



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Evaluación histológica y hematológica del infiltrado de células tumorales en tejidos linfoides y metastásicos en un modelo murino de cáncer de mama tratado con GK-1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

OSIRIS JAIR PATIÑO CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
[INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ
[INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA](#)

DR. ARMANDO PÉREZ TORREZ
[FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.](#)

Ciudad de México. Marzo, 2023



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.

“No importa si es en silla de ruedas, muletas, a pequeños pasos en bastón o corriendo, sonriendo y saltando. Lo importante es seguir siempre adelante, avanzando a veces con marcha lenta a veces apresurado, pero siempre con mucha humildad, bondad y una gran sonrisa en el rostro”

Agradecimientos

A mi querida madre Teresa de J. Patiño Chávez quien siempre me ha apoyado en cada paso que doy y cada día me impulsa a ser una mejor persona. Quien me ha demostrado que el amor de madre no tiene límites y me ha enseñado a ser resiliente y a actuar siempre con valores genuinos. Gracias por ser mi ejemplo de fuerza, perseverancia y nobleza.

A Viviana Trejo Becerra quien fue mi adorada compañerita de aventuras y me apoyo incansablemente en todo momento, gracias por mostrarme lo que es la lealtad y el amor auténtico en los bonitos, pero sobre todo en los complicados momentos, gracias por ser mi fuente de fortaleza durante tantos años. Las palabras nunca bastarán para expresar mi cariño, amor y gratitud. Estarás por siempre en mi corazón sin importar distancia o circunstancia.

A la brillante Dra. Gladis Fragoso, mi mentora, y a quien admiro profundamente, gracias por todo el apoyo brindado y por guiarme durante esta bonita pero complicada travesía que es dedicar tu tiempo, esfuerzo y tu ser a la ciencia. Le agradezco tanto el estar siempre al tanto de mí, sin importar las situaciones. Y por creer siempre en mi e impulsarme constantemente. Gracias Dra.

Agradecimientos académicos

El presente trabajo de tesis de posgrado se concretó gracias al financiamiento del CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) mediante la beca nacional, No. CVU: 856278. Y con el apoyo del programa de posgrado en ciencias bioquímicas de la facultad de química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco al Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme las herramientas necesarias para concluir mis estudios de posgrado.

Este trabajo fue financiado por DGAPA-UNAM, PAPIIT número IN2118822 e IN213219 y por CONACYT -Fordecyt-Pronaces grant No. 302961

Agradezco enormemente a la Dra. Gladis del Carmen Fragoso y a la Dra. Edda Sciutto por brindarme un espacio en el equipo de trabajo siempre con una sonrisa y la mejor disposición para escucharme, orientarme y empaparme de sus brillantes ideas.

Abreviaciones

ALC	Absolute lymphocyte count
ANC	Absolute neutrophil count
Arg-1	Arginase 1
b-FGF	Basic fibroblast grow factor
CD-11b	Cluster of Differentiation 11b (Granulocyte, monocyte)
CD-3	Cluster of Differentiation 3 (T cell)
CD-4	Cluster of Differentiation 4 (Helper T cell)
CD-45	Cluster of Differentiation 45 (Leucocitos)
CD-8	Cluster of Differentiation 8 (Cytotoxic T cell)
CD-19	Cluster of Differentiation 19 (B cell)
CD-80	Cluster of Differentiation 80
CD-86	Cluster of Differentiation 86
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLIS	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
CM	Cáncer de mama
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTCM	Célula tumoral de cáncer de mama
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CXCL-9	C-X-C motif chemokine ligand 9
DC	Dendritic cell
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ER	Estrogen receptor
Fas	Fas cell death receptor
Fas-L	Fas cell death receptor ligand
FMVZ	Facultad de medicina veterinaria y zootecnia
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
Gr-1	GPI-linked myeloid differentiation marker
H&E	Hematoxylin and eosin
HER2	Human hepidermal growth factor receptor 2
IDO	Indoleamine
IFN- γ	Interferón gamma
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IV	Intravenoso
LECs	Células endoteliales linfáticas
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex locus C1
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MDSC	Mieloid derived supresor cells
MF	Macrophage
MG-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

MHC-1 Major histocompatibility complex class 1
MIP- α Macrophage inflammatory protein alpha
NO Nitric oxide
Pd-1 Programed cell death protein 1
Pd-L1 Programed cell death ligand 1
PMN Premetastatic niche
PR Progesteron receptor
ROS Reactive oxygen species
SC Subcutáneo
SSI Solución salina isotónica
TCR T cell receptor
TGF- β Transforming growth factor beta
TNF- α Tumor necrosis factor alpha
VEGF Vascular endothelial grow factor
WBC White blood cell count

Índice

1	Introducción.....	11
1.1	Cáncer de mama.....	11
1.2	Tipos de cáncer de mama.....	12
1.3	Microambiente tumoral.....	14
1.4	Mecanismos asociados a evasión inmune en cáncer.....	15
1.5	Reacción leucemoide y MDSC asociadas a enfermedad neoplásica.....	18
1.5.1	Reacción leucemoide.....	18
1.5.2	células mieloides supresoras (MDSC).....	19
1.5.3	Tumor primario promueve movilización de MDSC a órganos distantes formando nichos pre-metastásicos.....	20
1.5.4	Mecanismos inmunosupresores de MDSC.....	21
1.6	Inmunoterapia como novedosa herramienta contra cáncer de mama.....	21
2	Antecedentes.....	23
2.1	Propiedades del péptido GK1.....	23
2.2	Modelo 4T1.....	27
2.2.1	Características del modelo.....	27
2.2.2	4T1 como modelo metastásico.....	28
2.2.3	Modelo 4T1 produce reacción leucemoide en asociación con esplenomegalia y factores de crecimiento derivados de tumor.....	29
2.2.4	Células granulocíticas CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ (MDSC) infiltran pulmones desde circulación sanguínea formando parte importante del microambiente metastásico.....	32
2.2.5	Tumor primario. 4T1 induce nicho linfovascular premetastásico en ganglio drenante.....	33
3	Justificación.....	34
4	Hipótesis.....	35
5	Objetivo general.....	35
5.1	Objetivos particulares.....	35
6	Metodología.....	36
6.1	Ratones de experimentación.....	36
6.2	Línea celular 4T1.....	36
6.3	GK-1.....	37
6.4	Inducción de modelo de cáncer de mama murino 4T1 en cepa BALB/c y determinación de volumen tumoral.....	37
6.5	Evaluación de metástasis en órganos distantes.....	39
6.5.1	Preservación tejidos y tinción histológica.....	39
6.5.2	Análisis histológico.....	40

6.6	Progresión de reacción leucemoide en sangre periférica.....	40
6.7	Análisis estadístico	41
7	Resultados.....	41
7.1	Tratamiento con GK-1 disminuye la tasa de crecimiento tumoral de forma significativa	41
7.2	GK-1 reduce el peso del total del tumor primario y la severidad de la esplenomegalia asociada a cáncer al día 28 de tratamiento.....	42
7.3	El tratamiento con GK-1 reduce el número de metástasis en pleura y parénquima pulmonar, así como su progresión.....	45
7.4	El tratamiento con GK-1 modifica la progresión de la reacción leucemoide característica del modelo de cáncer de mama 4T1, hasta el día 21 de tratamiento.....	55
7.5	Efectos de GK-1 sobre la progresión patológica del ganglio linfático drenante. ..	52
8	Discusión de resultados	68
9	Conclusiones.....	81
10	Bibliografía.....	81

Índice de figuras

Figura 1. Prevalencia de cáncer de mama en población femenina	11
Figura 2 Fases de la inmunomodulación del cáncer.....	15
Figura 3 Mecanismos asociados a la evasión inmune del cáncer.	17
Figura 4 Tumor primario media la movilización de MDSC a nichos premetastásicos (PMN).....	20
Figura 5 Efecto antitumoral del péptido sintético GK-1 en modelo murino de melanoma B16/F10.	24
Figura 7 Efecto del tratamiento con el péptido GK-1 en la supervivencia y metástasis pulmonar en modelo murino de cáncer de mama 4T1.....	25
Figura 8 Incremento significativo de poblaciones MDSC (CD11b+Gr-1+) en sangre periférica.....	30
Figura 9 La reacción leucemoide en el modelo 4T1 se relaciona con el aumento del volumen tumoral y una granulocitosis sin linfopenia en sangre periférica.	30
Figura 10 La esplenomegalia asociada a neoplasia en modelo 4T1. El incremento del peso de bazo se correlaciona al volumen tumoral y a la acumulación de granulocitos inmaduros (CD11b ⁺ Gr-1 ⁺).	32
Figura 11 Granulocitos inmaduros infiltran pulmones en ratones con tumor 4T1.....	33
Figura 12 Factores solubles secretados por tumor primario 4T1 induce la formación de un nicho premetastásico en ganglio drenante.....	34
Figura 13 Cronología experimental en días post-implantación de células 4T1.	38
Figura 14 Tasa de crecimiento tumoral, tratamiento GK-1 (100 µg) vías intravenosas (IV) y subcutánea (SC).	42
Figura 15 Peso tumor primario al día de sacrificio.	43
Figura 16 Reducción de esplenomegalia con tratamiento GK-1.....	44
Figura 17 Recuento de focos metastásicos en pulmones (focos metastásicos totales, intraparenquimatosos y pleurales).	46
Figura 18 Metástasis en parénquima pulmonar al día 21 post tratamiento.	48
Figura 19 Metástasis en parénquima pulmonar al día 28 post tratamiento.	48
Figura 20 Células tumorales invadiendo parénquima pulmonar desde tejido vascular.	49
Figura 21 Progresión de focos metastásicos intraparenquimatosos desde vasos sanguíneos (día 28 post-tratamiento).....	50
Figura 22 Metástasis en pleura pulmonar al día 21 post tratamiento. Pulmón, ratón.	51
Figura 23 Metástasis en pleura pulmonar al día 28 post tratamiento. Pulmón, ratón.	51
Figura 24 Apariencia del infiltrado linfocítico, micro y macro metástasis en pleura pulmonar.	52
Figura 25 Progresión patológica en ganglio drenante día 21 de tratamiento.	53
Figura 26 Progresión patológica en ganglio drenante día 28 de tratamiento	54
Figura 27 Peso de ganglio drenante al día de sacrificio (día 28).....	55
Figura 28 Morfología de leucocitos en extendidos de sangre periférica, estudio piloto.....	56
Figura 29 Progresión reacción leucemoide en sangre periférica a semana 1 de tratamiento. Frotis y conteo total de leucocitos	58

Figura 30 Progresión reacción leucemoide en sangre periférica a semana 3 de tratamiento. Frotis y conteo total de leucocitos.	59
Figura 31 Progresión reacción leucemoide en sangre periférica a semana 4 de tratamiento. Frotis y conteo total de leucocitos.	60
Figura 32 Sumario conteo total de leucocitos en sangre periférica.	62
Figura 33 Número total de leucocitos en sangre periférica y su tasa de variación en el tiempo.	63
Figura 34 Porcentaje de neutrófilos y linfocitos en sangre periférica de los grupos de estudio.	63
Figura 35 Números absolutos de neutrófilos y linfocitos en sangre periférica.	65
Figura 36 Números absolutos de linfocitos y neutrófilos en sangre periférica y sus tasas de variación.	67
Figura 37 Características de la enfermedad neoplásica generada por el modelo 4T1 relevantes para proponer mecanismos de acción terapéutica.	75
Figura 38 Rutas de biodistribución de biofármacos administrados vía subcutánea.	79

1 Introducción

1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es uno de los grandes retos de salud pública a nivel mundial, no solo es la patología tumoral de mayor incidencia y prevalencia en mujeres, sino también la forma de cáncer con mayor mortalidad en la población femenina [1].



Figura 1. Prevalencia de cáncer de mama en población femenina. (Izquierda) Incidencia, (centro) mortalidad, (derecha) prevalencia de cáncer en la población femenina mundial de acuerdo a los últimos datos publicados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.

De acuerdo con los últimos datos publicados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de mama posee una incidencia del 25.1% y una mortalidad del 14.7% del total de las patologías tumorales que sufren las mujeres a nivel mundial. La prevalencia mundial de cáncer de mama en mujeres a 5 años es de 36.3%, esto quiere decir, que por cada cuatro mujeres con alguna enfermedad neoplásica una de ellas tendrá cáncer de mama, figura 1 [1].

En México, según datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la tasa de mortalidad por CM va en aumento, el número de muertes por CM se incrementó un 23.7% en cinco años, pues de 2010 a 2015 la cifra pasó de 5094 a

6304. La tasa de muerte por CM continúa aumentando y según estimaciones de la OMS para 2022 morirían 7761 personas debido a esta patología en México [2].

Los hombres también tienen riesgo de desarrollar cáncer de mama, se estima que uno de cada mil casos de cáncer de mama ocurre en hombres. Las complicaciones más graves son debidas al desarrollo de metástasis en nódulos linfáticos regionales y en órganos distantes como pulmón, cerebro, hueso e hígado [3].

1.2 Tipos de cáncer de mama

Existen dos principales tipos de cáncer de mama *in situ*, el carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y el carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS). Estos derivan del tejido mamario, compuesto por los alveolos productores de leche (lóbulos) y los ductos lactíferos que conectan los lóbulos al pezón. El tejido restante del seno está compuesto por tejido adiposo, conectivo y linfático. El CDIS es el más común con 83% de incidencia, en este caso las células tumorales remplazan las células epiteliales que conforman el ducto lactífero y se expanden a otros ductos y lóbulos. El CLIS corresponde al 13% y se refiere a células anormales expandiéndose desde alguno de los lobulillos del seno. El 4% restante corresponde a otros tipos de cáncer de mama procedentes de otros tejidos o que tienen un origen desconocido [4].

Se estima que más del 80% de los casos de cáncer mama son o serán invasivos, con lo que las células tumorales habrán atravesado las paredes de los lóbulos o ductos del que se originaron, e invadirán el tejido circundante. Existen actualmente cuatro subtipos moleculares que han sido identificados con base en los marcadores biológicos que distinguen el tipo de células tumorales, su respuesta al tratamiento disponible, su

proliferación, pronóstico y factor de riesgo. Los cuatro principales subtipos moleculares se clasifican de acuerdo a la presencia o ausencia del receptor hormonal a estrógeno (ER) y/o progesterona (PR) así como a los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [5].

- **Luminal A (ER+ y/o PR+/HER2-)** Marcadores asociados a lento crecimiento y menor agresividad en comparación con otros subtipos. Tumores asociados a pronóstico favorable a corto plazo dada a la buena respuesta al tratamiento anti-hormonal, (71% de incidencia).
- **Luminal B (ER+ y/o PR+/HER2+)** Poseen sobreexpresión de HER2 así mismo son positivos a Ki67 indicador de células en división activa. Tienden a ser más riesgosos y con peor pronóstico en comparación con cáncer luminal A, (12% incidencia).
- **HER2 enriquecido (ER-/PR-/HER2+)** Este subtipo tiende a crecer y generar una invasión más agresiva en comparación con los otros. Se asocia a un pronóstico negativo en comparación con los subtipos luminales, (5% incidencia).
- **Triple negativo (ER-/PR-/HER2-)** Es la forma de cáncer de mama con peor pronóstico en el corto plazo, en parte por la carencia de terapias específicas contra este tipo de tumor, ya que no existe una terapia dirigida y se aborda con tratamientos convencionales, (12% incidencia) [6].

1.3 Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es un tejido diverso que se compone de la interacción de las células tumorales con su entorno celular; células endoteliales, leucocitos infiltrantes y fibroblastos [7]. Estas células están en contacto íntimo, comunicándose mediante factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. La compleja interacción del tumor y su microambiente puede desencadenar respuestas pro o anti-tumorales, que desencadenarán la supresión exitosa del tumor o procesos de inmunoección del cáncer. Cada individuo constituye una variable en la que su microambiente particular definirá el tipo de respuesta [8].

La inmunoección del cáncer es un proceso dinámico que comprende de tres fases secuenciales donde el sistema inmune intenta eliminar un tumor. Durante la fase de eliminación, el sistema inmune innato y adaptativo responden detectando la presencia del tumor en formación y destruyendo las células neoplásicas antes de ser clínicamente detectable. Si una variante celular tumoral inmunoevasiva escapa de la fase de eliminación, se puede proceder la fase de equilibrio, donde el crecimiento tumoral es prevenido por mecanismos inmunológicos. En este estado de dormancia, la constante presión de selección inmune sobre las células tumorales genéticamente inestables puede dar pauta a fenómenos de edición celular, donde las células tumorales acumulan mutaciones hasta que adquieren la capacidad de evadir el reconocimiento inmunológico. En esta fase denominada de escape las células tumorales pueden proliferar, generar un tumor clínicamente aparente e inducir un estado inmunosupresivo en el microambiente tumoral, figura 2 [8].

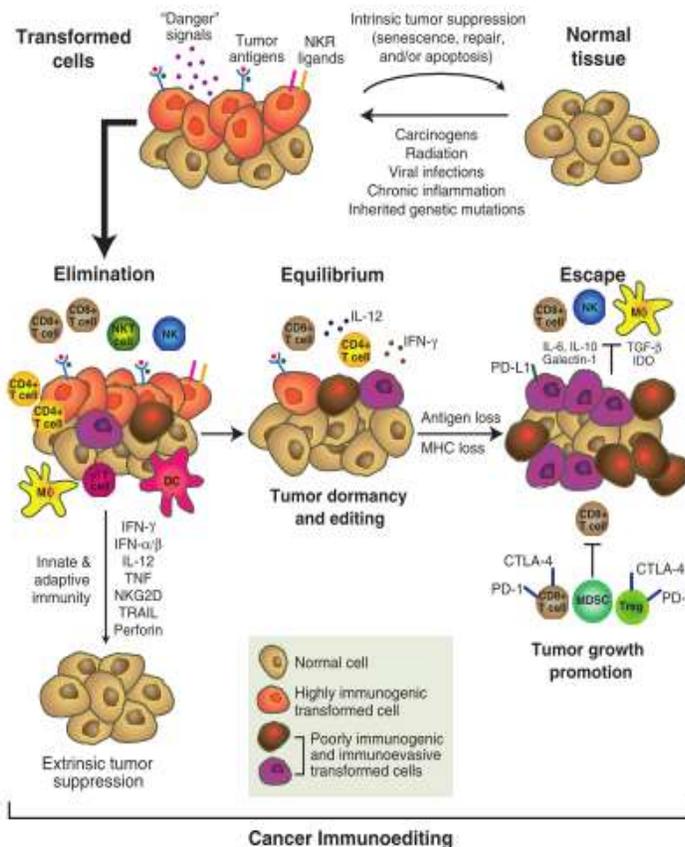


Figura 2 Fases de la inmunoedición del cáncer. Tomado de Schreiber et al.2011. La inmunoedición del cáncer consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. En la **eliminación**, la inmunidad innata y adaptativa destruyen los tumores en desarrollo. Si esta fase se completa, el huésped permanece libre de cáncer. Si alguna variante de células cancerosas poco frecuentes no se destruye, puede entrar en fase de **equilibrio**, en la que el sistema inmune controla su proliferación, esto puede restringir el crecimiento de tumores durante toda la vida del huésped. La **inmunoeedición** de la inmunogenicidad del tumor se produce en esta fase. Como consecuencia de la presión de selección inmune constantemente ejercida sobre las células tumorales, pueden surgir variantes de células tumorales que ya no son reconocidas por la inmunidad adaptativa (pérdida de antígenos o células tumorales que desarrollan defectos en el procesamiento y presentación de antígenos), se vuelven insensibles a los mecanismos efectores inmunes o inducen un estado inmunosupresor. Estas células tumorales pueden entrar en la fase de **escape**, en la que su crecimiento ya no está restringido por el sistema inmune. Estas células tumorales progresan en una enfermedad neoplásica.

1.4 Mecanismos asociados a evasión inmune en cáncer

Existen diversos mecanismos asociados a la evasión inmune de células tumorales de cáncer de mama (CTCM), donde estas células evitan el reconocimiento inmunológico mediante una expresión anormal del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-1) así mismo presentan deficiencias en la maquinaria de procesamiento de antígenos. Además, la estimulación por CTCM de vías de señalización negativas (CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1, Fas/FasL); inhiben la activación de células T efectoras y contribuyen a crear un microambiente inmunosupresor [9].

La expresión PD-L1 [ligando del receptor de muerte programada 1 (PD-1)], tiene un papel importante en la inducción y mantenimiento de células T reguladoras al inducir

Fas-L(ligando) e IL-10. El factor asociado a suicido (Fas) es un receptor que puede activar señalización proapoptótica, así, el incremento de Fas-L en células de CM inducen muerte de linfocitos T. Por otro lado, el corte de Fas-L por metaloproteínas contribuye a la evasión inmune del tumor, al interferir con el reconocimiento inmunológico [9], [10].

Las CTCM, células dendríticas (CD) y macrófagos-M2 (MF), en estados crónico-inflamatorios reclutan y promueven poblaciones de células T reguladoras (T-regs), al secretar CCL17, CCL22 y citocinas tipo TH-2. Las T-regs contribuyen a reducir la actividad de células citotóxicas y estimulan la producción de células mieloides supresoras (MDSCs). Las MDSCs son un conjunto diverso de células inmaduras derivadas de medula ósea con la capacidad de suprimir la respuesta inmune al inactivar a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se diferencian a DCs, MF y granulocitos que presentan características disfuncionales, ya que por ejemplo en tumores de CM la acumulación de DCs inmaduras y la expansión de DCs tolerogénicas son factores importantes en la evasión tumoral [9].

Finalmente, la producción de ciertos factores solubles contribuye a promover un microambiente pro-tumoral en CM, así, interleucinas como la IL-33 promueven la producción de MDSCs, mientras que IL-18 se asocia a promoción de metástasis distante. Por otro lado, la IL-10 inhibe la producción de citocinas inflamatorias. TGF- β , otra citocina presente en el microambiente tumoral posee un rol dual en la carcinogénesis al inhibir crecimiento de CTCM en estadios tempranos de enfermedad, sin embargo, en formas avanzadas de CM promueve proliferación, angiogénesis e inmunosupresión. Otras moléculas relevantes en el microambiente tumoral son la galectina-1 que bloquea la citotoxicidad mediada por linfocitos CD8⁺ y la indolamina

2,3 dioxigenasa (IDO por sus siglas en inglés), cuya sobreexpresión induce inmunosupresión[10]. La relevancia de conocer los mecanismos de evasión de CTCM y las interacciones en su microambiente tumoral; radica en la posibilidad de comprender el proceso del desarrollo del tumor, las variables que modulan su progresión y la potencial aplicación de agentes inmunoterapéuticos como herramientas moduladoras del microambiente tumoral [11].

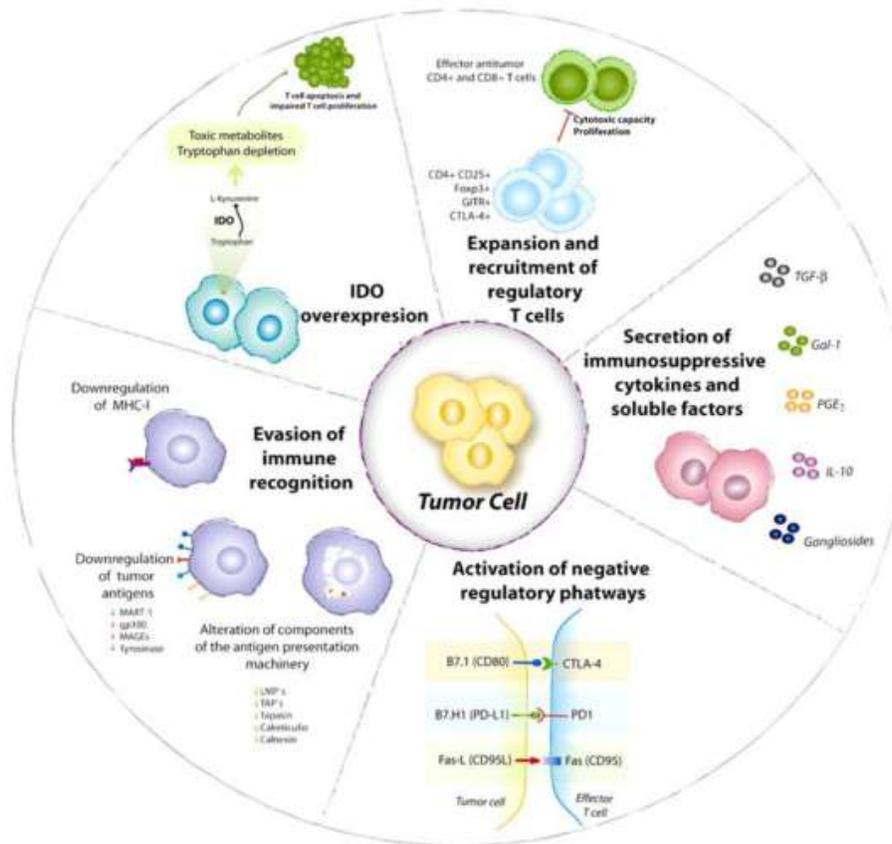


Figura 3 Mecanismos asociados a la evasión inmune del cáncer. Tomado de Croci et al. 2007.

Las células tumorales emplean distintos mecanismos inmunosupresores, que pueden actuar en sinergia para contrarrestar la respuesta inmune del huésped. Estos incluyen deterioro de la maquinaria de presentación de antígenos, activación de señales coestimuladoras negativas en el microambiente tumoral (CTLA-4 / B7, PD-1 / PD-L1, Fas / FasL), secreción de factores inmunosupresores (IL-10, TGF- β , galectina-1, gangliósidos, prostaglandina-E2 PGE₂), sobreexpresión de indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y expansión y reclutamiento de diferentes poblaciones de células reguladoras que contribuyen a esta red inmunosupresora que incluye células T reguladoras (Tregs) y células T reguladoras inducibles que impactan negativamente en el destino de las células T efectoras antitumorales.

