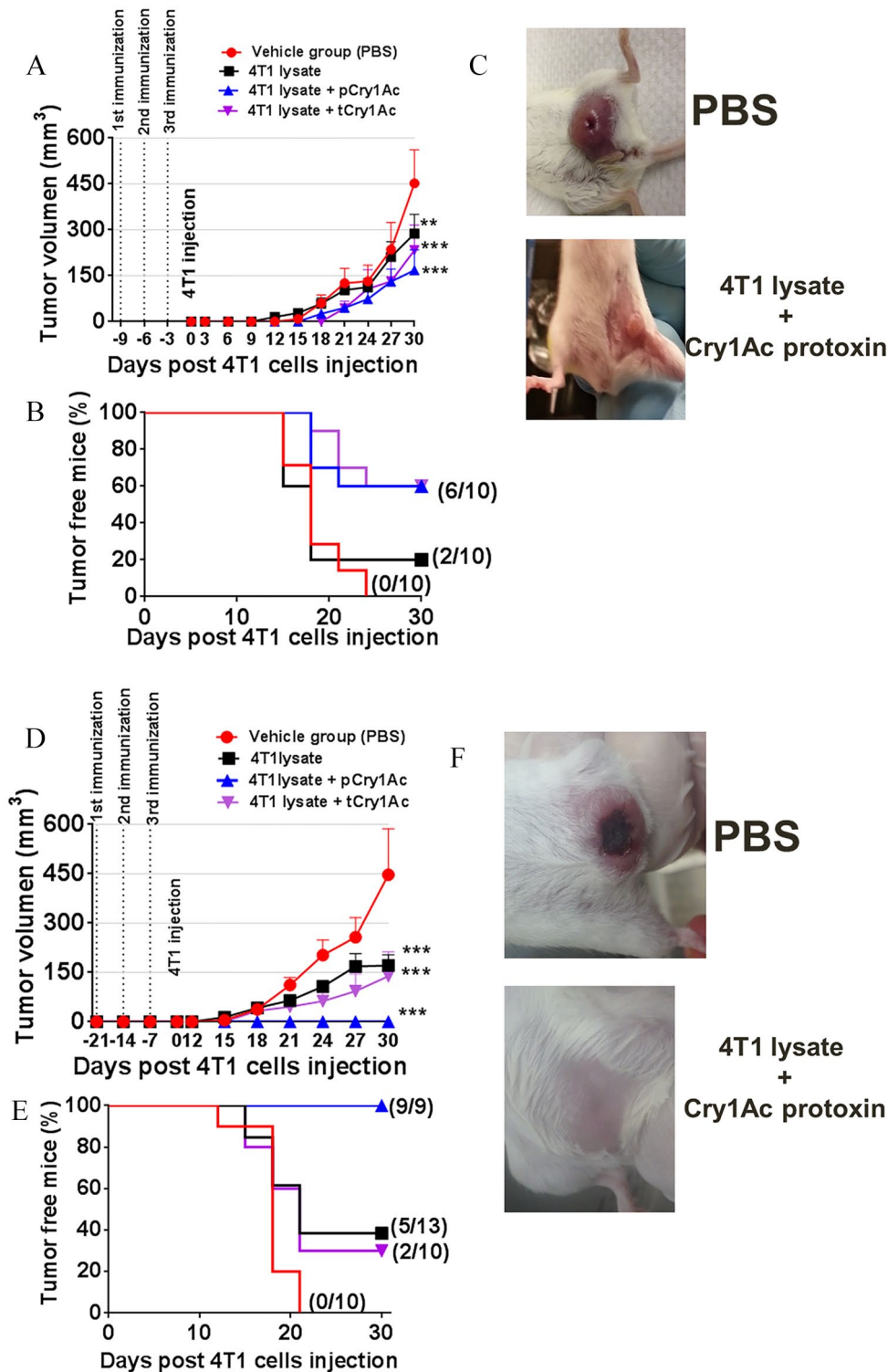
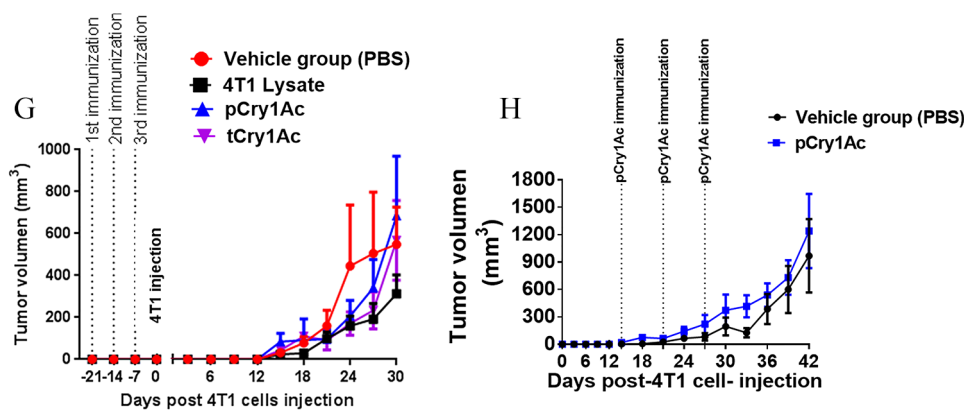


Figure 3. (Continued)



**Figure 3.** Cry1Ac protoxin has adjuvant antitumor effects in 2 different prophylactic immunization schemes. In both (short and long) schemes, BALB/c mice received 3 administrations of the vehicle (PBS) or the 4T1 lysate alone or coadministered with the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin as adjuvants, proteins were administered at 50  $\mu$ g doses each as specified in materials and methods. In the short scheme, each dose was applied every third day (A and B); while in the long scheme each dose was applied every seventh day (C and D) for 3 weeks. Subsequently, breast cancer was induced by the inoculation of  $3 \times 10^3$  4T1 cells by the subcutaneous (s.c.) route; the growth of the tumors was monitored every third day. Growth of tumors (A) and percentage of tumor-free mice (B) of the short immunization scheme, each point represents the mean tumor volume ( $\text{mm}^3$ )  $\pm$  SEM. ANOVA and Dunnett's multiple comparison test.  $**P < .01$ ,  $***P < .001$ . \* indicates significant differences with respect to the PBS group. Tumor photos of mice that received immunizations in the short scheme, control group (PBS) and 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin 30 days after inducing tumors (C). Growth of tumors (D) and percentage of tumor-free mice (E) of the long immunization scheme, each point represents the mean tumor volume ( $\text{mm}^3$ )  $\pm$  SEM. (F) Tumor photos of mice that received immunizations in the long scheme, vehicle group (PBS), and 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin 30 days after inducing tumors PBS, 4T1 lysate, and 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin ( $n=10$ ). (G) Growth of tumors in mice prophylactically administered with Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin alone (with long scheme) or with vehicle or 4T1 lysate. (H) Growth of tumors in mice therapeutically administered with Cry1Ac protoxin 14 days after tumor induction. Cry1Ac protoxin was applied once a week for 3 weeks. Tumor growth curves include only values from tumor-bearing mice. ANOVA and Dunnett's multiple comparison test.  $***P < .001$ . \* indicates significant differences with respect to the PBS group.

