



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CTLA-4 EN CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMARIO TRIPLE NEGATIVO Y EFECTO DE SU INHIBICIÓN CON
ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MARÍA GUADALUPE COLUMBA NAVARRETE BERNAL

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ELIZABETH LANGLEY MCCARRON
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

DR. JOSE SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
[Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas](#)

Ciudad de México. Enero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Agradezco el apoyo brindado durante los experimentos de vías de señalización a la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez, y al Dr. José Esparza López pertenecientes a la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Agradezco el apoyo brindado durante los experimentos de citometría de flujo al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, y al M. en C. Víctor Adrián Cortés Morales pertenecientes a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. Coordinación de Investigación en Salud. CMNSXXI.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas (CVU: 816672).

Agradezco a la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo técnico brindado para la realización de este proyecto.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	2
Tabla de contenidos	3
Lista de Figuras.....	5
Abreviaturas.....	7
Resumen	9
Introducción.....	10
Cáncer de mama, subtipos, y sus tratamientos.....	10
Cáncer de mama triple negativo	14
Inmunoterapias y cáncer de mama triple negativo.....	18
Papel de CTLA-4 en el sistema inmune	22
Ipilimumab.....	30
Antecedentes.....	33
Justificación	35
Hipótesis.....	35
Objetivo.....	35
Objetivos particulares	36
Metodología	37
Cultivo celular	37
Análisis de la expresión intracelular de CTLA-4 en células de CMTN por Citometría de flujo.....	38
Análisis de la expresión membranal de CD80 y CD86 en células de CMTN por Citometría de flujo	38
Ensayo de MTT por espectroscopía de UV-Vis	39
Ensayo de CellTracker™ Red CMTPX dye por fluorescencia	40
Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la viabilidad celular	40
Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando CD80 sobre la viabilidad celular	41
Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la invasión celular.....	41
Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la presencia de IL-2 secretada en el medio de cultivo	42
Efecto de la adición de IL-2 exógena sobre la viabilidad celular.....	42

Estudio de las vías de señalización activadas o suprimidas por la interacción de CTLA-4 con Ipilimumab y con la proteína recombinante CD80	43
Análisis estadístico.....	44
Resultados y Discusión.....	45
Expresión de CTLA-4 en células de carcinoma mamario triple negativo.....	45
Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la viabilidad celular	48
Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab sobre la capacidad invasora.....	55
Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab sobre la secreción de IL-2 al medio.....	57
Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab sobre las vías de ERK, Akt, y JNK	61
Expresión de CD80 y CD86 en células de carcinoma mamario triple negativo	64
Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando sobre la viabilidad celular	67
Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando sobre la secreción de IL-2 al medio.	70
Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando sobre las vías de ERK y Akt.....	72
Resumen de resultados.....	74
Conclusión.....	76
Perspectivas.....	77
Anexos	79
Estrategia de citometría de flujo.....	79
Referencias	83

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de la progresión tumoral del cáncer de mama.....	11
Figura 2. Modelos de las funciones intrínsecas de CTLA-4 en el linfocito T.....	24
Figura 3. Modelos de las funciones extrínsecas de CTLA-4 en el linfocito T.	26
Figura 4. Modelo de señalización de CD28 y CTLA-4.....	29
Figura 5. Mecanismo de Ipilimumab contra células tumorales.....	32
Figura 6. Expresión intracelular de CTLA-4 en células mononucleares de sangre periférica y líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.....	47
Figura 7. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 con bloqueo de CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante anti-CD-152.....	48
Figura 8. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 con bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab.....	49
Figura 9. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC70 con bloqueo de CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante anti-CD-152.....	50
Figura 10. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC70 con bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab.....	51
Figura 11. Ensayo de viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 con bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab.....	52
Figura 12. Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab en la capacidad invasora de las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231.....	56
Figura 13. Cuantificación de IL-2 secretada al medio de las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231.....	58
Figura 14. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 en incubación con IL-2 exógena.....	60
Figura 15. Ensayo de viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 en incubación con IL-2 exógena.....	60
Figura 16. Perfil de expresión de las proteínas ERK, JNK, y Akt en las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos de estimulación con Ipilimumab.....	62
Figura 17. Expresión membranal de CD80 en monocitos-dendríticas y líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.....	66
Figura 18. Expresión membranal de CD86 en monocitos-dendríticas y líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.....	67
Figura 19. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 con interacción de CTLA-4 con una proteína recombinante de CD80.....	68
Figura 20. Ensayo de viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 con interacción de CTLA-4 con una proteína recombinante de CD80.....	69
Figura 21. Cuantificación de IL-2 secretada al medio de las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231.....	71

Figura 22. Perfil de expresión de las proteínas ERK, y Akt en las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos de estimulación con CD80.	73
Figura 23. Espectro de absorción y emisión de los fluorocromos PE y APC.	80
Figura 24. Proceso de compensación del control.	80
Figura 25. Porcentajes de células positivas para CD80 y CD86 en el control.	81
Figura 26. Proceso de análisis de la expresión de los ligandos CD80 y CD86 en membrana de la línea celular HCC1937.	82
Figura 27. Porcentajes de células positivas para CD80 y CD86 en la línea celular HCC1937.	82

Abreviaturas

Siglas	Significado
aa	aminoácidos
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AICD	muerte celular inducida por activación
AP1	proteína activadora 1
AP-50	proteína adaptadora de clatrina
APC	células presentadoras de antígeno
ATC	antígenos testiculares de cáncer
BL1	tipo basal 1
BL2	tipo basal 2
BLIA	tipo basal inmunoactivador
BLIS	tipo basal inmunosupresor
BSA	albúmina de suero bovino
CaMa	cáncer de mama
CDs	células dendríticas
CMSP	células mononucleares de sangre periférica
CMTN	cáncer de mama triple negativo
CMTNm	cáncer de mama triple negativo metastásico
CK	citoqueratinas
CTLA-4	antígeno 4 del linfocito T citotóxico
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
FGFR	receptor del factor de crecimiento fibroblástico
HER-2	receptor 2 de factor epidérmico humano
HLA	antígeno leucocitario humano
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
IDO	indolamina 2,3-dioxigenasa
IGF-1R	receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IM	inmunomodulatorio
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
ITIM	motivos de inhibición en inmunorreceptores basados en tirosina
LAG-3	gen 3 de activación de linfocitos
LAR	receptor de andrógenos luminal
LB	linfocito B
LFA-1	antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos
LM	linfocitos T de memoria

LR	linfocitos T reguladores
LT	linfocito T
M	mesenquimal
MES	mesenquimal
MFI	intensidad media de fluorescencia
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MSL	mesenquimal tipo troncal
NFAT	factor nuclear de linfocitos T activos
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	células NK
ORR	rango de respuesta objetiva
OS	sobrevivencia promedio
PARP	(poli (ADP-ribosa) polimerasa)
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PDGFR	receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PD-1	muerte programada 1
PD-L1	ligando 1 de muerte programada
PD-L2	ligando 2 de muerte programada
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinasa
PLCγ1	fosfolipasa C γ 1)
RE	receptores de estrógeno
RP	receptores de progesterona
SERMs	moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SFB	suero fetal bovino
TCR	receptor de las células T
T_{h1}	linfocito T cooperador H1
T_{h2}	linfocito T cooperador H2
TILs	linfocitos infiltrantes de tumor
TGF-β	factor de crecimiento transformante β
TIGIT	inmunoglobulina de linfocitos T y motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
ZAP70	proteína cinasa asociada a la cadena Zeta 70

Resumen

El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por la baja o nula expresión de los receptores de estrógeno, progesterona, y el receptor 2 de factor epidérmico humano. Representa del 16-23.1% de los casos reportados de cáncer de mama en México. Este tipo de tumor presenta un comportamiento clínico agresivo y un mal pronóstico asociado a metástasis temprana. Actualmente no existen terapias específicas disponibles para este subtipo de cáncer de mama, por lo que el manejo clínico consiste en cirugías y quimioterapias sistémicas que son poco eficientes. Por esta problemática, en los últimos años se ha sugerido el uso de inmunoterapias para su tratamiento, ya que se ha observado la expresión de moléculas moduladoras del sistema inmune en las células de carcinoma mamario triple negativo. Una de estas moléculas es el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4 o CD152), que por su relevancia en la modulación de la activación de los linfocitos T se desarrolló un anticuerpo monoclonal que bloquea su dominio extracelular, llamado Ipilimumab.

Los resultados favorables de estudios clínicos recientes han sugerido el uso de Ipilimumab como terapia inmunológica contra el cáncer de mama triple negativo; sin embargo, se tiene una pobre caracterización de los efectos que esta terapia podría tener sobre las células tumorales que expresan CTLA-4. Es por eso, que en este trabajo se analizó por citometría de flujo la expresión de CTLA-4 en 4 líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231, DU4475, HCC70 y HCC1937), y se realizaron experimentos para evaluar el efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la viabilidad, capacidad invasora, y la cantidad de IL-2 secretada al medio de las líneas celulares. Asimismo, por citometría de flujo se analizó la expresión de CD80 y CD86 (ligandos de CTLA-4) en la membrana de las líneas celulares, y se probó por medio de una proteína recombinante de CD80 (rCD80) los efectos que ésta podría tener sobre la viabilidad, y la cantidad de IL-2 secretada al medio de las líneas celulares. Por último, se estudió por Western blot el efecto del bloqueo y activación de CTLA-4 sobre las vías Akt, ERK, y JNK.

Nuestros resultados muestran que las 4 líneas celulares expresan CTLA-4, y que las líneas MDA-MB-231 y HCC1937 expresan CD80 y CD86 en membrana. Las líneas celulares MDA-MB-231 y HCC1937 presentaron una disminución en la viabilidad celular al bloquear CTLA-4 con Ipilimumab, y a pesar de que no se observó efecto sobre la capacidad invasora de las células, se vio que la línea HCC1937 incrementó la cantidad de IL-2 secretada al medio después de que se bloqueó CTLA-4 con Ipilimumab. El bloqueo ocasionó en ambas líneas celulares la activación de ERK, y además en el caso de la línea HCC1937, una activación de Akt. Por otra parte, la activación de CTLA-4 con rCD80, causó en MDA-MB-231 y HCC1937 una disminución de la viabilidad celular; no obstante, no se observó efecto sobre la cantidad de IL-2 secretada. Por la parte de las vías de señalización, solo se observó activación de ERK en ambas líneas.

Estos resultados sugieren que CTLA-4 es funcional e influye en el comportamiento de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, abriendo la posibilidad que con futuros estudios este receptor pueda usarse para identificar pacientes que podrían responder a la inmunoterapia.

Introducción

Cáncer de mama, subtipos, y sus tratamientos

El cáncer se define como el conjunto de enfermedades compuestas por células anormales que se multiplican sin control, y son capaces de invadir diferentes tejidos por medio del torrente sanguíneo, y el sistema linfático [1]. Esta enfermedad es la tercera causa de muertes en México, por debajo de las enfermedades cardiovasculares, y la diabetes. Afecta principalmente a la población trabajadora (15-64 años) y en mayor proporción a las mujeres [2].

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC por sus siglas en inglés) reportó que los 5 tipos de cáncer con mayor cantidad de muertes en México durante el 2018 fueron el cáncer colorrectal (n=7,084), el cáncer de próstata (n=6,915), el cáncer de mama (n=6,884), el cáncer de hígado (n=6,868), y el cáncer de pulmón (n=6,733) [3]. Enfatizando que las muertes registradas en el 2018 de cáncer de mama doblaron casi en número a las registradas en el 2010 (n=3,503) [4].

El cáncer de mama (CaMa) se origina a partir de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en células normales de mama (*Figura 1*) [5]. A nivel mundial, el cáncer de mama se posiciona como la causa líder de muertes por cáncer entre mujeres, registrando en 2018, 2.1 millones de casos nuevos y 626,679 muertes, donde el 60% de las muertes registradas pertenecen a países en vías de desarrollo [6], [7]. En el 2018 de acuerdo con datos de la IARC se registró en México una incidencia de 27,283 nuevos casos de CaMa con una mortalidad de 6,884 personas.