1.5 Reacción leucemoide y MDSC asociadas a enfermedad neoplásica

1.5.1 Reacción leucemoide

El desarrollo de leucocitosis para-neoplásica, también llamada reacción leucemoide, es una rara pero importante perturbación en la hematopoyesis, producida por factores solubles secretados por tumores sólidos. La presencia de leucocitosis durante el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, se asocia con peor desenlace en la supervivencia [12]. Por otro lado, la mieloproliferación asociada a cáncer se caracteriza por el incremento patológico en circulación sanguínea de células de estirpe mieloide en diferentes estados de maduración, su infiltración en tumor y tejidos diversos. Por décadas estas observaciones clínicas relacionaron la mieloproliferación con la progresión tumoral, pero se desconocía su relevancia terapéutica hasta la reciente identificación de las células mieloides supresoras[12].

El crecimiento de tejido tumoral mamario promueve perturbaciones epigenéticas y alteraciones en la expresión de genes reguladores de hematopoyesis (*locus Hoxa9*) vía producción tumoral de G-CFS. Como consecuencia se produce una eritropoyesis alterada con producción de células mieloides inmaduras, leucocitosis, hematopoyesis extramedular en bazo y reacción leucemoide [13]. Por tanto la mieloproliferación asociada a cáncer constituye una diana terapéutica que cobra cada vez más relevancia, tras años de considerarse como un mero efecto paraneoplásico [12].

Se ha reportado que la reducción de la reacción leucemoide, rica en MDSC, en combinación con terapias checkpoint (anti-Pd-1) reduce el 80% de tumores en modelos murinos de cáncer de mama empleando la línea tumoral 4T1 [14].

1.5.2 células mieloides supresoras (MDSC)

Las denominadas células mieloides supresoras (MDSC por sus siglas en inglés) son una población heterogénea de células mieloides inmaduras, las cuales poseen un fuerte efecto inmunosupresor, tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmune antitumoral del individuo, así como promover metástasis. Estas células en personas sanas componen menos del 1% de células nucleadas en sangre periférica, pero pueden incrementarse hasta comprender el 50% de células circulantes en algunos pacientes con enfermedad metastásica. Estas células tienden a acumularse en medula ósea, tumores, órganos metastásicos, órganos linfoides secundarios y sangre periférica. Los mecanismos inmunosupresores de las MDSC descritos, modulan el microambiente tumoral y el nicho pre-metastásico, promoviendo la evasión inmune del cáncer, el asentamiento y crecimiento de células cancerosas migrantes[12].

Las MDSC se pueden identificar de forma general por la expresión de los marcadores $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ y de forma más específica como $CD11b^{+}Gr-1^{+}CD11c^{-}F4/80^{+/-}CD124^{+}$. Gracias a estudios en modelos murinos se ha demostrado que pueden subclasificarse en MDSC granulocíticas (G-MDSC) $CD11b^{+}Gr-1^{hi}Ly6C^{low}Ly6G^{+}CD49d^{-}$ y monocíticas (M-MDSC) $CD11b^{+}Gr-1^{mid}Ly6C^{hi}Ly6G^{-}CD49d^{+}$, con propiedades y características particulares [15]. De estos marcadores, el Ly6C (Lymphocyte antigen 6 complex locus C1) es un antígeno de diferenciación monocítico mientras que Ly6G (Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D) es un antígeno que se asocia con un temprano nivel de maduración en granulocitos. El marcador Gr-1 reconoce, indistintamente, los antígenos Ly6C y Ly6G [16].

1.5.3 El tumor primario promueve movilización de MDSC a órganos distantes formando nichos pre-metastásicos.

El tumor primario y las células estromales secretan factores solubles que son distribuidos sistémicamente. Citocinas y factores de crecimiento como G-CSF, GM-CSF, IL-6, IFN- γ y VEGF derivadas de tumor promueven la producción de MDSC en sitios de hematopoyesis y movilizan MDSC al torrente sanguíneo, donde circulan en sangre periférica hasta ser reclutadas en diferentes tejidos [15]. Se ha identificado que quimiocinas secretadas por el tumor, como CXCL1, CCL12, CCL2, CCL15, metaloproteinasas, TNF- α y calgranulina median la quimiotaxis de MDSC a nichos premetastásicos (PMN) y al propio tumor. Se ha reportado que en cáncer de mama, pulmones e hígado sobre expresan S100A8 (calgranulina A) facilitando reclutamiento de MDSC y su adhesión a estos órganos antes de la llegada de las células tumorales, figura 4 [15].

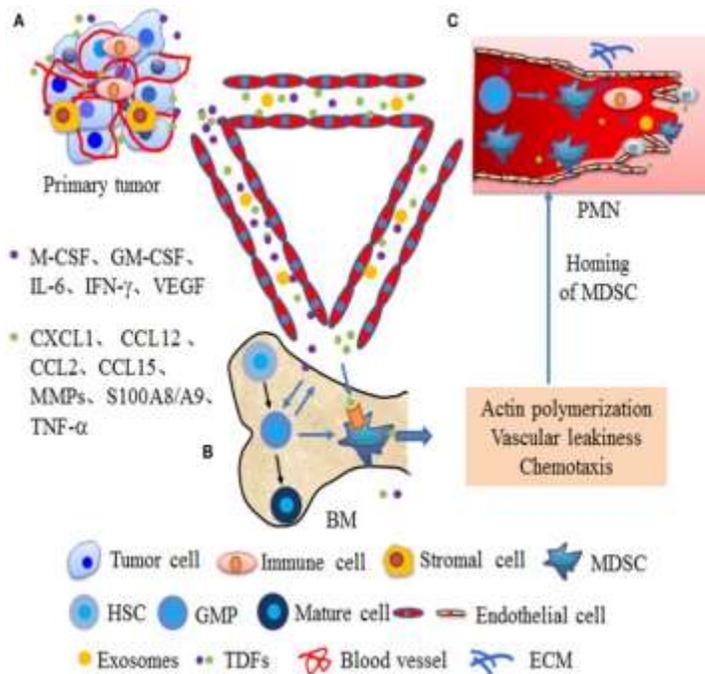


Figura 4 Tumor primario media la movilización de MDSC a nichos premetastásicos (PMN), Tomada de Wang et al. 2019. **A)** Células tumorales y estromales secretan numerosos factores solubles (G-CSF, GM-CSF, IL-6, IFN- γ y VEGF) que se distribuyen sistémicamente vía circulación sanguínea. **B)** En sitios de hematopoyesis, citocinas y factores de crecimiento procedentes del tumor promueven la diferenciación de precursores de granulocitos/monocitos a MDSC. Además las MSDC son movilizadas por estas citocinas a torrente sanguíneo al promover la filtración vascular **C)** Citocinas de tumores primarios, como CXCL1, CCL12, CCL2, CCL15, metaloproteinasas (MMP), S100A8 / A9 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) median la movilización de MDSC a tejidos secundarios por quimiotaxis y crean las condiciones propicias para la formación de nichos premetastásicos (PMN).

En modelos murinos de adenocarcinoma mamario se ha reportado la presencia de MDSC en pulmón premetastásico, estas células corresponden al fenotipo.

CD11b⁺Ly6C^{lo/med}Ly6G⁺, que se clasifican como MDSC granulocíticas, caracterizadas por su alta producción de Arg-1, metaloproteinasas y especies reactivas de oxígeno. Esto promueve la formación de un nicho premetastásico inmunosupresor, inflamatorio y con tejido vascular aberrante. Que evoluciona formando un ambiente idóneo para el establecimiento de metástasis distante [17][18].

1.5.4 Mecanismos inmunosupresores de MDSC

Entre los mecanismos inmunosupresores descritos de las MDSC figuran la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y de enzimas como arginasa 1 e indolamida, que depletan L-arginina y triptófano, respectivamente, del medio suprimiendo proliferación de linfocitos T. Las MDSC son una fuente importante de producción de óxido nítrico y ROS, formando compuestos como el peroxinitrito que causa nitración del receptor de células T (TCR por sus siglas del inglés) y disociación de la cadena CD3ζ, de linfocitos CD8. Eso representa en los linfocitos una pérdida de capacidad de unión a MHC-1 y pérdida de reconocimiento antigénico. Además, favorecen el desarrollo de linfocitos T reguladores mediante de liberación al medio de factores solubles supresores como IL-10 y TGF-β [15][18].

1.6 Inmunoterapia como novedosa herramienta contra cáncer

La inmunoterapia con agentes biológicos se ha posicionado como una importante opción de tratamiento, pues estimula al sistema inmune del propio paciente para destruir células tumorales. Los objetivos de la inmunoterapia son: Permitir el reconocimiento del tumor como agente extraño por el sistema inmune, revertir la inmunosupresión oncológica y estimular positivamente la respuesta inmune contra la neoplasia [19].

Actualmente los principales tratamientos contra el cáncer de mama se centran en una combinación de radioterapia, intervención quirúrgica y quimioterapia sistémica. Siendo la terapia anti-hormonal útil solamente en los subtipos positivos a receptores hormonales; en el caso de la inmunoterapia dirigida, esta se enfoca principalmente a subtipos de cáncer HER2+, siendo los anticuerpos anti-HER2 los principales tratamientos disponibles. La cirugía continúa siendo por sí sola la forma más efectiva de tratar un tumor primario, si su resección es posible. Sin embargo, esta aproximación terapéutica por sí sola no es suficiente para evitar la aparición de metástasis en estadios avanzados de cáncer, donde la enfermedad puede reaparecer en el corto plazo. Es por ello que la incorporación de quimioterapia o inmunoterapia, en un esquema neoadyuvante (antes de la intervención quirúrgica) o adyuvante (postcirugía), constituye un tratamiento enfocado a reducir el riesgo de desarrollar metástasis e incrementar la sobrevida de los pacientes [20].

Tras más de cuatro décadas de importante desarrollo de quimioterapéuticos citotóxicos y pese a su relevante papel en el tratamiento oncológico, en los últimos años han aportado pocos cambios en el manejo de la enfermedad metastásica [11][21]. Siendo la integración de novedosas inmunoterapias al tratamiento de cáncer, el avance terapéutico más relevante en las últimas décadas, al demostrar su gran potencial clínico mejorando el desenlace del paciente oncológico, la inmunoterapia será una herramienta importante en el esquema de tratamiento del cáncer en el futuro próximo. Es imperante por tanto el investigar nuevas modalidades de tratamiento que incluyan combinación de terapias convencionales con nuevas inmunoterapias [11].

2 Antecedentes

2.1 Propiedades del péptido GK1

El péptido sintético GK-1 (18 aminoácidos), fue identificado inicialmente como una región con un alto índice de antigenicidad de una proteína procedente de *Taenia crassiceps*[22]. Este péptido ha mostrado interesantes propiedades inmunopotenciadoras. Anteriormente se demostró su papel como agente adyuvante en la activación de células presentadoras de antígeno (CD y MF), al promover la expresión de las moléculas coestimuladoras CD-80 y CD-86, lo cual promueve la presentación de antígenos [23], así como un incremento de moléculas MHC clase II. Además, un estudio que evaluó su capacidad adyuvante de la vacuna de influenza comercial, tras su administración subcutánea, mostrando un incremento en los títulos de anticuerpos IgG específicos contra la vacuna de influenza en ratones BALB/c envejecidos, promoviendo una respuesta inmune positiva frente al fenómeno de senescencia inmunológica a diferencia de los que recibieron solo la vacuna comercial [24].

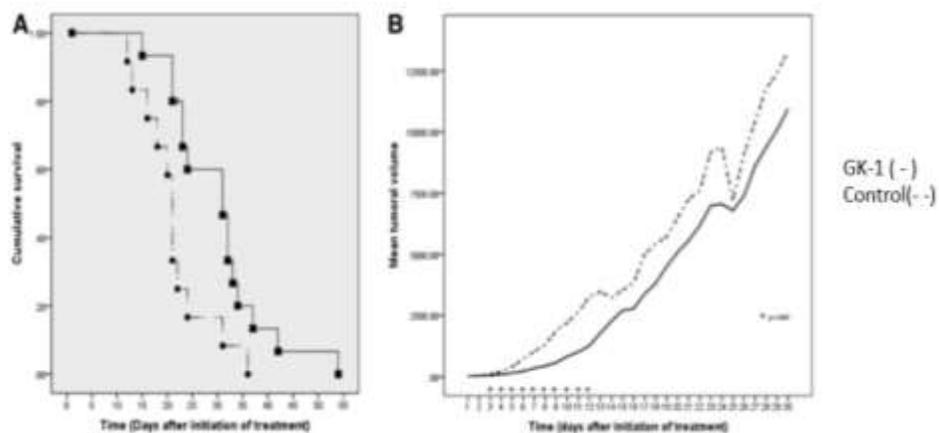


Figura 5 Efecto antitumoral del péptido sintético GK-1 en modelo murino de melanoma B16/F10. Tomado de Pérez-Torres et al. 2013. A) Incremento en la supervivencia en modelo murino de melanoma B16-F10 tratado con 10 μ g GK-1 respecto al grupo control. Los tiempos medios de supervivencia fueron 21.25 días para el grupo de control (●) y 30.3 días para el grupo tratado con GK1 (■) B) Reducción en la tasa de crecimiento tumoral en el grupo tratado comparado con control.

Durante este estudio se realizó un hallazgo que evidenció la potencial aplicación antitumoral de GK-1, al encontrar que en los ratones que recibieron el péptido GK-1 como adyuvante de la vacuna de influenza se presentaron con una menor frecuencia y severidad adenomas bronquiales, (tumores que aparecen de forma común y espontánea en ratones BALB/c envejecidos) comparado con los ratones que no recibieron el péptido GK-1 [22].

En un estudio preclínico realizado por el grupo de Pérez-Torres et, al. (2013), enfocado en evaluar la capacidad del péptido GK-1 como potencial inmunoterapéutico oncológico, se reportó un incremento en la sobrevida de los animales en un modelo murino de melanoma tratado con el péptido GK-1.

El modelo fue inducido con la línea tumoral B16-F10, donde ratones C57BL/6 fueron implantados con 2×10^5 células de forma subcutánea. Aplicándose un tratamiento peritumoral (10 μ g/100 μ l) de GK-1 o 100 μ l de solución salina (S.S.I.) para el grupo control, de forma semanal por tres ocasiones. El tratamiento comenzó al registrarse un volumen tumoral de 20 mm³. Gpo. GK-1 n=16, Ctrl n=12 [25].

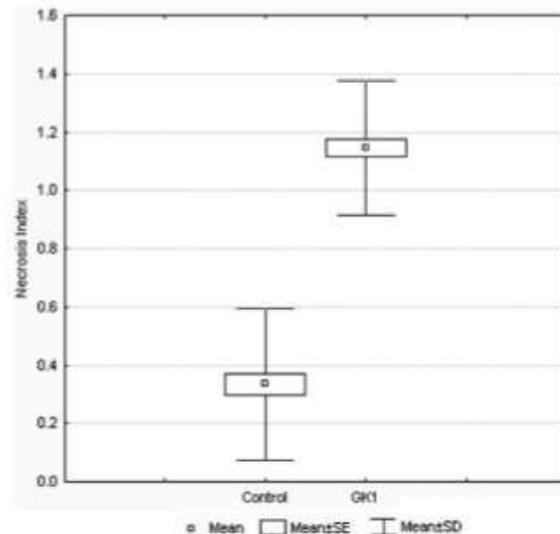


Figura 6 Incremento en el índice necrótico en el grupo tratado con GK-1 vs control. Tomado de Pérez-Torres et al. 2013. Los tumores de los ratones tratados con GK1 mostraron mayores áreas necróticas comparados con los ratones de control ($p < 0,05$).

Como se observa en la figura 5 A, la sobrevida se incrementó un 42.58% en el grupo tratado con GK-1 con respecto al grupo control, incrementando el tiempo de sobrevida

promedio en 9.05 días. Así mismo la tasa de crecimiento tumoral se redujo de forma estadísticamente significativamente durante los días 3 a 12 post-tratamiento con GK-1, en comparación con el control que solo recibió solución salina isotónica (SSI), (Figura 4B) [25].

Aunado a esto se analizaron imágenes de cortes histológicos de tumores teñidos con hematoxilina-eosina y fontana-mason; para determinar los porcentajes de áreas necróticas. Reportándose un incremento estadísticamente significativo en la necrosis tumoral en los ratones tratados con el péptido GK-1 (Figura 6). Este fue el primer estudio que demostró el potencial terapéutico del péptido GK-1 en un modelo tumoral y su posible uso como agente adyuvante en el tratamiento de cáncer [25].

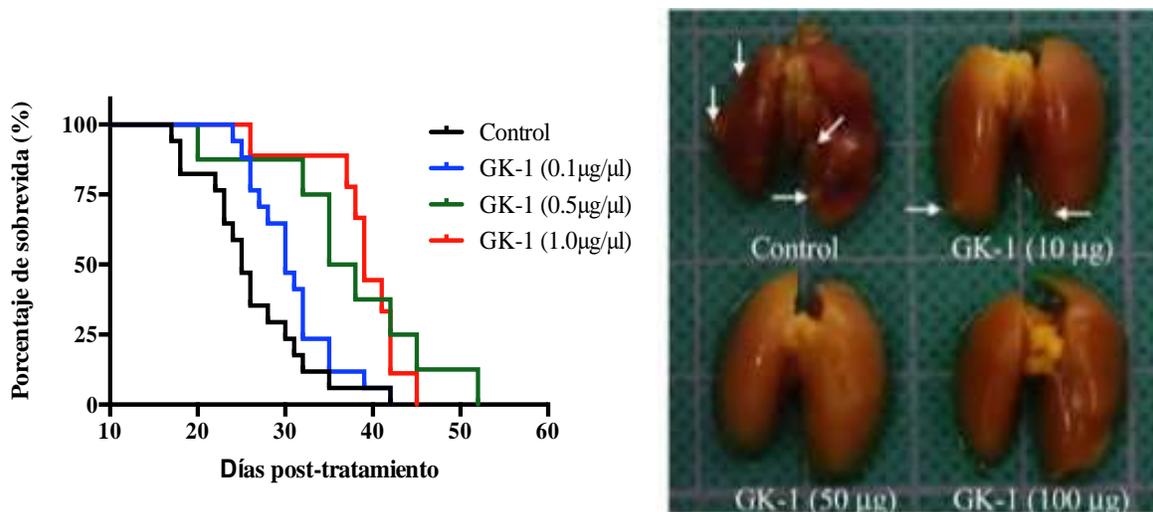


Figura 7 Efecto del tratamiento con el péptido GK-1 en la sobrevida y metástasis pulmonar en modelo murino de cáncer de mama 4T1. Tomado de Torres-García et al. 2017. (Izquierda) Curvas de sobrevida Kaplan-Meier en modelo murino 4T1 tratado con monoterapia con GK-1 a diferentes dosis. **(Derecha)** Reducción en la presencia de nódulos macrometástasicos en pulmón de ratones tratados con GK-1 a diferentes dosis de tratamiento.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se demostró que el tratamiento con GK-1 en un modelo 4T1 de cáncer de mama murino (BALB/c), sin resección de tumor, reduce el crecimiento tumoral, la carga metastásica e incrementa significativamente la supervivencia de los ratones [26]. En este trabajo, ratones BALB/c fueron implantados con 1×10^3 células 4T1 cerca de la 4ta. glándula mamaria, al desarrollarse tumores palpables se les administró un tratamiento semanal a diferentes dosis del péptido GK-1 (10, 50 y 100 μg totales) o 100 μl de SSI. Se observó que el tratamiento con GK-1 mejoró la progresión del CM de una forma dosis dependiente, observándose un incremento en supervivencia del 23.8% en la dosis de 50 μg comparado con el control con SSI, Figura 7 [26].

Adicionalmente se reportó una reducción en la tasa de crecimiento tumoral y una reducción estadísticamente significativa en el tamaño del volumen tumoral final. De forma interesante se observó una menor presencia de macrometástasis en pulmón (Figura 7), siendo la dosis de 100 μg la más efectiva, al solo observarse macrometástasis en el 28.57% de los casos comparado con el grupo control que presentó invasión metastásica en el 100% de los casos (Tabla 1) [26].

	Control	10 μg	GK-1 50 μg	100 μg	p value
Primary tumor volume (mm^3)	717.44 \pm 90.15	451.01 \pm 62.74	313.46 \pm 71.11	297.73 \pm 59.56	< 0.0001* < 0.01**
Primary tumor weight (g)	1.79 \pm 0.38	0.93 \pm 0.12	0.93 \pm 0.31	0.83 \pm 0.16	0.014
Pulmonary metastatic nodules	90.50 \pm 45.16	5.33 \pm 2.78	1.00 \pm 0.77	5.67 \pm 5.67	0.006
Mice with /without lung macrometastasis	7/0	4/3	4/3	2/5	0.02#

Tabla 1 Efectos de la inmunoterapia con GK-1 en volumen tumoral, peso de tumor y nódulos metastásico en pulmón. Tomado de Torres-García et al. 2017. El tratamiento con el péptido GK-1 mostró una reducción significativa en el volumen del tumor primario, una reducción en el peso tumoral y una disminución significativa en el número de macrometástasis en pulmón (Modelo tumoral 4T1).

La reducción de la presencia de metástasis pulmonar se correlacionó con disminución de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas como como b-FGF, CCL-3 (MIP-1a), GM-CSF, CCL-2 (MCP-1), TNF- α , y CXCL-9. Se observó, además, un incremento estadísticamente significativo en la necrosis tumoral en las capas superficiales del tumor primario, relacionándose con un aumento significativo de IL-12 en el tumor primario. Así mismo se incrementó la concentración de IL-6 en pulmones. Si bien el mecanismo de acción del péptido GK-1 aún no se conoce, basado en los datos publicados se propone que GK-1 podría afectar la progresión tumoral al modificar el microambiente tumoral [26].

De acuerdo con los estudios anteriormente mencionados, se evidencia la efectividad que posee el péptido GK-1 contra el CM invasivo en un modelo murino inducido por 4T1, dado que es capaz de modular positivamente la respuesta inmune y posiblemente modificar el microambiente tumoral. Ante la relevancia de estos descubrimientos, es imperante continuar explorando estrategias que arrojen mayor información preclínica; necesaria para diseñar futuros ensayos que evalúen el potencial de GK-1 como agente terapéutico en la inmunoterapia contra patologías tumorales.

2.2 Modelo 4T1

2.2.1 Características del modelo

El estudio de cáncer con metástasis espontánea, en ocasiones se ve obstruido por la escasez de modelos con este comportamiento y la capacidad de poseer paralelismo con la enfermedad humana. La línea celular 4T1 permite la inducción de un modelo de adenocarcinoma mamario triple negativo (ER-/PR-/HER2-). Esta línea es de haplotipo H-2^d, por lo que su implantación en ratones BALB/c induce un cáncer de mama altamente tumorigénico, que genera metástasis espontánea a órganos distantes como

pulmones, cerebro, hueso e hígado (similar a como ocurre en la patología humana). Esta línea fue aislada de un tumor mamario espontaneo en ratón BALB/BfCH3, además posee varias características que lo hacen ser un modelo adecuado para el estudio de CM cómo: ser fácilmente trasplantable al sitio anatómico correcto, fácil manipulación *in vitro* e *in vivo*, posee resistencia al quimioterapéutico 6-tioguanina por acción de la enzima tiopurinmetiltransferasa, lo que permite la detección de células en estado metastásico en órganos distantes. Además, el tumor primario generado puede ser removido quirúrgicamente de modo comparable a la situación clínica en humanos[27].

2.2.2 4T1 como modelo metastásico

El modelo 4T1 es preferido por su patrón de metástasis análogo con el CM en humanos, se sabe que en los ratones BALB/c a los que se les ha administrado 7×10^3 células 4T1, la metástasis se extiende de manera similar a como sucede en el CM en estadio IV, donde existe una prevalencia de 24-77% de expandirse hacia el pulmón y 22-62% de invadir el hígado. Una manifestación clínica característica de este modelo es la presencia de esplenomegalia, la cual se relaciona negativamente con la sobrevida. Mediante el modelo 4T1 un ratón BALB/c puede desarrollar tumores palpables en las glándulas mamarias de 2-3 semanas, con el consecuente desarrollo de metástasis ya sea en etapa temprana o avanzada que va progresando con el transcurso del tiempo, por ello es posible probar diversas inmunoterapias en cualquiera de estas etapas [27].

2.2.3 En el modelo de CM inducido por la línea 4T1 se produce reacción leucemoide en asociación con esplenomegalia y factores de crecimiento derivados de tumor.

El modelo 4T1 se caracteriza por la inducción de una severa reacción leucemoide con leucocitosis compuesta principalmente por granulocitos inmaduros y esplenomegalia [28]. Esta desregulación en la hematopoyesis es causada por la producción tumoral del factor estimulante de colonias de granulocitos [29]. Trabajos previos han descrito que los ratones implantados con la línea 4T1 presentan altos niveles de G-CSF en circulación sanguínea (tabla 2) acompañado de una leucocitosis, que progresa junto con el crecimiento tumoral, figura 9 A [28].

	pg/mL (fold increase over control)	
	G-CSF	GM-CSF
Normal	150±164	<1.8
Day 8	188±124 (1.25)	<1.8
Day 15	425±186 (2.83)	<1.8
Day 29	591±418 (3.94)	<1.8

All results are the mean±SD ($n=4$ mice per group).

Tabla 2 Inmunoensayo para factores estimulantes de colonias en suero sanguíneo de ratones implantados con tumores 4T1. Tomado de duPre et al. 2006.

El suero de ratones con tumor 4T1 presenta un incremento gradual de G-CSF el cual se correlaciona con el incremento del volumen tumoral. Células 4T1 y el tumor primario sobreproducen y secretan este factor soluble. GM-CSF no se vio alterado.