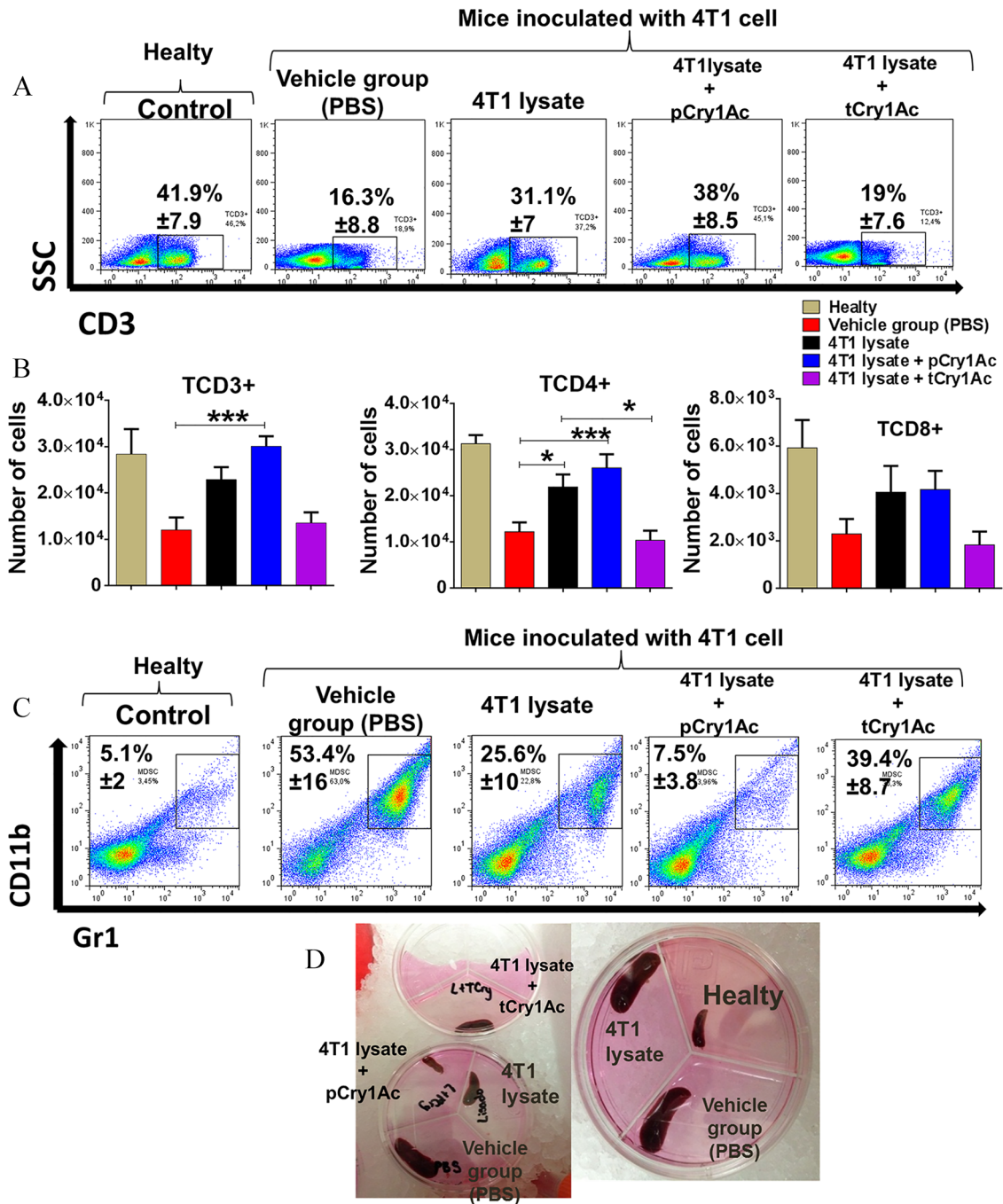
comparison with the mice that developed tumors, control group PBS (16.3%), 4T1 lysate (37.1%), and 4T1 lysate + Cry1Ac toxin (19%) (Figure 4A). When the total number of TCD3+, TCD4+, and TCD8+ lymphocyte subpopulations were analyzed, we found statistically significant differences in the mice that received the immunization with the Cry1Ac protoxin as an adjuvant, as they did not show a decrease in the number of TCD3+ and TCD4+ lymphocytes in comparison with mice that received the control group PBS, while mice that received the Cry1Ac toxin as an adjuvant showed a decrease in both the percentage and number of TCD3+, TCD4+, and TCD8+ lymphocytes (Figure 4B).

While the analysis of T cell populations, in mice prophylactically immunized with the short scheme (performed in the groups immunized with 4T1 lysate alone or with Cry1Ac proteins or just receiving the vehicle; that were then inoculated with 4T1 cells and killed 30 days after), showed that mice coadministered with 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin or + Cry1Ac toxin presented a minor reduction in the percentage of TCD8 lymphocytes and significantly higher numbers of T lymphocytes than the vehicle group (Supplementary Figure 3A and B respectively).

We also examined the lymphocyte proliferative responses and the cytokine production in lymphocyte culture supernatants in the same mice prophylactically immunized with the short scheme and killed at day 30. However, similar lymphocyte proliferative responses were elicited among the distinct treatments (data not shown), while the cytokine levels

(TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) tended to be higher in mice with tumors (in any of the treatments) while mice immunized with Cry1Ac protoxin (which did not develop tumors) had a lower production of these cytokines similar to the one presented in healthy mice (Supplementary Figure 3C and D). Therefore, further characterization of cytokine profile rest to be done, to determine, at early time points after immunization, whether or not the antitumor adjuvant of Cry1Ac is related with its ability to increase the levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  or of other cytokines. The experimental conditions used in present study may not have been optimal for assessing changes in cytokines due to the adjuvants; possibly cytokine evaluation should have been performed at earlier time points after tumor induction, or perhaps should have been assessed prior to tumor induction; or it may be necessary to include some type of stimulation in the assay, such as tumor peptides, or anti CD3/anti CD28 or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).

We also analyzed a population of cells known as myeloid-derived suppressor cells (MDSC), which play a critical role in maintaining the immunosuppressive tumor environment. These cells are a heterogeneous population of myeloid progenitor cells, comprising immature granulocytes, macrophages, and DC.<sup>43</sup> In mice, MDSCs express both the myeloid lineage differentiation antigens, Gr1 and CD11b.<sup>44</sup> In the 4T1 TNBC model, MDSCs increase in the peripheral blood, spleen, lymphoid nodes, and improve the growth of tumors and metastasis, and favors the evasion of recognition by the immune system.<sup>45</sup> Remarkably, we observed that mice that received the 4T1