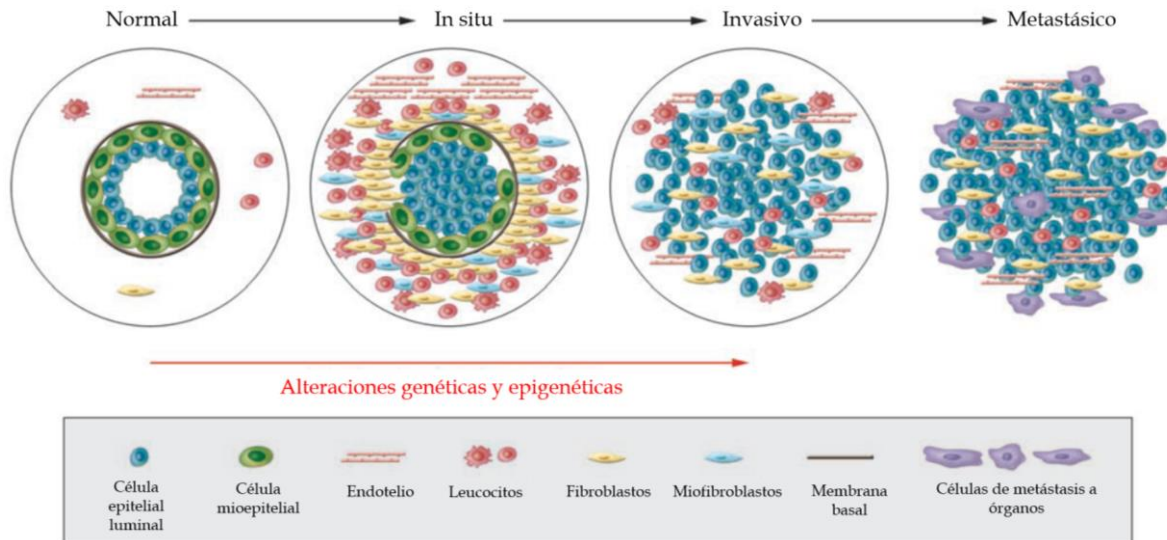


Figura 1. Modelo de la progresión tumoral del cáncer de mama. Los ductos normales del seno están compuestos por la membrana basal, una capa de células mioepiteliales, y epiteliales luminales. Las células que comprenden el estroma son los leucocitos, fibroblastos, miofibroblastos, y células endoteliales. En los carcinomas in situ las células mioepiteliales están epigenéticamente y fenotípicamente alteradas, y su número decrece potencialmente debido a la degradación de la membrana basal. Al mismo tiempo, el número de fibroblastos estromales, miofibroblastos, linfocitos, y células endoteliales aumenta. La pérdida de células mioepiteliales resulta en carcinomas invasivos, donde las células tumorales pueden invadir tejidos cercanos y pueden migrar a órganos distantes, que eventualmente conduce a la metástasis. Modificado de [8].

El cáncer de mama se considera una enfermedad clínica y molecularmente heterogénea. Su clasificación en diferentes subgrupos se ve influenciada por el tipo histológico, grado, tamaño del tumor, implicación de los nódulos linfáticos, y la expresión de receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP), y el receptor 2 de factor epidérmico humano (HER-2) en el tumor [9].

La investigación de Sørlie et al. reportó, por medio de micro arreglos de ADN, 5 subtipos de cáncer de mama, cada uno con un pronóstico clínico distintivo. Estos subgrupos son luminal A, luminal B, sobreexpresión de HER-2, tipo basal y tipo normal [10], [11]. A pesar de que éste fue uno de los métodos pioneros para la clasificación de los diferentes tipos de cáncer de mama, este método no es factible para estudios a larga escala de muestras fijadas en formalina o muestras conservadas en parafina, además, que no es realizable para clínicas de salud con limitaciones económicas. Es por ello que en la práctica, se utiliza un clasificación clínico-

patológica del cáncer de mama, basada en marcadores inmunohistoquímicos que se correlacionan a los perfiles de expresión génica previamente mencionados, estos marcadores son el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona, y el receptor 2 de factor epidérmico humano [12], [13].

La clasificación clínico-patológica se compone por 3 principales grupos: luminal, sobreexpresión de HER-2, y triple negativo. Estos subgrupos se subdividen de acuerdo con la alta, baja o nula expresión de los 3 marcadores (RE, RP, y HER-2) [14]. El grupo luminal presenta expresión de los receptores hormonales (progesterona y estrógeno), el grupo con sobreexpresión de HER-2 presenta altos niveles de esta proteína en las células cancerígenas de mama, y por último, el subgrupo triple negativo, haciendo alusión a su nombre, en pruebas inmunohistoquímicas da negativo para RE, RP, y HER-2 [15], [16]. A nivel mundial el porcentaje de prevalencia para cada subtipo se compone del 65% para el grupo luminal, 21% para los que cuentan con sobreexpresión de HER-2, y del 10-15% para los triple negativo [15]. En cambio, para la población mexicana los pertenecientes al subgrupo luminal representan el 60% de los casos totales de cáncer de mama, el 20.4% para el subgrupo con sobreexpresión de HER-2, y para el subgrupo triple negativo le corresponde del 16-23.1 % [17]-[19].

Conforme a esta clasificación se tienen diferentes opciones de terapia para cada subtipo. Para aquellos tumores mamarios positivos a receptores de hormonas (subtipo luminal), se utiliza la terapia hormonal dirigida, que a su vez es el tratamiento menos tóxico disponible para pacientes de CaMa. Este tipo de terapia se considera uno de los primeros ejemplos de terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer, puesto que su blanco molecular es uno en específico, el receptor de estrógeno. Este receptor es una proteína nuclear que actúa como factor de transcripción de genes que responden al estrógeno, y para regular este receptor se utilizan moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (selective estrogen receptor modulators, SERMs por sus siglas en inglés) los cuales bloquean la

señalización del RE. Los SERMs son antagonistas o agonistas dependiendo de su interacción con los RE, tipo de tejido, y efectos postraduccionales. El tamoxifeno es un SERMs que actúa como un inhibidor competitivo del estradiol; siendo un agonista parcial al estrógeno en el útero, hígado, y hueso, mientras que actúa como antagonista en el seno, y el cerebro. El tamoxifeno bloquea la unión del estrógeno al RE, e inhibe la proliferación de células tumorales ductales de seno. Aparte del uso de los SERMs, también se utilizan inhibidores de aromatasas, basándose en que la biosíntesis del estrógeno empieza con el colesterol, que después de sucesivas reacciones se obtienen andrógenos los cuales son catalizados por la enzima aromatasas para formar estrógenos [20].

La terapia hormonal no es la única terapia dirigida disponible para uno de los subtipos de cáncer de mama. Para el subgrupo que presenta una sobreexpresión y/o amplificación del gen de HER-2 existen terapias dirigidas basadas en anticuerpos monoclonales e inhibidores de cinasas de tirosina. La razón de estas dos principales opciones de terapia se basa en la relevancia que tienen los dominios extracelulares e intracelulares de HER-2 para el desarrollo tumoral por medio de los efectos que tiene éste sobre la proliferación celular, migración, angiogénesis, y señales antiapoptóticas. Trastuzumab, creado en 1998, es un anticuerpo monoclonal murino humanizado IgG1 que se une al dominio extracelular de HER-2, cuyo mecanismo de acción de actividad antitumoral se deriva de una combinación de citotoxicidad mediada por anticuerpos, y disminución de la reparación de ADN y transducción de señales intracelulares [21]. Por el lado de los inhibidores de tirosinas, se encuentra Lapatinib, el cual se une de manera reversible a la cavidad de unión de ATP de HER-2, inhibiendo su autofosforilación que por ende previene la activación de vías de señalización que promueven la supervivencia y proliferación de células tumorales [22].

Gracias al desarrollo de estas terapias específicas, estos subtipos de cáncer de mama logran considerarse como enfermedades crónicas manejables, con una buena

respuesta clínica, y periodos mayores a los 5 años de supervivencia. No obstante, éste no es el caso para el subgrupo triple negativo. El cáncer de mama triple negativo (CMTN) no expresa RE, RP, y HER-2, lo que imposibilita el uso de las terapias dirigidas previamente explicadas para su tratamiento. Debido a esto, y a otras características, como elevadas tasas de proliferación celular y baja supervivencia en sus convalécientes, el CMTN se considera el subtipo más agresivo de CaMa, teniendo mayor prevalencia en la población hispana y afroamericana [23],[24].

Cáncer de mama triple negativo

El cáncer de mama triple negativo está constituido por un grupo de tumores malignos heterogéneos que carecen de la expresión inmunohistoquímica de los receptores de estrógeno, progesterona y HER-2. Debido a la frecuente expresión de marcadores basales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor, EGFR por sus siglas en inglés) y las citoqueratinas 5/6, 14, y 17 (cytokeratins, CK por sus siglas en inglés) los CMTN son confundidos por los cáncer de mama de tipo basal [25], [26]. Aunque estos dos subtipos comulgan en la expresión negativa de los receptores de hormonas y HER-2, no todos los triples negativos expresan marcadores basales. Bertucci et al. demostró que el 71% de los cánceres de mama triple negativos son del subtipo basal, y el 77% de los de tipo basal son triples negativos [27]. Resultados similares se obtuvieron en estudios realizados por Ronde et al. [28], y Parker et al. [29].

El CMTN ocurre con mayor frecuencia en poblaciones afroamericanas e hispanas, con una predominancia sobre mujeres premenopáusicas, donde al momento del diagnóstico la mayoría de los casos se tratan de carcinomas ductales invasivos en estadios clínicos de etapa II o III [18], [30]. La prevalencia de este subtipo de CaMa en la población latina hispano hablante es del 10-20% dependiendo del país [31]. En México, se reportan porcentajes de prevalencia que van del 14% [19] hasta el 23% [32], valores obtenidos por el Seguro Social y el INCan (Instituto Nacional de

Cancerología), respectivamente. Aparte de la raza, existen otros factores de riesgo para desarrollar CMTN, como un alto nivel de índice de masa corporal, consumo de alcohol, vida sedentaria, y la toma de anticonceptivos orales [33].

Este subtipo de CaMa se distingue por tener características histopatológicas agresivas, como un alto grado histológico y núcleo tumoral, tamaño grande de tumor, conteo mitótico elevado, un área central fibrótica y necrótica, pobre formación tubular, respuesta de linfocitos estromales, una razón elevada entre radio nuclear y citoplasmático y altos niveles de proliferación [34], [35]. Así mismo, el perfil molecular de estos tumores se caracteriza por la ausencia de la expresión de BCL-2, alto contenido de p53, mutaciones en el gen BRCA1 y sobreexpresión de factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endotelial growth factor, VEGF por sus siglas en inglés) [17], [18].

Las estrategias de tratamiento actuales incluyen una variedad de agentes quimioterapéuticos como antraciclinas, taxanos, ixabepilona, sales de platino, y agentes antiangiogénicos. Los tumores triple negativo tienen mayores tasas de respuesta a una variedad de quimiofármacos en comparación con los luminales [23]. Los quimiofármacos más usados son paclitxel, doxorubicina, fluorouracilo, y ciclofosfamida [36]. A pesar de las favorables tasas de respuesta a la quimioterapia, éstas nos son prolongadas, ya que se desarrollan mecanismos de resistencia [23]. La conducta biológica del CMTN suele ser más agresiva con un riesgo 4 veces mayor a desarrollar metástasis a distancia comparada con los otros subtipos de cáncer de mama, predominando la metástasis a hígado, pulmón, y sistema nervioso central [17]. Bajo la misma estrategia de quimioterapia del CMTN se trata el cáncer de mama triple negativo metastásico (CMTNm), donde solo 1/3 de los pacientes presentan respuestas objetivas a la primera línea de tratamiento, lo que se asocia con una supervivencia promedio de un año [23]. La supervivencia libre de enfermedad a 5 años de los pacientes de CMTN es del 77% en comparación al 93% del subtipo luminal [36], [37]. Además, el 50% de los pacientes diagnosticados con CMTN en

estadios no metastásicos reincidirán, y el 37% fallecerá durante los primeros 5 años después de la primera línea de tratamiento [38], [39].