Esta población anormal de granulocitos en diferentes estadíos de maduración presenta un fenotipo CD11b⁺Gr-1⁺, correspondiente a MDSC, que incrementa su proporción en circulación sanguínea hasta comprender cerca del 80% de leucocitos totales (células CD-45⁺) a los 29 días post-implantación, figura 8 A, B. Cabe destacar que esta reacción leucemoide no se acompaña de linfopenia, el número de linfocitos no decrece en sangre periférica a lo largo del modelo 4T1, a pesar de que su porcentaje sí. figura 9 B [28].

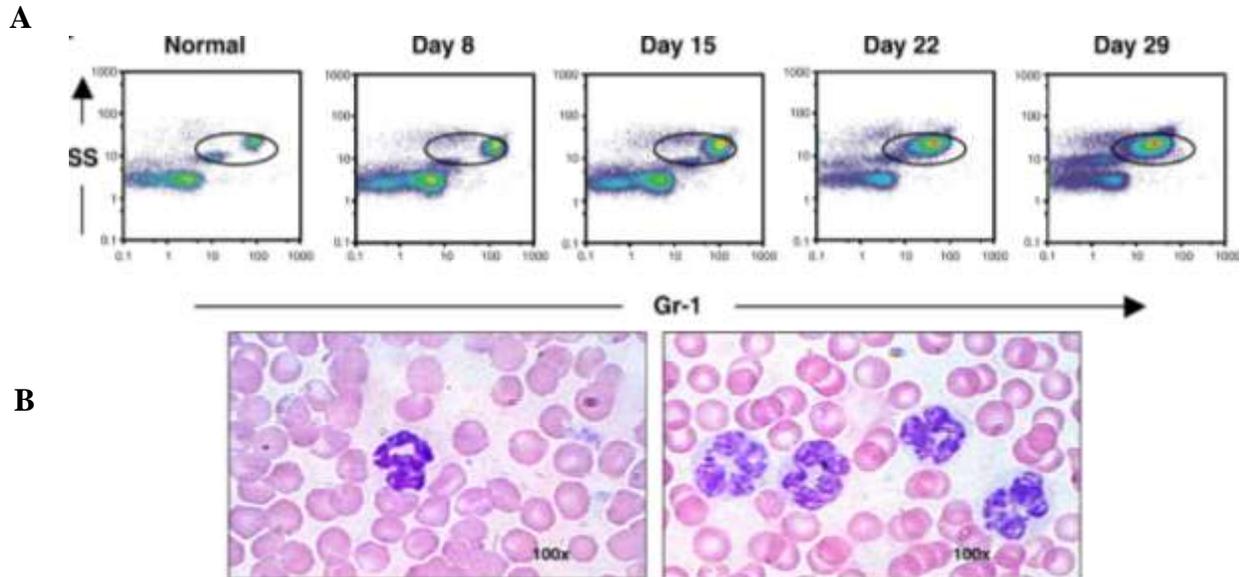


Figura 8 Incremento significativo de poblaciones MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) en sangre periférica. Modificado de duPre et al. 2006.

A) Citometría de flujo de sangre periferia de ratones con tumores 4T1 muestran un incremento progresivo de células (CD-45⁺ CD11b⁺ Gr-1⁺) correspondientes a MDSC. **B)** Extendidos de sangre periférica (izquierda) ratón WT sin tumor, (Derecha) ratón implantado con células 4T1. Incremento de células con morfología de granulocitos (neutrófilos), cabe destacar que es imposible diferenciar neutrófilos maduros de los neutrófilos inmaduros CD11b⁺Gr-1⁺ (MDSC) a simple vista al microscopio, vista 100x.

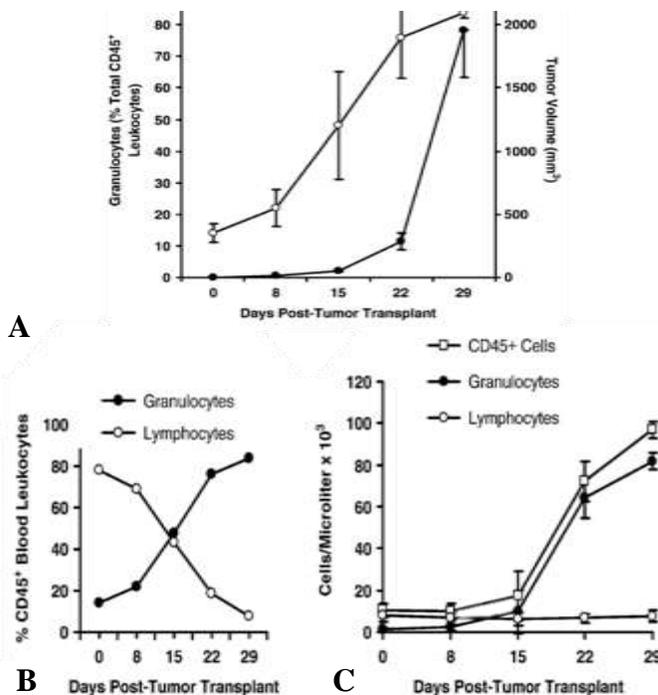


Figura 9 La reacción leucemoide en el modelo 4T1 se relaciona con el aumento del volumen tumoral y una granulocitosis sin linfopenia en sangre periférica. Modificado de duPre et al. 2006.

A) Incremento de granulocitos en circulación sanguínea (reacción leucemoide) progresa conforme el volumen tumoral aumenta. **B)** Incremento de granulocitos inmaduros (CD11b⁺Gr-1⁺) y caída de linfocitos (CD3⁺/CD19⁺) como porcentaje de leucocitos totales (CD-45⁺) en sangre periférica, cinética porcentual a 29 días post-implantación. **C)** Números totales de leucocitos, granulocitos y linfocitos en sangre periférica, si bien el porcentaje de linfocitos baja sus números totales no decrecen durante el modelo tumoral. El incremento de leucocitos circulantes se incrementa hasta en 20 veces los niveles normales.

Los leucocitos totales pasan de comprender alrededor de $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ a niveles cercanos a $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ a 29 días post-implantación, figura 9 C [28].

La progresiva esplenomegalia que acompaña el modelo 4T1 se caracteriza por una acumulación de granulocitos $\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^+$ (MDSC), con una significativa expansión de pulpa roja y reducción de pulpa blanca, figuras 10 B, D. Aún se desconoce si la esplenomegalia es el resultado de la acumulación del exceso de granulocitos procedentes de circulación sanguínea (reacción leucemoide), producida por hematopoyesis extramedular como resultado de la desregulación en la mielopoyesis derivada del G-CSF tumoral o producto de ambos fenómenos [28].

Cabe señalar que en la especie *Mus musculus* el bazo es un sitio activo de hematopoyesis extramedular que persiste a lo largo de la vida del ratón y comprende hasta el 30% de la hematopoyesis. Este nivel de hematopoyesis extramedular es característico en roedores [30]. Mediante análisis histológicos, se ha reportado un severo incremento en la hematopoyesis extramedular en bazos de ratones portadores de tumores 4T1 a los días 27 post-implantación. Revelándose se aprecia un marcado incremento la presencia de megacarioblastos y células precursoras de linaje mieloide [31]. Este incremento de la hematopoyesis también se aprecia en gran medida en medula ósea donde se identifica una exacerbada mielopoyesis y una acumulación de células mieloides en varios estados de diferenciación[31].

El incremento en el peso de bazo se correlaciona directamente con un aumento en el porcentaje de granulocitos, células que se van incrementando progresivamente desde comprender menos de 15% en bazos de ratones WT, hasta cerca de 80% del total de linfocitos (células CD-45^+), en ratones con tumor 4T1 a 29 días post-implantación. Estudios con citometría de flujo demuestran que estas poblaciones de linfocitos CD-45^+ , corresponden a un incremento en células $\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^+$ (MDSC) [28].

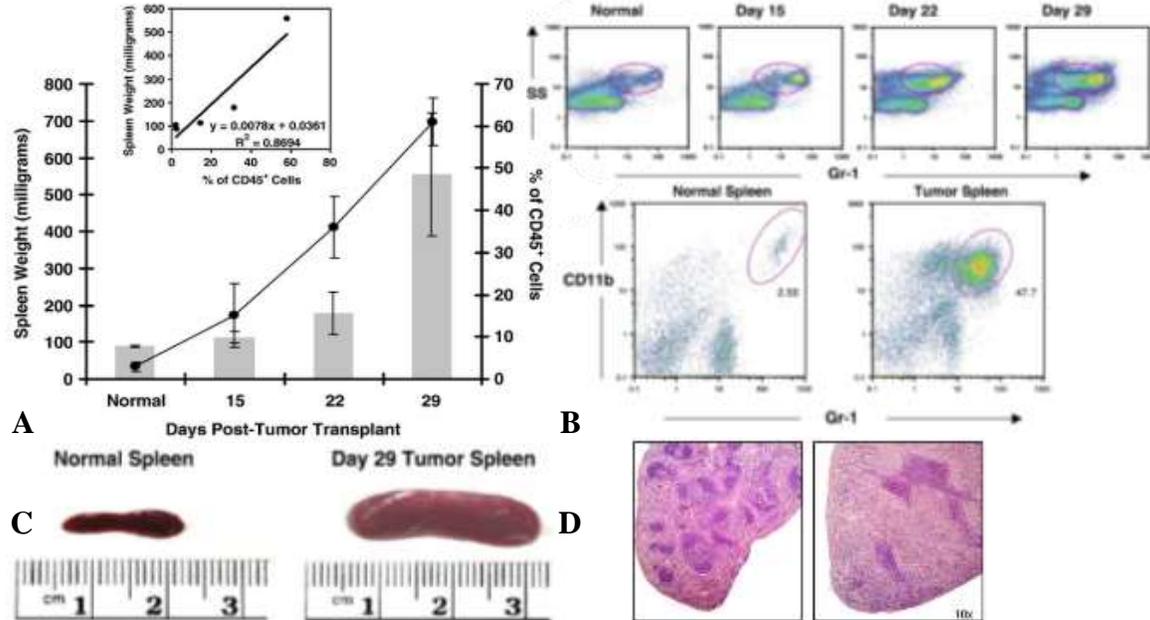


Figura 10 La esplenomegalia asociada a neoplasia en modelo 4T1. El incremento del peso de bazo se correlaciona al volumen tumoral y a la acumulación de granulocitos inmaduros (CD11b⁺Gr-1⁺). Modificado de duPre et al. 2006.

A) El incremento en el peso del bazo se correlaciona directamente al incremento porcentual de granulocitos del total de leucocitos (CD-45⁺) dentro del mismo. B) Células granulocíticas CD11b⁺Gr-1⁺ (MDSC) se incrementan gradualmente dentro del bazo conforme progresa el modelo tumoral 4T1. C) Comparativa de tamaño de bazo normal y bazo de un ratón con tumor 4T1 a 29 días post-implantación. D) Corte histológico de bazo normal (izquierda) bazo patológico a día 29 (derecha): se aprecia una reducción significativa de la pulpa blanca y un incremento de pulpa roja.

2.2.4 Células granulocíticas CD11b⁺Gr-1⁺ (MDSC) infiltran pulmones desde circulación sanguínea formando parte importante del microambiente metastásico

Se ha demostrado que células granulocíticas inmaduras CD11b⁺Gr-1⁺ (MDSC) infiltran el tejido pulmonar incrementándose gradualmente hasta componer el entorno del tejido hasta un 80% de células CD-45⁺ en pulmones metastásicos a 29 días post-implantación. En el caso de la población linfocitaria esta compone el 50% de leucocitos en pulmones de ratones WT mientras que en pulmones con metástasis 4T1 caen a menos del 15% [29].

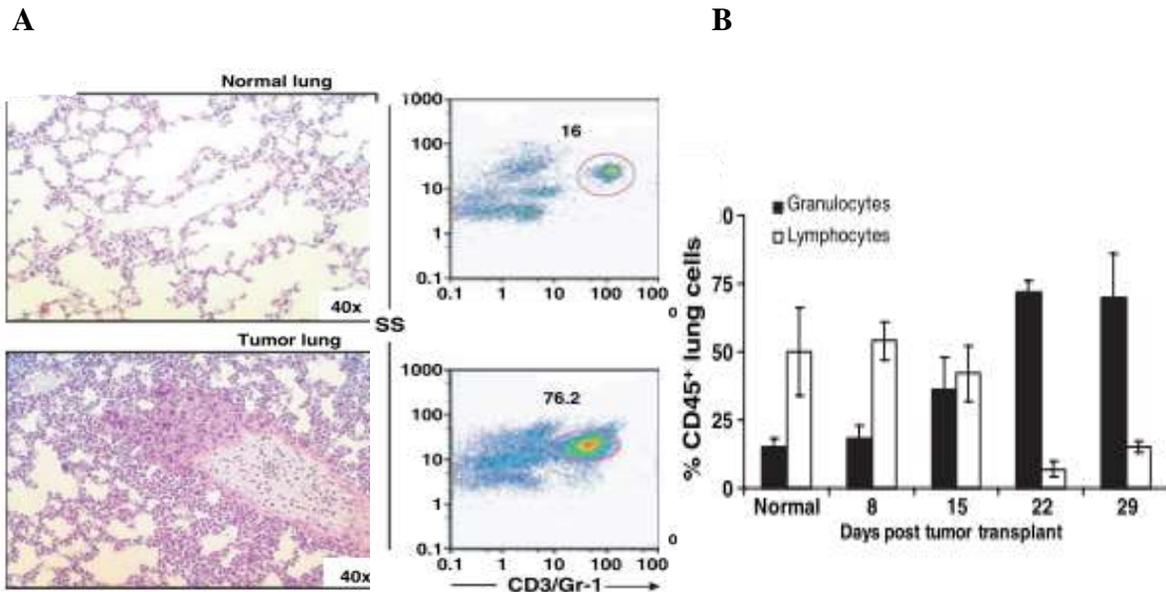


Figura 11 Granulocitos inmaduros infiltran pulmones en ratones con tumor 4T1. Modificado de duPre et al. 2006.

A) Cortes de pulmón teñidos con H&E, muestran pulmón normal y pulmón con metástasis 4T1 29 días post-implantación. Se aprecia un gran infiltrado granulocítico rodeando un foco metastásico, vista 40x. Se acompaña de un dotplot bivariado de pulmones digeridos enzimáticamente, dentro del círculo rojo se muestra el incremento de células CD-45⁺ CD-11b⁺ Gr-1⁺, fenotipo asociado a MDSC. B) Porcentaje de linfocitos presentes en pulmón a diferentes tiempos tras implantación de células 4T1. Barras representan; granulocitos CD-11b⁺ Gr-1⁺ (MDSC) y linfocitos (linfocitos T CD-3⁺ y linfocitos B CD-19⁺). Pulmones son infiltrados por un gran número de granulocitos inmaduros.

2.2.5 Tumor primario. La línea 4T1 induce un nicho linfovascular premetastásico en ganglio drenante

El tumor 4T1 induce la formación de un nicho premetastásico generado por factores linfangiogenicos, (VEGF, COX-2, heparin binding factor), que drenan del tumor primario. Estos factores solubles generan una hiperplasia de células endoteliales linfáticas (LECs por sus siglas del inglés), tejido vascular, fibroblastos reticulares y leucocitos, figura 12. Conforme se incrementa el volumen tumoral el peso del ganglio drenante aumenta. Además, se ha demostrado que ocasionan la sobreexpresión de integrina α IIb que en el LECs media la unión a fibrinógeno lo que se correlaciona con incremento en metástasis a ganglio drenante. Las células tumorales viajan desde tumor generalmente adheridas a fibrinógeno, leucocitos, plaquetas y MSCD [17][32].

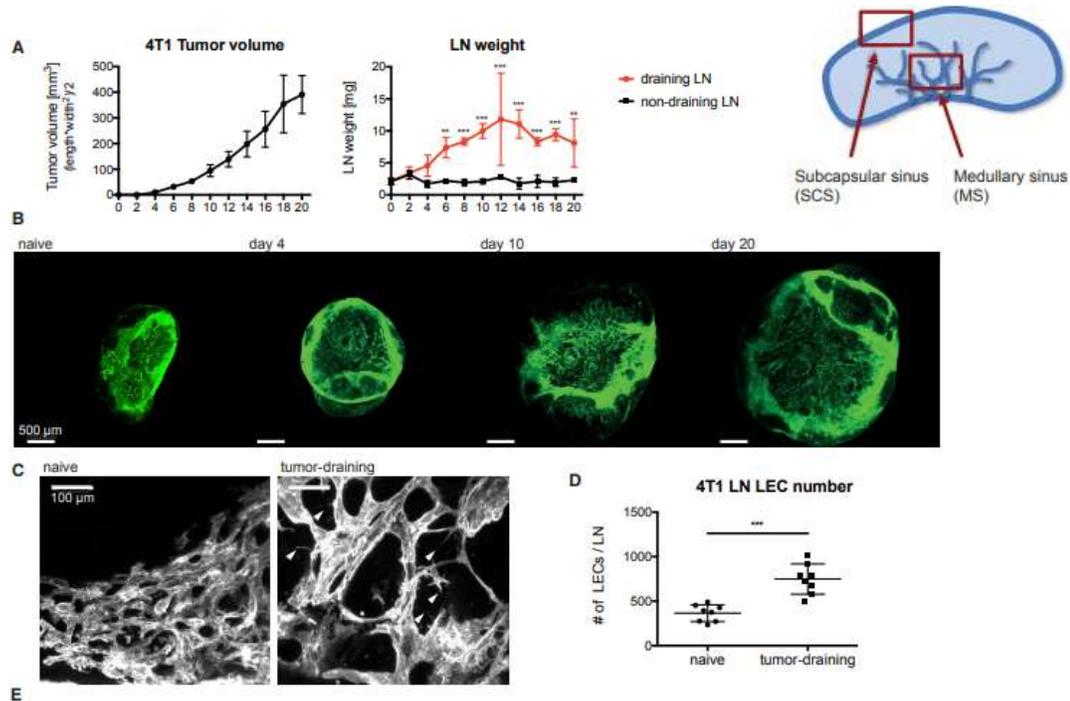


Figura 12 Factores solubles secretados por tumor primario 4T1 induce la formación de un nicho premetastásico en ganglio drenante. Modificado de Commenford et al. 2018.

A) El incremento de volumen tumoral se acompaña de un aumento en peso del ganglio linfático drenante. Marcadores de proliferación Ki67 indican que la hiperplasia de LECs se concentra en el seno subcapsular y en seno medular. **B)** Remodelación del ganglio drenante, se evidencia una remodelación masiva de la red linfática y un agrandamiento en volumen. **C)** Microscopia del seno medular que evidencia los cambios morfológicos ocasionados por el modelo 4T1. **D)** Diferencias significativas entre la cantidad de LECs en ganglio naive y ganglio drenante.

3 Justificación

Considerando el potencial terapéutico del péptido GK-1 en cáncer de mama, y los cambios hematopoyéticos observados durante el desarrollo del CM, el presente proyecto propone evaluar el efecto terapéutico de GK-1 sobre la progresión y composición de la reacción leucemoide asociada a la neoplasia y al número de focos metastásicos en pulmón en el modelo 4T1 de cáncer de mama murino (BALB/c).

4 Hipótesis

El tratamiento con el péptido GK-1 en un modelo murino 4T1 de cáncer de mama, modificará la progresión de la metástasis en pulmón y en el ganglio drenante, así como la reacción leucemoide y la esplenomegalia respecto a los ratones no tratados.

5 Objetivo general

Caracterizar los efectos de la inmunoterapia con el péptido GK-1 en un modelo 4T1 de cáncer de mama murino, sobre la progresión de la reacción leucemoide, la esplenomegalia y el número de focos metastásicos y su progresión en pulmón y ganglio drenante.

5.1 Objetivos particulares

- ✓ Inducir un modelo tumoral de cáncer de mama murino empleando células 4T1 en la cepa singénica BALB/c.
- ✓ Determinar si existe diferencia relevante en la tasa de crecimiento tumoral y esplenomegalia administrando GK-1 intravenoso y subcutáneo.
- ✓ Evaluar mediante observación histológica en ciego (H&E) el efecto de la inmunoterapia con GK-1 sobre el número de focos metastásicos y su progresión en tejido pulmonar y ganglios linfáticos drenantes de los ratones tratados vs control.
- ✓ Evaluar el efecto de GK-1 sobre la progresión de la reacción leucemoide en sangre periférica mediante conteo automatizado de leucocitos totales.
- ✓ Determinar si hay cambios en el conteo diferencial de leucocitos en extendidos de sangre periférica.

6 Metodología

6.1 Ratones de experimentación

Ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, fueron mantenidos dentro de un bioterio con ambiente controlado tipo barrera. En ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, bajo condiciones libres de patógenos. Criados de acuerdo a las reglamentaciones de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y a las recomendaciones de mantenimiento de la guía de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL). Los animales fueron mantenidos en cajas de polisulfonato ventiladas provistas de alimento y agua estériles *ad libitum*. Con un máximo de 5 animales por caja. Tanto la manipulación de los animales de experimentación como los procedimientos experimentales fueron realizados bajo los lineamientos recomendados por la NOM-062-ZOO-1999. El proyecto cuenta con el número de aprobación ID 152, avalado por el CICUAL del IIBO.

6.2 Línea celular 4T1

La línea celular 4T1 fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA), fue crecida a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de estreptomycin-penicilina (Gibco, Grand Island, NY). Las células fueron cosechadas mediante tripsinización (0.25%, 0.53 mM EDTA) y lavadas con buffer amortiguador de fosfatos. Antes de la implantación subcutánea las células fueron cuantificadas en cámara de newbawer para ajustar la cantidad a 1000 células/100 µl.

6.3 GK-1

El péptido GK-1 (G-Y-Y-Y-P-S-D-P-N-T-F-Y-A-P-P-Y-S-A) empleado, fue sintetizado por USV, LTD, Mumbai, Maharashtra, India (lote RD0001) El péptido cuenta con una pureza del 95% determinada por análisis con HPLC en fase reversa en una columna C18 sunfire (4.6 × 150 mm, 5 µm; Waters Corp., Milford, MA) [24] [33]. Se preparó una solución stock disolviendo el péptido GK-1 en solución salina isotónica (0.9%) a una concentración de 1 mg/mL, esta solución stock se dividió en alícuotas mantenidas a -20° C.

6.4 Inducción de modelo de cáncer de mama murino 4T1 en la cepa BALB/c y determinación de volumen tumoral.

Ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de edad fueron implantados con células tumorales 4T1 (1000 células/ 100ul/ratón), vía subcutánea, cerca de la 4ta. glándula mamaria derecha. Este protocolo de inducción del modelo ha sido aprobado por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (CICUAL) del IIBO y cuenta con el número de aprobación ID 152.

Los animales fueron monitoreados hasta desarrollar tumores palpables (11-14 días post-implantación), tras esto, se seleccionaron aleatoriamente en los grupos de estudio. El tratamiento inició al detectarse crecimiento tumoral por palpación, en un régimen de una dosis semanal de GK-1 (100µg) vía intravenosa (IV) o subcutánea (Sc) (para algunos experimentos) y 100µl de solución salina isotónica (S.S.I) por vía IV o Sc para los grupos control durante 4 semanas post detección de tumor palpable.

El tumor primario fue medido cada 3er. día con ayuda de un vernier digital, para determinar el volumen tumoral se empleó la siguiente fórmula.

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

L= largo del tumor

W= ancho del tumor

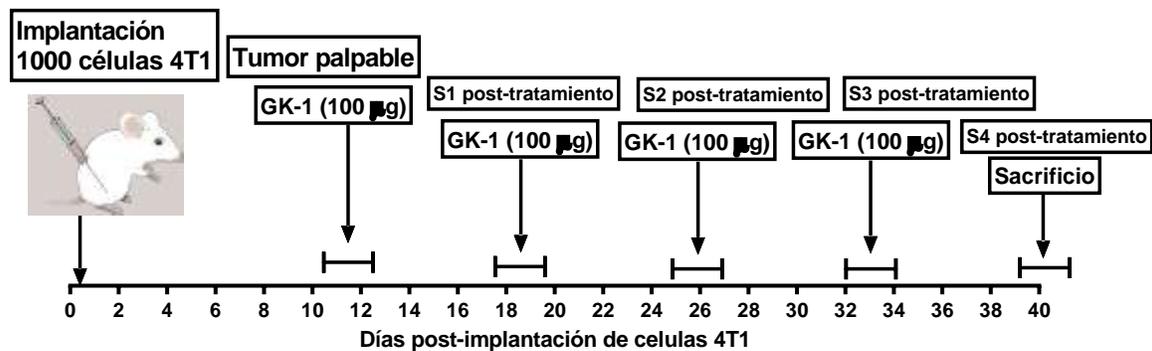


Figura 13 Cronología experimental en días post-implantación de células 4T1. La inducción del modelo tumoral 4T1 empleado por nuestro grupo de investigación comprende la implantación de 1000 células 4T1 (el día de implantación corresponde al día 0), el desarrollo del tumor indetectable mediante palpación se estima entre los días 10 – 13 post-implantación. La administración del tratamiento (GK-1 o SSI) se realizó de forma semanal a partir de la detección de tumor palpable.

Los ratones fueron humanamente sacrificados cuando la patología deploró gravemente su estado de salud o a la 4ta semana post-tratamiento, es decir, 28 días después de la detección de tumor palpable. El sacrificio se realizó mediante dislocación cervical, los animales fueron previamente anestesiados con sevoflurano inhalado.

En base al modelo realizado previamente dentro del grupo de trabajo por Torres-García, et al. 2017, se ha definido una población de estudio para el análisis de la presencia de células con un fenotipo tumoral en los tejidos, de n=8 por grupo;

dividiéndose a lo largo de 2 experimentos independientes. Los grupos de estudio fueron los siguientes: grupo control (SSI) y grupo de tratamiento (GK-1). Para los estudios de progresión de reacción leucemoide se realizaron experimentos con 5 ratones por grupo. Evaluando adicionalmente, según las conveniencias experimentales del grupo de trabajo, dos vías de administración de tratamiento intravenosa y subcutánea. Los grupos evaluados fueron los siguientes:

Intravenoso (IV)		Subcutáneo (Sc)		Naive (Sin tumor)
SSI	GK-1	SSI	GK-1	

Tabla 3 Nomenclatura que ilustra los grupos de estudio.