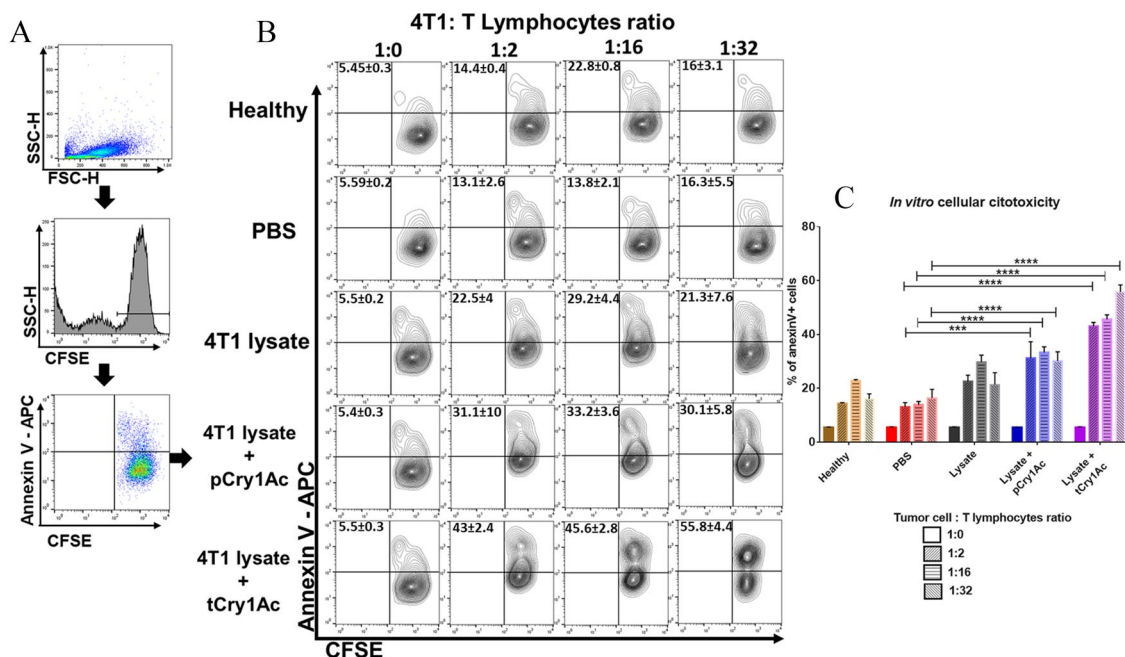


**Figure 4.** Prophylactic immunization with the long scheme, with 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin prevents tumor-induced decline of TCD3+, TCD4+, and TCD8+ lymphocytes and increased MDSC in the spleen. Spleen lymphocyte populations were obtained from healthy mice, mice receiving the vehicle or were immunized with the long prophylactic scheme (1 immunization every week for 3 weeks) with 4T1 lysate alone or coadministered with Cry1Ac protoxin or toxin (at 50  $\mu$ g doses each). Tumors were induced by inoculation of  $3 \times 10^3$  4T1 cells and killed at day 30. (A) Representative dot plots of the percentage of TCD3+ lymphocytes in the spleen of mice that received different treatments. (B) Total number of TCD3+, TCD4+, and TCD8+ lymphocytes obtained from the spleen  $\pm$  SEM. Total cell counts were estimated by analysis of equal cell counts, 100 000 events per sample were acquired. (C) Representative dot plot of the percentage of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the spleen. (D) Size of spleen obtained from mice that received different treatments. TCD3+ cells were gated from lymphocyte region defined on basis of FSH and SSH parameters. CD4 and CD8 were calculated from CD3+ gated cells. MDSC region was defined as F4/80+CD11b+ cells. Bar graphs show mean percentages or number  $\pm$  SEM of gated CD3+ or MDSC populations. ANOVA and Dunnett's multiple comparison test. \* $P < .05$ , \*\*\* $P < .001$ .  $n=7-10$ .

lysate + Cry1Ac protoxin treatment did not have an increase in MDSC (7.5%) compared with mice that developed tumors, control group PBS (53.4%), 4T1 lysate (25.6%), and 4T1 lysate + Cry1Ac toxin (39.4%) (Figure 4C). The increase in the

number of MDSCs is related to an increase in the size of the spleens, which was observed on the day of killing (Figure 4D).

These results suggest that the protective and adjuvant antitumor effect of the protoxin Cry1Ac is related to



**Figure 5.** Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin administered with 4T1 lysates induce spleen T cell-mediated cytotoxicity in vitro. For the analysis of cell cytotoxicity mediated by T cells, the mice were immunized with 4T1 lysate alone or coadministered with Cry1Ac protoxin or toxin (at 50  $\mu$ g doses each). Mice received 2 immunizations or vehicle administrations 1 per week and were killed on day 21. The spleens of healthy mice or from immunized mice were collected and T lymphocytes were isolated by negative selection with magnetic beads and were cocultured with 4T1-CFSE cells for 4 hours. Cells were recovered, stained with Annexin V-APC, and analyzed by flow cytometry with a FACSCalibur cytometer, in which 10000 events per sample were recorder. (A) Flow cytometry gating strategy, the figure shows the regions used to isolated 4T1- CFSE+ cells for the analysis shown in B. (B) Representative dot plots of 4T1- CFSE+ cells positives to Annexin V with different ratios of T cells, mean of the CFSE+ Annexin V+ quadrants are shown. (C) Percentage of cytotoxicity of 4T1 cells; the data in bar graphs are represented as mean  $\pm$  SEM. N=3. \*\*\* and \*\*\*\* denote significant differences, where the P value was  $\leq$  .01 or .001, respectively.

the ability to improve cellular immune responses, with the capability to prevent the decrease of TCD4+ and TCD3+ lymphocytes and to avoid the increase of MDSCs at a systemic level.

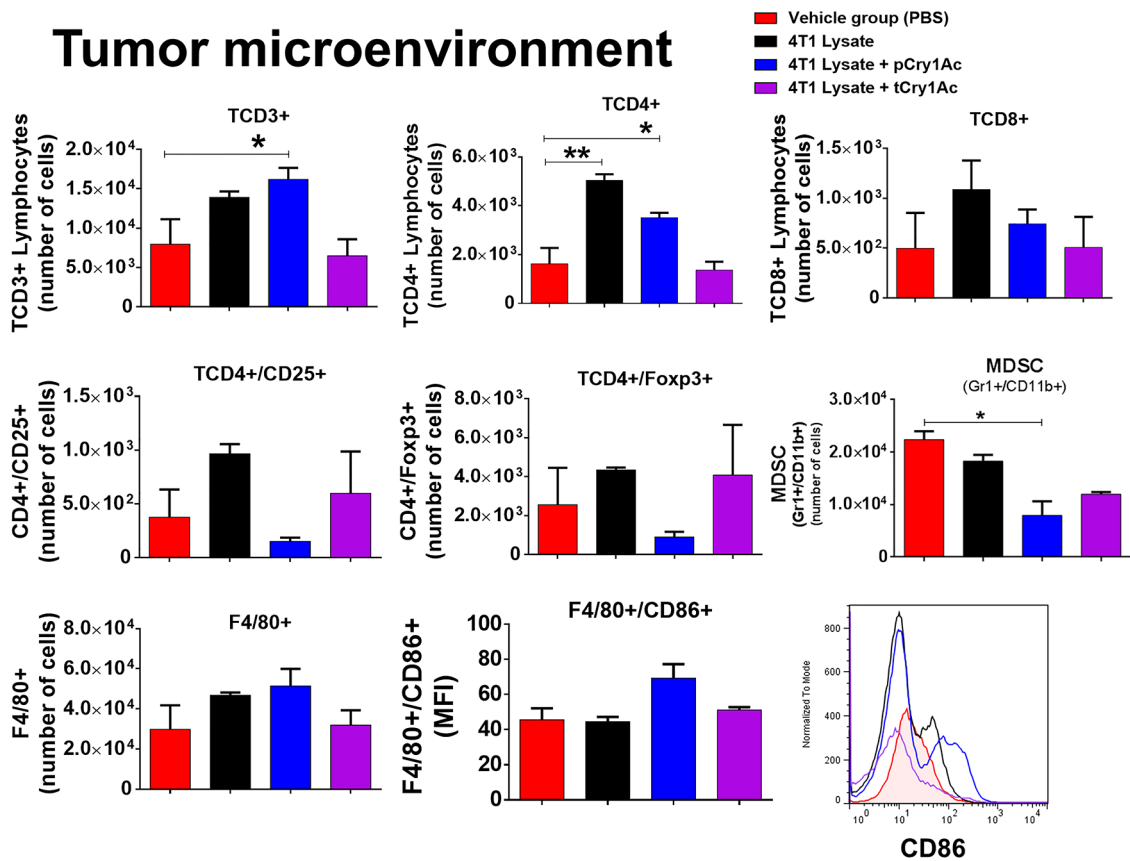
#### *Immunization with the 4T1 lysate + Cry1Ac proteins increases specific cytotoxic T-cell responses*

Furthermore, the in vitro evaluation of the cytotoxic response of T lymphocytes on CFSE labeled 4T1 cells confirmed the increased specific cytotoxic capacity of T lymphocytes isolated from spleen of prophylactically immunized mice with the 4T1 lysate coadministered with the Cry1Ac protoxin or Cry1Ac toxin in comparison with T cells from unimmunized mice or immunized with 4T1 lysate alone. Surprisingly, Cry1Ac toxin showed a better capacity to activate T cells to kill 4T1 cells in vitro, than Cry1Ac protoxin, which promotes a better antitumor response. The increased apoptosis was evaluated by the expression of Annexin V in CFSE-stained 4T1 cells incubated with distinct ratios of T cells from mice immunized in comparison with lymphocytes from unimmunized mice (Figure 5).

Improved antibody-mediated cytotoxicity of 4T1 tumor cells might be an additional immune mechanism participating in the enhanced antitumor response elicited by the adjuvant Cry1Ac protoxin, but this will require further investigation.