Advirtiendo que estos tumores no responden a las terapias dirigidas de los otros subtipos, y que la quimioterapia no es un tratamiento eficiente, las investigaciones acerca del CMTN se encuentran principalmente orientadas a la búsqueda de blancos moleculares, pero la heterogeneidad de esta enfermedad complica dicha búsqueda; sin embargo, como herramienta para este propósito, se han realizado diferentes subclasificaciones del cáncer de mama triple negativo, las cuales ayudan a la identificación de blancos moleculares para su uso en el diseño de terapias dirigidas [40]. Una de las principales clasificaciones del CMNT se realizó por el grupo de Lehman en 2011, donde se realizó el análisis molecular de los perfiles de expresión génica, describiendo 6 grupos que difieren el uno del otro en su comportamiento clínico, sensibilidad a la quimioterapia, y supervivencia. Estos subgrupos son el tipo basal 1 y 2 (BL1 y BL2), inmunomodulatorio (IM), mesenquimal (M), mesenquimal tipo troncal (MSL), y receptor de andrógenos luminal (LAR) [41]. Esta clasificación es criticada con base a dos razones, la primera que estos subtipos no pueden identificarse a partir de la subtipificación de los tumores limitada a la información inmunohistoquímica de los receptores de estrógeno, progesterona, y HER-2, asimismo, los subtipos basales 1 y 2 no son fácilmente distinguibles cuando se usa la firma de genes propuesta por Lehman en los agrupamientos jerárquicos de los sets de datos públicos del CMTN[42].

En 2014, Burstein et al. revisó la clasificación del CMTN, y reorganizó a los subtipos en 4 grupos en lugar de 6, por medio de perfiles de expresión de mRNA y análisis ADN. Estos grupos son receptor andrógeno luminal (LAR), mesenquimal (MES), tipo basal inmunosupresor (BLIS) y tipo basal inmunoactivador (BLIA). El subtipo LAR presenta activación en las vías de receptores de andrógeno, prolactina, ErbB4, y receptores de estrógeno a pesar de que es negativo para RE por medio de análisis inmunohistoquímico. Este subtipo realza la posibilidad que tumores negativos para

RE podrían aun así responder a medicamentos antagonistas para RE. El subtipo MES expresa niveles altos de factores de crecimiento y genes que normalmente solo son observados en osteocitos y adipocitos, este subtipo se correlaciona al subtipo mesenquimal tipo troncal. El subtipo BLIS exhibe una disminución en la regulación de vías de citoquinas y vías regulatorias de los linfocitos T (LT), linfocitos B (LB) y células NK (natural killer cells). Además, baja expresión de moléculas que regulan la presentación de antígeno, diferenciación de células inmunitarias, y comunicación de la respuesta inmune innata y adaptativa. En contraste, el subtipo BLIA sobreexpresa genes que controlan funciones de LT, LB y NK. Este subtipo, en comparación a los 3 previamente descritos, tiene el mejor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad [26], [43].

Las diferentes subclasificaciones que se han realizado para el CMTN y los diferentes estudios que se han dedicado al mapeo genético de la heterogeneidad de éste, han ayudado a identificar posibles blancos moleculares que podrían utilizarse para efectuar terapias dirigidas. Dentro de estas posibilidades se encuentran inhibidores de PARP (poli (ADP-ribosa) polimerasa), que podrían ser especialmente útiles para tumores con mutaciones en BRCA1. De igual manera, inhibidores de receptores de tirosina cinasa que vayan contra EGFR, FGFR (receptor del factor de crecimiento fibroblástico), receptor TGF- β (receptor del factor de crecimiento transformante β), PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas), VEGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), e IGF-1R (receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1), por sus papeles en proliferación, diferenciación, regulación en el crecimiento, metabolismo y supervivencia celular. A pesar de que estos agentes están validados por estudios realizados en líneas celulares, ninguno de estos es completamente prometedor para utilizarse como monoterapia [44].

La identificación de niveles elevados de expresión de genes inmunológicos en los tumores triple negativos, como en el caso del subgrupo BLIA, sugiere que los pacientes se podrían beneficiar de terapias inmunológicas. El sistema inmune juega

un doble rol en la progresión del cáncer de mama, ya que al inicio, el tumor causa una respuesta de la inmunidad innata para después suprimir la respuesta inmune adaptativa [45]. Las células tumorales triple negativas presentan inestabilidad genómica, una alta carga de mutaciones, y el microambiente tumoral que las rodea es rico en células inmunes infiltradas, las cuales se encuentran en el proceso continuo de inmunoección. Este estado pudiera utilizarse como un marcador de pronóstico favorable, ya que se ha reportado que pacientes de CMTN que presentan una infiltración del 50% de linfocitos infiltrantes de tumor (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs por sus siglas en inglés), el 89% de ellos llega a 5 años libre de enfermedad en comparación al 62% que no presentan dicha infiltración[46].

Inmunoterapias y cáncer de mama triple negativo

Las interacciones entre el cáncer y el sistema inmune son complejas y multifacéticas. A pesar de que existe evidencia de respuestas inmunes antitumorales en pacientes convalecientes de esta enfermedad, los tumores son capaces de desarrollar múltiples estrategias para evadir la detección y destrucción por el sistema inmune. El objetivo de las inmunoterapias es generar y/o potenciar la inmunidad tumoral para obtener un beneficio clínico. Avances en la definición de los mecanismos que rigen la respuesta inmunológica han provisto de nuevos blancos terapéuticos. Diferentes tipos de cáncer se han visto beneficiados de esta terapia, como son el cáncer de pulmón, melanoma, y vejiga [47]-[49]

Un sistema inmune preparado para identificar y destruir células tumorales eliminaría células malignas en nódulos linfáticos cercanos y en nichos metastásicos, resolviendo así uno de los problemas más complicados de las terapias contra el cáncer, que es el tratamiento de pacientes en estadios avanzados. Ejemplo de esta necesidad es que la supervivencia a 5 años de pacientes de melanoma en estadio I es mayor al 80%, mientras que los pacientes en estadio IV es de 5-10% [50]

El sistema inmune está caracterizado por un sistema complejo de puntos de chequeo y balance para proteger al cuerpo de patógenos exógenos por medio de la identificación de lo que es propio del cuerpo y lo ajeno. Este sistema involucra componentes estimuladores e inhibidores, y varios mecanismos de tolerancia periférica. Como el cáncer surge de las mismas células del cuerpo provoca un reto para el sistema inmune identificarlas y sobrepasar la barrera de la tolerancia periférica. Aunque existe evidencia que indica que el sistema inmune protege al cuerpo de desarrollar tumores (vigilancia inmunológica) algunos tipos de cáncer adquieren mecanismos para evadir al sistema inmune, posiblemente por medio de presión selectiva. Los linfocitos T pueden atacar y destruir células tumorales; sin embargo, las células tumorales son capaces de inhibir la activación de los LT y escapar la vigilancia inmunológica [51]-[53].

El progreso de las inmunoterapias se debe principalmente al uso de anticuerpos monoclonales antagonistas dirigidos a CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico), PD-1 (muerte programada 1), y PD-L1 (ligando 1 de muerte programada). El rango de respuesta objetiva (objective response rate, ORR por sus siglas en inglés) con el tratamiento contra PD-L1 van de 19-23% en pacientes de células no pequeñas de cáncer de pulmón[54]-[56], a 25% en pacientes de carcinoma renal [57], y 40% en pacientes de melanoma estadio IV [58]; donde a pesar de no tener valores de ORR mayores al 50%, se han observado respuestas duraderas con los pacientes que si respondieron a la inmunoterapia.

Los resultados prometedores que ha obtenido el anticuerpo monoclonal anti PD-L1 brindan optimismo a la posible aplicación de inmunoterapias a aquellos tipos de cáncer que carecen de una terapia dirigida, como el CMTN. Históricamente, todos los subtipos de cáncer de mama se consideraban no inmunogénicos, pero ahora nueva evidencia señala que el CMTN tiene un carácter inmunogénico. Un estudio comparativo mostró que los tumores triple negativos están caracterizados por altos niveles de expresión de bloques de genes funcionales asociados a 15 tipos diferentes

de células del sistema inmune como linfocitos B (LB), linfocitos T reguladores CD4+, linfocitos CD8+, macrófagos, células dendríticas (CDs), células NK, neutrófilos, entre otras. Adicionalmente, altos niveles de expresión de antígenos testiculares de cáncer (ATC), los cuales se expresan en una gran variedad de tumores, pero no en tejidos normales, a excepción de la placenta y las células germinales masculinas, de donde deriva su nombre. De igual manera, se encuentran expresados genes supresores inmunológicos tumorales como moléculas de puntos control que participan en la inmunosupresión: CTLA-4, PD-L1, PD-L2 (ligando 1 de muerte programada), PD-1, LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos), y TIGIT (inmunoglobulina de linfocitos T y motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina) [59], [60]. Conjuntamente un metaanálisis con 2987 pacientes con CMTN de 8 estudios diferentes mostró que la presencia de TILs está significativamente asociada a reducciones del 30% en la recurrencia de la enfermedad, 22% en recurrencia a distancia, 34% en muerte, y una mejor supervivencia, independiente si la localización de los TILs es intratumoral o estromal[61].

Sumando a estas observaciones, se encontró que mientras mayor sea la incidencia de mutaciones en los genes ATM y TP53, y alteraciones en las vías PI3K/MEK y BRCA, mayor será la inmunogenicidad del tumor y el porcentaje de TILs encontrados [62]. A partir del conocimiento del carácter inmunogénico del CMTN, en un estudio retrospectivo se demostró que la presencia de linfocitos CD8+ infiltrados en tumores triple negativos es característica de una respuesta más alta a inhibidores de puntos control [63]. Debido a esto, se han expandido la cantidad de estudios clínicos donde evalúan el uso de inmunoterapias en pacientes con CMTN.

Existen ensayos clínicos terminados y en proceso que buscan evaluar el potencial de inhibidores de puntos control, principalmente PD-1 y PD-L1. Anticuerpos monoclonales que bloquean a PD-L1, como Avelumab y Atezolizumab, produjeron rangos de respuesta objetiva (ORR) de 44.4 % y 13%, respectivamente en pacientes

de CMTN positivos para PD-L1 [64], [65]. Adicionalmente, el anticuerpo Pembrolizumab (anti PD-1) originó un ORR de 18.5% en pacientes de CMTNm, positivos para PD-L1 [66]. El 8 de marzo del 2019, la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA por sus siglas en inglés) otorgó una aprobación acelerada para el medicamento Atezolizumab (Tecentriq, anticuerpo monoclonal humanizado de isotipo IgG1) en combinación con el quimiofármaco nab-paclitaxel (Abraxane), para el tratamiento inicial de cáncer de mama triple negativo metastásico. Esta terapia es el primer régimen aprobado por la FDA para el CaMa que involucra la inmunoterapia. La aprobación acelerada de este régimen terapéutico se basó en los resultados obtenidos de la fase III del estudio clínico IMpassion 130, que demostró que Atezolizumab en combinación con nab-paclitaxel (agente quimioterapéutico ligado a albumina que inhibe la mitosis de la célula tumoral al impedir la despolimerización de los microtúbulos [67]) conducen a aumentos en los valores de progresión libre de enfermedad (7.2 vs 5.5 meses) y supervivencia total (21.3 vs 17.6) [68]. Una de las explicaciones para comprender como la combinación de Atezolizumab con nab-paclitaxel conduce a mejores resultados que sus usos por separado en monoterapia, se puede deber a la conjunta acción de una mayor liberación de antígenos de células tumorales causada por el quimiofármaco, que provocan junto con el bloqueo de PD-L1 un aumento de la actividad antitumoral del linfocito T [69].

Aunque las respuestas a las inmunoterapias no son mayores al 50%, todavía se considera un campo prometedor, ya que los pacientes que sí responden al tratamiento tienen un pronóstico favorable, y comúnmente muestran un incremento significativo en la supervivencia total con inmunidad antitumoral extendida. Los obstáculos principales son: identificar a los pacientes que puedan responder a la terapia, incrementar la respuesta objetiva al tratamiento, y en un futuro lograr que todos los pacientes sean susceptibles y respondan a ésta [70].

A pesar de que se ha demostrado el carácter inmunogénico del CMTN y que éste es capaz de responder a terapias con inhibidores de puntos control, la investigación no se ha expandido lo suficiente para establecer biomarcadores predictivos que aseguren que el paciente responderá al tratamiento. En la conferencia de St. Gallen se ha discutido el uso del porcentaje de TILs como marcador predictivo y pronóstico del CMTN; sin embargo, esta noción fue descalificada [71]. Se espera que análisis más minuciosos sobre el microambiente tumoral, y la respuesta inmunológica sistémica de pacientes podría ayudar a la identificación o cimentación de biomarcadores predictivos [72].