6.5 Evaluación de metástasis en órganos distantes

6.5.1 Preservación de tejidos y tinción histológica

Para evaluar presencia de células con un fenotipo tumoral en los tejidos, los ratones sacrificados fueron diseccionados para extraer órganos y tejidos con potencial de ser invadidos por las células tumorales (pulmones, cerebro, hígado, ganglios, bazo) así como el tumor primario). Bazo y tumor primario fueron pesados para evaluar esplenomegalia y peso final de tumor. Los pulmones fueron perfundidos y mantenidos en solución zamboni como medio contrastante para facilitar la evaluación macroscópica. El resto de los tejidos fue mantenido en formaldehído amortiguado al 10%.

Posteriormente los tejidos fueron deshidratados secuencialmente y embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de 4 μ m con micrótopo y fueron teñidos con hematoxilina/eosina, para realizar análisis histológico busca de células invasoras en pulmón, ganglio drenante y cerebro.

6.5.2 Análisis histológico

El análisis histológico se realizó en asistencia con el departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Las muestras se analizaron y fotografiaron con un microscopio óptico Nikon DS-Ri1 (IIBO) y Zeiss Axiocam 506 color (FMVZ). En busca de indicativos de invasión metastásica como lo son: células anormales, multinucleadas, polimórficas, distribución irregular, imágenes mitóticas, pleomorfismo nuclear (variación en tamaño y forma del núcleo).

En el caso del pulmón se realizó recuento de focos metastásicos en un corte representativo, en el plano transversal, conteniendo los 5 lóbulos pulmonares. El recuento fue realizado en ciego y por duplicado, distinguiendo entre focos metastásicos pleurales y parenquimatosos.

6.6 Progresión de reacción leucemoide en sangre periférica

Se recuperaron muestras hematológicas mediante punción de la vena facial submandibular, con aguja estéril 21 G. Se colectaron 100 μ L de sangre en tubo ependorff previamente con EDTA como anticoagulante. La flebotomía se realizó los días 7, 21 y 28 post detección de tumor palpable.

Las muestras fueron procesadas en la unidad de hematología de la FMVZ UNAM. Se realizó un conteo automatizado para determinar el número total de leucocitos. Para obtener el diferencial celular se realizaron extendidos de sangre periférica, fijados con

metanol y teñidos con colorante de Wrigth. Se realizó el recuento diferencial de linfocitos en microscopio óptico, conteo a 400 células, en ciego.

6.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con el software Graph Pad Prism® versión 8.0.0.

Se realizó *Shapiro-Wilk test* para determinar la normalidad de los datos. Con base en los resultados de normalidad se procedió a realizar el análisis con pruebas paramétricas o no paramétricas. Como prueba paramétrica se empleó *T-test* no pareado con corrección de *Welch* para tomar en consideración desigualdad de varianzas. Como prueba no paramétrica se utilizó *Mann-Whitney test*. Se consideró que existía una significancia estadística a partir de $P < 0.05$.

7 Resultados

Durante el presente trabajo de investigación se obtuvieron los siguientes resultados:

7.1 El tratamiento con GK-1 disminuye la tasa de crecimiento tumoral de forma significativa

Con anterioridad el grupo de trabajo reportó una reducción en la tasa de crecimiento tumoral de forma dosis dependiente administrando GK-1 intravenoso [26]. Como se observa en la figura 14, los resultados obtenidos son consistentes con lo previamente reportado. Se midieron tumores primarios de los ratones de estudio cada 3 días, se determinó el volumen tumoral con la ecuación descrita anteriormente y se tabularon los datos. Para obtener la variación en el tiempo del incremento de volumen tumoral se obtuvo la regresión lineal de los datos.

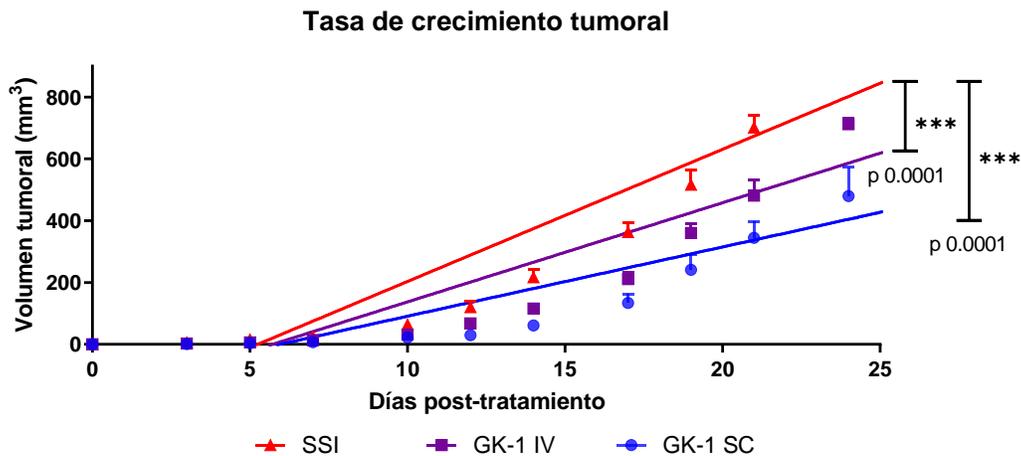


Figura 14 Tasa de crecimiento tumoral, tratamiento GK-1 (100 µg) vías intravenosas (IV) y subcutánea (SC). El tratamiento con GK-1, tanto vía intravenosa como subcutánea, reduce de forma significativa la tasa de crecimiento tumoral comparado con el grupo control que recibió solución salina isotónica. No existe diferencia significativa en la tasa de crecimiento tumoral comparando GK-1 intravenoso contra subcutáneo.

Este caso se evaluó adicionalmente dos vías de administración intravenosa (IV) y subcutánea (SC). Se observa que ambos grupos de ratones tratados con 100µg de GK-1 tuvieron una menor tasa de crecimiento tumoral comparados con el grupo control que recibió solución salina (SSI). Se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar la pendiente de los grupos tratados contra el grupo control; GK-1 IV vs SSI, $p < 0.0001$ y GK-1 SC vs SSI, $p < 0.0001$. Destacando que no se encontró diferencia significativa al comparar la tasa de crecimiento tumoral de los grupos de tratamiento, GK-1 IV vs GK-1 SC, $p = 0.124$.

7.2 GK-1 reduce el peso del tumor primario y la severidad de la esplenomegalia asociada a cáncer al día 28 de tratamiento.

Los tumores primarios y bazo fueron diseccionados y pesados al momento del sacrificio (día 28 de tratamiento). El tratamiento con GK-1 (100µg) dio como resultado tumores primarios de menor peso, comparado con los tumores de ratones que recibieron solución salina; GK-1 IV (1.019 ± 0.214 gr), GK-1 SC (0.919 ± 0.358 gr), SSI

(1.345±0.273gr). En el caso de los ratones tratados con GK-1 se observó diferencia estadísticamente significativa en ambas vías de administración comparadas con el grupo control, figura 15. Para determinar esto se realizó un *T*-test no pareado con corrección de *Welch* obteniéndose la siguiente información; GK-1 IV vs SSI, $p < 0.041$ y GK-1 SC vs SSI, $p < 0.045$. Resaltando que no se encontró diferencia significativa al comparar las dos vías de administración empleadas en los grupos de tratamiento; GK-1 IV vs GK-1 SC, $p = 0.556$.

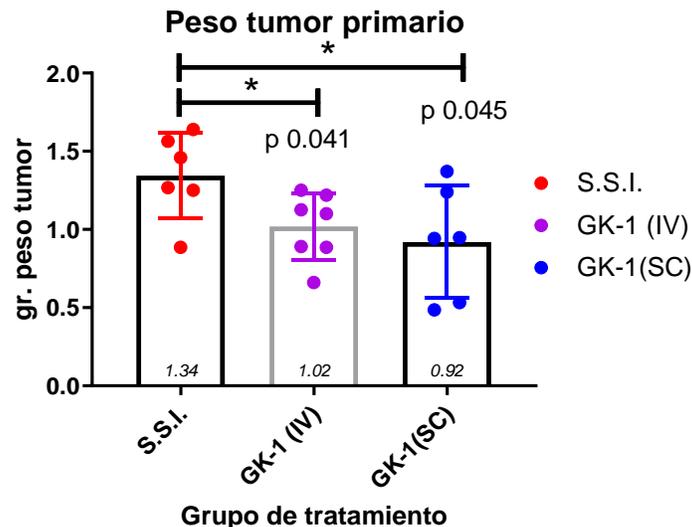


Figura 15 Peso tumor primario al día de sacrificio.

El tratamiento con GK-1 reduce de forma significativa el peso total del tumor primario al día 28 de tratamiento. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E.

El modelo de cáncer de mama 4T1 se caracteriza por generar una severa esplenomegalia, el incremento en tamaño y peso de bazo se asocia a un peor pronóstico. Se determinó el peso del bazo al día del sacrificio como indicador de la esplenomegalia. Para incrementar la precisión del análisis se siguieron las pautas sugeridas por *Xuefeng, et al. (2016)*, normalizando el peso absoluto del bazo con el peso del individuo, esto para tomar en cuenta que un ratón de mayor peso y tamaño

tendrá un bazo inicial de mayor masa inicial. Por lo que el análisis final sugerido debería expresarse en peso de bazo relativo al peso total del individuo [31].

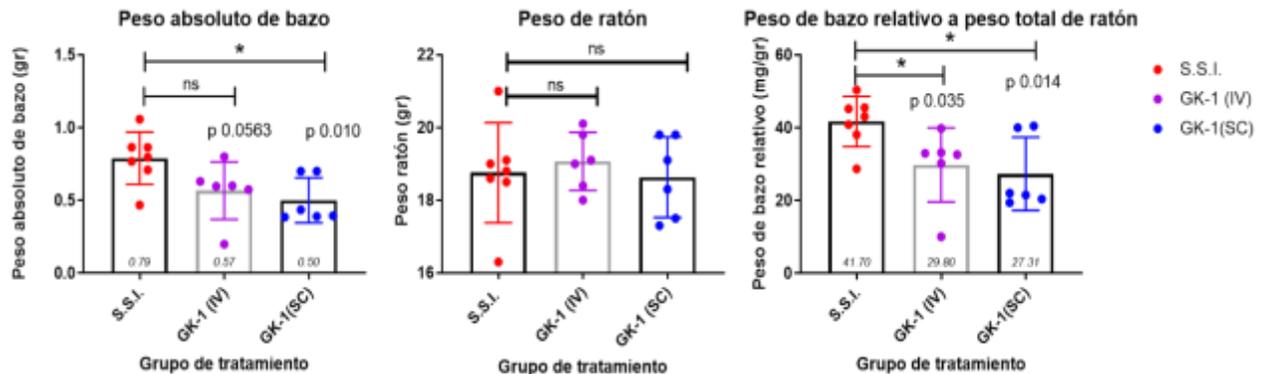


Figura 16 Reducción de esplenomegalia con tratamiento GK-1. Péptido GK-1 reduce el peso de bazo al día del sacrificio (día 28 de tratamiento). Se ajustó peso de bazo relativo al peso total del ratón correspondiente de estudio. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E

Como se muestra en la figura 16, ambos grupos tratados con GK-1 presentaron menores promedios de peso de bazo; GK-1 IV (0.566 ± 0.197 gr), GK-1 SC (0.500 ± 0.155 gr), SSI (0.789 ± 0.179 gr). Encontrándose diferencia significativa al comparar ar el grupo GK-1 SC con el grupo control $p < 0.01$ y una tendencia de $p=0.0563$ al comparar el grupo GK-1 IV contra el control. El peso normal de bazo de un ratón WT se ubica en torno a 0.1 gr.

Para normalizar el peso de bazo respecto al peso del ratón, estos fueron pesados previo al sacrificio. Se obtuvieron los siguientes promedios; GK-1 IV (19.07 ± 0.799 gr), GK-1 SC (18.63 ± 1.106 gr), SSI (18.76 ± 1.375 gr). No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar los grupos experimentales de estudio.

Tras ajustar el peso de bazo relativo al peso total del ratón se vuelve más evidente el efecto en la reducción de la esplenomegalia en los grupos de tratamiento con GK-1. Se

obtuvieron los siguientes datos; GK-1 IV (29.8 ± 10.19 mg/gr), GK-1 SC (27.31 ± 10.05 mg/gr), SSI (41.7 ± 6.912 mg/gr). Se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar los grupos de tratamiento contra el grupo control; GK-1 IV vs SSI, $p < 0.035$ y GK-1 SC vs SSI, $p < 0.014$. No se encontró diferencia significativa al comparar las vías de administración del tratamiento con GK-1; GK-1 IV vs GK-1 SC, $p = 0.678$. Es importante recalcar que el tratamiento con GK-1 no evita la presencia de esplenomegalia asociada a cáncer tan característica de este modelo, pero sí reduce su progresión.

7.3 El tratamiento con GK-1 reduce el número de focos metastásicos en pleura y parénquima pulmonar, así como su progresión.

Previamente nuestro grupo de investigación reportó la reducción de la macrometástasis en la superficie pulmonar asociada al tratamiento con GK-1 administrado de forma intravenosa. Esto evaluando de forma macroscópica pulmones con tratamiento a distintas dosis de GK-1 y controles con solución salina[26]. Con base en el antecedente anterior, en el presente trabajo de investigación se decidió evaluar microscópicamente el número focos enriquecidos con células con una apariencia tumoral (micrometástasis) en cortes representativos de pulmón. Los pulmones fueron recuperados tras la necropsia y perfundidos con solución Zamboni al 10%. Se realizaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina.

Se realizó el conteo de los focos metastásicos, distinguiendo entre metástasis pleural y parenquimatosa al día 28 de tratamiento, se realizó recuento de focos metastásicos en un corte representativo, el corte fue realizado en la misma región anatómica del pulmón en el plano transversal, de forma que en el corte obtenido tuviera una porción

de tejido similar de los 5 lóbulos pulmonares de ratón. El recuento fue realizado en ciego y por duplicado, distinguiendo entre focos metastásicos pleurales y parenquimatosos. Se tomaron microfotografías de la progresión metastásica a los días 21 y 28 de tratamiento. Tal como se indica en las secciones 6.5.1 y 6.5.2.

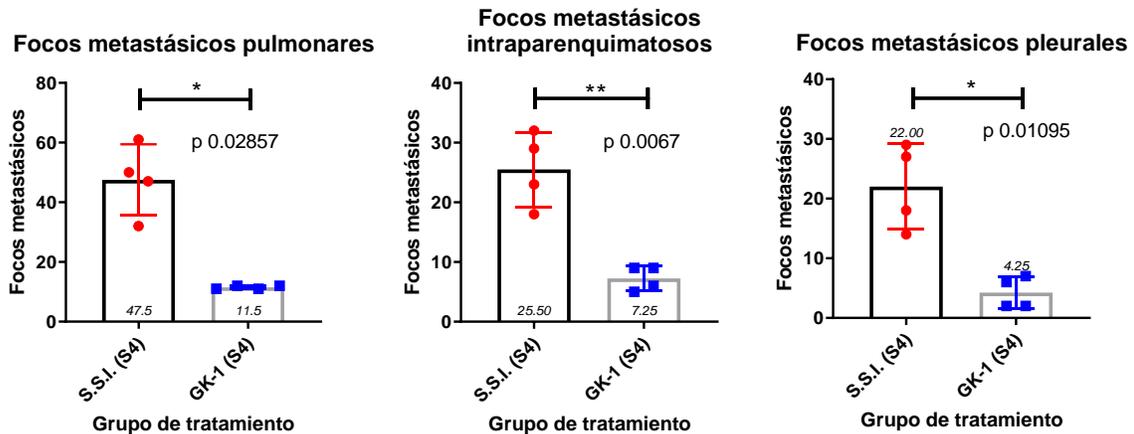


Figura 17 Recuento de focos metastásicos en pulmones (focos metastásicos totales, intraparenquimatosos y pleurales). El tratamiento con GK-1 intravenoso reduce significativamente el número de focos metastásicos en pleura y parénquima pulmonar al día 28 de tratamiento. Se realizó el recuento de focos metastásicos en un corte representativo, en el plano transversal, conteniendo tejido de los 5 lóbulos pulmonares. El recuento fue realizado en ciego y por duplicado. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E.

El tratamiento intravenoso con GK-1 (100 μ g) redujo de forma significativa el número de focos metastásicos presentes en los cortes histológicos analizados, en comparación con el grupo control, tal como se muestra en la figura 17. El recuento total de focos metastásicos (la suma de focos en parénquima y pleura pulmonar) arrojó los siguientes promedios. Para el grupo de tratamiento GK-1 (13.5 \pm 2.88) y en el caso del grupo control SSI (48 \pm 10.42). Se realizó una prueba t (Mann-Whitney test) encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio; GK-1 vs SSI, $p < 0.0285$.

El número de focos metastásicos en parénquima pulmonar fue significativamente menor con el tratamiento con GK-1. Para el grupo GK-1 (7.25 ± 2.06) y en el caso del grupo control SSI (25.5 ± 6.24). Se realizó una prueba t (Welch test) para determinar significancia estadística GK-1 vs SSI, $p < 0.0067$. En el caso de los focos metastásicos presentes en pleura pulmonar, se volvió a observar una disminución significativa en el grupo GK-1 comparado con el control. GK-1 (4.25 ± 2.6), control SSI (22 ± 7.16), GK-1 vs SSI, $p < 0.0109$.

En las figuras 18,19,23 y 24, se observa la progresión metastásica en parénquima y pleura pulmonar a los días 21 y 28 de tratamiento, respectivamente. Al día 21 se observa la presencia de pequeños focos micrometastásicos que van invadiendo el espacio alveolar y progresando en metástasis de tamaño considerable al día 28, observándose diferencias importantes en la progresión metastásica entre los pulmones de ratones que recibieron GK-1 y el grupo control (SSI).

Cabe destacar la presencia de abundantes granulocitos (en diferentes etapas de maduración) infiltrantes en el tejido pulmonar. Los pulmones al día 21 presentan focos metastásicos de tamaño reducido y el estado patológico general es similar en ambos grupos de tratamiento. En este punto del modelo de estudio, los focos metastásicos apreciables en parénquima comprendían pequeños cúmulos de células tumorales infiltrando desde tejido vascular, Figura 20 (A, B).

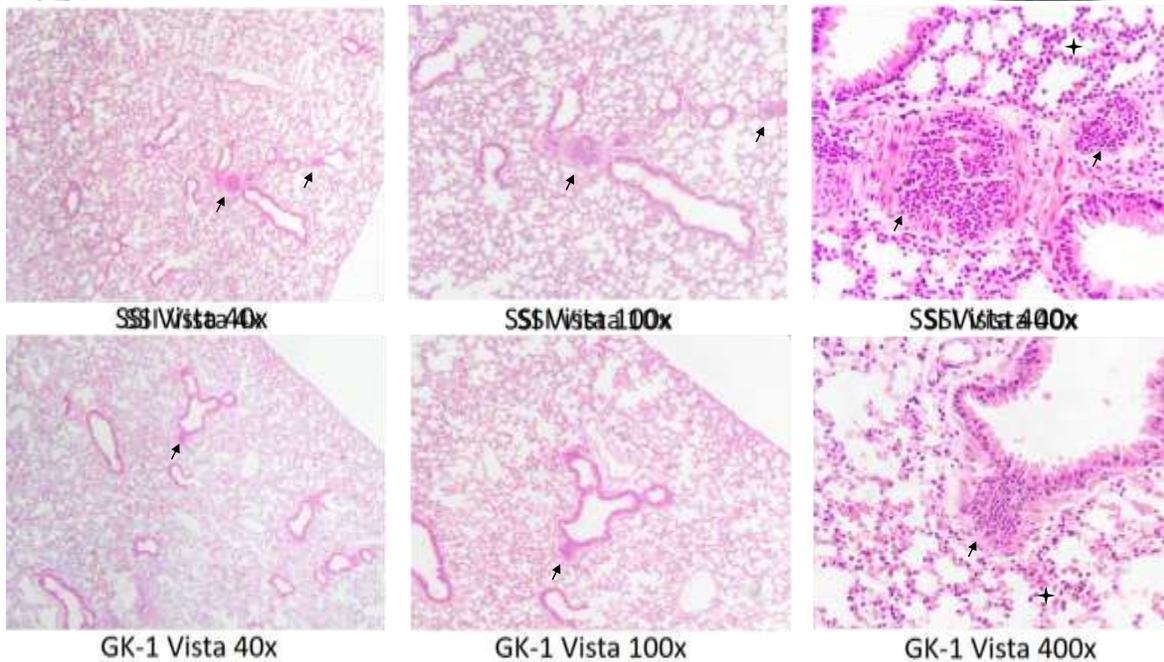


Figura 18 Metástasis en parénquima pulmonar al día 21 post tratamiento. Pulmón, ratón. H&E. Al día 21 de tratamiento se aprecian focos metastásicos (↑) los cuales presentan tamaño reducido que progresan desde tejido vascular (SSI - GK-1, 40x). Estos focos apreciables en parénquima pulmonar comprenden pequeños cúmulos de células tumorales y el estado patológico es similar en ambos grupos de tratamiento (SSI - GK-1, 100x). Se aprecia abundante infiltrado granulocítico en los capilares alveolares circundantes al foco metastásico (✦) (SSI - GK-1, 400x).

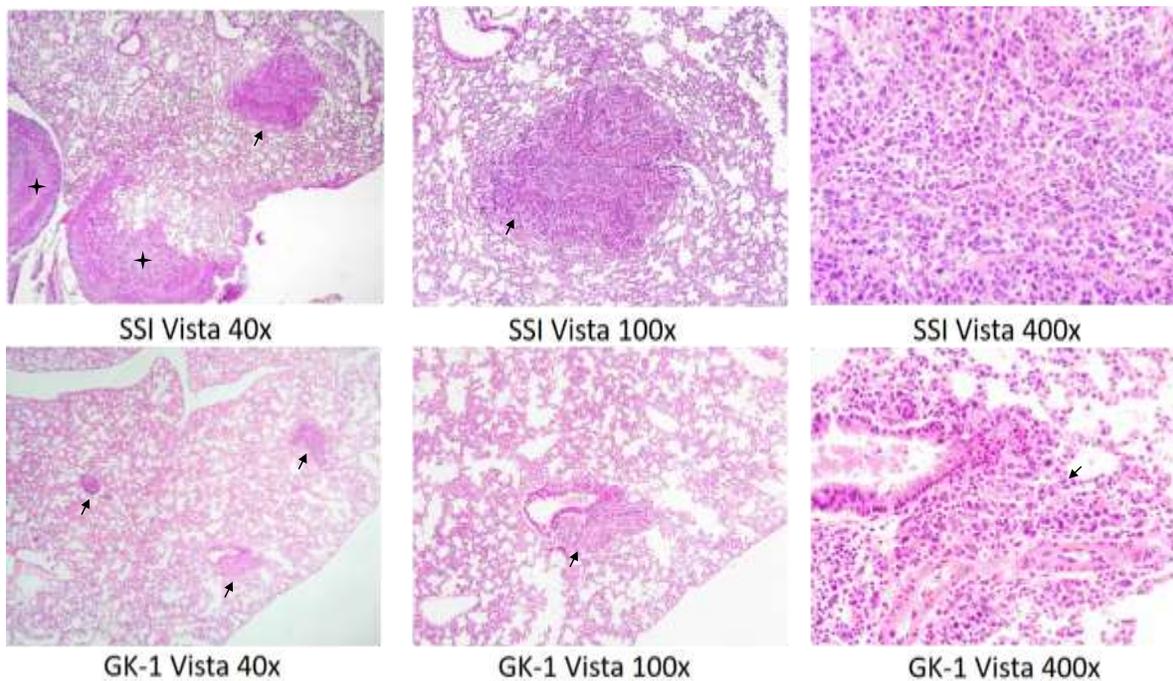


Figura 19 Metástasis en parénquima pulmonar al día 28 post tratamiento. Pulmón, ratón. H&E. Los focos metastásicos (↑) progresaron abarcando importantes áreas del parénquima (✦) Corresponde a extensos focos pleurales) donde se encontraron extensamente diseminados, siendo evidente que dichos focos metastásicos presentan menor tamaño, severidad y progresión patológica en el grupo tratado con GK-1 comparado con el control (SSI vs GK-1, 40x). Los focos parenquimatosos progresan desde tejido vascular alterando la forma sacular característica del tejido alveolar circundante, compresión alveolar, (SSI - GK-1, 100x). Acercamiento a focos metastásicos, se aprecian células tumorales poliédricas a fusiformes que exhiben cariomegalia, anisocariosis, anisocitosis y núcleos pleomorfos. Se aprecian células granulocíticas infiltrantes entre las células tumorales (SSI - GK-1, 400x).

Cabe señalar que, en órganos altamente vascularizados como el pulmón, la diseminación hematógena es la principal vía de ingreso de células neoplásicas. Las células neoplásicas fueron fácilmente identificables, presentando marcado pleomorfismo (variación de forma y tamaño celular), anaplasia, multinucleación, anisocitosis (núcleos de tamaño irregular), cariomegalia (aumento del tamaño nuclear desproporcionado), anisocariosis (variación en forma y tamaño nuclear entre células) e imágenes mitóticas anormales, figura 20 C.