#### *The coadministration of Cry1Ac protoxin activate immune cells in tumor microenvironment*

To evaluate whether the distinct immunization treatments had effects on the immunological cells in the tumor environment, we evaluated populations which may be associated with improvements in the capability to induce tumor immunity. To this aim, a 2 immunization protocol with 4T1 lysates alone or with Cry1Ac protoxin toxin was performed, then we induced tumors, and after 3 weeks, were analyzed in the tumors the following immunological parameters: the number of T lymphocytes and its activation, the amount of regulatory T cells, the number of macrophages F4/80 and its activation, and the number of MDSC (Figure 6). Unimmunized mice presented a low amount of T cells, while mice immunized with Cry1Ac protoxin presented the highest amount of T cells, followed by the mice immunized with lysate alone and finally mice immunized with the Cry1Ac toxin presented a low amount similar to the found in immunized mice. However, the amount of CD4T cells was higher in mice immunized with lysate alone followed by the group coadministered with Cry1Ac protoxin and unimmunized mice and mice coadministered with Cry1Ac toxin presented the lowest amounts of CD4T cells. While no statistically significant changes were recorded for CD8 T cells. Interestingly, mice immunized with the Cry1Ac protoxin presented the lowest amount of regulatory T cells CD4



**Figure 6.** Immunization with 4T1 lysate + Cry1Ac activate immune cells in tumor environment. The effect of immunization in the immune populations in tumor environment was evaluated by flow cytometry. In this experiment was performed a two i.p. immunization scheme, applied once a week with 4T1 lysate alone or coadministered with Cry1Ac toxin or protoxin, 7 days after mice were inoculated with  $1 \times 10^4$  4T1 cells and mice were killed to collect tumors 3 weeks after induction. The populations analyzed were T lymphocytes TCD3+, TCD4+, TCD8+, or T regulatory lymphocytes TCD4 + CD25 +, TCD4 + FoxP3 +, the population of MDSC cells CD11b + Gr1 + cells and the population of macrophages F4/80 +. We estimated the amount of all these cell populations and the amount of F4/80 + upregulating CD86. Values shown are means  $\pm$  SD expressed as number of cells or the mean fluorescence intensities of CD86 in the representative histograms of gated macrophages F4/80 +. In the figure, representative data of 2 independent experiments are shown. Total cell counts of each analyzed population were estimated by analysis of equal cell counts, 100 000 events per sample were acquired.

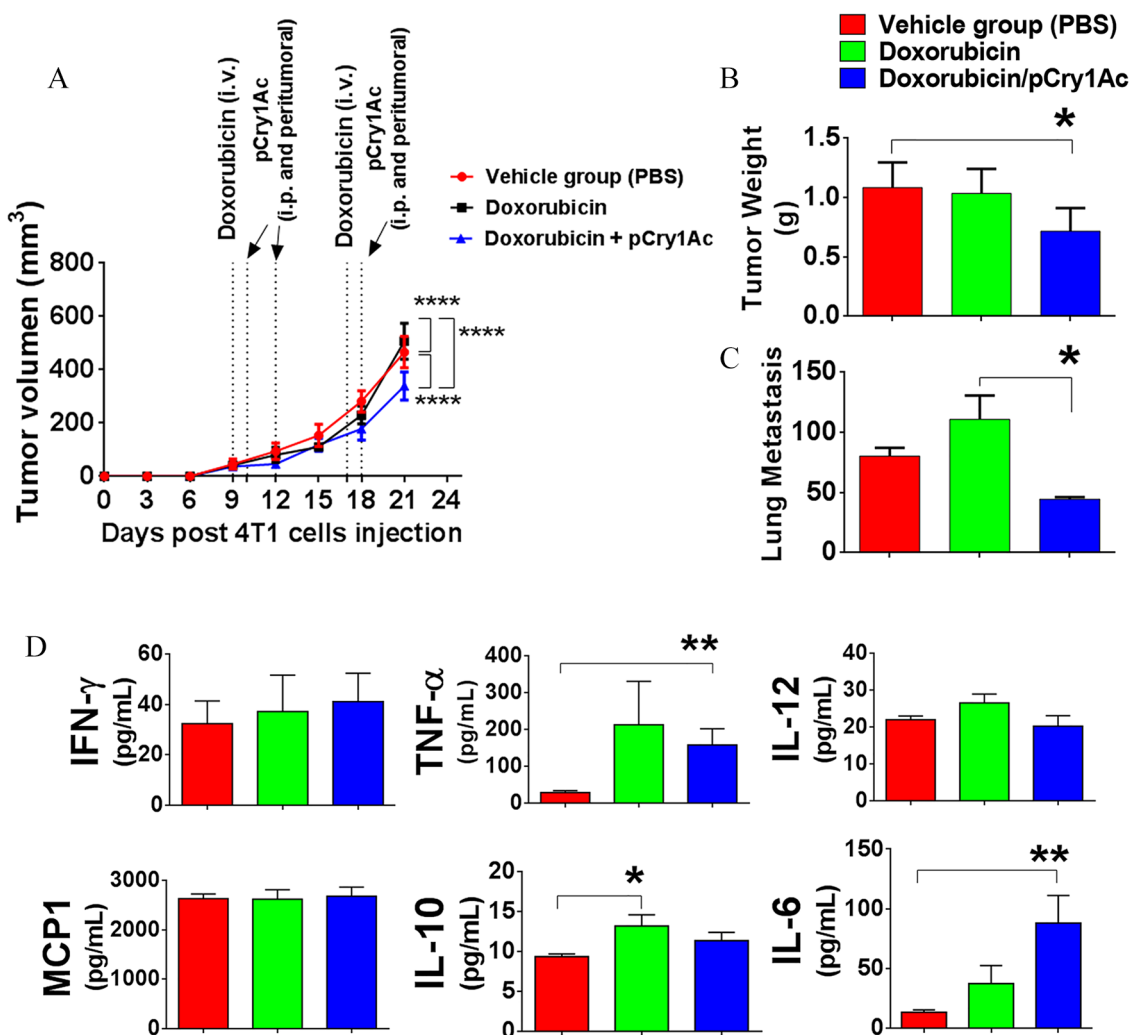
FoxP3+ and CD25+ which had been associated with immunosuppression in tumor environment.<sup>46</sup> While these populations of regulatory T cells were higher in the rest of the groups (unimmunized or immunized with lysate alone or with Cry1Ac toxin), but without significant differences among groups, although in mice immunized with lysate alone tended to be higher. The number of MDSC which also had been related with immunosuppressive effects within the tumors was reduced in mice immunized with Cry1Ac protoxin and also in mice immunized with the toxin but in lesser magnitude. In contrast, mice administered with the vehicle or immunized with the 4T1 lysate alone presented a marked increase of MDSC populations within the tumors. Mice immunized with Cry1Ac protoxin presented higher number macrophages with upregulation of CD86 in relation with the rest of treatments.

*Cry1Ac protoxin and doxorubicin therapy reduces tumor growth and decreases the severity of metastases.* Given that the potential application of Cry1Ac protoxin in humans, in a prophylactic approach would be limited, due to the heterogeneity of tumors between

patients and the lack of specific antigens for breast cancer. We decided to evaluate a therapeutic approach to determine whether the adjuvant antitumor effect of Cry1Ac protoxin could improve therapy with doxorubicin, an anthracycline used in patients with TNBC. BALB / c mice 6 to 8 week old were injected with  $2 \times 10^4$  4T1 cells, when the tumors were palpable; the mice were separated into 3 groups: no treatment (PBS vehicle), doxorubicin and doxorubicin + Cry1Ac protoxin. Mice that received doxorubicin + Cry1Ac protoxin combination therapy showed less tumor growth and tumor weight (Figure 7A and B) and decreased incidence of lung metastases, compared with mice that only received doxorubicin or the vehicle. Therefore, the adjuvant effect of Cry1Ac protoxin in combination therapy with doxorubicin offers therapeutic benefit in TNBC (Figure 7C).

No significant benefit was observed in mice that only received doxorubicin therapy; indeed this group showed the highest number of lung metastases. The absence of antitumor effect may be related to the high number of 4T1 cells used in this experiment to induce tumors, along with the aggressiveness of the model.