Papel de CTLA-4 en el sistema inmune

El antígeno 4 del linfocito T citotóxico (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, CTLA-4 por sus siglas en inglés) fue el primer punto de control inmunológico utilizado como blanco molecular de inmunoterapia [73]. Este receptor es una glicoproteína transmembranal de tipo 1 perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas CD28:B7. CTLA-4 está compuesto por un total de 223 aminoácidos (aa) y se encuentra como un homodímero de 41-43 KDa. Su fracción extracelular tiene un único dominio de tipo IgV que es capaz de interactuar con sus ligandos B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) que se encuentran presentes en células presentadoras de antígeno (antigen-presenting cells, APC por sus siglas en inglés). La porción citoplasmática de CTLA-4 es de 36 aa y carece de actividad enzimática intrínseca y de motivos de inhibición en inmunorreceptores basados en tirosina (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM por sus siglas en inglés)[74]-[77].

CTLA-4 se expresa en linfocitos T citotóxicos (linfocitos CD8+), linfocitos T cooperadores (linfocitos CD4+ o helper), linfocitos T reguladores (LR), y linfocitos T de memoria (LM) [78]. Su papel es indispensable para un correcto funcionamiento de la respuesta inmune; demostrado por el fenotipo letal de ratones knockout para

CTLA-4 que sufren de un sistema inmune sobreactivado[79], [80]. Aunque este receptor se expresa en linfocitos CD8+ activos, sus funciones principales las ejerce a través de los linfocitos CD4+, disminuyendo la actividad del linfocito T cooperador H1 (T_{H1}), y aumentando la capacidad inmunosupresora de los LR.

El papel de CTLA-4 es regular la amplitud de las primeras etapas de activación de estos tipos celulares. Para activar a los linfocitos T se requieren de 3 principales señales. Primero es la unión del antígeno con el receptor de las células T (TCR), segundo, la interacción del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, en humanos: antígeno leucocitario humano, HLA) con los receptores CD8 o CD4 de los linfocitos T, y tercero, la generación de una señal coestimuladora por medio de la unión de CD80 o CD86 con CD28. Una vez que estas tres señales se completan, la vía por CD28 amplifica la señalización del TCR para activar la proliferación de los linfocitos T. CD28 y CTLA.4 comparten los mismos ligandos; sin embargo, estos se unen a CTLA-4 con mayor afinidad, por esta razón, CTLA-4 contrarresta la actividad coestimuladora de CD28 [81]. La afinidad de CD80 con CD28 y CTLA-4 (K_d :4 μ M y 0.4 μ M, respectivamente) es más alta que la de CD86 para con estos receptores (aproximadamente K_d :15-40 μ M y 4 μ M, respectivamente). Por estas cualidades en resumen, CD28 es un receptor altamente expresado pero con baja afinidad, mientras que CTLA-4 es poco abundante pero presenta una mayor afinidad competitiva para con sus ligandos[82], [83].

Se ha propuesto que la expresión de CTLA-4 atenúa la activación de los linfocitos T por competencia de ligando contra CD28 y por señales intracelulares inhibitorias. Estudios sugieren que la activación de SHP2 y PP2A neutraliza la señalización por cinasas del TCR y CD28. Otro mecanismo incluye la expansión de los LR, que producen citocinas inmunosupresoras, como TGF- β , y además indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que es una enzima que cataliza la degradación del triptófano [84].

Los niveles de expresión membranal de CTLA-4 en la mayoría de los LT en reposo es bajo e incluso inexistente, pero esta condición cambia justo después de la

activación del linfocito T. A pesar de que la máxima expresión de CTLA-4 en membrana es en el rango de 48-72 horas después de la activación, siguen siendo valores bajos de expresión de un receptor en membrana. Esta falta de estabilidad en la permanencia en la membrana se debe al dominio citoplasmático que cuenta CTLA-4, que es capaz de interactuar con la proteína adaptadora de clatrina (AP-50), lo que causa la rápida internalización de este receptor [84]. Consecuentemente, la mayor cantidad de CTLA-4 se encuentra en vesículas intracelulares [85].

A pesar de que se tienen identificadas las características biofísicas, estructurales, y aspectos biológico-celulares del sistema de CTLA-4, aun es ambiguo la manera en que estas propiedades se integran en la completa función de este receptor. Existen propuestas de modelos que integran las observaciones de los efectos de CTLA-4 sobre la activación de los linfocitos T, y estos modelos se pueden dividir en funciones intrínsecas (la interacción de CTLA-4 con su receptor altera a la célula que lo expresa) y extrínsecas (CTLA-4 ejerce su efecto a través de otras células).

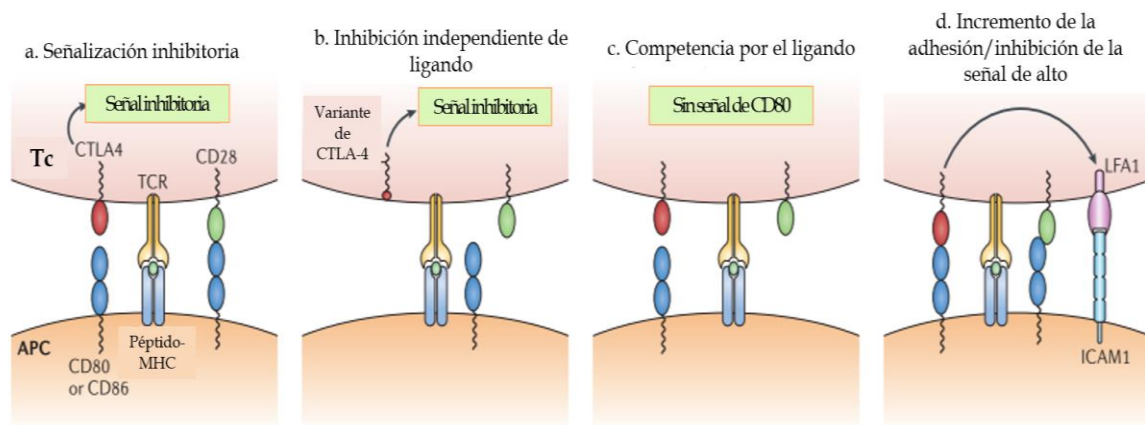


Figura 2. Modelos de las funciones intrínsecas de CTLA-4 en el linfocito T. los posibles roles inhibitorios intrínsecos de CTLA-4 son a) generación de una señal que interfiere con la señalización próxima del receptor de células T (TCR) o de CD28, causando el reclutamiento de fosfatasa, alteración de la formación de balsas lipídicas, disminución en la producción de IL-2 e inhibición en la proliferación de la T_C. b) la isoforma de CTLA-4 que carece de dominio extracelular inhibe la activación de las T_C por medio de vías de señalización inhibitorias. c) CTLA-4 no está orquestando la señalización, sino que previene la interacción de CD28 con sus ligandos CD80/CD86. d) CTLA-4 altera la adhesión de la T_C con la APC, ya sea aumentando el tiempo de adhesión por medio de una vía mediada por LFA1 (antígeno 1 asociado a la función del linfocito) o disminuyendo el tiempo al inhibir la señal de alto. Modificado de [87].

Una de las funciones intrínsecas de CTLA-4 es la activación de una cascada de señales inhibitorias (*Figura 2a*). Empieza con el reclutamiento de fosfatasa como PP2A y SYP (conocido también como PTPN11) [88], éstas desfosforilan proteínas clave en la cascada de señalización del TCR. CTLA-4 regula diferencialmente a ERK, y JNK, al mismo tiempo que interfiere con la formación de balsas lipídicas, y afecta la formación de microclusters que contienen ZAP70 (proteína cinasa asociada a la cadena Zeta 70) (*Figura 4*). Asimismo, CTLA-4 puede ser fosforilado por la familia de cinasas SRC y cinasas de linfocitos en reposo (RLK o también conocidas como TXK) dando como resultado el reclutamiento de PI3K (fosfatidilinositol-3-cinasa), lo que permite que los LT en estado de anergia no vayan a apoptosis [89].

La función intrínseca de inhibición independiente del ligando (*Figura 2b*) se basa en la isoforma de CTLA-4 formada por splicing alternativo que carece de la sección codificada por el exón 2. Esta variante se encuentra anclada a la membrana citoplasmática, y carece del dominio extracelular. Por la existencia de esta isoforma se sugiere que existe una señal inhibitoria por el dominio citoplasmático de CTLA-4 que es capaz de inhibir la activación del linfocito T; sin embargo, no se cuentan registros de que el dominio citoplasmático de CTLA-4 cuente con actividad enzimática intrínseca [90], [91].

Uno de los modelos de las funciones intrínsecas de CTLA-4 más aceptados es el de competencia por ligando (*Figura 2c*) donde CTLA-4 impide la activación de CD28 al competir por los mismos ligandos (CD80 y CD86). La efectividad de este modelo depende en la cantidad de receptor y ligando presente en membrana[92].

El último modelo se basa en dos acciones contrarias. Una es el incremento de la adhesión entre el LT y la APC, y el de inhibir la señal de alto (*Figura 2d*). La interacción de CTLA-4 con CD80 o CD86 incrementa la adhesión y agrupamiento mediada por LFA-1 (antígeno 1 asociado a la función de los leucocitos, integrina α L β 2). CTLA-4 por medio de Hck (miembro de la familia de cinasas Src) fosforila a Rap1 GEF C3G en la membrana plasmática, y causa un aumento en los niveles de

GTP-Rap1, que incrementan la adhesión de LFA1 a su ligando ICAM-1. Estudios mostraron que este mecanismo ayuda a que los LR compitan con LT por los mismos ligandos en APC [93]. Sin embargo, existen otros estudios que indican que CTLA-4 mantiene en realidad a los linfocitos T en movimiento, impidiendo que éstos sean apropiadamente activados por APC. Esta última sugerencia es más pertinente, ya que explica la ausencia de CTLA-4 en LT no maduros [94].

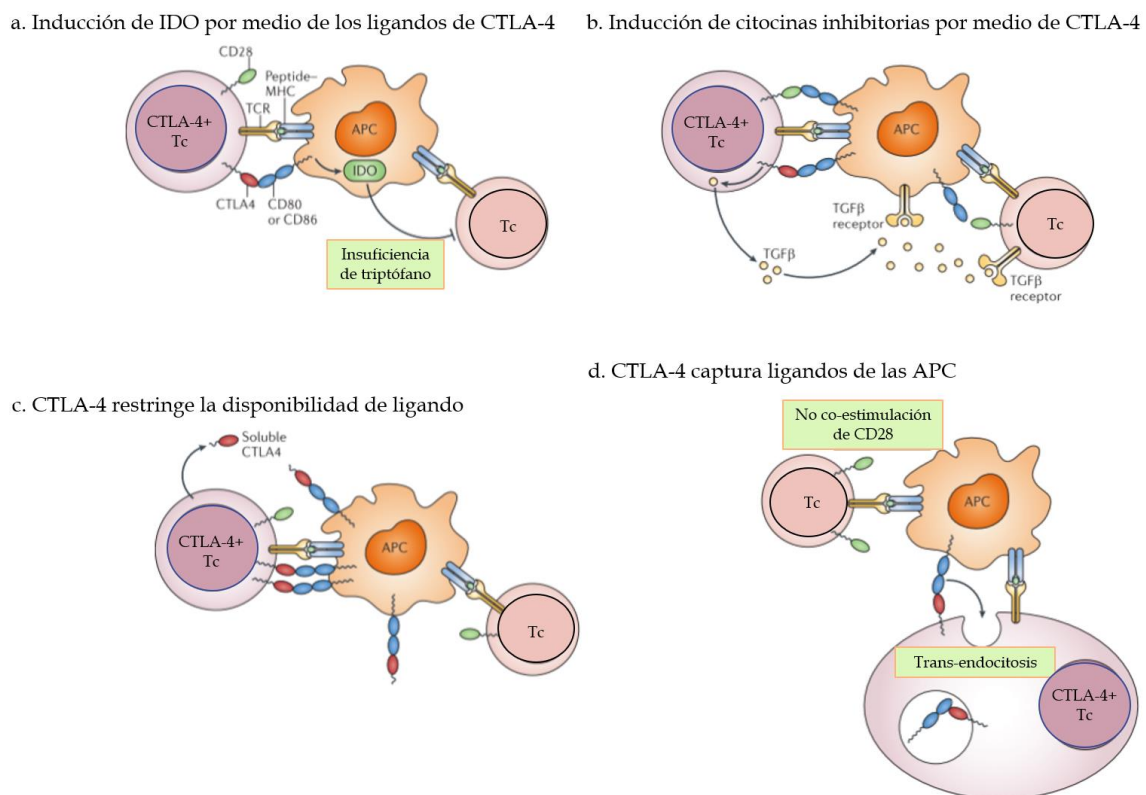


Figura 3. Modelos de las funciones extrínsecas de CTLA-4 en el linfocito T. los posibles roles inhibitorios extrínsecos de CTLA-4 son a) CTLA-4 inicia señales de reversa en las APC por medio de CD80/CD86, lo que resulta en la activación de la enzima IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) que degrada triptófano, que puede causar inhibición del linfocito T por falta del aminoácido o por la acumulación de metabolitos inhibitorios. b) CTLA-4 estimula la producción de citocinas regulatorias, como TGFβ, la cual puede inhibir a las células presentadoras de antígeno y/o linfocitos T. c) CTLA-4 es capaz de secuestrar a sus ligandos CD80/CD86 al mantener una interacción con ellos o por medio de la isoforma soluble de CTLA-4, lo que conduce a una disminución de la disponibilidad de estos ligandos para interactuar con CD28. d) Nuevo modelo de trans-endocitosis, que explica que cuando CTLA-4 es endocitado resulta también en la internalización de sus ligandos, lo que causa un menor número de ligandos presentes en la superficie de las APC. Modificado de [87].