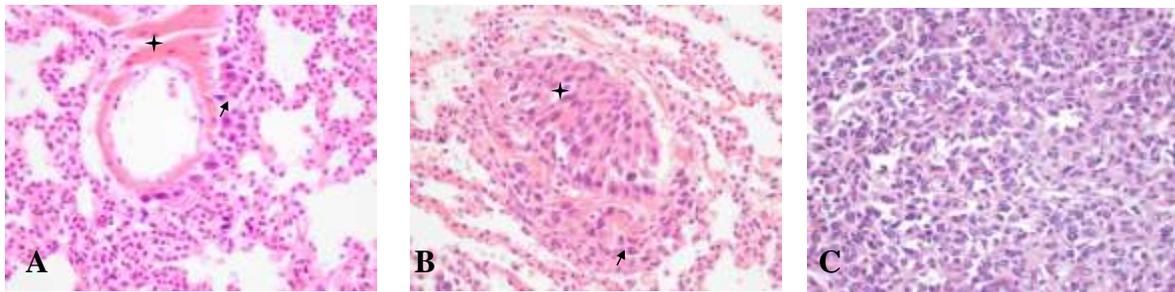


Figura 20 Células tumorales invadiendo parénquima pulmonar desde tejido vascular.

A) La túnica muscular del vaso sanguíneo (+) se observa hipereosinofilia e infiltrada por células neoplásicas (↑). Gran presencia de infiltrado granulocítico. **B)** La luz del vaso sanguíneo se encuentra ocluida por un émbolo de células neoplásicas (+) e infiltran la túnica media (↑). **C)** Células neoplásicas de un foco metastásico, se observan poliédricas a fusiformes, con moderada cantidad de citoplasma eosinofílico de bordes poco definidos y núcleos pleomorfos. Estas células muestran marcado pleomorfismo, cariomegalia, anisocariosis y anisocitosis. Grupo SSI día 28, pulmón, ratón. H&E, 600x.

Al día 28, los pulmones exhibieron nódulos micrometastásicos que se encontraron diseminados por todo el pulmón. Los nódulos progresan desde tejido vascular abarcando áreas importantes del parénquima pulmonar, perdiéndose la forma sacular característica del tejido alveolar y deformando el tejido circundante que se encuentra alrededor de la periferia metastásica (compresión alveolar), figuras 21 B, C. Se aprecia gran cantidad de granulocitos tanto en la periferia de los nódulos metastásicos como dentro de los mismos, figuras 19 SSI 400x y 21 A. Se aprecian claras diferencias en el tamaño y progresión de los focos metastásicos intraparenquimatosos en los grupos de

estudio, siendo de forma evidente de menor tamaño y severidad en el grupo de tratamiento con GK-1, figuras 18 y 19.

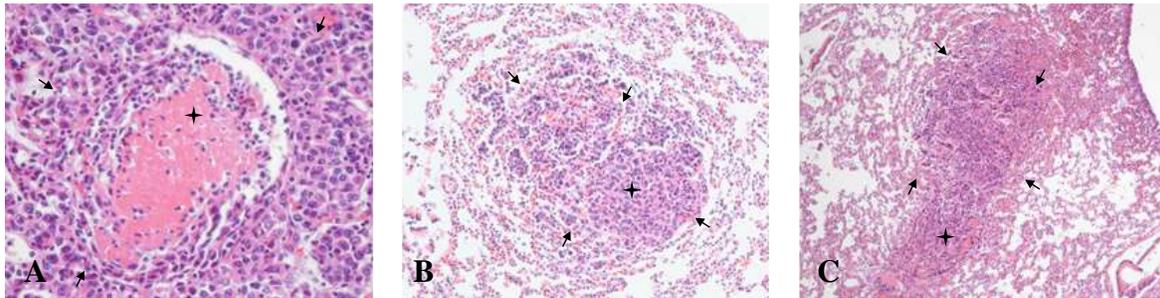


Figura 21 Progresión de focos metastásicos intraparenquimatosos desde vasos sanguíneos (día 28 post-tratamiento). A) En la luz del vaso sanguíneo (+) se aprecia abundante fibrina adherida al endotelio vascular entremezclada con leucocitos y células neoplásicas (trombo). Rodeando por completo al vaso sanguíneo hay numerosas células neoplásicas (↑) invadiendo tejido pulmonar, 600x. B) Foco de células neoplásicas intraparenquimatoso (+) que comprime al parénquima pulmonar adyacente y progresa rellenado el espacio alveolar (↑), 200x. C) Foco metastásico (+) progresa hacia parénquima desde un vaso sanguíneo ocluido por un embolo neoplásico (↑), x100. Grupo SSI día 28, pulmón, ratón. H&E.

En el caso de los focos metastásicos apreciables en la pleura al día 21 de tratamiento, estos comprendían pequeños cúmulos de células tumorales infiltrando la pleura pulmonar y de reducida extensión, tal como se muestran en las figuras 22 y 24 B. Estos focos pleurales progresaron notablemente al día 28, expandiendo la pleura de forma importante, invadiendo el espacio subpleural y expandiéndose más allá de los límites normales de la pleura pulmonar, figura 24 C. El foco metastásico pleural progresa de forma considerable comprimiendo el parénquima adyacente y rellenado el espacio alveolar, figuras 23 y 24 C. Los focos metastásicos pleurales presentaron menor tamaño, severidad y progresión patológica en el grupo tratado con GK-1 comparado con el control, siendo considerablemente más extensos en el grupo SSI tal como se muestra en la figura 23.

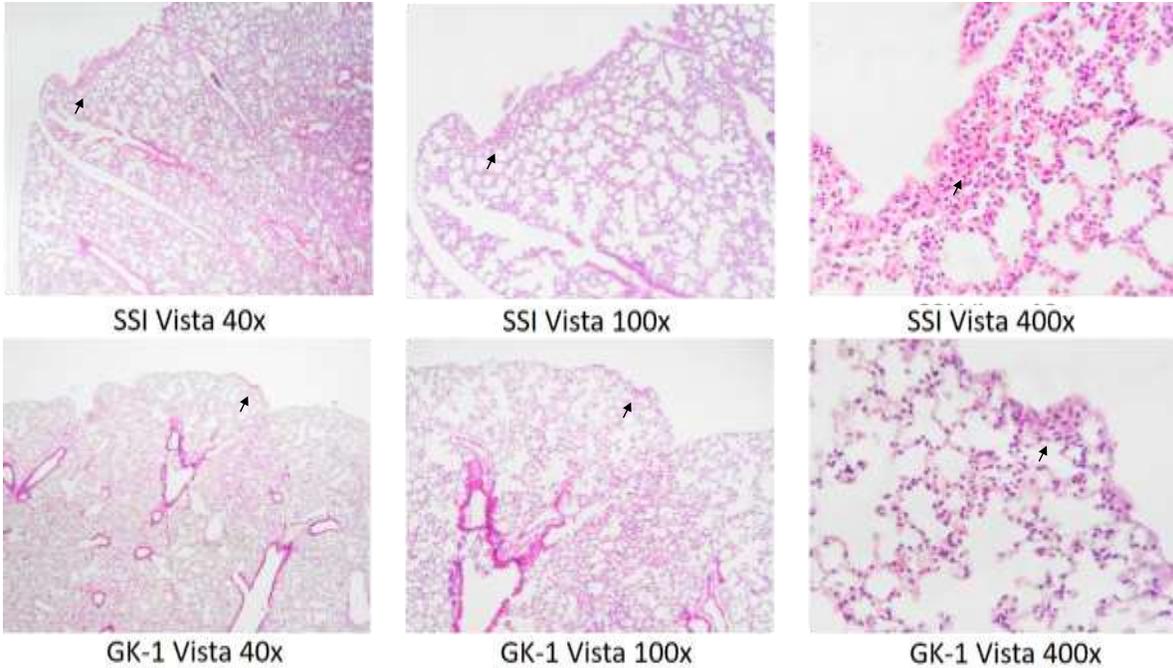


Figura 22 Metástasis en pleura pulmonar al día 21 post tratamiento. Pulmón, ratón. H&E. Al día 21 de tratamiento se aprecian focos metastásicos (↑) de reducida extensión, que progresan desde pleura pulmonar (SSI - GK-1, 40x), pese a observarse focos de mayor extensión en el grupo SSI, el estado patológico en este punto del modelo se aprecia similar en ambos grupos de tratamiento (SSI - GK-1, 100x). Estos focos apreciables en pleura pulmonar comprenden pequeños cúmulos de células tumorales (SSI - GK-1, 400x).

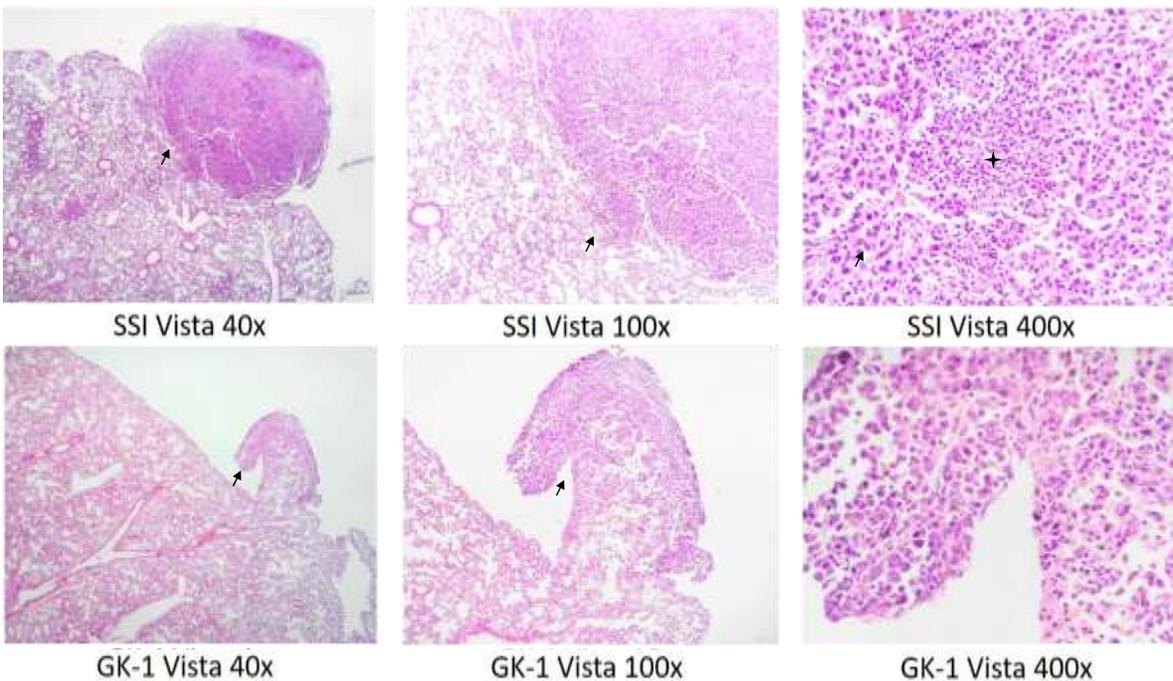


Figura 23 Metástasis en pleura pulmonar al día 28 post tratamiento. Pulmón, ratón. H&E. Los focos metastásicos pleurales (↑) progresan invadiendo tanto el espacio subpleural como expandiéndose más allá de los límites originales de la pleura pulmonar, los focos metastásicos presentaron menor tamaño, severidad y progresión patológica en el grupo tratado con GK-1 comparado con el control (SSI vs GK-1, 40x). Los focos comprenden grandes masas de células tumorales que rellenan el espacio alveolar y comprimen el tejido circundante (SSI - GK-1, 100x). Acercamiento a focos metastásicos, se aprecian células tumorales poliédricas a fusiformes que exhiben cariomegalia, anisocariosis, anisocitosis y núcleos pleomorfos. En SSI, 400x, se aprecia una sección del extenso foco metastásico, en el centro se aprecia una gran cantidad de células granulocíticas infiltrantes (✚) rodeadas por células metastásicas 4T1. En GK-1, 400x se aprecian células neoplásicas progresando hacia el espacio subpleural y relleno el espacio alveolar.

En los capilares alveolares de los pulmones de ratones tratados tanto con GK-1 como SSI se observaron numerosas células inmaduras del linaje mieloide infiltrando desde tejido vascular, se apreciaron rodeando focos metastásicos e incluso se encontraron infiltrando el tejido metastásico, figuras 24 A y 23, SSI, vista 400x.

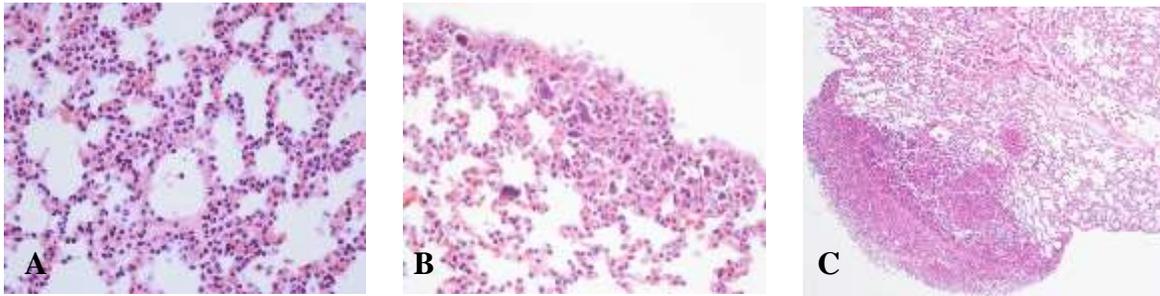


Figura 24 Apariencia del infiltrado linfoide y progresión metastásica en pleura pulmonar (Sin tratamiento antitumoral) entre los días 21 – 28, en el grupo de ratones a los que se les administró SSI.

A) En las paredes alveolares se observa abundante infiltrado celular correspondiente a granulocitos en diferentes estadios de maduración, 600x. Grupo SSI día 21. **B)** Infiltrando la pleura pulmonar se aprecia un pequeño foco de células neoplásicas y en los capilares alveolares numerosos leucocitos, 600x. Grupo SSI día 21. **C)** Expandiendo la pleura pulmonar se aprecia una prominente área hiper celular con células neoplásicas (foco metastásico), con regiones de células que muestran picnosis y cariólisis (necrosis), 50x. Grupo SSI día 28, pulmón, ratón. H&E.

En aspectos generales se aprecia una mayor afectación metastásica en el grupo control comparado con el grupo que recibió tratamiento con GK-1, apreciándose una mayor diseminación metastásica tanto en pleura como en parénquima pulmonar, siendo las diferencias patológicas más evidentes al día 28 post tratamiento.

7.4 Efectos de GK-1 sobre la progresión patológica del ganglio linfático drenante.

Tal como se menciona en la sección 2.2.5, factores solubles del tumor primario 4T1 ocasionan una remodelación del tejido linfoide, el cual promueve la proliferación de células endoteliales linfáticas (LECs), células reticulares fibroblásticas y vasos

linfáticos, extendiendo así la red linfática y estableciendo un nicho linfovascular que promueve el establecimiento de metástasis en ganglio [32]. Con este antecedente se analizaron cortes histológicos teñidos con H&E para evaluar si había diferencias apreciables con el tratamiento con 100 μ L GK-1 intravenoso.

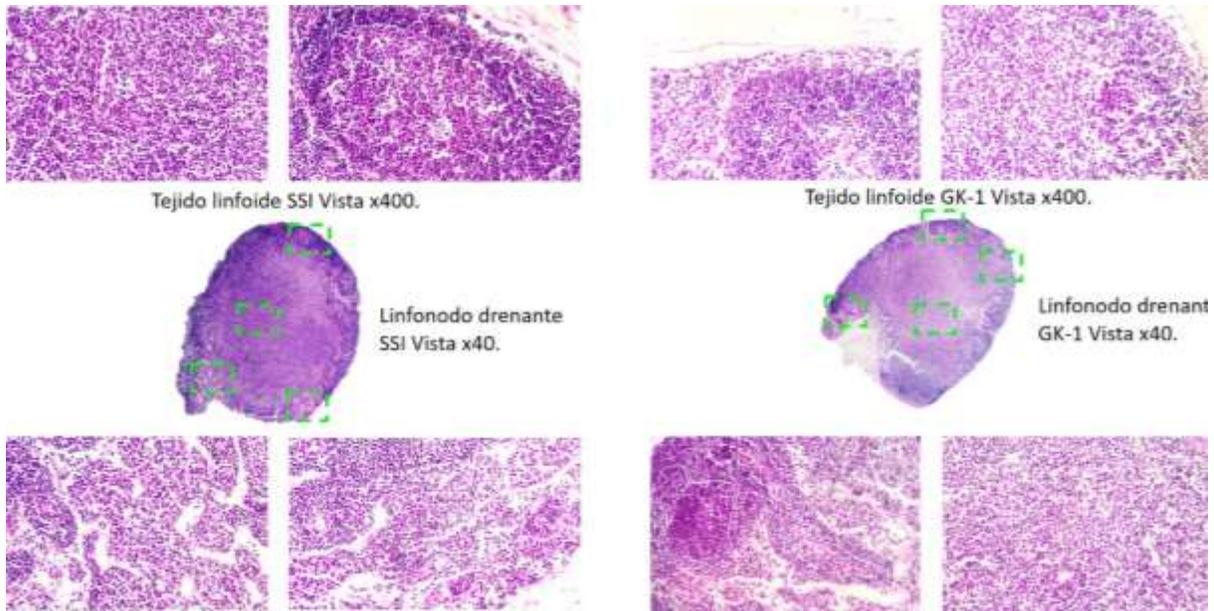


Figura 25 Progresión patológica en ganglio drenante día 21 de tratamiento. Ratón. H&E

Al día 21 de tratamiento se aprecia que ambos tanto en el grupo tratado con SSI así como con el tratado con GK-1 IV, exhiben un estado patológico similar, observándose hiperplasia linfovascular principalmente en el seno medular y un remodelamiento del seno subcapsular, sin encontrarse evidencia de establecimiento de colonias metastásicas, figura 25.

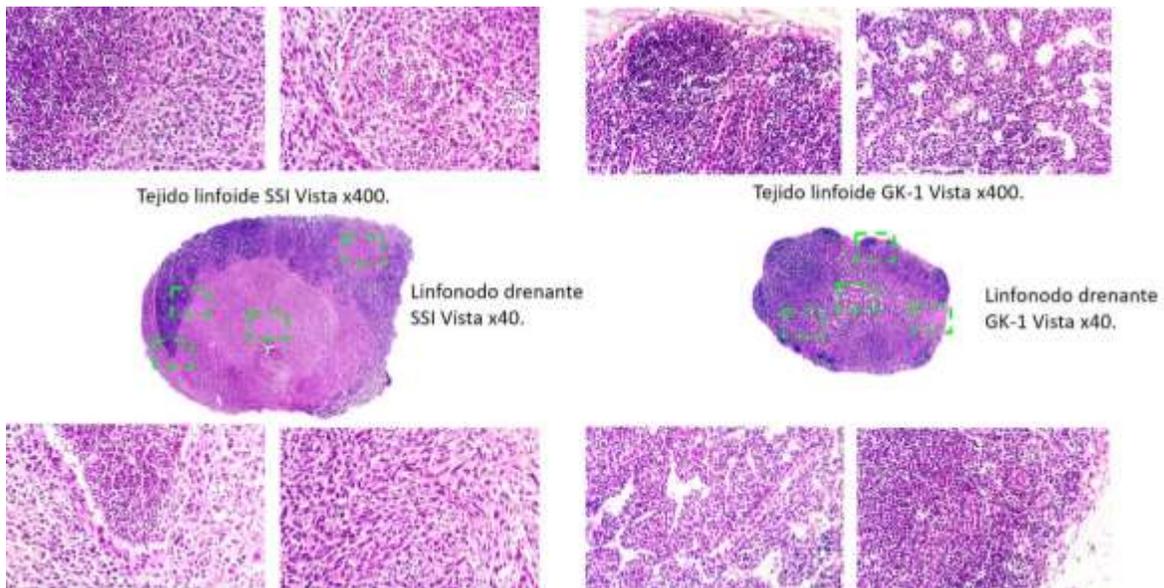


Figura 26 Progresión patológica en ganglio drenante día 28 de tratamiento, ratón. H&E

Para el día 28 en caso del grupo control tratado con SSI, se encontró una extensa invasión metastásica en el 100% de ganglios drenantes analizados, apreciándose una compresión de tejido linfoide y sustitución por tejido metastásico. Siendo fácilmente diferenciable el tejido linfoide del metastásico, las células metastásicas exhiben marcado pleomorfismo, anaplasia, anisocitosis, cariomegalia, anisocariosis e imágenes mitóticas aberrantes. El ganglio metastásico perdió su morfología y anatomía característica, siendo difícil identificar sus componentes, se encontró infiltrado granulocítico presente en tejido metastásico, figura 26. En la misma figura se aprecia que en el ganglio del grupo tratado con GK-1 no hay establecimiento de sustitución de tejido linfoide por metástasis. Se detectó presencia de células tumorales en seno medular, vénulas de endotelio alto y seno subcapsular, sin que establecieran focos metastásicos considerables. Se aprecia hiperplasia linfovascular en el seno medular y un remodelamiento del seno subcapsular similar al estado observado al día 21. Los resultados observados señalan que el tratamiento con GK-1 podría retardar el

establecimiento de metástasis en ganglio drenante al menos entre los días 21 a 28 de tratamiento en modelo de cáncer de mama 4T1.

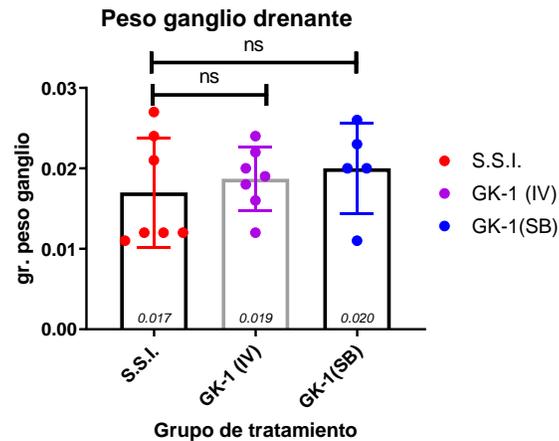


Figura 27 Peso de ganglio drenante al día de sacrificio (día 28).

Se ha reportado que la linfangiogénesis en ganglio drenante incrementa su peso en el modelo 4t1 [32]. Se registró el peso del ganglio drenante al día de sacrificio para determinar si había diferencias entre grupos de tratamiento. No se encontraron diferencias significativas al comparar los pesos de ganglios drenantes entre los grupos, figura 27.

7.5 El tratamiento con GK-1 modifica la progresión de la reacción leucemoide característica del modelo de cáncer de mama 4T1, hasta el día 21 de tratamiento.

Tal como se mencionó anteriormente, la reacción leucemoide inducida por el modelo de cáncer de mama 4T1 se encuentra extensamente caracterizada, la cual se destaca por presentar una progresiva leucocitosis granulocítica, con un incremento de células con morfología de granulocitos en sangre periférica, exhibiendo un fenotipo inmaduro

correspondiente a los marcadores asociados a MDSC, CD11b⁺Gr-1⁺, sin grandes cambios en los números absolutos de linfocitos en circulación, pero con un incremento porcentual de granulocitos, desde un 20% normal, hasta cerca de 80% tras 4 semanas de implantación [29][28].

Dado que la reacción leucemoide está relacionada tanto en la promoción de metástasis, la esplenomegalia y considerando que en neoplasias humanas la reacción leucemoide se asocia a una peor prognosis, se decidió evaluar si el tratamiento con GK-1 tendría efectos sobre su progresión.

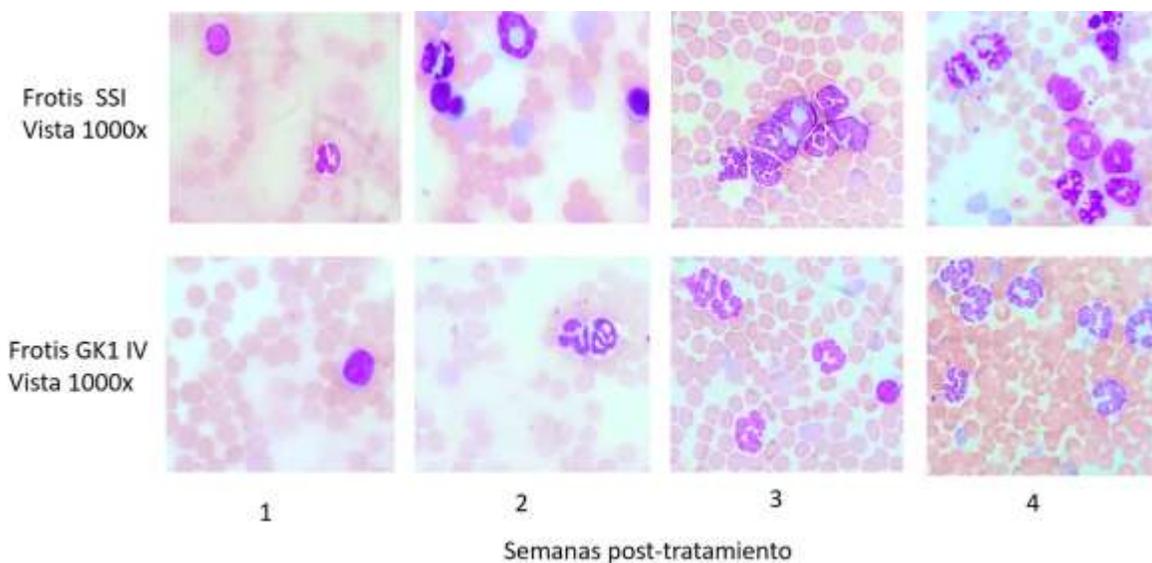


Figura 28 Morfología de leucocitos en extendidos de sangre periférica, estudio piloto.

Se aprecia la progresión de la reacción leucemoide, a 4 semanas post-tratamiento. Se observa un incremento en células con morfología granulocítica (morfológicamente similar a neutrófilos).

Se realizó un estudio piloto en el cual no se encontraron diferencias en el diferencial de leucocitos, pero se apreció una tendencia de una menor cantidad de leucocitos por campo, en el grupo tratado con GK-1, figura 28. Considerando este resultado, se decidió continuar con el análisis tomando en cuenta el recuento total de leucocitos.