**Figure 7.** Cry1Ac protoxin and doxorubicin therapy reduces tumor growth and decreases the severity of metastases. BALB/c mice 6 to 8 weeks of age were injected with  $2 \times 10^4$  4T1 cells to induce tumor growth, when the tumors were palpable, the mice were separated into 3 groups: no treatment (PBS vehicle group), doxorubicin, and doxorubicin + Cry1Ac protoxin. Doxorubicin was administered intravenously (i.v.) at a concentration of 5 mg/kg in 100  $\mu$ L on days 9 and 17 after tumor induction. Cry1Ac protoxin was administered after doxorubicin therapy on days 10, 12, and 18 after tumor induction by intratumoral route at a concentration of 50  $\mu$ g in 50  $\mu$ L and intraperitoneally at a concentration of 50  $\mu$ g in 100  $\mu$ L. The growth of the tumors was monitored on the third day. Mice were killed on day 24 after tumor induction. Tumors were obtained and processed from the mice with the different treatments as described in materials and methods to evaluate the production of cytokines in the tumor. Volume was normalized by tumor mass as described in methods. Mice lungs were obtained for staining with India ink and assessing metastasis. (A) Growth of tumors in the therapy protocol. Each point represents the mean tumor volume ( $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ ). Two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test.  $***P < .0001$ .  $n=5$ . (B) Weight of tumors. (C) Metastasis in the lung. (D) Cytokines in mice tumor (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10, and MCP1). ANOVA and Dunnett's multiple comparison test.  $*P < .05$ ,  $**P < .01$ .  $n=5$ .

The TME has a very important role in the therapy and elimination of tumor cells; therefore, we decided to evaluate the cytokine production in the tumor of the mice that received the combined Doxorubicin + Cry1Ac protoxin therapy. Mice that received doxorubicin + Cry1Ac protoxin combination therapy had greater production of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the tumor, compared with mice that received no treatment and those that received only doxorubicin (Figure 7D).

## Discussion

The major findings in the present study is, first, the evidence showing the significant antitumor adjuvant effect conferred by

the prophylactic coadministration of the Cry1Ac protoxin with 4T1 lysate in a TNBC model. This effect is related to its capacity to improve tumor immunity and is much higher than the one conferred by the Cry1Ac toxin. Moreover, using a therapeutic approach with doxorubicin protoxin Cry1Ac also conferred antitumor benefit.

These findings are relevant because, although there are various strategies to enhance tumor immunity, such as TLR agonists, anti-CD40 antibodies, cytokines, like IL-2 and IFN- $\alpha$ , or growth factors, such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), that have been investigated,<sup>47</sup> in general, these have shown limitation in capacity, safety, costs,

or stability.<sup>48,49</sup> A desired condition for an adjuvant capable of enhancing antitumor immunity is the capacity to activate APCs. In agreement with this requirement, we found that both proteins Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin were able to activate DC following i.p. coadministration with 4T1 lysate. We chose the i.p. route because the administration of adjuvants by the i.p. route has been reported to induce DC activation and a strong TCD8+ lymphocytes response in the spleen.<sup>50</sup>

The differential capability between Cry1Ac toxin and Cry1Ac protoxin to induce the activation and recruitment of DC may explain the higher adjuvant effect conferred by the Cry1Ac protoxin compared with the Cry1Ac toxin. Since in the spleen, MLN, and peritoneal cavity, the recruitment and activation of DC upon i.p. injection occurred particularly with Cry1Ac protoxin, unlike with Cry1Ac toxin. It is important to mention that in steady conditions, DC represents 1% of the resident cells in the rat peritoneum cavity,<sup>51</sup> while in mice, macrophages can represent up to 50% of cells and the majority correspond to the called large peritoneal macrophage population (LPM).<sup>38</sup> In the present study, 4 populations with differential expression of MHCII and CD11c were distinguished in the peritoneal cavity. The populations that increased in number with Cry1Ac protoxin plus 4T1 lysate were CD11c+ MHCII+<sup>low</sup> and CD11c+<sup>low</sup>MHCII- cells with the upregulation of CD80 in the latter, which might correspond to immature DC. However, they also could be macrophages, as some macrophages in serous cavities also express CD11c.<sup>52,53</sup>

Although we presumed that the activation of DC could be better appreciated in the MLN, considered a key determinant of the flow of the peritoneal cavity,<sup>54</sup> changes upon Cry1Ac protoxin injection were not detected in this tissue but were detected in the omentum. Likewise, following i.p. injection with diverse inflammatory stimuli, such as LPS, thioglycolate, or even with the Cry1Ac protoxin, mainly monocytes are recruited to the peritoneal cavity but the main resident population of macrophages appeared to migrate mainly to the omentum.<sup>22,38</sup> Leukocytes found in the murine omentum are concentrated in milky spots, composed of both myeloid and lymphoid cells; these spots increase in size and number upon peritoneal inflammatory stimuli. While the low number of DC found in the omentum of unstimulated mice led to propose that the omentum is an inflammatory-induced lymphoid structure.<sup>55,56</sup> In accordance with these notions, we observed that the size and total number of leukocytes recovered from omentum were increased in Cry1Ac protoxin stimulated mice. It has been reported that the omentum contains DC that are able to cross-present exogenous antigens that promote rapid early activation of T lymphocytes. In addition, there is a constant flow of T and B lymphocytes from the peritoneal cavity to the omentum.<sup>32</sup> Similarly, we observed an increase in the number of DC in the omentum but only in mice that received the Cry1Ac protoxin plus 4T1 lysate; it is possible that these DC might have cross presented tumor antigens and

contributed to the enhanced tumor immunity observed in this group. Interestingly, in the spleen, we also observed that only mice that received the Cry1Ac protoxin enhanced CD80 expression in DC, compared with the control group PBS. These results indicate that the Cry1Ac protoxin, unlike the Cry1Ac toxin, increases the activation of DC and other APCs, locally (in the peritoneal cavity and omentum) and systemically (spleen), and this effect might be related to the better antitumor response.

Some evidence indicates that to achieve effective antitumor immunity, not only a local immune response (within the tumor) is required but a systemic response (at blood, secondary lymphoid organs, and bone marrow) of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes<sup>57,58</sup> also contributes. Notably, we observed that only use of the Cry1Ac protoxin as an adjuvant with the 4T1 lysate increased the specific response of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes, obtained from both systemic and local tissues (spleen and MLN, respectively). These results showed that the Cry1Ac protoxin promotes the increment and activation of DC accompanied with enhanced proliferative responses of T lymphocytes, which led us to presume that it could confer an antitumor adjuvant effect, as it was evidenced. Certainly, the Cry1Ac protoxin, unlike the Cry1Ac toxin, conferred a significant adjuvant effect, preventing tumor induction when the effect was tested in the murine breast cancer model induced by 4T1 cells. These results are outstanding because this 4T1 model, done in the immunocompetent BALB/c mice, resembles stage IV human TNBC, which provokes most deaths due to breast cancer because of its aggressiveness and lack of therapeutic targets available.<sup>2</sup> In this 4T1-induced tumor model, similarly as occurs in women, the TNBC tumor grows in situ and generates metastasis to the lung, liver, bone, and brain.<sup>59,60</sup> Due to its aggressiveness, there are no known vaccine strategies able to prevent tumor development in TNBC as we accomplished in the present work in TNBC model, using the prophylactic scheme. Two of the main factors known to contribute in the efficacy of cancer vaccines are the type of TAAs and the adjuvants employed.<sup>61,62</sup> In the present study, we chose tumor cell lysates as a source of TAAs because the 4T1 tumor model is considered non-immunogenic, and in therapeutic approaches, this strategy has proved to be effective to induce a strong antitumor response and prevent tumor escape, in comparison with the use of some peptide vaccines. This greater effect had been attributed to the large amount of TAAs. The higher antitumor effect achieved with the longer prophylactic immunization schedules in comparison with the short scheme may be attributed to the effective induction of adaptive immunity with the former. This antitumor effect was significantly enhanced by the coadministration of Cry1Ac proteins but the Cry1Ac toxin showed partial antitumor adjuvant effects in both immunization schedules, whereas the antitumor adjuvant effect of protoxin that was partial in the short scheme was enhanced so that it prevented tumor development. These findings clearly supporting the antitumor adjuvant effect of the Cry1Ac protoxin

are relevant because it is not easy to achieve complete tumor immunity in this aggressive TNBC model. Indeed, when the effect of a DNA vaccine target to interleukin-13 receptor  $\alpha 2$  chain as a tumor antigen was evaluated in the same TNBC 4T1 mouse model, the vaccine did not completely protect against tumor development, but it was able to reduce tumor growth compared with the control group. In that study, the DNA vaccine was coadministered with IFA (incomplete Freund's adjuvant) and CpG as adjuvants in prophylactic and therapeutic schemes.<sup>63</sup> Likewise, when the prophylactically effect of a heterogeneous vaccine (multi-epitope DNA and peptides-based cancer vaccine) coadministered with IFA as an adjuvant was evaluated in the TNBC 4T1 mouse model, a reduction in tumor growth was observed, but mice were not fully protected against tumor development.<sup>64</sup> The greater effect achieved by us with Cry1Ac protoxin as an adjuvant could be due the antigen source, as the 4T1 lysate contained a higher amount of TAAs than the antigen sources used in the mentioned studies.