Las funciones extrínsecas de CTLA-4 fueron reportadas por Bachman et al. que encontraron que ratones deficientes en Rag2 y reconstituidos con una mezcla de medula ósea positiva y negativa en la expresión de CTLA-4 no desarrollaban enfermedades autoinmunes, mientras que aquellos ratones que se les transfirió medula ósea con expresión negativa para CTLA-4, tuvieron el resultado contrario [95]. Una posible explicación para la habilidad de CTLA-4 de funcionar por un mecanismo extrínseco es su capacidad de interactuar con APC e iniciar una señal de reversa. CTLA-4, tanto en su forma de proteína fusión de inmunoglobulina (CTLA4-Ig) como de receptor en los LR, es capaz de inducir la actividad de IDO sobre las APC positivas para CD80 y CD86 (*Figura 3a*). IDO cataboliza al aminoácido triptófano, lo que conduce a una disminución local de triptófano, llevando a la inhibición de los LT [96].

Aparte de inducir la actividad de IDO, CTLA-4 puede inducir la producción de citocinas inhibitorias (*Figura 3b*) ya que la ligación de éste conduce a la activación de las funciones supresoras de los LR. El rol intrínseco de CTLA-4 en los LR conduce a un resultado extrínseco. Se ha reportado que la ligación de CTLA-4 ocasiona un aumento en la producción de TGF β [97]. No obstante, contra esta postura se encuentran argumentos basados en reportes que en quimeras de medula ósea las células positivas para CTLA-4 son capaces de controlar a aquellas deficientes en este receptor, pero que esta acción no es dependiente de TGF β o IL-10. Y a pesar de que la ligación de CTLA-4 sí induce la liberación de alguna molécula inmunosupresora, su identidad aún permanece en debate[98].

La restricción en la disponibilidad del ligando de manera extrínseca por medio de la isoforma soluble de CTLA-4 (sCTLA-4) es un mecanismo aún no completamente definido (*Figura 3c*). La isoforma sCTLA-4 surge de un splicing alternativo de mRNA, y carece del dominio transmembranal que es codificado por el exón 3; y es capaz de interactuar con los ligandos CD80 y CD86, modulando de esta manera la activación del linfocito T [99]. No obstante, hasta el momento no se conoce con

certeza que tipo de célula y estímulo son necesarios para fomentar la producción de esta isoforma.

Se ha demostrado que los linfocitos T reguladores son capaces de alterar la habilidad de las células dendríticas (CDs) de formar interacciones estables con los LT en los nódulos linfáticos, afectando la capacidad estimuladora de las CDs. Adicionalmente, los LR positivos para CTLA-4 son capaces de reducir los niveles de expresión de los ligandos CD80 y CD86, al removerlos físicamente de las APC (*Figura 3d*), conduciendo a una co-estimulación fallida y a una supresión de la respuesta de los LT. Este proceso se conoce como trans-endocitosis, donde el modelo muestra que por medio de la interacción de CTLA-4 con sus ligandos, éste los secuestra y sucede una transferencia intercelular al pasar los ligandos de la APC a vesículas que contienen CTLA-4 dentro del LT. Este proceso representa una extensión del modelo de competencia por ligando [100].

En los mecanismos intrínsecos se refirieron algunas de las interacciones y efectos río abajo que puede tener y ejercer el dominio citoplasmático de CTLA-4. Como ya se estableció, CTLA-4 regula de manera diferencial a diferentes moléculas de la familia MAPK. Mientras que la inhibición de ERK explica algunos de los efectos negativos de las funciones de CTLA-4, este mismo receptor es capaz de activar a JNK para la diferenciación de los linfocitos CD4⁺ a T_{H1} en vez de linfocito T cooperador H2 (T_{H2}). Conjuntamente, CTLA-4 inhibe la progresión del ciclo celular y la activación de factores de transcripción como NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), NFAT (factor nuclear de linfocitos T activos) y AP1 (proteína activadora 1) [101].

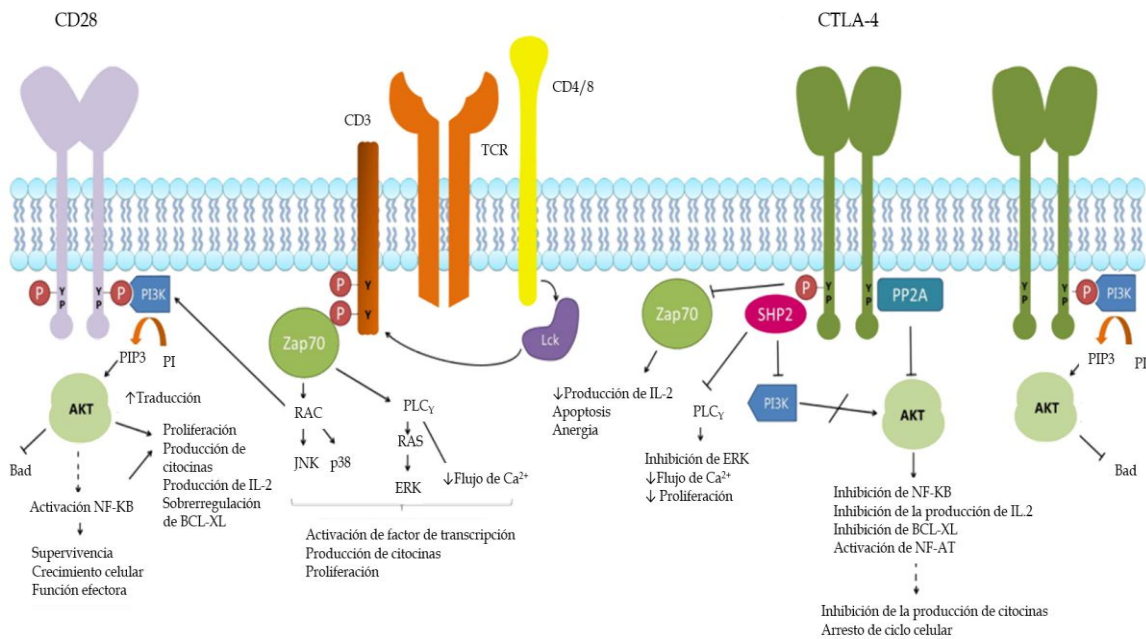


Figura 4. Modelo de señalización de CD28 y CTLA-4. Cuando se estimula el linfocito T, los residuos intracelulares de CD28 son fosforilados, atrayendo a PI3K. Al activarse PI3K promueve la activación de PKB/Akt, seguida de NF-κB, que resulta en la sobreexpresión del gen BCL-XL, favoreciendo así la supervivencia de las T_C. La activación de Akt también promueve la producción de IL-2. El complejo HLA-péptido es reconocido por el TCR y por su co-receptor CD4/CD8, lo que activa a la cinasa Lck, la cual fosforila al complejo CD3. Esto ocasiona el reclutamiento y fosforilación de Zap70, causando el inicio de la cascada de señalización que activa a PLCγ1 y RAC. PLCγ1 promueve la movilización de calcio y la activación de la vía de RAS. La combinación de estas cascadas de señalización promueve la activación de factores de transcripción y proliferación celular. CTLA-4 suprime la activación y la función de los linfocitos T mediante el reclutamiento de las fosfatasa SHP-2 y PP2A. Estas fosfatasas desfosforilan varios de los puntos de señalización que son esenciales para la co-estimulación de las T_C. Modificado de [84].

CD28 y CTLA-4 tienen papeles opuestos, pero igualmente importantes para la activación y regulación del linfocito T (**Figura 4**). El complejo peptídico unido al MHC es reconocido por el TCR y por sus correceptores CD4 o CD8, resultando en la activación de la cinasa Lck, y ésta fosforila los motivos ITAM del complejo CD3. Posteriormente, se recluta y fosforila ZAP70, quien fosforila proteínas adaptadoras para la consecuente activación de PLCγ1 (Fosfolipasa C γ 1) y RAC. PLCγ1 promueve la movilización de Ca²⁺ y la activación de RAS. La combinación de estos eventos dirige la activación de las MAP cinasas (ERK, JNK, y p38), así como PI3K y PKB/ Akt

(proteína cinasa B). Después CD28 ayuda a la generación de señales coestimuladoras que sirven para la amplificación de la señal. Este receptor interactúa con sus ligandos CD80 o CD86 provocando la activación de Akt por la vía PI3K. En conjunto estas vías promueven la producción de citocinas como IL-2, y la proliferación y diferenciación del linfocito T [92]. A partir de la activación del LT, el papel de regulación de CTLA-4 entra en juego, ya sea por medio de mecanismos intrínsecos o extrínsecos. En la *Figura 4* se ejemplifica como el dominio citoplasmático de CTLA-4 es capaz de interactuar con fosfatasa y cinasas, las cuales, por mecanismos aun no completamente definidos, efectúan las funciones de CTLA-4. Por medio del dominio YVKM (Tyr, Val, Lys, Met), el cual es capaz de interactuar con las fosfatasa SHP2 y PP2A, que desfosforilan residuos de tirosina, serina y treonina, respectivamente. Sus acciones conducen a la inhibición de las vías de ERK, NF- κ B, NFAT, BCL-xL (linfoma de células B extra grande), y sus efectos se ven reflejados en la disminución de producción de IL-2 y proliferación. En contraste, ese mismo dominio citoplasmático de CTLA-4 es capaz de reclutar a PI3K para consecuentemente activar a Akt. Ésto activa señales de supervivencia que permiten la inducción de anergia sin ocasionar apoptosis. Éste mecanismo se cree útil dentro la tolerancia inmunológica a largo plazo [89], [102].

Ipilimumab

La identificación de CTLA-4 como un receptor coinhibitorio expresado en los linfocitos T condujo al desarrollo de anticuerpos que bloquearan su dominio extracelular para mantener y/o estimular la respuesta inmune antitumoral. Tremelimumab e Ipilimumab son anticuerpos monoclonales humanizados que bloquean el ectodominio de CTLA-4. Éstos en estudios clínicos de fase I y II contra melanoma mostraron que eran seguros y que tenían actividad antitumoral tanto como monoterapia como en combinación con IL-2, vacuna gp100, y quimioterapia [103]. Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humanizado que consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras kappa unidas por enlaces

disulfuro, y su peso molecular aproximado es de 148 KDa. Se desarrolló a partir de un modelo murino transgénico para crear un anticuerpo monoclonal con genes humanos de inmunoglobulina que se uniera a CTLA-4, así bloqueando la interacción con sus ligandos [104]. Estudios clínicos han confirmado que Ipilimumab puede inducir respuestas duraderas e incrementar la supervivencia promedio (overall survival, OS por sus siglas en inglés) de pacientes con melanoma avanzado. Además, dos estudios de fase III demostraron la eficacia de este inmunofármaco a dos diferentes dosis (3 y 10 mg/kg) en melanoma metastásico. Se obtuvieron rangos de supervivencia a 3 años del 23% y 31% para las dosis de 3 y 10 mg/kg respectivamente; no obstante, se ve un incremento en la severidad de los efectos secundarios en la dosis de 10 mg/kg en comparación con la de 3 mg/Kg. En base a los resultados de estos dos estudios clínicos, en 2011 la FDA aprobó el uso de Ipilimumab a una dosis de 3 mg/kg como tratamiento para melanoma metastásico [105]. En contraste, Tremelimumab falló en incrementar significativamente la supervivencia promedio de pacientes con melanoma avanzado en comparación al grupo tratado con quimioterapia [106]. Se hipotetiza que una de las razones para la diferencia en efectos sea que los dos pertenecen a diferentes clases de inmunoglobulinas, ya que Ipilimumab es clase IgG1, y se ha demostrado que ejerce una disminución más potente sobre los linfocitos T reguladores gracias a que se une con mayor afinidad a FcγRs, en comparación a su contraparte IgG2, clase a la que pertenece Tremelimumab [107], [108].