Se tomaron muestras sanguíneas 100 μ L mediante punción de la vena facial submandibular, a las semanas 1, 3 y 4 de tratamiento. Se realizó un conteo total de leucocitos (WBC) de forma automatizada en la unidad de hematología de la facultad de veterinaria de la UNAM. Para obtener el diferencial celular se realizaron extendidos de sangre periférica, fijados con metanol y teñidos con colorante de Wrigth. Se realizó el recuento diferencial de linfocitos en microscopio óptico, en ciego.

Como se muestra en la figura 29, a la semana 1 de tratamiento el recuento total de leucocitos demostró una diferencia estadísticamente significativa en el número de leucocitos (incrementados) en el grupo control, que recibió solución salina, comparado con ambos grupos de tratamiento con GK-1 (IV y SC) así como el grupo de ratones naive, (sin implantación de células 4T1), que fungió como grupo control (baseline).

En los extendidos de sangre periférica se observó un incremento en el número de células observables por campo (Naive < GK-1 IV/SC < SSI). Los datos obtenidos, expresados en 1×10^9 células /L, fueron los siguientes; Naive (5.4 ± 0.77), GK-1 IV (7.04 ± 1.42), GK-1 SC (6.4 ± 0.48) y en grupo control SSI (10.47 ± 1.82). Se realizó prueba t (Welch test) para determinar significancia estadística; GK-1 IV vs SSI $p < 0.004$, GK-1 SC vs SSI $p < 0.0007$, Naive vs SSI $p < 0.0001$. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las vías de administración de GK-1; GK-1 IV vs GK-1 SC, $p = 0.399$. Figuras 30, 31.

Extendidos de sangre periférica 40x.

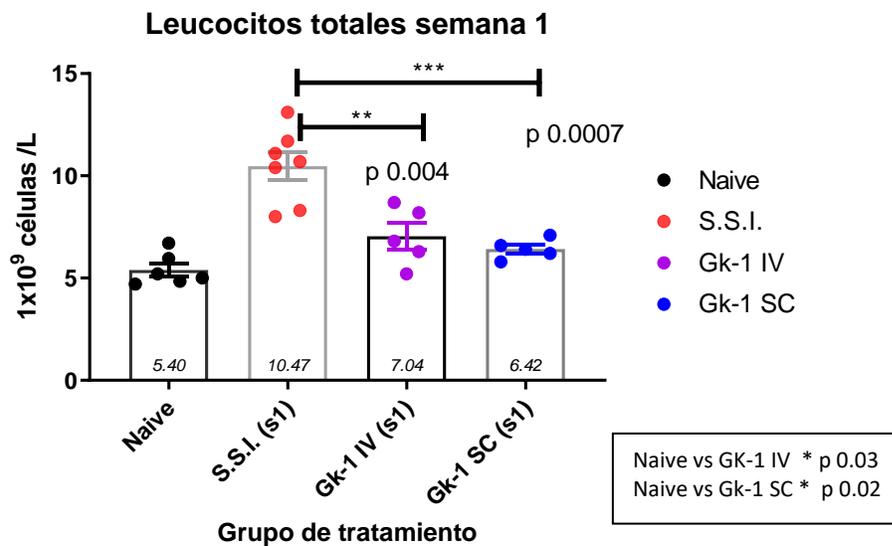
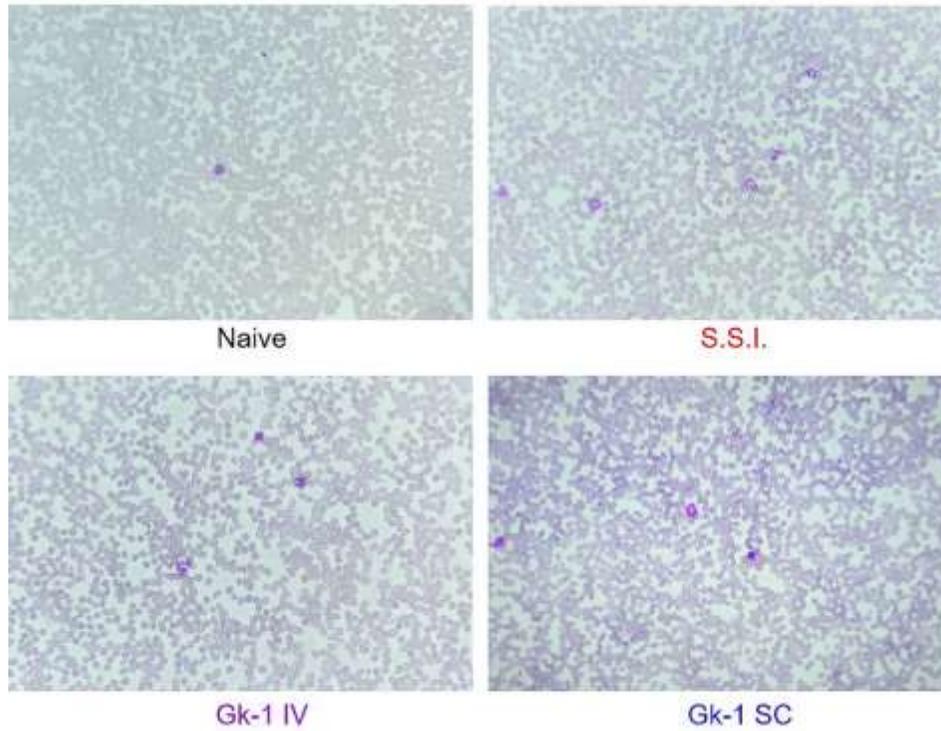


Figura 29 Progresión reacción leucemoide en sangre periférica a semana 1 de tratamiento. Frotis y conteo total de leucocitos. Se observa un incremento en número de leucocitos por campo en los frotis sanguíneos. Los resultados del WBC muestran que el número de leucocitos en sangre periférica es significativamente menor en los grupos tratados con GK-1 comparados con el control. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E.

Extendidos de sangre periférica 400x.
Extendidos de sangre periférica 40x.

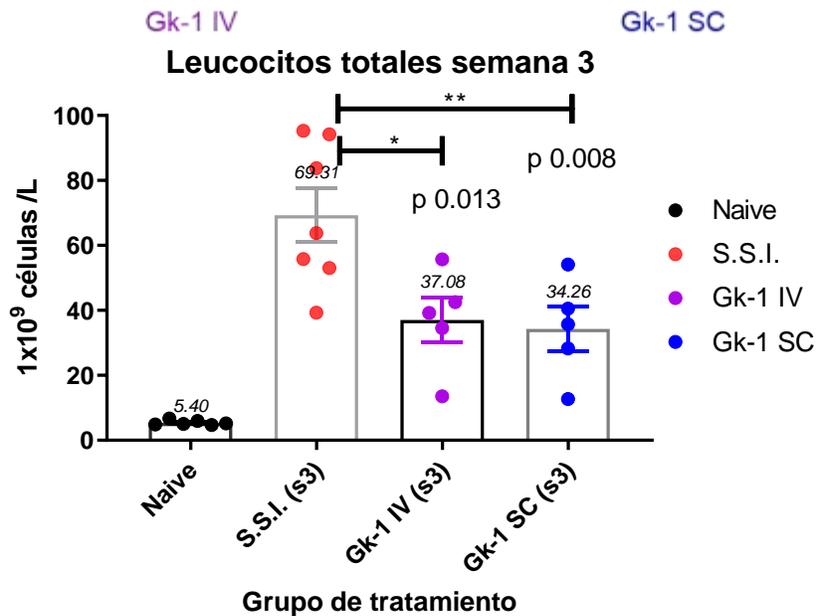
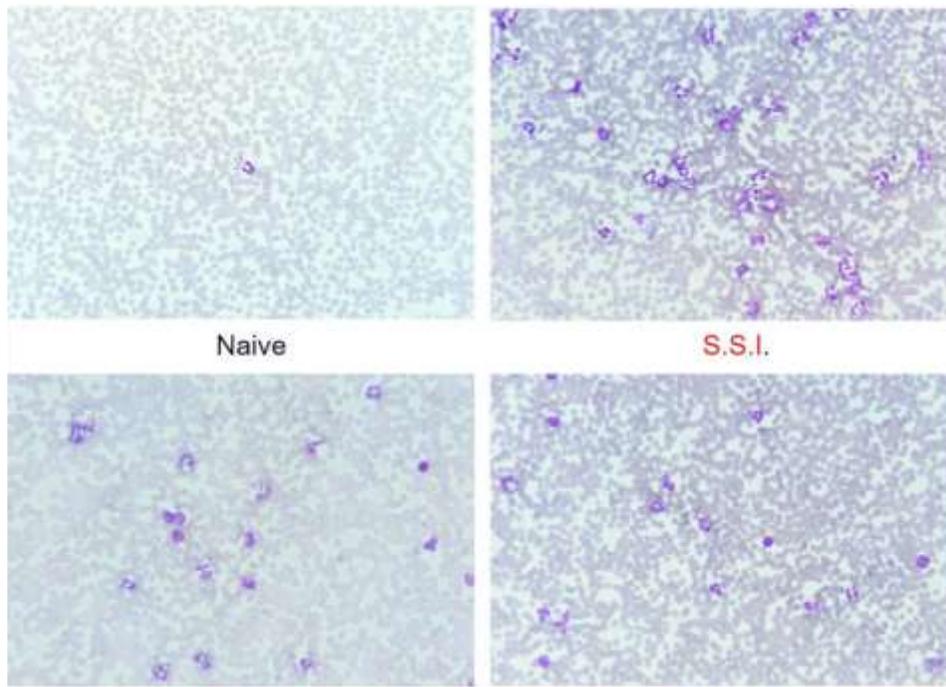


Figura 30 Progresión reacción leucemoide en sangre periférica a semana 3 de tratamiento. Frotis y conteo total de leucocitos. Se aprecian diferencias en la progresión de la reacción leucemoide siendo significativamente menor en los grupos tratados con GK-1. El frotis sanguíneo se observa menor número de leucocitos por campo, efecto que se corrobora con los resultados del WBC. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E

Extendidos de sangre periférica 400x.

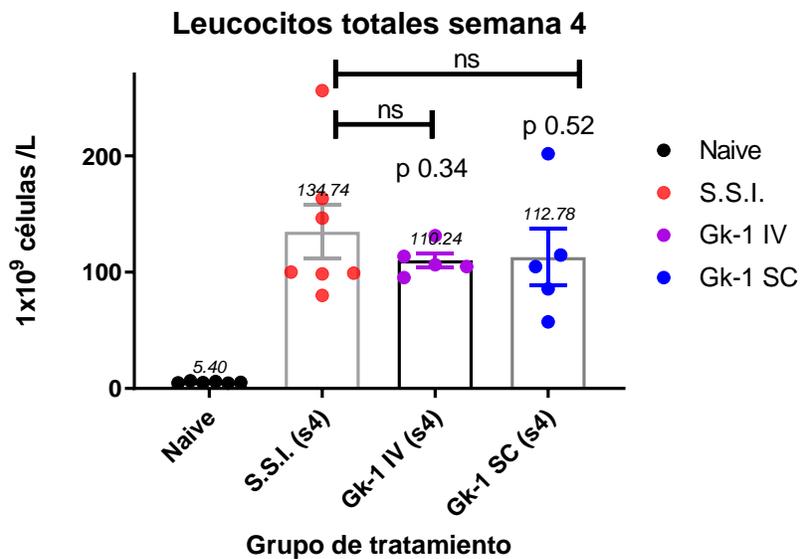
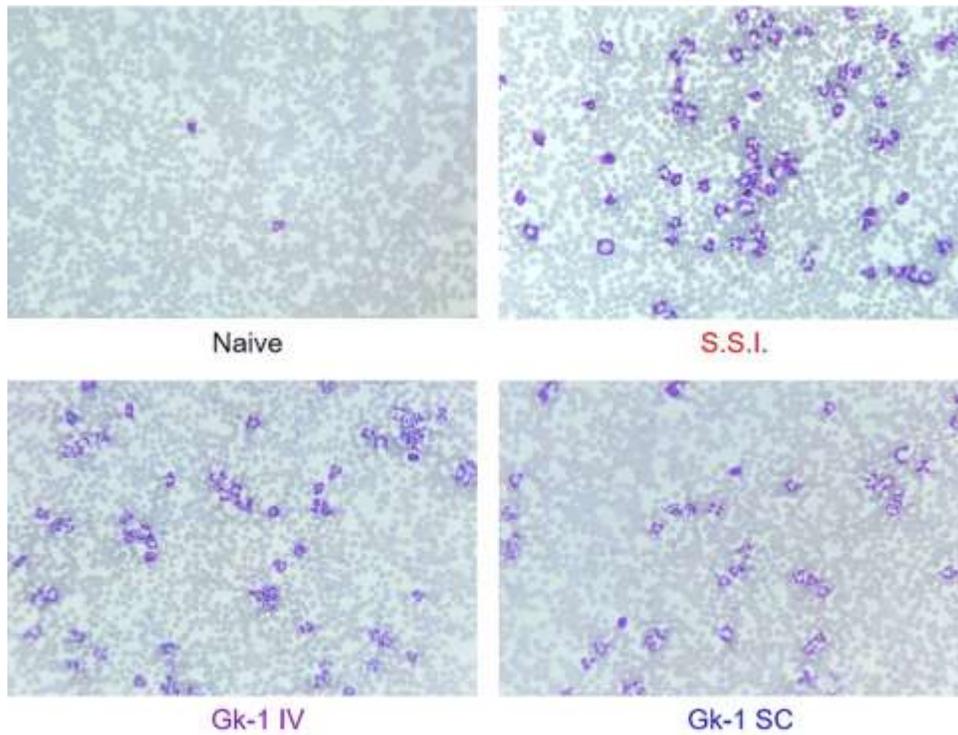


Figura 31 Progresión reacción leucemoide en sangre periférica a semana 4 de tratamiento. Frotis y conteo total de leucocitos. Se aprecia la progresión de la reacción leucemoide incrementándose drásticamente el número de leucocitos por campo, efecto que se corrobora con los resultados del WBC. No se encontró significancia estadística en este punto del tratamiento. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E

Cabe destacar que el tratamiento con GK-1 mostro significativamente menos leucocitos en sangre periférica en etapas tan tempranas de tratamiento (primera semana, 1 dosis administrada) comparado con el grupo SSI. Al comparar los grupos de tratamiento con GK-1 con el grupo naive (sin implantación 4T1), los niveles de leucocitos fueron significativamente más elevados en los grupos GK-1, resultado que señala que si bien el tratamiento reduce la reacción leucemoide con respecto al grupo tratado con SSI, no la elimina (GK-1 IV vs Naive $p < 0.037$, GK-1 SC vs Naive $p < 0.027$). Figuras 29, 32.

En la figura 30, se ilustra la progresión de la reacción leucemoide a la semana 3 de tratamiento, siendo de forma evidente, el incremento en leucocitos observables por campo (leucocitosis). De forma destacable se aprecia que en los grupos de tratamiento con GK-1 existe un menor número de leucocitos observables comparados con el grupo control SSI, es decir una reducción en la progresión de la reacción leucemoide hasta este punto del modelo. Este efecto que se corrobora con los resultados del recuento total de leucocitos, el cual demostró una diferencia estadísticamente significativa en el número de leucocitos en sangre de los ratones, el cual es menor en los grupos de tratamiento GK-1 (IV y SC) comparados con el grupo control (SSI). Los datos obtenidos, expresados en 1×10^9 células /L, fueron los siguientes; Naive (5.4 ± 0.77), GK-1 IV (37.08 ± 15.36), GK-1 SC (34.26 ± 15.29) y en grupo control SSI (69.31 ± 21.93). Se realizó prueba t (Welch test) para determinar significancia estadística; GK-1 IV vs SSI $p < 0.013$, GK-1 SC vs SSI $p < 0.008$, Naive vs SSI $p < 0.0002$. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las vías de administración de GK-1; GK-1 IV vs GK-1 SC, $p = 0.778$. Figuras 30, 32.

A la semana 4 de tratamiento, el recuento total de leucocitos mostro un cuantioso incremento con promedios que sobrepasaron las 100×10^9 células /L en todos los grupos de tratamiento, comparando con los parámetros normales de ratones naive (5.4×10^9 células /L), esto refiere un incremento de más de 20 veces los parámetros normales. En los extendidos de sangre periférica se evidencian estos efectos, una severa leucocitosis granulocítica, se aprecia un gran contraste en el número de células por campo tomando como referencia el grupo naive, figura 31. Los datos obtenidos, expresados en 1×10^9 células /L, fueron los siguientes; Naive (5.4 ± 0.77), GK-1 IV (110.2 ± 13.39), GK-1 SC (112.8 ± 54.25) y grupo control SSI (134.7 ± 61.15). En este punto del tratamiento no se encontró diferencia estadísticamente significativa en los grupos de tratamiento. GK-1 IV vs SSI $p = 0.34$, GK-1 SC vs SSI $p = 0.54$. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las vías de administración de GK-1; GK-1 IV vs GK-1 SC, $p = 0.92$.

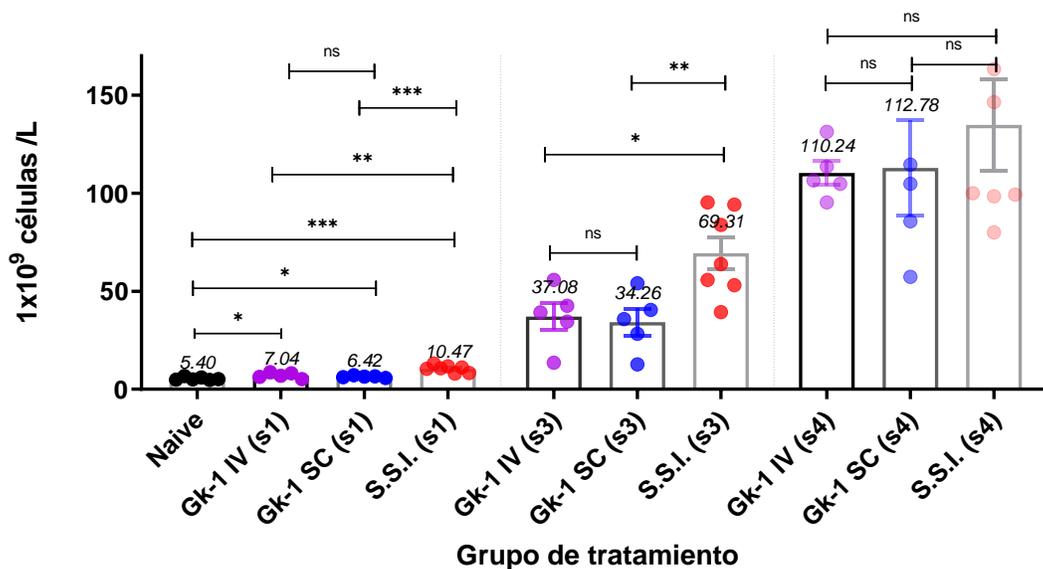


Figura 32 Sumario conteo total de leucocitos en sangre periférica. Se muestra la recopilación del conteo WTC de la semana 1 a semana 4 de tratamiento. El tratamiento con GK-1 modifica significativamente la progresión de la leucocitosis (reacción leucemoide) de la semana 1 a 3 de tratamiento. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E

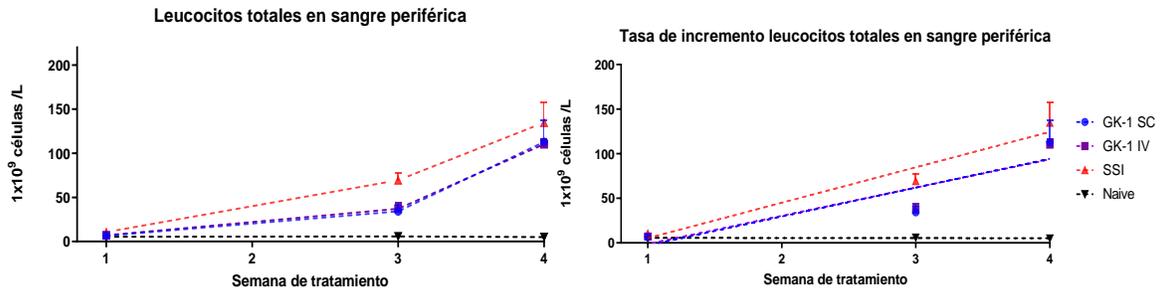


Figura 33 Número total de leucocitos en sangre periférica y su tasa de variación en el tiempo. Se aprecia un notable incremento en leucocitos circulantes en los grupos de tratamiento a solo 28 días post detección de tumor palpable.

Se procedió a tabular los datos obtenidos para obtener la regresión lineal que indica la variación de cambio de leucocitos en el tiempo, es decir la tasa de incremento, al comparar las pendientes de los grupos de tratamiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, figura 33.

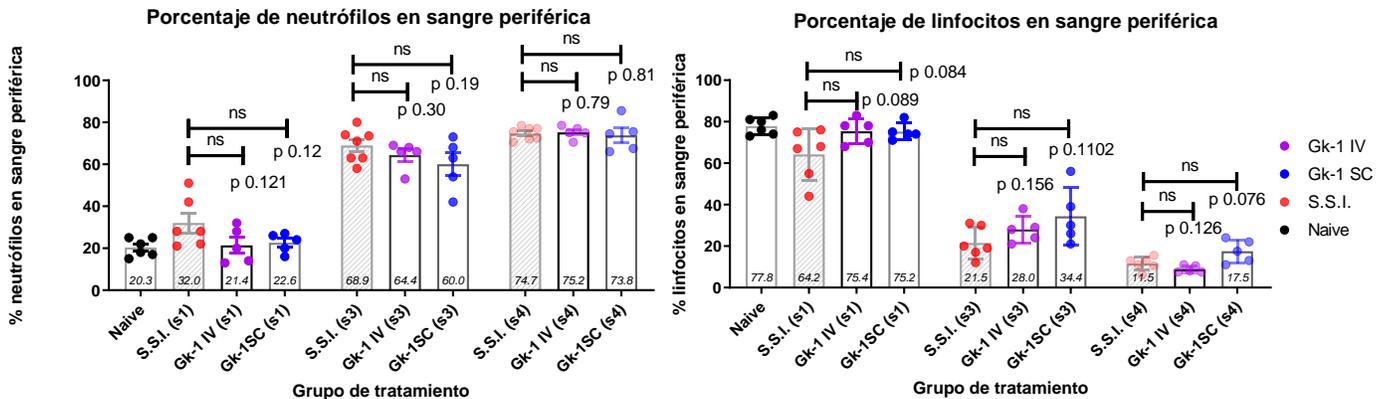


Figura 34 Porcentaje de neutrófilos y linfocitos en sangre periférica de los grupos de estudio. Se aprecia un incremento gradual en el porcentaje de neutrófilos y un decremento el porcentaje de linfocitos. No se encontró significancia estadística en los grupos de estudio. Se realizó t test con corrección Welch ($P < 0.05$), barras representan E.E

Tal como se indica en la sección 6.6, los extendidos de sangre periférica se emplearon para realizar el recuento diferencial de leucocitos (estudio que se realizó bajo un esquema en ciego para no tener sesgo). En la figura 34 se observan los resultados obtenidos. Tal como se menciona en la literatura, el progreso del modelo 4T1 denota

un incremento en el porcentaje de células con morfología de granulocitos (neutrófilos) y una disminución porcentual en los valores de leucocitos, como se aprecia en la figura, el tratamiento con GK-1 no disminuyó el porcentaje de estas células con respecto al grupo tratado con SSI. Tras tabular los datos porcentuales obtenidos se obtuvo la regresión lineal que indica la tasa de variación porcentual de los datos durante el periodo de estudio, es decir la razón de cambio con la que se da incremento o decremento porcentual en el diferencial de leucocitos en el tiempo. Al comparar las pendientes de los grupos de tratamiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Se continuó el análisis obteniendo el conteo absoluto de neutrófilos (ANC) y el conteo absoluto de linfocitos (ALC). Valores que se obtienen multiplicando el número total de leucocitos por el porcentaje de neutrófilos o linfocitos totales obtenidos en conteo diferencial, generando los resultados que se presentan en la figura 35. Al obtener los números absolutos se evidenció que sí existían diferencias significativas en el número total de neutrófilos, siendo significativamente menores en los grupos de tratamiento GK-1 (IV, SC) comparados con el control (SSI) desde la semana 1 a la semana 3 de tratamiento. A la semana 4 se perdió la significancia estadística. Resultado consistente con lo observado en el conteo total de leucocitos (WBC). Respecto a los niveles de linfocitos en circulación, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con GK-1 (IV vs SC), además de que su conteo se mantuvo relativamente inalterado, resultado esperado con base a lo reportado por la literatura en el que se describe que el modelo 4T1 induce una granulocitosis (que compone la reacción leucemoide) con ausencia de linfopenia, tal como se mencionó en la figura 9 de la sección 2.2.3 [28].