A hallmark in the TNBC model with the 4T1 cell is the systemic decrease of lymphocytes in mice that develop tumors.<sup>42</sup> A proposed mechanism to explain this decrease is thymic atrophy, which causes a spread decline of TCD4+ and TCD8+ lymphocytes in both peripheral organs, such as the spleen.<sup>65,66</sup> Remarkably, we observed that mice immunized with the 4T1 lysate + Cry1Ac protoxin prevented the decrease in the percentage and number of TCD3+ and TCD4+ lymphocytes in the spleen, compared with the control group PBS. These results suggest that immunization with the Cry1Ac protoxin with tumor antigens improves tumor immunity, allowing the maintenance of normal lymphocytes numbers and function. Likewise, the induction of specific cytotoxic T cell responses able to induce apoptosis of 4T1 cells was particularly achieved following coadministration of the Cry1Ac toxin and Cry1Ac protoxin. The analysis of immune cells within tumor environment reinforces the potential benefit of the use of Cry1Ac as an anti-tumoral adjuvant, as particularly following immunization with 4T1 lysate plus Cry1Ac protoxin were found changes in the populations which has been associated with improved tumor immunity such as reduction in the number of immune suppressive cells such as MDSC and regulatory T cells and increased numbers of macrophages upregulating CD86.

The marked effect in the reduction of the immunosuppressive population of MDSC, observed following coadministration of the Cry1Ac protoxin with 4T1 lysate, is a relevant effect that deserves further investigation, as the elimination of MDSC is considered an efficient strategy to be able to induce efficient anti-tumor immune responses.<sup>67,68</sup> It is important to mention that despite both proteins having a similar capacity to activate macrophages,<sup>22,23,29</sup> only the Cry1Ac protoxin showed the potential capability to improve tumor immunity, preventing tumor development. Despite the Cry1Ac toxin used as an adjuvant showed a partial anti-tumor adjuvant effect, the induction of specific cytotoxic T cell responses was an effect elicited with both proteins,

which was even better elicited with the Cry1Ac toxin than with the protoxin. These differences may be due to the differential effects on the activation of APCs elicited by each protein.<sup>37</sup>

The outcomes indicate that the Cry1Ac protoxin confers a better anti-tumor adjuvant effect than the toxin in TNBC 4T1 mouse model, since mice that were immunized prophylactically with the 4T1 lysate were fully protected against the development of tumors. These protective effects correlated with the maintenance of normal numbers of lymphocytes, avoidance of MDSC increments, a better capacity to activate DC and induce T lymphocyte proliferative responses and an immunological improvement in tumor environment, with lower amount immunosuppressive populations. The distinct capacity between Cry1Ac protoxin and Cry1Ac toxin to improve tumor immunity might be also explained by the distinct capacity to induce local and systemic immune activation, with the Cry1Ac protoxin able to induce local (at peritoneal cavity, omentum, and MLN) and systemic (in spleen) activation of DC, accompanied with enhanced T cell responses, unlike the Cry1Ac toxin, which only induced local activation of T cell responses (in the MLN).

A limitation of present results is to having not determined the extent of the prominent anti-tumor effect conferred by coadministration with the protoxin Cry1Ac; this critical point should be examined in further immunological memory studies by repeating the injection with 4T1 cells at distinct time points in immunoprotected mice, which resisted the first inoculation challenge with  $3 \times 10^3$  4T1 cells. The anti-tumor immunoprotection capacity also could be evaluated injecting a higher amount of 4T1 cells, but due to the aggressiveness of this model protection is unlikely to occur under these conditions, as we have observed that injection with  $1 \times 10^4$  4T1 cells surpassed the 100% immunoprotection capacity conferred by coadministration with Cry1Ac protoxin. Thus to strength the potential utility of this protein to improve tumor immunity, further studies will be required to validate whether the significant anti-tumor adjuvant effect observed in present study in the TNBC mouse model induced with 4T1 cells are also achieved using alternative less aggressive mouse models of TNBC such as EMT6 model or to test the effect in a distinct type of cancer model.

The potential application of Cry1Ac protoxin in a prophylactic approach in humans would be limited, as it might present several difficulties, such as the heterogeneity of tumors between patients, or the lack of specific antigens for breast cancer. Therefore, we decided to evaluate in a therapeutic approach whether the adjuvant anti-tumor effect of Cry1Ac protoxin could enhance therapy with doxorubicin, an anthracycline used in the treatment of patients with TNBC. The results indicate Cry1Ac might confer benefit for cancer immunotherapy, since mice receiving doxorubicin + Cry1Ac protoxin combined therapy showed less tumor growth and decreased the incidence of lung metastases. A possible explanation for these effects

could be due to the adjuvant effect of Cry1Ac, which allowed a better presentation of tumor antigens, both in the TME and possibly at the systemic level; since doxorubicin therapy has been reported to be capable of inducing the release of antigens in the TME.<sup>69</sup> However, more studies are needed to describe the exact mechanism by which Cry1Ac protoxin enhances the antitumor effect of doxorubicin therapy.

The presence of cytokines in the TME plays an important role in mediating an antitumor response. The mice that received the combination therapy of doxorubicin + Cry1Ac protoxin had a higher production of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the tumors. Although TNF- $\alpha$  and particularly IL-6 are widely described as cytokines involved in promoting tumor growth and metastasis,<sup>70-73</sup> it has also been described that the presence of IL-6 can provoke an “acute” inflammatory response that favors the elimination of tumor cells.<sup>74</sup> IL-6 might contribute to antitumor immunity by mobilizing T cell responses, by providing survival, differentiation, recruitment and proliferative signals to many leukocyte populations.<sup>75</sup> It has been reported that the presence of TNF- $\alpha$  in tumors can have a vasomodulator effect that improves the concentration of different drugs in the tumor tissue, favoring the elimination of tumors.<sup>76</sup> Assessing cytokine production in the tumor at different stages could help us to better describe the adjuvant effect of Cry1Ac protoxin in combination therapy with doxorubicin.

Mice that received only doxorubicin therapy showed even a greater amount of metastasis than mice that received no therapy; a possible explanation for this effect could be due to pro-metastatic effects elicited by doxorubicin through the release of extracellular vesicles that enhance pre-metastatic niches in the lung.<sup>77,78</sup> Together, these results suggest that combination therapy of doxorubicin with Cry1Ac protoxin may improve the decrease in tumor growth and decrease lung meta, further supporting the potential benefit Cry1Ac may confer for cancer immunotherapy.

### Acknowledgements

Servin-Garrido Roberto Raúl is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship (CVU) 545848. Jiménez-Chávez Ángel de Jesús received a postdoctoral fellowship from COMECYT Estado de México.

### Author Contributions

Conception or design of the work: LMF and RRS; methodological standardization: RRS, DIA, and JCA; experimental design: RRS, LMF, DIA, and JCA; experimentation and data collection: RRS, DIA, and JCA; data analysis and interpretation: RRS, LMF, and JCA; drafting the article: RRS; critical revision of the article: LMF and RRS; final approval of the version to be published: LMF, DIA, RRS, and JCA.

### Ethical Approval

The authors state that all procedures performed in present study which involved experimentation with animals were approved by a research ethics committee at the institution UNAM FES Iztacala. The authors declare that all experimental procedures were performed in accordance with the ethical standards of the institutional and national research ethical committee following the international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals.