Estudios preclínicos y clínicos demostraron que Ipilimumab al bloquear la señal inhibitoria inducida por las vías de señalización de CTLA-4, ocasiona la activación, y aumento del número de linfocitos T efectores (LT citotóxicos y cooperadores) sensibles a células tumorales, provocando el montaje de una respuesta inmune directa por los LT efectores contra las células cancerígenas [109] (*Figura 5*). El bloqueo de CTLA-4 también puede reducir la función de los LR, conduciendo a un aumento en la respuesta inmune antitumoral [110]. En experimentos *in vitro* se identificó que Ipilimumab es capaz de disminuir el número de LR por mecanismos

de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC por sus siglas en inglés) mediada por FcγRIIIA (monocitos no-clásicos CD16⁺) [111].

Ipilimumab muestra promesa como inmunoterapia, no solo para el melanoma, sino también para otros tipos de cáncer. En la actualidad se están llevando estudios clínicos para el uso de Ipilimumab como monoterapia y en combinación con otros inmunofármacos; además, se están desarrollando mejores métodos de entrega para disminuir su toxicidad[112].

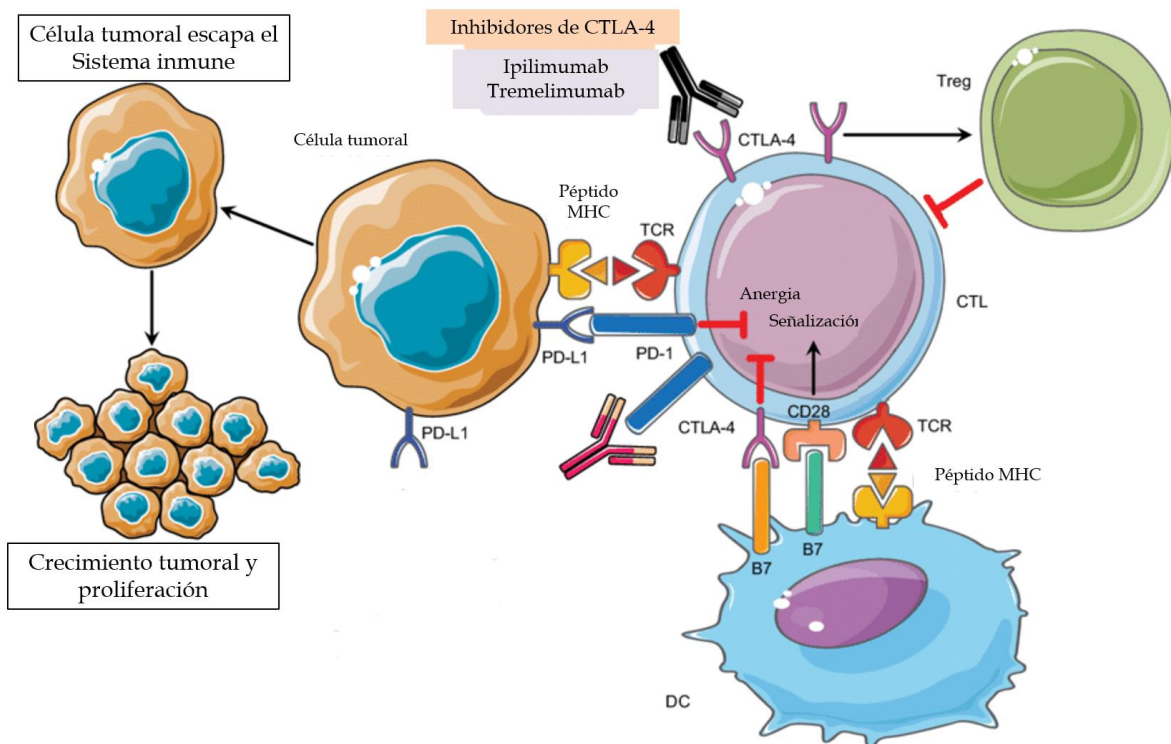


Figura 5. Mecanismo de Ipilimumab contra células tumorales. La incapacidad para activar a los CTL (Linfocitos T citotóxicos) en el microambiente tumoral ya sea a través del efecto supresor de T_{regs} o mediante puntos de control inmunitarios permite a las células tumorales escapar del ataque inmunitario, sobrevivir y crecer. Los ligandos B7 expresados en las células presentadoras de antígeno se unen al receptor CD28 en los CTL, lo que conduce a la amplificación de las células T y la respuesta inmune. Alternativamente, la unión de ligandos B7 a CTLA-4 expresado en células T suprime su actividad. CTLA-4 también mejora la actividad de T_{regs} que conduce a la actividad inmunosupresora. La inhibición farmacológica de los puntos de control inmunitario con anticuerpos monoclonales restaura la actividad antitumoral de los CTL y alivia la inmunosupresión. Modificado de [113].

Antecedentes

La expresión de CTLA-4 no se encuentra limitada a los diferentes subtipos de linfocitos T, si no que también se encuentra reportado su expresión en fibroblastos de placenta[114], células musculares de cultivo [115], monocitos [116], y una variedad de células de leucemia[117], asimismo, este receptor también se expresa en células tumorales. En 2005 Contardi et al. reportó la expresión de CTLA-4 en membrana en 30 de 34 líneas celulares tumorales, entre ellas líneas celulares cancerígenas de mama, colon, riñón, pulmón, ovario, útero, vejiga, entre otros [118]. Otro estudio corroboró la expresión de CTLA-4 en membrana de líneas celulares de melanoma, y que estas eran capaces de interactuar con Ipilimumab [119]. Respecto a líneas celulares de CMTN, se reportó que la línea celular MDA-MB-231 expresa en membrana y citoplasma CTLA-4, y que la presencia de este receptor altera la maduración y función de las CD4 [120].

Aparte de la expresión de CTLA-4 en líneas celulares, se ha observado que en pacientes de cáncer de mama existe una correlación entre la expresión de CTLA-4 en biopsias tumorales y un peor pronóstico [121], [122]. Además, existe una mayor expresión de CTLA-4 en biopsias de tumores de CaMa en comparación con tejido sano de mama, y un aumento de la expresión de CTLA-4 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), lo que se correlacionó con una menor producción de IL-2 y menor respuesta a estimulantes, como fitohemaglutinina (PHA) [123].

Se ha detectado sobreexpresión de CTLA-4 en el subtipo no escamoso de cáncer de pulmón de células no pequeñas; ésto tuvo correlación con la edad del paciente y diferenciación histológica, pero no con el pronóstico clínico. Valores altos de mRNA de CTLA-4 representan un escenario diferente para pacientes de leucemia linfocítica crónica de célula tipo B, ya que se relaciona con un buen pronóstico clínico, pero para pacientes con cáncer de mama se asocia con metástasis a los ganglios linfáticos axilares. Además, pacientes de carcinoma nasofaríngeo, melanoma, y cáncer de

pulmón de células no pequeñas con altos niveles de expresión de CTLA-4 en tumores tienen peores pronósticos [124].

Aparte de CTLA-4, existen otras moléculas coestimuladoras y reguladoras de la respuesta inmunológica que se expresan en células tumorales, como CD80 y CD86. A pesar de que estos ligandos comúnmente se expresan en APC, existen reportes de su expresión en células tumorales renales, carcinomas gástricos, colorrectales [125], [126] y un reporte de la expresión de CD86 en líneas celulares de mama [118]; sin embargo, se desconoce el papel que estas podrían jugar en ambiente tumoral, por otra parte.

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se realizó el estudio de la expresión de CTLA-4 sobre la línea celular DU4475 perteneciente al fenotipo de cáncer de mama triple negativo [127]. En esta línea, se observó una expresión positiva de CTLA-4 y susceptibilidad al tratamiento con ipilimumab a una concentración de 0.5 mg/ml, disminuyendo la viabilidad celular en un 15% en comparación con su control después de bloquear CTLA-4 en un periodo de incubación de 72 horas. Adicionalmente, la capacidad de formación de colonias se vio afectada por el bloqueo de CTLA-4, con una disminución del 19% en comparación con su control. A pesar de ello, cuando se evaluó la capacidad invasora de la línea celular bloqueada con Ipilimumab, se observó un aumento del 45% en el número de células que invadieron en comparación con su control [127].

En ese trabajo solo se realizaron dos ensayos independientes por triplicado de cada experimento, adicionalmente solo se estudió una sola línea celular de cáncer de mama triple negativo, lo cual impidió obtener una conclusión certera del papel de CTLA-4 sobre líneas tumorales pertenecientes al fenotipo de CMTN. No obstante, este trabajo se puede tomar como un antecedente del grupo que insta a estudiar a fondo el papel de este receptor sobre un contexto de líneas celulares de CMTN positivas en la expresión de CTLA-4.

Justificación

El cáncer de mama triple negativo es el fenotipo más agresivo de cáncer de mama, y carece de un tratamiento dirigido y eficaz. Se ha sugerido el uso de Ipilimumab como terapia inmunológica, basado en el bloqueo del receptor CTLA-4 presente en los linfocitos T; sin embargo, se ha observado que las células de tumores mamarios también son capaces de expresar CTLA-4, y se desconoce la función de CTLA-4 en éstas. Por ello, es importante analizar el efecto fisiológico que causaría bloquear a CTLA-4 en líneas celulares tumorales con un inmunofármaco como Ipilimumab.

Hipótesis

Si las células de carcinoma mamario triple negativo expresan CTLA-4, CD80 y CD86, se espera que al bloquear CTLA-4 con un anticuerpo neutralizante, y activarlo con su ligando exista un efecto sobre la viabilidad celular, la capacidad invasora, la concentración de IL-2 secretada al medio de cultivo, y la modulación de las vías de señalización de ERK, Akt y JNK.

Objetivo

Determinar la expresión de CTLA-4 en 4 líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo (MDA-MB-231, DU4475, HCC70 y HCC1937). Evaluar el efecto de su activación y bloqueo sobre la viabilidad celular y capacidad invasora de las líneas celulares, evaluando el papel de las vías Akt, Erk y JNK en dichas condiciones.

Objetivos particulares

1. Determinar por citometría de flujo la expresión de CTLA-4 en 4 líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo.
2. Evaluar el efecto de la interacción de CTLA-4 con Ipilimumab sobre la viabilidad celular y capacidad invasora de las líneas celulares de CMTN.
3. Determinar por citometría de flujo la expresión de CD80, y CD86 en líneas celulares de CMTN.
4. Evaluar el efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando CD80 sobre la viabilidad celular de las líneas celulares de CMTN.
5. Determinar si las líneas celulares de CMTN producen IL-2 en condiciones normales, de bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab y de activación con su ligando CD80.
6. Dilucidar por Western blot el efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab y activación con su ligando CD80 sobre las vías Akt, Erk y JNK en líneas celulares de CMTN.

Metodología

Cultivo celular

Se utilizaron las siguientes 4 líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo: MDA-MB-231 (etapa metastásica con histología de adenocarcinoma, ATCC® HTB-26™), HCC1937 (Estado IIB grado 3, con histología carcinoma ductal, ATCC® CRL-2336™), DU4475 (etapa metastásica, ATCC® HTB-123™), y HCC70 (estado IIIA grado 3, ATCC® CRL-2315™). Se utilizó medio RPMI 1640 (In vitro) de Caisson Labs. El medio se complementó al 1% de antibióticos (10 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de antimicótico anfotericina B Fungizone®, de GIBCO). La línea MDA-MB-231 se suplementó al 7% con suero fetal bovino inactivado (SFB) de ByProducts, y de las otras 3 líneas celulares se suplementó al 10%. El medio de cultivo se renovaba cada 3 días. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con atmosfera húmeda de 95% aire y 5% CO₂, y temperatura de 37°C.

Para resemenbrar las líneas celulares adherentes (MDA-MB-231, HCC70, y HCC1937) primero se retiraba el medio de cultivo y se hacían lavados con PBS estéril (solución amortiguadora de fosfatos: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM, pH=7.4) se hacia una incubación de 5 minutos con una solución de verseno estéril (EDTA 1 mM, NaCl 0.17 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH=7.7) y tripsina al 0.25% (GIBCO). Las células eran recolectadas y centrifugadas a 125 x g por 5 minutos, se desechaba el sobrenadante y se resuspendían en medio fresco. Para la línea celular DU4475 que crece en suspensión, se recolectaba el medio y se centrifugaba a 125 x g por 5 minutos, se desechaba el sobrenadante, y se resuspendían las células en medio fresco.