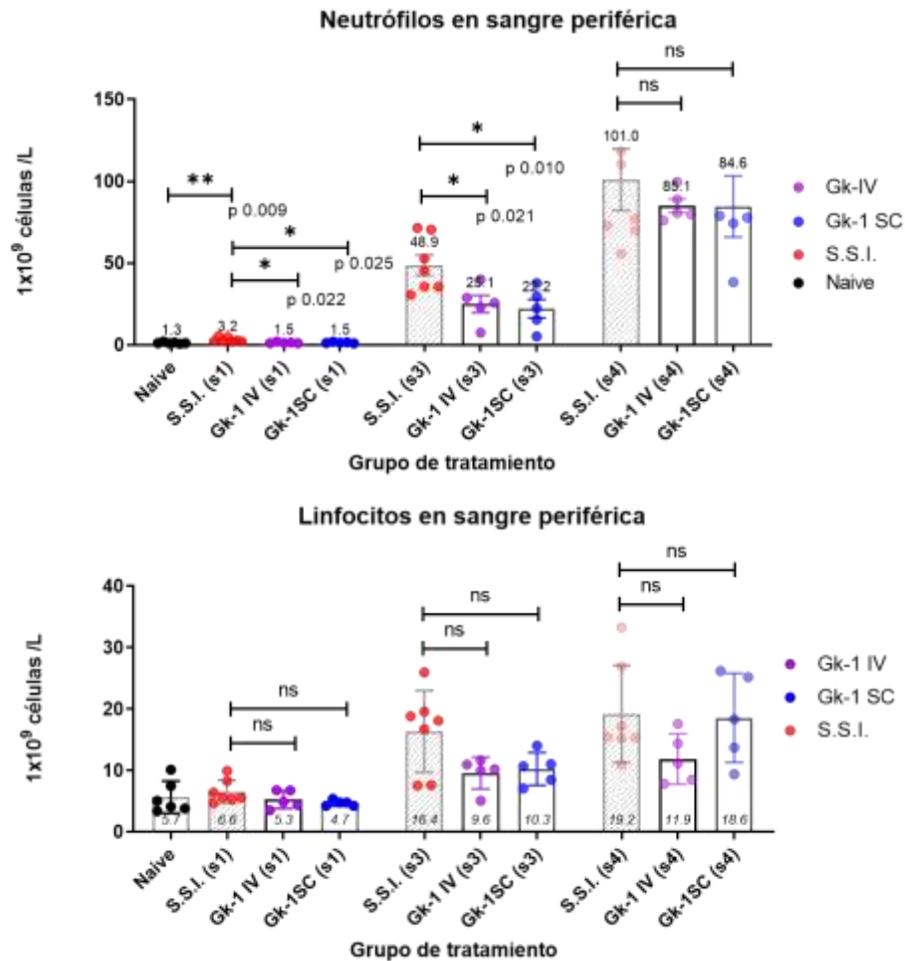


Figura 35 Números absolutos de neutrófilos y linfocitos en sangre periférica. El tratamiento con GK-1 redujo de forma significativa el número de neutrófilos en circulación en las semanas 1 a 3, no hubo efectos significantes sobre los números totales de linfocitos en circulación a lo largo del tratamiento. Se realizó t test ($P < 0.05$), barras representan E.E.

Los datos correspondientes al número de neutrófilos, a la semana 1, expresados en 1×10^9 células /L, se presenta a continuación; Naive (1.34 ± 0.47), GK-1 IV (1.47 ± 0.40), GK-1 SC (1.54 ± 0.36) y en grupo control SSI (5.45 ± 3.20). Se realizó prueba t test para determinar significancia estadística; GK-1 IV vs SSI $p < 0.022$, GK-1 SC vs SSI $p < 0.025$, Naive vs SSI $p < 0.009$. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las vías de administración de GK-1; GK-1 IV

vs GK-1 SC, $p = 0.8$. Ni al comparar Gk-1 (IV, SC) con el naive. GK-1 IV vs Naive $p = 0.63$, GK-1 SC vs Naive $p < 0.46$.

A la semana 3, los números de neutrófilos se incrementan notablemente en todos los grupos, sin embargo, se continúa viendo una reducción estadísticamente significativa en la granulocitosis generada por el modelo 4T1 (Reacción leucemoide) en los ratones que recibieron tratamiento con GK-1, al compararlos con el control (SSI). Datos expresados en 1×10^9 células /L; GK-1 IV (25.11 ± 11.74), GK-1 SC (22 ± 0.36) y en grupo control SSI (48.91 ± 16.78). GK-1 IV vs SSI $p < 0.021$, GK-1 SC vs SSI $p < 0.013$. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las vías de administración de GK-1; GK-1 IV vs GK-1 SC, $p = 0.71$.

En la semana 4 la granulocitosis progresó drásticamente y no se encontraron diferencias significantes entre los grupos de tratamiento. Datos expresados en 1×10^9 células /L; GK-1 IV (85.11 ± 9.4), GK-1 SC (84.63 ± 41.8) y en grupo control SSI (101 ± 49.98).; GK-1 IV vs SSI $p < 0.5$, GK-1 SC vs SSI $p < 0.56$, Figura 35.

En caso de los linfocitos sus números absolutos no se vieron alterados en gran medida durante el modelo de estudio, careciendo de significancia estadística la comparativa entre grupos de tratamiento. Si bien el porcentaje de linfocitos cae drásticamente, esto se debe únicamente al gran incremento de granulocitos, que son los que incrementan el total de leucocitos en circulación generando la reacción leucemoide. Tal como se aprecia en la figura 34, los números de linfocitos se mantuvieron estables en gran medida comparados con los neutrófilos. Al tabular los datos y generar la regresión lineal de los mismos, se apreció que en el caso de los linfocitos las pendientes

obtenidas fueron cercanas a una línea horizontal, con lo que se confirma que sus niveles se mantuvieron constantes, sin diferencias entre grupos.

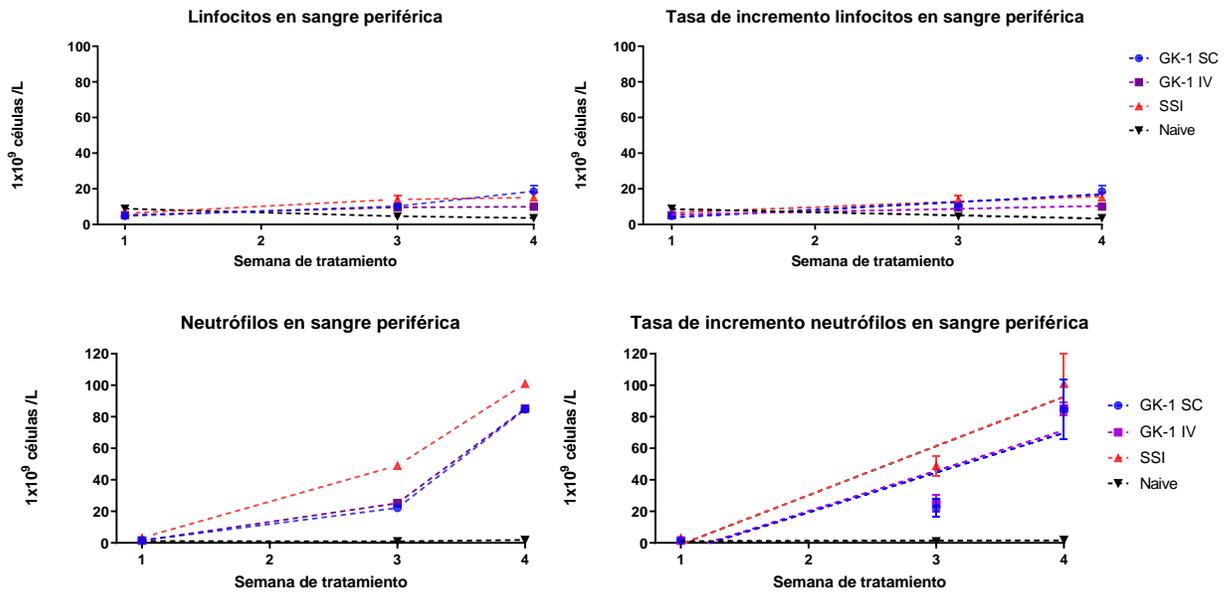


Figura 36 Números absolutos de linfocitos y neutrófilos en sangre periférica y sus tasas de variación. Se aprecia un acelerado incremento en el porcentaje de neutrófilos circulantes mientras existe una caída en el porcentaje de linfocitos, en los grupos de tratamiento no se encontraron diferencias significativas en las tasas de variación de estos cambios porcentuales en el diferencial de leucocitos.

En el caso de los neutrófilos sus números se incrementaron de menos de 2×10^9 células /L en la semana 1 de tratamiento a más de 80×10^9 /L para la semana 4, números similares a los reportados por la literatura [28]. Al comparar las pendientes de los grupos de tratamientos no se encontraron diferencias significativas, la tasa de incremento de neutrófilos en sangre periférica fue similar a las 4 semanas de tratamiento. Sin embargo, cabe destacar que en el periodo comprendido entre la semana 1 y semana 3 de tratamiento con GK-1 sí se presentaron cambios significativos en el número de neutrófilos circulantes, figura 35.

8 Discusión de resultados

Tal como se ha reportado anteriormente y como sustenta este trabajo de investigación, el tratamiento con el péptido inmunomodulador GK-1 muestra interesantes propiedades terapéuticas en el tratamiento de patologías tumorales [25][34][26]. En este modelo de cáncer de mama murino 4T1, GK-1 ha mostrado efectos positivos sobre la progresión de la enfermedad neoplásica, en cuanto a su capacidad de reducir significativamente la tasa de crecimiento tumoral, tanto administrado por vía intravenosa como subcutánea. Este efecto es consistente con lo reportado previamente por *Torres-García, et al. (2017)* [26] y por *Perez-Torres, et al. (2013)* [25], quienes observaron un efecto similar.

El tratamiento con 100 μg (IV y SC) de GK-1 produce una disminución significativa de la tasa de crecimiento tumoral, lo que se relaciona con una disminución en peso total del tumor primario. La reducción en la tasa de volumen tumoral se relaciona con la generación de tumores de menor volumen y por consiguiente de menor masa. Esto se observa en la figura 15, donde se aprecia la generación de tumores significativamente de menor peso con el tratamiento con GK-1 comparados con el control. Este efecto puede relacionarse con el incremento en áreas necróticas reportadas anteriormente en modelos de cáncer de mama y melanoma tratados con GK-1, donde se reportan diferencias estadísticamente significativas en el índice necrótico de tumores primarios [25][26].

La severidad de la esplenomegalia asociada a la enfermedad neoplásica se ve reducida durante el tratamiento con GK-1. Lo que podría relacionarse con una disminución en acumulación de granulocitos dentro de bazo procedentes de circulación sanguínea. Como se explicó en la sección 2.2.3, el modelo de mama 4T1 cursa con una característica reacción leucemoide y esplenomegalia. La severidad de la esplenomegalia asociada a este modelo se ve reducida durante la terapia con GK-1 hasta el día 28 de tratamiento, esta reducción es estadísticamente significativa tras normalizar el peso del bazo y el peso total correspondiente a cada ratón de estudio, tal como se recomienda por la literatura *Xuefeng, et al. (2016)* [31], figura 16. La reducción en la esplenomegalia se asocia a un mejor desenlace en patologías tumorales, resaltando que el tratamiento con GK-1 reduce, pero no evita la presencia de esplenomegalia.

Se conoce que el peso del bazo está directamente relacionado con la acumulación de leucocitos (CD-45⁺) en bazo y que conforme progresa el modelo 4T1 se incrementa notablemente el número de granulocitos inmaduros CD11b⁺Gr-1⁺(MDSC), tanto en bazo como en circulación sanguínea, hasta comprender entorno al 80% del total de leucocitos en bazo, figura 10 [28]. Aún se desconoce si la esplenomegalia es resultado de la acumulación del exceso de granulocitos generados por hematopoyesis extramedular en bazo o si infiltran este órgano desde circulación sanguínea, donde se encuentran en exceso fruto de la reacción leucemoide, o producto de ambos fenómenos [28]. En este sentido, se tiene el antecedente de la importante hematopoyesis extramedular en bazo, propia de roedores y que en ratones sanos llega a comprender el 30% de la hematopoyesis [30]. Por lo que sería esperable considerar que en el modelo 4T1 el bazo sea un productor importante de estos granulocitos

inmaduros CD11b⁺Gr-1⁺(MDSC). Aunado a esto, experimentos realizados por *Sevmis, et al. (2017)* en modelo 4T1 donde se realizó esplenectomía sin resección de tumor primario, muestran un incremento significativo en circulación de granulocitos CD11b⁺Gr-1⁺(MDSC) comparados con ratones sin esplenectomía, ya que, al eliminar el bazo como reservorio principal de estas células, incrementaron su número en sangre periférica (reacción leucemoide) con un consiguiente aumento en la infiltración en pulmón y otros tejidos [35].

El efecto positivo del tratamiento con GK-1 sobre la esplenomegalia, pudiera estar relacionado con una disminución en circulación sanguínea del G-CSF producido por el tumor primario 4T1, efecto que podría ser inducido indirectamente por GK-1 como consecuencia de la reducción de tamaño del tumor primario y la tasa de crecimiento tumoral. Se podría esperar que tumores primarios 4T1 de menor volumen secreten menor G-CSF. Se sabe que G-CSF se incrementa gradualmente en circulación conforme el modelo tumoral 4T1 progresa y el tumor aumenta su volumen, tabla 2 [28]. Con anterioridad se reportó que el tratamiento con GK-1 reduce los niveles de MG-CSF en tejido pulmonar comparado con el control sin tratamiento, en el modelo tumoral 4T1 [26]. Sin embargo aún no se han evaluado si existen modificaciones, aunque sean transitorias, en los niveles de G-CSF sanguíneo. El que el GK-1 retarde el crecimiento tumoral podría significar una menor cantidad de G-CSF de origen tumoral lo que reduciría la hematopoyesis exacerbada, la reacción leucemoide y a su vez la esplenomegalia. Puesto que los granulocitos de la reacción leucemoide se almacenan en bazo produciendo esplenomegalia (además de la propia hematopoyesis extramedular en bazo) [28][31]. Estudios en el modelo 4T1 con resección de tumor primario, muestran una caída en los niveles de G-CSF y reversión de esplenomegalia tras la escisión tumoral, demostrando que el tumor primario es la principal fuente de

G-CSF y su relación con la esplenomegalia, tal como menciona Bosiljic *et al.* (2019) [36].

La leucocitosis para-neoplásica o reacción leucemoide, es un incremento anormal en el número de leucocitos en circulación sanguínea, ocasionada por una perturbación en la hematopoyesis, provocada por factores solubles secretados por tumores sólidos [12]. Su presencia en enfermedades neoplásicas se asocia con un pobre pronóstico en la supervivencia[37]. La reacción leucemoide característica del modelo 4T1 es inducida principalmente por la sobreexpresión de G-CFS, producido por el tumor primario 4T1, generando una hematopoyesis exacerbada que progresa junto al crecimiento tumoral. El suero sanguíneo de ratones con tumor 4T1 presenta niveles elevados de G-CSF el cual se incrementa gradualmente a medida que el tumor progresa [28][31]. La principal población que compone la reacción leucemoide 4T1 consta de granulocitos aberrantes que presentan un fenotipo CD11b+Gr-1+, correspondiente a MDSC granulocíticas (indistinguibles morfológicamente de neutrófilos maduros), que incrementa su proporción en circulación sanguínea hasta comprender cerca del 80% de leucocitos totales [28][29].

El tratamiento con 100 GK-1 100 µg (IV) y (SC), mostró una reducción estadísticamente significativa en la leucocitosis (reacción leucemoide) característica del modelo 4T1, durante las semanas 1 a 3 de tratamiento, comparada con el control, figuras 29 a 32. Estos efectos positivos sobre la reacción leucemoide se relacionan directamente con una disminución en los números de granulocitos (granulocitos) en circulación sanguínea comparado con el grupo control. Si bien los números totales de leucocitos continuaron aumentados considerablemente con la progresión del modelo respecto al naive (sin implantación de células 4T1), GK-1 mantuvo un efecto positivo

durante este fenómeno hasta la semana 3 de tratamiento. Este efecto pudiera relacionarse con lo mencionado anteriormente respecto a los niveles de G-CSF producidos por el tumor primario, al retardarse el incremento en el volumen tumoral en los ratones tratados con GK-1 estos producirían menores cantidades de G-CSF. Como se mencionó previamente, el tejido tumoral mamario 4T1 induce perturbaciones epigenéticas y en la expresión de genes reguladores de hematopoyesis (locus Hoxa9) vía sobreproducción tumoral de G-CFS, figura 37, [13]. En consecuencia, se produce desregulación en la hematopoyesis con sobreproducción de células mieloides inmaduras, leucocitosis, incremento de hematopoyesis extramedular y reacción leucemoide [31].

A la semana 4 de tratamiento se perdió este efecto y los números de leucocitos, anormalmente elevados, fueron similares al control, figura 31. Esto puede deberse a que el volumen tumoral del grupo de tratamiento GK-1 llega a un punto en el que a pesar de tener un menor volumen que el grupo control, la producción de G-CFS alcanza un umbral máximo de efecto biológico sobre la hematopoyesis. Y a partir del cual el número de leucocitos pierde significancia entre grupos. Cabe recordar que en este punto del modelo los promedios de WBC sobrepasaron las 100×10^9 células /L en todos los grupos de tratamiento, comparando con los parámetros normales (naive) 5.4×10^9 células /L, es decir, un incremento de más de 20 veces los parámetros normales.

En la mayoría de las cepas de ratón destinadas a investigación, los diferenciales hemáticos reportados son: Linfocitos (70 - 80%), neutrófilos (20 - 30%), eosinófilos (0 - 7%), basófilos (0-1%), monocitos (1 - 2%), con un conteo total de $2 - 5 \times 10^3$ células/ μ L [30]. Aunado a esta información es importante considerar que la reacción

leucemoide se acompaña de una severa esplenomegalia resultado de una acumulación de granulocitos CD11b⁺Gr-1⁺ en la pulpa roja [28]. Adicionalmente, se ha reportado la infiltración de granulocitos Gr-1⁺ en pulmones metastásicos de ratones implantados con células 4t1, llegando a comprender el 81% del total de linfocitos en pulmón a 29 días post-implantación. Asociándose este infiltrado a la modificación del microambiente tumoral y la progresión metastásica [29].

Respecto a la composición de la reacción leucemoide, se obtuvieron los números absolutos de neutrófilos y linfocitos. Encontrándose tal y como indica la literatura, [28], una severa granulocitosis sin alteración relevante en los números de linfocitos circulantes. El incremento en los número de leucocitos se deben principalmente a una sobreproducción de granulocitos, mientras que los linfocitos se mantuvieron relativamente constantes. Las variaciones porcentuales en el diferencial de leucocitos se deben a este hecho. De forma consistente con los resultados del WBC, en los grupos de tratamiento GK-1 se encontró una reducción significativa en el número de neutrófilos en sangre periférica comparados con el control, durante la semana 1 a 3 de tratamiento. Perdiéndose la significancia a la semana 4. Estos resultados tienen relevancia terapéutica, dado que se ha reportado, que estos neutrófilos circulantes infiltran diversos tejidos entre los que se encuentran bazo y pulmón [28][29][36][38]. De modo que, al reducirse significativamente su número en circulación, al menos durante un periodo de tiempo, potencialmente se reduciría el número de granulocitos infiltrantes. Efecto que podría estar relacionado con la reducción de esplenomegalia y a un menor número de nichos premetastásicos en pulmón, ya que este infiltrado de granulocitos se asocia a la promoción de metástasis en pulmón figura 37.

Como se menciona en la sección 2.2.2, se ha publicado extensamente que, los granulocitos inmaduros con morfología de neutrófilos son las células que predominan en la reacción leucemoide del modelo 4T1. Estas células exhiben un fenotipo CD11b⁺Gr-1⁺(MDSC), y gradualmente se ven incrementadas en circulación sanguínea, bazo y pulmones metastásicos, figuras 8, 10, 11 [29][28][36]. Pese a que en el presente trabajo no se realizó la identificación del fenotipo CD11b⁺Gr-1⁺(MDSC), es altamente probable que los granulocitos incrementados en circulación sanguínea (reacción leucemoide), correspondan a este tipo de células. Esta inferencia es factible considerando que la sobreproducción de estas células (MDSC) y sus efectos inmunosupresores y prometastásicos se encuentran extensamente caracterizados en el modelo 4T1, figura 37.

El tratamiento intravenoso con GK-1 demostró ser eficaz en la disminución significativa del número de focos metastásicos tanto en pleura como en parénquima pulmonar, respecto al control (SSI), al día 28 de tratamiento, figura 17. Este resultado es consistente con lo previamente reportado por *Torres-García, et al. (2017)* [26], quien reporto que el tratamiento con GK-1 redujo significativamente el número de macrometástasis en pulmones de ratones implantados con células 4T1.

Tal como se observa en las figuras 18,19, 22 y 23; los pulmones de ratones tratados con GK-1 muestran un mejor estado patológico general, al apreciarse una menor diseminación metastásica en pleura y parénquima pulmonar comparado con el grupo control. Al comparar el estado patológico de ambos grupos del día 21 al día 28, se aprecia que la progresión metastásica fue más severa en el grupo control. Este importante efecto terapéutico puede estar relacionado con la modificación del

microambiente metastásico donde GK-1 podría modificar el grado de inmunosupresión generado por la enfermedad neoplásica.

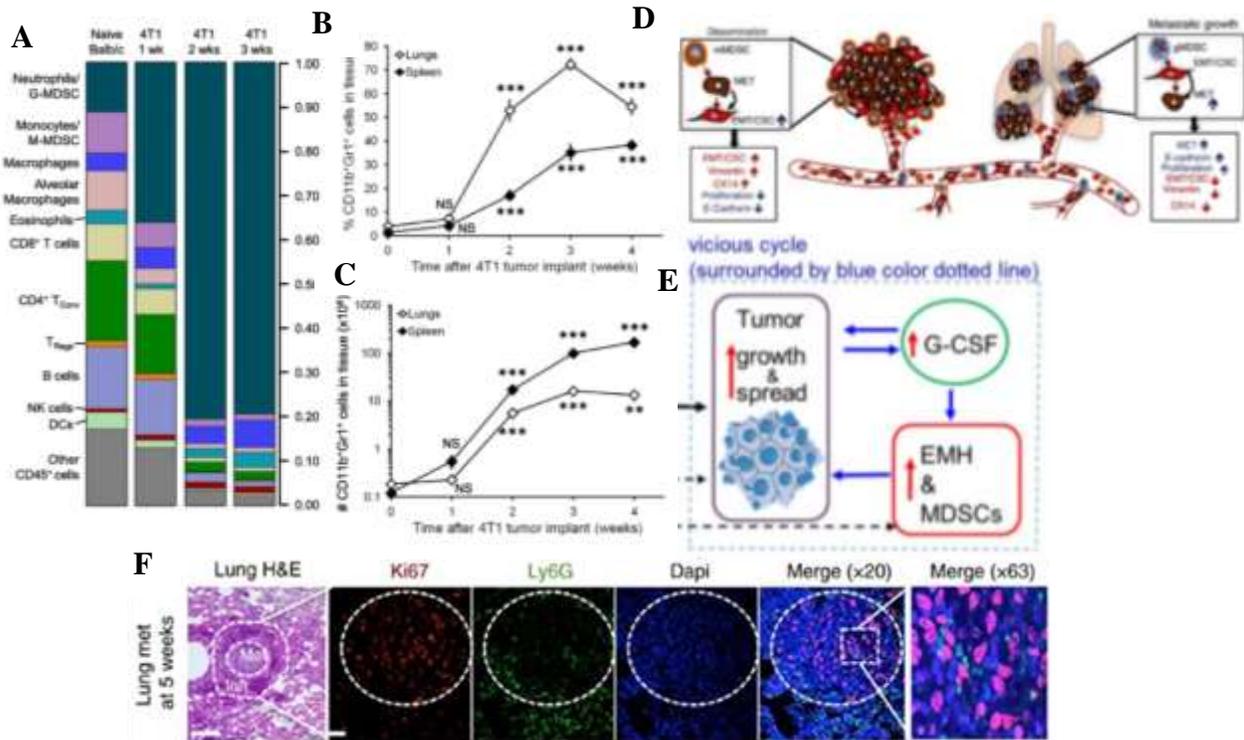


Figura 37 Características de la enfermedad neoplásica generada por el modelo 4T1 relevantes para proponer mecanismos de acción terapéutica de GK-1. Modificado de Ouzounova et al. 2017, Xuefeng et al. 2016. **A)** Proporción de estirpes celulares presentes en pulmones naive y 4T1. A partir de la semana 2 los Neutrófilos/MDSC granulocíticas comprenden el 80% de población celular en pulmón. **B)** Incremento de porcentaje de células CD11b⁺Gr1⁺ (MDSC) en pulmones y bazo. **C)** Incremento de número absoluto de células CD11b⁺Gr1⁺ (MDSC) en pulmones y bazo. **D)** MDSC monocíticas promueven la transición epitelio-mesénquimal en tumor, células tumorales viajan por torrente sanguíneo asociadas a MDSC granulocíticas y forman nichos metastásicos en pulmón, MDSC granulocíticas promueven la transición mesénquimal-epitelial y promueven el establecimiento de la metástasis y su crecimiento. **E)** Circulo vicioso producido por el tumor 4T1, la producción tumoral de G-CSF ocasiona desregulación en la hematopoyesis extramedular (EMH), produce granulocitos inmaduros (MDSC) que promueven el crecimiento tumoral y metástasis, el tumor primario de mayor tamaño incrementa su producción de G-CSF y el ciclo se repite. **F)** Asociación directa en el microambiente metastásico en foco metastásico de pulmón 4T1, células tumorales (Ki67) interaccionan con el infiltrado granulocítico MDSC (Ly6G) promoviendo su expansión y un microambiente inmunosupresor.

Torres-García, et al. (2017) previamente reporto que el tratamiento con GK-1 en modelo murino 4T1 reduce significativamente las quimiocinas CCL2 y CCL3 en tejido pulmonar [26]. CCL2 se ha reportado como una quimiocina que promueve la metástasis a pulmon en modelo 4T1[39]. Pues moviliza MDSC granulocíticas al nicho

pre-metastásico en pulmón y promueve la secreción de S100A8 (Calgranulina A) formando un microambiente inmunosupresor [15]. Se ha reportado además que CCL3 es quimioatrayente de neutrófilos a nichos pre-metastásicos en cáncer de mama [40] y la expresión de CCL3 se encuentra elevada en MDSC granulocíticas (Neutrófilos de fenotipo inmunosupresor) aisladas de pulmones metastásicos en modelo 4T1 [38].