### ORCID iD

Jiménez-Chávez Ángel de Jesús  <https://orcid.org/0000-0003-1652-3140>

Moreno-Fierros Leticia  <https://orcid.org/0000-0002-2786-885X>

### Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

### REFERENCES

- Kondov B, Milenković Z, Kondov G, et al. Presentation of the molecular subtypes of breast cancer detected by immunohistochemistry in surgically treated patients. *Open Access Macedonian J Med Sci.* 2018;6:961-967. doi:10.3889/oamjms.2018.231.
- Vidula N, Bardia A. Targeted therapy for metastatic triple negative breast cancer: the next frontier in precision oncology. *Oncotarget.* 2017;8:106167-106168. doi:10.18632/oncotarget.22580.
- Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11:509-524. doi:10.1038/nrclinonc.2014.111.
- Banday AH, Jeelani S, Hruba VJ. Cancer vaccine adjuvants—recent clinical progress and future perspectives. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2015;37:1-11. doi:10.3109/08923973.2014.971963.
- Jie J, Zhang Y, Zhou H, et al. CpG ODN1826 as a promising Mucin1-maltose-binding protein vaccine adjuvant induced DC maturation and enhanced antitumor immunity. *Int J Mol Sci.* 2018;19:920. doi:10.3390/ijms19030920.
- Zhu S, Lv X, Zhang X, et al. An effective dendritic cell-based vaccine containing glioma stem-like cell lysate and CpG adjuvant for an orthotopic mouse model of glioma. *Int J Cancer.* 2019;144:2867-2879. doi:10.1002/ijc.32008.
- Srivastava AK, Yolcu ES, Dinc G, Sharma RK, Shirwan H. SA-4-1BBL/MPL as a novel immune adjuvant platform to combat cancer. *Oncimmunology.* 2016;5:e1064580. doi:10.1080/2162402X.2015.1064580.
- Yue W, Chen L, Yu L, et al. Checkpoint blockade and nanosensitizer-augmented noninvasive sonodynamic therapy combination reduces tumour growth and metastases in mice. *Nat Commun.* 2019;10:2025. doi:10.1038/s41467-019-09760-3.
- Cho JH, Lee HJ, Ko HJ, et al. The TLR7 agonist imiquimod induces anti-cancer effects via autophagic cell death and enhances anti-tumoral and systemic immunity during radiotherapy for melanoma. *Oncotarget.* 2017;8:24932-24948. doi:10.18632/oncotarget.15326.
- Doorduyn EM, Sluiter M, Salvatori DC, et al. CD4(+) T cell and NK cell interplay key to regression of MHC class I(low) tumors upon TLR7/8 agonist therapy. *Cancer Immunol Res.* 2017;5:642-653. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0334.
- Di S, Zhou M, Pan Z, et al. Combined adjuvant of poly I:C improves antitumor effects of CAR-T cells. *Front Oncol.* 2019;9:241. doi:10.3389/fonc.2019.00241.
- Glaflig M, Stergiou N, Schmitt E, Kunz H. Immunogenicity of a fully synthetic MUC1 glycopeptide antitumor vaccine enhanced by poly(I:C) as a TLR3-activating adjuvant. *ChemMedChem.* 2017;12:722-727. doi:10.1002/cmdc.201700254.
- Peyret V, Nazar M, Martin M, et al. Functional toll-like receptor 4 overexpression in papillary thyroid cancer by MAPK/ERK-induced ETS1 transcriptional activity. *Mol Cancer Res.* 2018;16:833-845. doi:10.1158/1541-7786.MCR.
- Bugge M, Bergstrom B, Eide OK, et al. Surface toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness. *J Biol Chem.* 2017;292:15408-15425. doi:10.1074/jbc.M117.784090.
- Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of toll-like receptors in cancer. *Oncogene.* 2014;33:3485-3495. doi:10.1038/onc.2013.302.