Análisis de la expresión intracelular de CTLA-4 en células de CMTN por Citometría de flujo

Se utilizó 1×10^6 células para cada condición de cada línea celular. Se realizó un lavado con PBS-EDTA (1 mM), y se centrifugó las células a $125 \times g$ por 5 minutos. Se resuspendió el pellet de células en 250 μ l de Cytofix/Cytoper (#554722) y se incubó por 20 minutos a 4°C. Se realizó un lavado con Perm Wash 1X (#554723), y se resuspendió el pellet de células en 100 μ l de esta misma solución. Se añadió 1 μ l de bloqueador intracelular (Bloqueador de FcR-Fracción cristalizable Mat #120-000-422) y se incubó por 10 minutos a 4°C. Se realizó un lavado con la solución de Perm Wash, y se resuspendió el pellet de células en 100 μ l de solución Perm Wash. Se añadió 2.5 μ l del anticuerpo APC anti-human CD152 (BD Bioscience), y se incubó por 20 minutos a 4°C. Se realizó un último lavado con Perm Wash y con una solución de PBS-EDTA (1 mM) y 3% de albumina de suero bovino (BSA). Como control de la expresión de CTLA-4 se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP), las cuales se activaron durante 7 días con fitohemaglutinina (PHA). Adicionalmente, como control se realizaron lecturas de auto fluorescencia de cada línea celular. Se utilizó el citómetro FACS Canto II para la adquisición de datos, los cuales fueron procesados con el programa FlowJo.

Análisis de la expresión membranal de CD80 y CD86 en células de CMTN por Citometría de flujo

Se cosechó 1×10^6 células para cada condición de cada línea celular. Se realizó un primer lavado con PBS, y un segundo con PBS-EDTA (1 mM), las células se recuperaron al centrifugarse a $125 \times g$ por 5 minutos. Se realizó un tercer lavado con una solución de PBS-EDTA (1 mM) y 3% de albumina de suero bovino (BSA), se repitió la centrifugación a $125 \times g$ por 5 minutos a 10°C. Las células se bloquearon con 300 μ l de SFB a 4°C por 10 minutos. Las células se lavaron con la solución

previamente mencionada de PBS-EDTA y BSA. Se añadieron 2.5 µl de los anticuerpos Human B7-1/CD80 Phycoerythrin MAb y Human B7-2/CD86 APC-conjugated Antibody (R and D systems), se realizó una incubación por 20 minutos a 4°C. Se agregaron 250 µl de fijador 1X (FACs lysing solution 10X (349202 BD)) y se incubaron las células por 10 minutos a 4°C. Se realizó un último lavado con la solución de PBS-EDTA y BSA. Como control de la expresión de CD80 y CD86 se utilizaron monocitos y células dendríticas, las cuales fueron activadas durante 3 días con IFN-γ. Adicionalmente, como control se realizaron lecturas de auto fluorescencia de cada línea celular. Se utilizó el citómetro FACS Canto II para la adquisición de datos, los cuales fueron procesados con el programa FlowJo.

Ensayo de MTT por espectroscopía de UV-Vis

Este ensayo se utilizó para la evaluación de la viabilidad celular. Se preparó una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma) disuelto en PBS a una concentración final de 0.5 mg/ml. Transcurrido el tiempo del ensayo, se retiró el medio condicionado y se adicionaron 100 µl de medio fresco y 50 µl de la solución de MTT. Se incubó a las células por 2 horas en una incubadora con atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. El medio se retiró después del tiempo, y los cristales de formazan se resuspendieron en 150 µl de isopropanol. El ensayo se analizó con el espectrómetro con lector de placas Biotek ELx800 a 570 nm. Se realizó una curva patrón para estandarizar las unidades de absorbancia contra el número de células, y esta se utilizó para la interpretación de los valores obtenidos del ensayo de viabilidad.

Ensayo de CellTracker™ Red CMTPX dye por fluorescencia

Este ensayo se utilizó para cuantificar el número de células que fueron capaces de invadir durante el ensayo de capacidad invasora. Se preparó una solución de 10 μM de CellTracker Red CMPTX dye con medio RPMI 1640. Transcurrido el tiempo del ensayo, se retiró el matrigel de la cámara de boyden, y se incubó ésta con verseno estéril y tripsina al 0.25% por 5 minutos para despegar las células que tal vez se adherieron a la parte inferior de la cámara después de haber invadido. Se juntó a las células colectadas con la solución de verseno y tripsina con las colectadas en el medio que se encontraba bajo la cámara de boyden. Se centrifugó a las células se a 125 x g por 5 minutos. El pellet de células se resuspendió en 200 μl de la solución de CellTracker y se incubó por 45 minutos en una incubadora con atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Se colectó a las células por medio de una centrifugación a 125 x g por 5 minutos, y se resuspendió el pellet de células en 100 μl de medio sin SFB. Las muestras se colocaron en una placa negra de 96 pozos y se leyó a una longitud de onda de excitación de 577 nm, y a una longitud de emisión de 602 nm por medio del lector de placas Synergy H4 hybrid reader de BioTek, usando el software Gen5. Se realizó una curva patrón para estandarizar la intensidad de fluorescencia contra el número de células, y esta se utilizó para la interpretación de los valores obtenidos del ensayo de invasión.

Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la viabilidad celular

En una placa de 96 pozos se sembró para cada condición 1×10^4 células iniciales en 100 μl de medio. Se utilizó el anticuerpo monoclonal Ipilimumab de Bristol-Myers Squibb en presentación de 5 mg/ml. Se probaron 3 concentraciones de este anticuerpo: 1, 5, y 10 $\mu\text{g/ml}$ sobre las 3 líneas celulares. Además, se probó el anticuerpo comercial neutralizante anti-CD-152 (CTLA-4) de la clona L3D10 de BioLegend (349903), el cual se probó a las mismas concentraciones utilizadas para

Ipilimumab (1, 5, y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre las líneas celulares HCC70 y HCC1937. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado con lecturas a las 24, 48, y 72 horas para los tratamientos con Ipilimumab, y solo un ensayo por triplicado para el anticuerpo neutralizante anti-CD152, con lecturas a las 24, 48 y 72 horas. Como control de la viabilidad celular se utilizaron células sin tratamiento. Las placas se analizaron por medio del ensayo de MTT previamente mencionado.

Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando CD80 sobre la viabilidad celular

Se seleccionaron las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231. En una placa de 96 pozos se sembró para cada condición 1×10^4 células iniciales en 100 μl de medio. Se utilizó una proteína recombinante CD80 (Recombinant human CD80 protein de Abcam (ab173993)). Se probaron 3 concentraciones de esta proteína: 0.025, 0.15, y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sobre 2 líneas celulares. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado con lecturas a las 24, 48, y 72 horas. Como control de la viabilidad celular se utilizaron células sin tratamiento. Las placas se analizaron por medio del ensayo de MTT previamente mencionado.

Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la invasión celular

Se utilizaron cámaras de Boyden con membrana porosa (poros: 8 μm de diámetro) a las cuales se les añadió un recubrimiento de Matrigel® Matrix de Corning a una concentración de 2 mg/ml . En la parte superior de la cámara se colocaron 3×10^5 células en 500 μl de medio RPMI sin SFB y con o sin tratamiento de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ipilimumab. En la parte inferior de la cámara se colocaron 750 μl de medio RPMI con o sin SFB al 10%. El experimento se incubó por 24 horas en una incubadora con

atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. El análisis se llevó a cabo por CellTracker™ Red CMTPX de Life Technologies.

Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la presencia de IL-2 secretada en el medio de cultivo

Se utilizó el Human IL-2 Mini ELISA Development kit de PreproTech para la realización de este experimento. La placa para ELISA se incubó con el anticuerpo de captura a temperatura ambiente toda la noche. Luego se bloqueó con el buffer de bloqueo (1% BSA en PBS) por 1 hora. Se añadió el estándar de IL-2 a los pozos correspondientes para la curva de calibración, y a los otros pozos se añadió el medio de cultivo extraído de los diferentes tratamientos realizados, se incubó por 2 horas. Se añadió el anticuerpo de detección y nuevamente se incubó la placa por 2 horas. Se añadió la Avidina HRP y se incubó por 30 minutos. Por último, se añadió ABTS, este último se incubó por 30 min (tiempo suficiente para que se diera la reacción colorimétrica). La placa se leyó a 405 nm con corrección de longitud de onda a 650 nm, se usó el lector de placas Synergy H4 hybrid reader de BioTek, usando el software Gen5. Todos los pasos de este procedimiento se realizaron a temperatura ambiente, y entre cada paso se realizaron 4 lavados a los pozos con un buffer de lavado (0.05% Tween-20 en PBS).

Como controles se utilizaron el medio extraído de células en cultivo por 48 horas con medio RPMI 1640 en presencia o ausencia de SFB. Adicionalmente se cuantificó la IL-2 presente en el medio RPMI 1640, y el SFB.

Efecto de la adición de IL-2 exógena sobre la viabilidad celular

En una placa de 96 pozos se sembró para cada condición 1×10^4 células iniciales en 100 μ l de medio. Se utilizó una proteína recombinante de IL-2 (R&D Systems). Se

probaron 3 concentraciones de esta proteína: 0.004, 0.04, y 0.2 µg/ml sobre 2 líneas celulares. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado con lecturas a las 24, 48, y 72 horas. Como control de la viabilidad celular se utilizaron células sin tratamiento. Las placas se analizaron por medio del ensayo de MTT previamente descrito.

Estudio de las vías de señalización activadas o suprimidas por la interacción de CTLA-4 con Ipilimumab y con la proteína recombinante CD80

Previo a la colocación del tratamiento de ipilimumab (10 µg/ml) o el de la proteína recombinante CD80 (0.15 µg/ml) se incubó a las líneas celulares durante 2 horas en medio sin suero fetal bovino en una incubadora con atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Después de colocar el tratamiento la proteína se extrajo a los tiempos de 3, 5, 10, 15, 30, y 60 minutos. Como control se utilizó extracto de proteína total sin tratamiento. La proteína se extrajo con una solución amortiguadora de lisis RIPA (Tris 50 mM pH=8, NaCl 150 mM, 1.0% Triton X-100, 0.5% Deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS) con la adición de inhibidores de proteasas (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) a 40 µl/ml, e inhibidores se incubó las células con dicha solución durante 20 minutos con agitación constante a 4°C. El lisado se centrifugó por 3 minutos a 20,238 × g, y se recuperó el sobrenadante. Los extractos proteicos se cuantificaron por el método de Lowry modificado del Kit DC Protein Assay (BIO-RAD).

Se realizó la electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 10 % a un voltaje de 85-100 volts. En cada carril se colocaron 25 µg de proteína. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por una hora a 250 mA. El bloqueo se realizó con una solución de TBS con Tween (20 mM Tris pH=7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 2) y de albumina de suero bovino (BSA) al 5%.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (CST #9251), SAPK/JNK (CST #9252), Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (CST #9101), Phospho-Akt (Thr308) (244F9) Rabbit mAb (CST #4056), Phospho-Akt (Ser473) (CST #9271), Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb (CST #4691), ERK 1 Antibody (C-16) (sc-93), ERK 2 (C-14) (sc-154),y GAPDH (GTX100118). Como anticuerpo secundario se utilizó el Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (CST#7074). Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:1000 en TBS-T con 5% de BSA, a excepción del anticuerpo de GAPDH, el cual se utilizó en 1: 10,000 en TBS-T con 5 % de BSA. El secundario se utilizó a una dilución de 1:3000 en TBS-T con 5 % de BSA. La detección de las bandas se realizó por medio de una reacción quimioluminiscente por medio del kit Clarity Western ECL Substrate de Bio-Rad Laboratories, y las imágenes se visualizaron con el equipo ChemiDoc XRS+ System de Bio-Rad Laboratories.

Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular, invasión, medición de IL-2 secretada al medio fueron normalizados respecto al control sin tratamiento. Los resultados de éstos muestran el valor promedio de tres experimentos independientes por triplicado. Las diferencias significativas entre los tratamientos de los ensayos se analizaron mediante un ANOVA de una vía y con la prueba post hoc de Dunnet para comparar respecto al control, y se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó en el programa Graph Pad Prism 5.