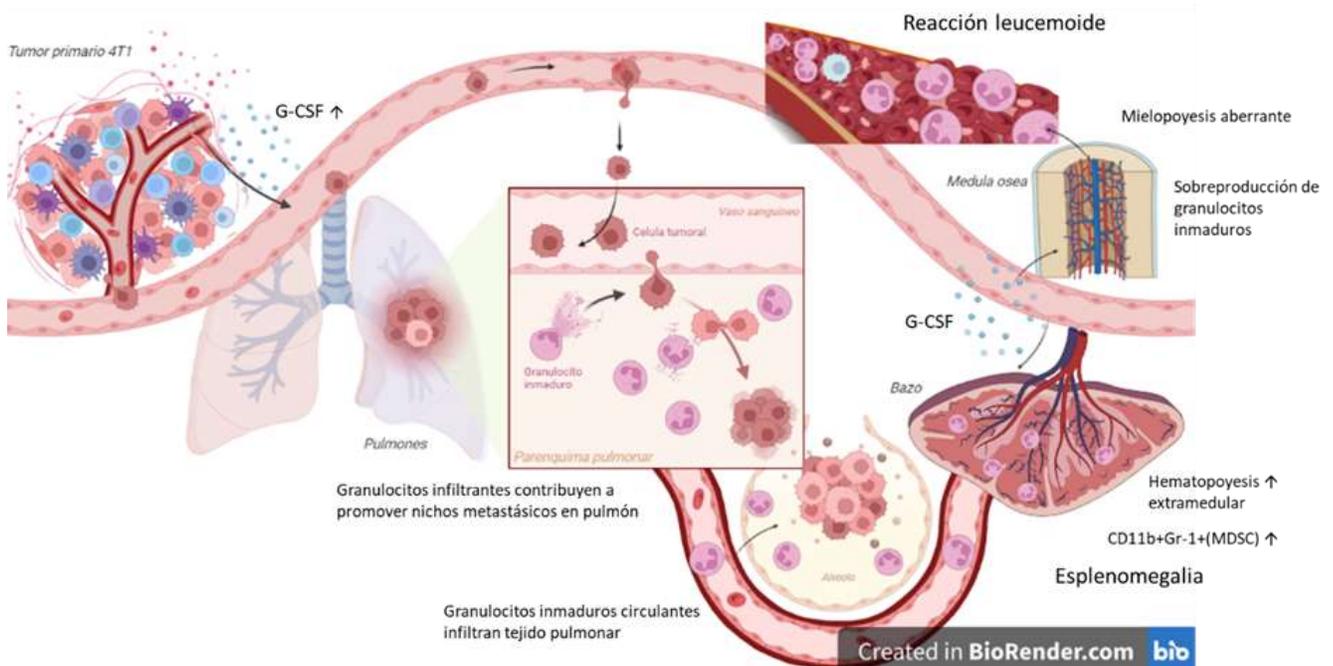


Figura 38 Efectos del tumor primario 4T1 en la progresión de esplenomegalia, reacción leucemoide y su relación con la formación de nichos metastásicos.

En sintonía con los demás efectos terapéuticos reportados, de comprobarse que los neutrófilos en circulación que se reducen durante las primeras 3 semanas de tratamiento corresponden a MDSC y que su infiltración en pulmón se ve disminuida, podría relacionarse con una menor formación de nichos pre-metastásicos en pulmón y con una reducción en la progresión del foco metastásico al disminuirse los efectos supresores que las MDSC producen en pulmón. Las cuales se ha reportado forman parte importante del microambiente tumoral y metastásico en el modelo 4T1, figura

37, [29][36]. Además se ha demostrado que la exposición prolongada a altos niveles de G-CSF, como en el caso de su sobreexpresión de origen tumoral, resulta en una metástasis más agresiva como resultado de la producción y movilización de granulocitos CD11b⁺Gr-1 (MDSC) a pulmón [41].

Tratamiento con GK-1 genera efectos positivos sobre la progresión de la enfermedad generada por el modelo de cáncer de mama 4T1

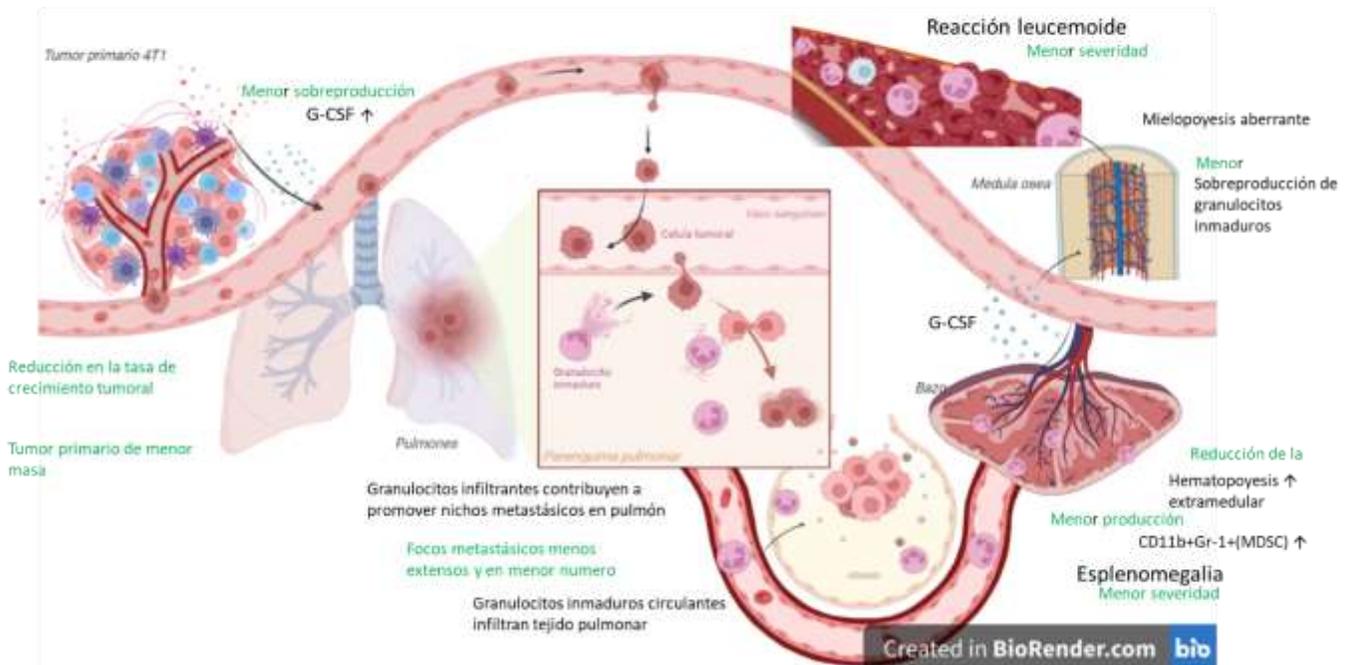


Figura 39 (Propuesta) Efectos positivos del tratamiento con GK-1 sobre la progresión de la enfermedad generada por el modelo de cáncer de mama 4T1, enfocado en esplenomegalia, reacción leucemoide y progresión de nichos metastásicos.

Adicionalmente, GK-1 podría modificar la formación del nicho linfovascular premetastásico en el ganglio drenante, y como consecuencia retardar, mas no evitar, el establecimiento de metástasis en ganglio.

Se puede inferir que los efectos terapéuticos positivos del tratamiento con GK-1, influyen no solo a nivel de tumor primario, sino que repercutirían de forma sistémica, tanto en la mielopoyesis asociada a cáncer (reacción leucemoide), la reducción de

esplenomegalia y la importante reducción de focos metastásicos en pulmones. A pesar de que en el presente trabajo de investigación no se mostró un mecanismo directo que relacionara todos los hallazgos reportados, se puede especular que existe relación entre ellos y que de forma probable los granulocitos CD11b⁺Gr-1⁺(MDSC) sean un factor relevante que intervienen en los efectos terapéuticos observados. Ya sea porque GK-1 retarde su sobreproducción, reduzca en cierta medida sus niveles en circulación (reacción leucemoide), limite la formación de nichos pre-metastásicos o modifique el microambiente metastásico, donde las MDSC formar parte importante. Explorar el papel de las MDSC, aunado a otros mecanismos que están siendo investigados por nuestro grupo de investigación, es crucial para elucidar los mecanismos por los cuales el péptido inmunoregulador GK-1 resulta efectivo en el tratamiento de este modelo de cáncer de mama.

Como un hallazgo preliminar el efecto de la inmunoterapia con GK-1 administrado tanto vía intravenosa como subcutánea denotó tener efectos terapéuticos similares; tanto en la reducción de la tasa de crecimiento tumoral, menor masa de tumor y reducción de esplenomegalia. Si bien, para complementar los resultados obtenidos durante el presente trabajo de investigación, aún es necesario conducir experimentos de sobrevida, análisis de necrosis tumoral, biodisponibilidad, entre otros. Los resultados presentados son relevantes pues representan un indicio de que la efectividad del tratamiento con GK-1 se mantiene, empleando ambas vías de administración.

Invariablemente de las ventajas y desventajas propias de cada vía de administración, el hecho de que GK-1 muestre efectividad terapéutica empleando ambas vías (IV y SC) constituye una gran ventaja al tener la posibilidad de escoger la que mejor se adecue a

las particularidades del paciente, dosis o simplemente la versatilidad de tener una vía de administración alterna. La vía intravenosa destaca por ser en la que se obtiene una mayor biodisponibilidad de forma rápida, con menor riesgo de generar inmunogenicidad contra el fármaco además de ser la vía preferente para aplicar grandes cantidades de medicamento, pero comprende de una administración compleja que requiere de personal capacitado, siendo la vía subcutánea interesante no solo por resultar menos invasiva y de fácil administración, sino por la posibilidad de implementar un tratamiento ambulatorio sin la necesidad de que el paciente acuda a unidades médicas especializadas para la aplicación de tratamiento, lo que resulta más práctico para el paciente y reduce el gasto sanitario [42].

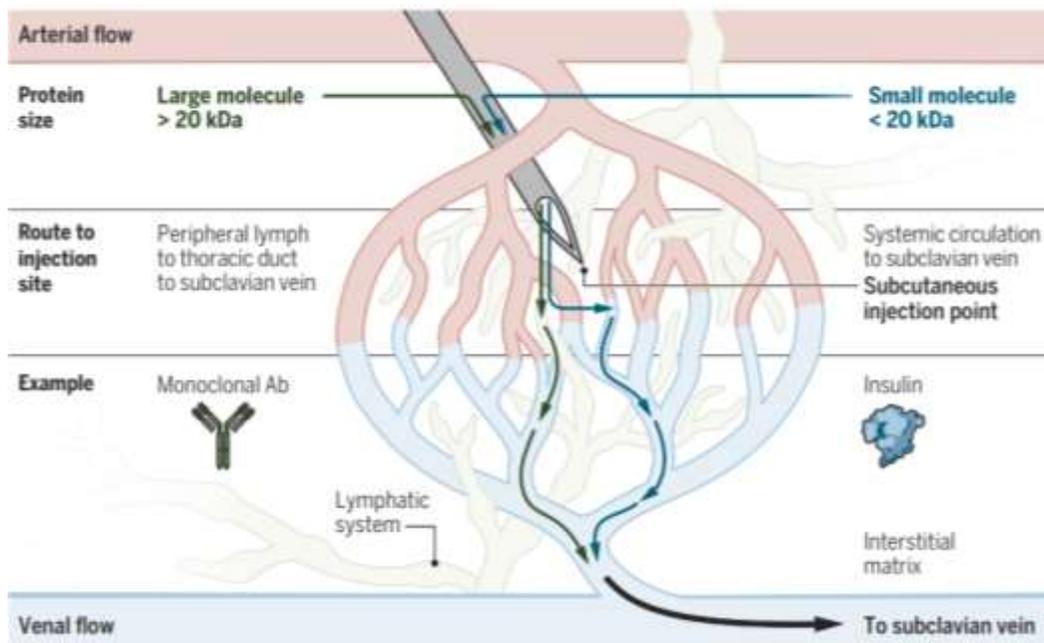


Figura 40 Rutas de biodistribución de biofármacos administrados vía subcutánea. Tomado de Jones et al. 2017. Existen dos rutas de recepción y biodistribución de proteínas terapéuticas inyectadas subcutáneamente. Moléculas pequeñas (<20 kDa) entran directamente a circulación general por los capilares sanguíneos. Moléculas de gran tamaño (>20 kDa) entran por capilares linfáticos y requieren inicialmente de distribución linfática periférica, hasta alcanzar la circulación sanguínea en la vena subclavia.

Actualmente existe un gran número de inmunoterapias que emplean proteínas de alto peso molecular y gran complejidad estructural que son administradas subcutáneamente e incluso autoadministradas por el propio paciente. Ejemplo de esto son los anticuerpos terapéuticos que se emplean en diversidad de patologías (anti-TNF- α , anti-IL-6R, anti-IL-1, etc). En el caso particular de inmunoterapias oncológicas trastuzumab (anti-HER2) y rituximab (anti-CD-20) poseen formulaciones, aprobadas por la FDA, de administración tanto intravenosa como subcutánea y que han demostrado tener efectividad terapéutica similar [43].

En el caso de péptidos terapéuticos la tendencia actual es optar por una administración subcutánea, de ser esta factible, pues reduce los costos de la atención médica relacionados con la aplicación, es menos invasiva y tiende a ser preferida por los pacientes [43]. En el caso de GK-1 el observar efectos terapéuticos similares, con aplicación tanto intravenosa como subcutánea, podría deberse a que por ambas vías la biodistribución sistémica se da vía circulación sanguínea.

En el caso de la administración subcutánea el tamaño de la molécula determina el tipo de distribución del fármaco una vez inyectado desde la matriz intersticial, grandes moléculas (>20 kDa) como el caso de anticuerpos terapéuticos son absorbidos vía linfática y alcanzan circulación sanguínea hasta que son translocados del drenaje linfático por la vena subclavia, ya que los vasos capilares linfáticos son más permeables que los capilares vasculares, figura 38 [43][44]. Por otro lado, moléculas pequeñas (<20 kDa) como la insulina (51 aminoácidos), pueden alcanzar circulación sistémica directamente desde el punto de inyección, pues por su tamaño ingresan a través de capilares vasculares [44]. Si bien la vía intravenosa es la vía más rápida y directa de biodistribución, GK-1 al ser un péptido (18 aminoácidos) cumple con las

características necesarias para ingresar rápidamente a torrente sanguíneo desde una inyección subcutánea.

9 Conclusiones

GK-1 administrado por vía subcutánea tiene efectos antitumorales equiparables a su administración por vía intravenosa; al reducir de manera similar la tasa de crecimiento tumoral, el peso de tumor, la esplenomegalia y retardar la reacción leucemoide.

Los hallazgos de la presente investigación corroboran que el péptido GK-1 es eficaz en el tratamiento, la modificación de la enfermedad neoplásica y metastásica generada por el modelo murino de cáncer de mama 4T1.

10 Bibliografía

- [1] P. Release, "Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012 : Marked increase in breast cancers must be addressed.," *Int. Agency Res. Cancer, World Heal. Organ.*, no. December, pp. 2012–2014, 2013, doi: 223.
- [2] INEGI, "Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cancer: Datos Nacionales," *Comun. Prensa Núm. 61/18*, pp. 1–13, 2018, [Online]. Available: http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf.
- [3] A. Fantozzi and G. Christofori, "Mouse models of breast cancer metastasis," *Breast Cancer Res.*, vol. 8, no. 4, 2006, doi: 10.1186/bcr1530.
- [4] Breastcancer.org, "Your Guide to the Breast Cancer Pathology Report," pp. 6–34, 2006.
- [5] F. M. Blows *et al.*, "Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies," *PLoS Med.*, vol. 7, no. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pmed.1000279.
- [6] R. Haque *et al.*, "Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival:

- an analysis spanning two decades.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 21, no. 10, pp. 1848–55, 2012, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0474.
- [7] S. RJ, H. C, S. F, K. RD, and Z. MH, "Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression," *Converg. Sci. Phys. Oncol.*, vol. 3, no. 3, p. 034002, Jul. 2017, doi: 10.1088/2057-1739/AA7E86.
- [8] R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth, and M.] Smyth3 ', "Suppression and Promotion," *Source Sci. New Ser.*, vol. 3312517425, no. 6024, pp. 1565–1570, 2011, [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/29783923>http://www.jstor.org/stable/29783923?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents<http://about.jstor.org/terms>.
- [9] D. O. Croci, M. F. Zacarías Fluck, M. J. Rico, P. Matar, G. A. Rabinovich, and O. G. Scharovsky, "Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 56, no. 11, pp. 1687–1700, 2007, doi: 10.1007/s00262-007-0343-y.
- [10] M. Wang *et al.*, "Mechanism of immune evasion in breast cancer," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 10, pp. 1561–1573, 2017, doi: 10.2147/OTT.S126424.
- [11] M. J. Smyth, S. F. Ngiow, A. Ribas, and M. W. L. Teng, "Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 13, no. 3, pp. 143–158, 2016, doi: 10.1038/nrclinonc.2015.209.
- [12] R. A. Wilcox, "Cancer-associated myeloproliferation: Old association, new therapeutic target," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 85, no. 7, pp. 656–663, 2010, doi: 10.4065/mcp.2010.0077.
- [13] A. Sio *et al.*, "Dysregulated hematopoiesis caused by mammary Cancer is associated with epigenetic changes and Hox gene expression in hematopoietic cells," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 19, pp. 5892–5904, 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0842.
- [14] K. Kim *et al.*, "Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 32, pp. 11774–11779, 2014, doi: 10.1073/pnas.1410626111.
- [15] Y. Wang, Y. Ding, N. Guo, and S. Wang, "MDSCs: Key criminals of tumor pre-

- metastatic niche formation," *Front. Immunol.*, vol. 10, no. FEB, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00172.
- [16] V. Bronte *et al.*, "Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards," *Nat. Commun.* 2016 71, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2016, doi: 10.1038/ncomms12150.
- [17] Y. Wang, Y. Ding, N. Guo, and S. Wang, "MDSCs: Key criminals of tumor pre-metastatic niche formation," *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. FEB. Frontiers Media S.A., p. 172, Feb. 07, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00172.
- [18] F. Veglia, E. Sanseviero, and D. I. Gabrilovich, "Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity," *Nat. Rev. Immunol.* 2021 218, vol. 21, no. 8, pp. 485–498, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41577-020-00490-y.
- [19] M. A. Geresu, A. F. Sultan, S. K. Ahmed, and G. M. Kassa, "Immunotherapy against cancer : A comprehensive review," vol. 8, no. July, pp. 15–25, 2016, doi: 10.5897/JCREO2015.0124.
- [20] J. Liu *et al.*, "Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease," *Cancer Discov.*, vol. 6, no. 12, pp. 1382–1399, 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0577.
- [21] P. Savage, J. Stebbing, M. Bower, and T. Crook, "Why does cytotoxic chemotherapy cure only some cancers?," *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2008 61, vol. 6, no. 1, pp. 43–52, Nov. 2008, doi: 10.1038/ncponc1260.
- [22] G. Fragoso *et al.*, "Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 18, no. 7, pp. 1067–1076, 2011, doi: 10.1128/CVI.05030-11.
- [23] G. Fragoso, E. Sciutto, and A. Sarukhan, "Towards Identification of the Mechanisms of Action of Parasite-Derived Peptide GK1 on the Immunogenicity of an Influenza Vaccine ," vol. 16, no. 9, pp. 1338–1343, 2009, doi: 10.1128/CVI.00106-09.
- [24] R. Segura-Velázquez *et al.*, "A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine," *Vaccine*, vol. 24, no. 8, pp. 1073–1080, 2006, doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.014.
- [25] A. Pérez-Torres *et al.*, "The Synthetic Parasite-Derived Peptide GK1 Increases Survival in a Preclinical Mouse Melanoma Model," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 28, no. 9, pp. 682–690, 2013, doi: 10.1089/cbr.2012.1438.

- [26] D. Torres-García *et al.*, "GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model," *Vaccine*, vol. 35, no. 42, pp. 5653–5661, 2017, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.060.
- [27] F. Miller and A. Care, "Mouse 4T1 Breast Tumor Model," pp. 1–16, 2000.
- [28] S. A. duPre' and K. W. Hunter, "Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: Association with tumor-derived growth factors," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 82, no. 1, pp. 12–24, 2007, doi: 10.1016/j.yexmp.2006.06.007.
- [29] S. A. DuPré, D. Redelman, and K. W. Hunter, "The mouse mammary carcinoma 4T1: Characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 88, no. 5, pp. 351–360, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x.
- [30] K. E. O'Connell *et al.*, "Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research," *Comp. Med.*, vol. 65, no. 2, p. 96, Apr. 2015, Accessed: Aug. 12, 2021. [Online]. Available: /pmc/articles/PMC4408895/.
- [31] J. Xuefeng, T. Sonoki, M. Miyajima, T. Sawada, N. Terada, and K. Sakaguchi, "EphA4- deleted microenvironment regulates cancer development and leukemoid reaction of the isografted 4T1 murine breast cancer via reduction of an IGF1 signal," *Cancer Med.*, pp. 1214–1227, 2016, doi: 10.1002/cam4.670.
- [32] C. D. Commerford *et al.*, "Mechanisms of Tumor-Induced Lymphovascular Niche Formation in Draining Lymph Nodes," *Cell Rep.*, vol. 25, no. 13, pp. 3554–3563.e4, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.CELREP.2018.12.002.
- [33] J. Cervantes-Torres, R. Segura-Velázquez, P. Padilla, E. Scitutto, and G. Fragoso, "High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1060, pp. 97–102, 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.05.027.
- [34] A. Pérez-Torres *et al.*, "Hematological effects, serum, and pulmonary cytokine profiles in a melanoma mouse model treated with GK1," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 30, no. 6, pp. 247–254, 2015, doi: 10.1089/cbr.2015.1835.
- [35] M. Sevmis *et al.*, "Splenectomy-Induced Leukocytosis Promotes Intratumoral Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells, Angiogenesis and Metastasis," *Immunol. Invest.*, vol. 46, no. 7, pp. 663–676, Oct. 2017, doi:

- 10.1080/08820139.2017.1360339.
- [36] M. Bosiljcic *et al.*, "Targeting myeloid-derived suppressor cells in combination with primary mammary tumor resection reduces metastatic growth in the lungs," *Breast Cancer Res.* 2019 211, vol. 21, no. 1, pp. 1–16, Sep. 2019, doi: 10.1186/S13058-019-1189-X.
- [37] K. A. Mouchemore, R. L. Anderson, and J. A. Hamilton, "Neutrophils, G-CSF and their contribution to breast cancer metastasis," *FEBS J.*, vol. 285, no. 4, pp. 665–679, Feb. 2018, doi: 10.1111/FEBS.14206.
- [38] M. Ouzounova *et al.*, "ARTICLE Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade," *Nat. Commun.*, 2017, doi: 10.1038/ncomms14979.
- [39] T. Yoshimura *et al.*, "Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2 Produced by Stromal Cells Promotes Lung Metastasis of 4T1 Murine Breast Cancer Cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e58791, Mar. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0058791.
- [40] Y. Xiao *et al.*, "Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation," *Cancer Cell*, vol. 39, no. 3, pp. 423-437.e7, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.CCELL.2020.12.012.
- [41] M. Kowanzetz *et al.*, "Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 50, pp. 21248–21255, Dec. 2010, doi: 10.1073/PNAS.1015855107.
- [42] B. Bittner, W. Richter, and J. Schmidt, "Subcutaneous Administration of Biotherapeutics: An Overview of Current Challenges and Opportunities," *Biodrugs*, vol. 32, no. 5, p. 425, Oct. 2018, doi: 10.1007/S40259-018-0295-0.
- [43] A. N. Ganesh, C. Heusser, S. Garad, and M. V. Sánchez-Félix, "Patient-centric design for peptide delivery: Trends in routes of administration and advancement in drug delivery technologies," *Med. Drug Discov.*, vol. 9, p. 100079, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.MEDIDD.2020.100079.
- [44] G. B. Jones, D. S. Collins, M. W. Harrison, N. R. Thyagarajapuram, and J. M. Wright, "Subcutaneous drug delivery: An evolving enterprise," *Sci. Transl. Med.*, vol. 9, no. 405, Aug. 2017, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAF9166.

Publicaciones científicas de las que es parte el presente trabajo de tesis.

Clinical Immunology
GK1 effectively reduces angiogenesis and prevents T cell exhaustion in a breast cancer murine model
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	Immunotherapy
Keywords:	4T1-model; T cell exhaustion; breast cancer; angiogenesis; immunotherapy; GK-1
Corresponding Author:	Edda Scitutto National Autonomous University of Mexico Institute of Biomedical Research México, Distrito Federal MEXICO
First Author:	Juan A. Hernández-Aceves
Order of Authors:	Juan A. Hernández-Aceves Jacquelynnne Cervantes-Torres Diana Torres-García Francisco J. Zuñiga-Flores Osiris Patiño José Eduardo Aguayo-Flores Yonathan Garfias Laura Montero-León Laura Romero-Romero Armando Pérez-Torres Gladis Fragoso Edda Scitutto
Abstract:	The experimental model of the metastatic 4T1 breast cancer was employed to evaluate the impact of the GK-1 anti-tumor peptide in the tumor progression and metastasis. GK-1 (5 mg/kg, i.v.) weekly administrated not only decrease tumor growth but also decrease the number of lung macro-metastases and lung and lymph nodes micro-metastases. Histological analysis reveals that GK-1 reduced in 57% the intra-tumor vascular areas, diminished the progression of the leukemoid reaction and the weight and length of the spleens. A significant reduction in VEGF-C, SDF-1, angiopoietin-2, and endothelin-1 angiogenic factors was induced. GK-1 also prevents T cell exhaustion in the tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) decreasing PD-1 expression. It also increased IFN- γ and granzyme-B expression and increased the cytotoxic activity of CD8+ TILs cells against tumor cells. Altogether, GK-1 points as a promising approach to improve the clinical outcome of triple-negative breast cancer immunotheraov. Translation research is oncoing towards