16. Qin L, Wu X, Block ML, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007;55:453-462. doi:10.1002/glia.20467.
17. Furi I, Sipo F, Germann TM, et al. Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: clinico-pathogenic aspects. *World J Gastroenterol*. 2013;19:4119-4126. doi:10.3748/wjg.v19.i26.4119.
18. Gomez I, Sanchez J, Munoz-Garay C, et al. Bacillus thuringiensis Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochem J*. 2014;459:383-396. doi:10.1042/BJ20131408.
19. Vazquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De La Riva GA, Lopez-Revilla R. Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol*. 1999;49:578-584. doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00534.x.
20. Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, Lopez-Revilla R, Pina-Cruz S. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of Streptococcus pneumoniae polysaccharides in mice. *Scand J Immunol*. 2003;57:45-55. doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01190.x.
21. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R, Vazquez-Padron RI. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes Infect*. 2000;2:885-890. doi:10.1016/s1286-4579(00)00398.
22. Rubio-Infante N, Ilhuicatzí-Alvarado D, Torres-Martínez M, et al. The macrophage activation induced by Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin involves ERK1/2 and p38 pathways and the interaction with cell-surface-HSP70. *J Cell Biochem*. 2018;119:580-598. doi:10.1002/jcb.26216.
23. Moreno-Fierros L, Garcia-Hernandez AL, Ilhuicatzí-Alvarado D, et al. Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-alpha cytokines. *Int Immunopharmacol*. 2013;17:1051-1066. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.005.
24. Legorreta-Herrera M, Meza RO, Moreno-Fierros L. Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:198921. doi:10.1155/2010/198921.
25. Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against Naegleria fowleri meningoencephalitis. *Infect Immun*. 2004;72:4368-4375. doi:10.1128/IAI.72.8.4368-4375.2004.
26. Ibarra-Moreno S, Garcia-Hernandez AL, Moreno-Fierros L. Coadministration of protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite Immunol*. 2014;36:266-270. doi:10.1111/pim.12103.
27. Gonzalez-Gonzalez E, Garcia-Hernandez AL, Flores-Mejia R, Lopez-Santiago R, Moreno-Fierros L. The protoxin Cry1Ac of Bacillus thuringiensis improves the protection conferred by intranasal immunization with Brucella abortus RB51 in a mouse model. *Veter Microbiol*. 2015;175:382-388. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.021.
28. Guerrero GG, Dean DH, Moreno-Fierros L. Structural implication of the induced immune response by Bacillus thuringiensis Cry proteins: role of the N-terminal region. *Mol Immunol*. 2004;41:1177-1183. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.026.
29. Torres-Martínez M, Rubio-Infante N, Garcia-Hernandez AL, Nava-Acosta R, Ilhuicatzí-Alvarado D, Moreno-Fierros L. Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;78:106-115. doi:10.1016/j.biocel.2016.06.022.
30. Kij A, Kus K, Smeda M, et al. Differential effects of nitric oxide deficiency on primary tumour growth, pulmonary metastasis and prostacyclin/thromboxane A2 balance in orthotopic and intravenous murine models of 4T1 breast cancer. *J Physiol Pharmacol*. 2018;69:911-919. doi:10.26402/jpp.2018.6.05.
31. Niggeh SE, Yeap SK, Nordin N, Rahman H, Rosli R. In vivo anti-tumor effects of citral on 4T1 breast cancer cells via induction of apoptosis and downregulation of aldehyde dehydrogenase activity. *Molecules*. 2019;24:3241. doi:10.3390/molecules24183241.
32. Carlow DA, Gold MR, Ziltener HJ. Lymphocytes in the peritoneum home to the omentum and are activated by resident dendritic cells. *J Immunol*. 2009;183:1155-1165. doi:10.4049/jimmunol.0900409.
33. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature*. 2015;520:692-696. doi:10.1038/nature14426.
34. Bautista-Jacobo I, Rubio-Infante N, Ilhuicatzí-Alvarado D, Moreno-Fierros L. Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin and protoxin do not provoke acute or chronic cytotoxicity on macrophages and leukocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2021;57:42-52. doi:10.1007/s11626-020.
35. Jimenez-Chavez AJ, Moreno-Fierros L, Bustos-Jaimes I. Therapy with multi-epitope virus-like particles of B19 parvovirus reduce tumor growth and lung metastasis in an aggressive breast cancer mouse model. *Vaccine*. 2019;37:7256-7268. doi:10.1016/j.vaccine.2019.09.068.
36. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
37. Ibarra-Moreno CD, Ilhuicatzí-Alvarado D, Moreno-Fierros L. Differential capability of Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin and toxin to induce in vivo activation of dendritic cells and B lymphocytes. *Dev Comp Immunol*. 2021;121:104071. doi:10.1016/j.dci.2021.104071.
38. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:2568-2573. doi:10.1073/pnas.0915000107.
39. Soliman H, Mediavilla-Varela M, Antonia SJ. A GM-CSF and CD40L bystander vaccine is effective in a murine breast cancer model. *Breast Cancer*. 2015;7:389-397. doi:10.2147/BCTT.S89563.
40. Yin P, Liu X, Mansfield AS, et al. CpG-induced antitumor immunity requires IL-12 in expansion of effector cells and down-regulation of PD-1. *Oncotarget*. 2016;7:70223-70231. doi:10.18632/oncotarget.11833.
41. Mendoza-Almanza G, Rocha-Zavaleta L, Aguilar-Zacarias C, Ayala-Lujan J, Olmos J. Cry1A proteins are cytotoxic to HeLa but not to SiHa cervical cancer cells. *Curr Pharmaceut Biotechnol*. 2019;20:1018-1027. doi:10.2174/1389201020666190802114739.
42. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:228. doi:10.1186/1471-2407.
43. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol*. 2007;25:2546-2553. doi:10.1200/JCO.2006.08.5829.
44. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008;181:5791-5802. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5791.
45. Hsu YL, Yen MC, Chang WA, et al. CXCL17-derived CD11b(+)Gr-1(+) myeloid-derived suppressor cells contribute to lung metastasis of breast cancer through platelet-derived growth factor-BB. *Breast Cancer Res*. 2019;21:23. doi:10.1186/s13058-019.
46. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19:1423-1437. doi:10.1038/nm.3394.
47. Berinstein NL. Enhancing cancer vaccines with immunomodulators. *Vaccine*. 2007;25:B72-B88. doi:10.1016/j.vaccine.2007.06.043.
48. Geller MA, Cooley S, Argenta PA, et al. Toll-like receptor-7 agonist administered subcutaneously in a prolonged dosing schedule in heavily pretreated recurrent breast, ovarian, and cervix cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59:1877-1884. doi:10.1007/s00262-010.
49. Dillon PM, Petroni GR, Smolkin ME, et al. A pilot study of the immunogenicity of a 9-peptide breast cancer vaccine plus poly-I:CLC in early stage breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2017;5:92. doi:10.1186/s40425-017.
50. Schmidt ST, Khadke S, Korsholm KS, et al. The administration route is decisive for the ability of the vaccine adjuvant CAF09 to induce antigen-specific CD8(+) T-cell responses: the immunological consequences of the biodistribution profile. *J Control Release*. 2016;239:107-117. doi:10.1016/j.jconrel.2016.08.034.
51. Van Vugt E, Arkema JM, Verdaasdonk MA, Beelen RH, Kamperdijk EW. Morphological and functional characteristics of rat steady state peritoneal dendritic cells. *Immunobiology*. 1991;184:14-24. doi:10.1016/S0171-2985(11)80568.
52. Bain CC, Hawley CA, Garner H, et al. Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nat Commun*. 2016;7:ncmms11852. doi:10.1038/ncmms11852.
53. Kim KW, Williams JW, Wang YT, et al. MHC II+ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. *J Exp Med*. 2016;213:1951-1959. doi:10.1084/jem.20160486.
54. Parungo CP, Soybel DI, Colson YL, et al. Lymphatic drainage of the peritoneal space: a pattern dependent on bowel lymphatics. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:286-298. doi:10.1245/s10434-006.
55. Van Vugt E, Van Rijthoven EA, Kamperdijk EW, Beelen RH. Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats. *Anat Rec*. 1996;244:235-245. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199602)244:2<235::AID-AR11>3.0.CO;2-Q.
56. Platell C, Cooper D, Papadimitriou JM, Hall JC. The omentum. *World J Gastroenterol*. 2000;6:169-176. doi:10.3748/wjg.v6.i2.169.
57. Spitzer MH, Carmi Y, Reticker-Flynn NE, et al. Systemic immunity is required for effective cancer immunotherapy. *Cell*. 2017;168:487-502.e15. doi:10.1016/j.cell.2016.12.022.
58. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kuhnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75:689-713. doi:10.1007/s00018-017-2686-7.
59. Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, et al. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res*. 2005;3:1-13.
60. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res*. 1992;52:1399-1405.

61. Schijns V, Tartour E, Michalek J, Stathopoulos A, Dobrovolskiene NT, Strioga MM. Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines. *Cytotherapy*. 2014;16:427-439. doi:10.1016/j.jcyt.2013.09.008.
62. Khong H, Overwijk WW. Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J Immunother Cancer*. 2016;4:56. doi:10.1186/s40425-016-0160-y.
63. Nakashima H, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK. Interleukin-13 receptor alpha2 DNA prime boost vaccine induces tumor immunity in murine tumor models. *J Transl Med*. 2010;8:116. doi:10.1186/1479-5876-8-116.
64. Safavi A, Kefayat A, Mahdevar E, Ghahremani F, Nezafat N, Modarressi MH. Efficacy of co-immunization with the DNA and peptide vaccines containing SYCP1 and ACRBP epitopes in a murine triple-negative breast cancer model. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;17:22-34. doi:10.1080/21645515.2020.1763693.
65. Fu Y, Paul RD, Wang Y, Lopez DM. Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas. *J Immunol*. 1989;143:4300-4307.
66. Wang W, Thomas R, Sizova O, Su DM. Thymic function associated with cancer development, relapse, and antitumor immunity—a mini-review. *Front Immunol*. 2020;11:773. doi:10.3389/fimmu.2020.00773.
67. Alizadeh D, Trad M, Hanke NT, et al. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res*. 2014;74:104-118. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1545.
68. Geng F, Bao X, Dong L, et al. Doxorubicin pretreatment enhances FAPalpha/survivin co-targeting DNA vaccine anti-tumor activity primarily through decreasing peripheral MDSCs in the 4T1 murine breast cancer model. *Oncotarget*. 2020;9:1747350. doi:10.1080/2162402X.2020.1747350.
69. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:860-875. doi:10.1038/nrc3380.
70. Gopinathan G, Milagre C, Pearce OM, et al. Interleukin-6 stimulates defective angiogenesis. *Cancer Res*. 2015;75:3098-3107. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1227.
71. Isobe A, Sawada K, Kinose Y, et al. Interleukin 6 receptor is an independent prognostic factor and a potential therapeutic target of ovarian cancer. *PLoS ONE*. 2015;10:e0118080. doi:10.1371/journal.pone.0118080.
72. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol*. 2020;43:1-18. doi:10.1007/s13402-019-00489-1.
73. Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, Wu CJ, Ji YH, Xu J. IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26:421-426. doi:10.17219/acem/62120.
74. Liu K, He K, Xue T, Liu P, Xu LX. The cryo-thermal therapy-induced IL-6-rich acute pro-inflammatory response promoted DCs phenotypic maturation as the prerequisite to CD4(+) T cell differentiation. *Int J Hyper*. 2018;34:261-272. doi:10.1080/02656736.2017.1332394.
75. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol*. 2014;26:38-47. doi:10.1016/j.smim.2014.01.008.
76. Greish K, Taurin S, Morsy MA. The effect of adjuvant therapy with TNF-alpha on animal model of triple-negative breast cancer. *Ther Deliv*. 2018;9:333-342. doi:10.4155/tde-2017-0101.
77. Karagiannis GS, Pastoriza JM, Wang Y, et al. Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaan0026. doi:10.1126/scitranslmed.aan0026.
78. Keklikoglou I, Cianciaruso C, Guc E, et al. Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models. *Nat Cell Biol*. 2019;21:190-202. doi:10.1038/s41556-018.