Resultados y Discusión

Expresión de CTLA-4 en células de carcinoma mamario triple negativo

El primer objetivo de este proyecto fue el análisis de la expresión de CTLA-4 en las 4 líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo seleccionadas (DU4475, MDA-MB-231, HCC70 y HCC1937). Para este propósito se escogió la técnica de citometría de flujo con tinción intracelular para la evaluación de la expresión de CTLA-4 en los controles, y en las líneas celulares de CMTN, ya que la detección de CTLA-4 en membrana de linfocitos T primarios es difícil por medio de métodos convencionales de citometría o microscopia, debido a que la expresión de CTLA-4 en membrana es irregular y poco estable, en comparación a su contraparte CD28 [128], [129].

En la **Figura 6** se muestran los resultados obtenidos del experimento con tinción intracelular (n=1). Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) activadas y no activadas como control positivo de la expresión de CTLA-4. Las CMSP no activadas tienen un porcentaje bajo de células que expresan CTLA-4 (0.72%), en cambio, las CMSP activadas presentan un valor de 78.9%. Estas células se encuentran compuestas por linfocitos, monocitos, células NK y/o células dendríticas. Los linfocitos T presentes pueden ser estimulados con fitohemaglutinina para activarlos y así aumentar la expresión *in vitro* de CTLA-4 [130], [131]. Por esa razón se ve una diferencia en los porcentajes de células positivas para CTLA-4 entre las CMSP activadas y no activadas. Igual en la **Figura 6** se muestran las gráficas de punto obtenidas del análisis de las líneas celulares DU4475, MDA-MB-231, HCC70, y HCC1937, las cuales mostraron los siguientes porcentajes de células positivas a CTLA-4: 8.13%, 24.5%, 7.36%, y 13.4%, respectivamente. Para el estudio de la expresión de CTLA-4 se obtuvieron del análisis los valores del incremento en veces de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de CTLA-4 para cada línea celular. Éstos fueron 2.1 para DU4475, 1.8 para MDA-MB-231, 1.0 para

HCC70 y 1.8 para HCC1937. Los valores del incremento en veces de MFI se obtienen a partir de la razón de la media de la intensidad de fluorescencia de los eventos positivos para CTLA-4 sobre la media de la intensidad de fluorescencia de los eventos negativos para CTLA-4 de cada línea celular. Estos valores correlacionan el número de anticuerpos que reconocen y unen a un determinado antígeno, como CTLA-4, permitiendo la cuantificación de la expresión de antígeno por célula [132], [133]. La línea celular que presenta la mayor cantidad de moléculas de CTLA-4 por unidad de célula es DU4475; sin embargo, menos del 10% de la población total de esta línea es positiva para CTLA-4. Las líneas HCC1937 y MDA-MB-231 presentan valores iguales de la cantidad de moléculas de CTLA-4 por célula, difiriendo solo en que MDA-MB-231 tiene casi el doble del porcentaje de células CTLA-4+ que HCC1937. La línea celular HCC70 presenta una molécula de CTLA-4 por célula positiva en su expresión, siendo de igual manera la que presenta el menor porcentaje de células CTLA-4+ de las líneas celulares de CMTN analizadas en este trabajo. Cabe resaltar que las líneas MDA-MB-231 y HCC1937 presentan los valores más altos de porcentajes de células CTLA-4+ hasta ahora reportados en la literatura para líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo.

En la interpretación y consideración de estos resultados se debe tomar en cuenta que solo se realizó una única repetición de este experimento, y que los porcentajes de células CTLA-4+ pueden cambiar al incrementar el número de repeticiones. Además, durante el experimento no se consideró el uso de un control de isotipo. Este control se utiliza para estimar el número de células que reaccionan de manera no específica con el anticuerpo utilizado en el análisis [134]. A pesar de que el anticuerpo utilizado es específico para CTLA-4 pueden existir interacciones inespecíficas de los anticuerpos con receptores Fc presentes en leucocitos, o con proteínas o moléculas inespecíficas en las células de CMTN [135],[136]. Las uniones inespecíficas pueden evitarse al bloquear las células con un reactivo comercial de bloqueo a Fc (como el utilizado en la metodología de este experimento), con suero de ratón o humano, o con concentraciones altas de IgG de humano o de ratón [137].

Sin embargo, aunque se utilizó un reactivo comercial de bloqueo Fc, no se pueden descartar otras posibles interacciones inespecíficas que se hubieran podido detectar a partir de un control de isotipo.

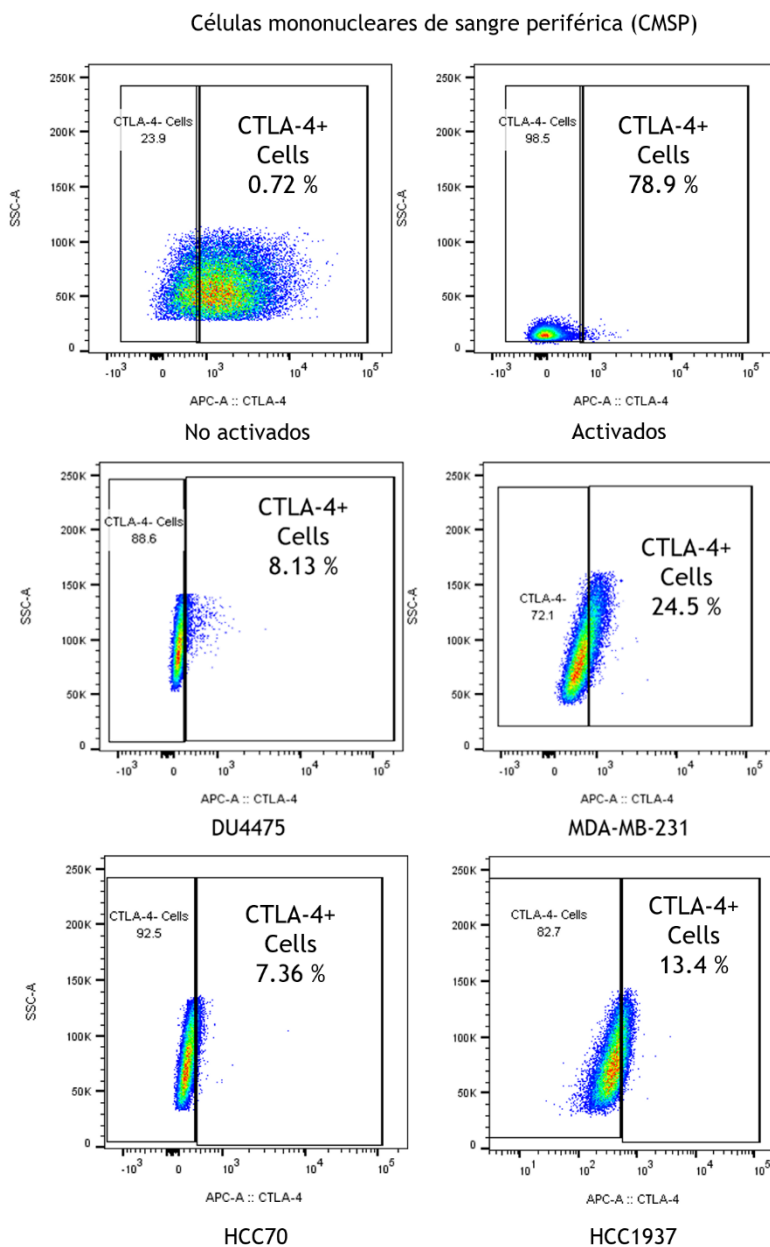


Figura 6. Expresión intracelular de CTLA-4 en células mononucleares de sangre periférica y líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Ensayo de citometría de flujo con tinción intracelular (n=1). Se evaluaron las líneas celulares DU4475, MDA-MB-231, HCC70 y HCC1937. Se utilizaron como control de la expresión de CTLA-4 a células mononucleares de sangre periférica activadas y no activadas.

Efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre la viabilidad celular

Al establecer que CTLA-4 se encuentra expresado en las 4 líneas celulares de CMTN, se decidió evaluar si el bloqueo de éste genera algún efecto sobre el comportamiento de la célula. El siguiente objetivo del trabajo fue evaluar el efecto sobre la viabilidad celular al bloquear el receptor con un anticuerpo neutralizante anti-CD-152 e Ipilimumab. En la *Figura 7* se muestra el ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937, donde se bloqueó CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante anti-CD-152. A las 24 horas se observa una disminución de la viabilidad celular a las 3 concentraciones probadas del anticuerpo (1,5, y 10 $\mu\text{g/ml}$); sin embargo, al realizar el análisis estadístico, se obtuvo que el efecto no era estadísticamente significativo. En los análisis posteriores a los tiempos de 48 y 72 horas se aprecia como hay un incremento de la viabilidad celular sobre las células tratadas que las iguala al control sin tratamiento, lo que implica que el efecto que tuvo el anticuerpo sobre éstas fue transitorio, ya que las células fueron capaces de recuperarse y seguir proliferando.

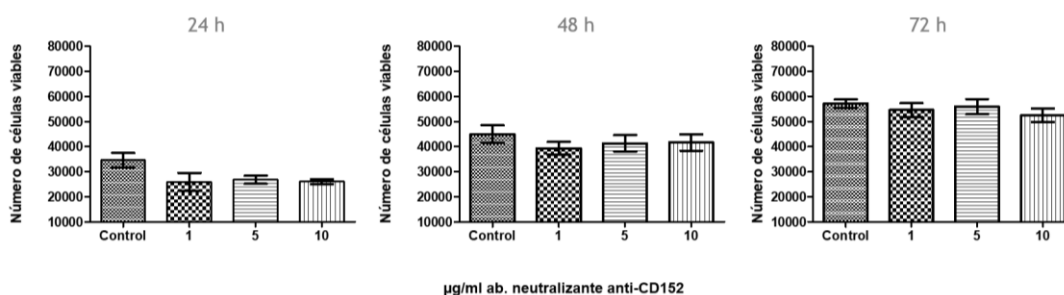


Figura 7. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 con bloqueo de CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante anti-CD-152. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones del anticuerpo neutralizante anti-CD-152 ($\mu\text{g/ml}$): 1, 5, y 10. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de dos pruebas por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

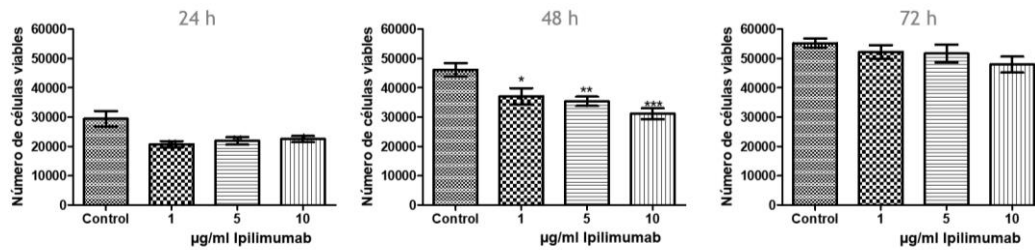


Figura 8. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 con bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de Ipilimumab ($\mu\text{g/mL}$): 1, 5, y 10. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de tres pruebas independientes por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

En la **Figura 8** se muestra el ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937, pero con bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab a 3 diferentes concentraciones. A las 24 horas se puede observar que las 3 concentraciones (1, 3, y 5 $\mu\text{g/ml}$) muestran una menor viabilidad celular que el control sin tratamiento; no obstante, en el análisis estadístico no se obtuvo significancia. En cambio, a las 48 horas el efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab afecta de manera significativa a la viabilidad celular a las 3 concentraciones, siendo la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de Ipilimumab la que ocasiona el mayor efecto con una disminución de la viabilidad celular del 32.4%. En el análisis a las 72 horas se ve que a las 3 concentraciones del tratamiento presentan una viabilidad celular cercana al control, lo que implica que a pesar de que el tratamiento de Ipilimumab disminuyó o detuvo la proliferación de una fracción de las células desde las 24 horas, éstas fueron capaces de recuperarse después de las 48 horas.

Las diferencias en la disminución de la viabilidad celular de HCC1937 dependientes del tipo de anticuerpo usado para el bloqueo de CTLA-4, sugiere que a pesar de que Ipilimumab y el anticuerpo neutralizante se dirigen específicamente al mismo

blanco no conducen al mismo efecto. Esto se puede deber a la secuencia de aminoácidos con la que interactúan específicamente sobre el dominio extracelular de CTLA-4, ya que se encuentra reportado que Ipilimumab se une en el mismo dominio en el que interactúan los ligandos CD80 y CD86 de CTLA-4, mientras que el anticuerpo neutralizante interactúa en un dominio adyacente al que interactuarían los ligandos de CTLA-4 [138], [139].

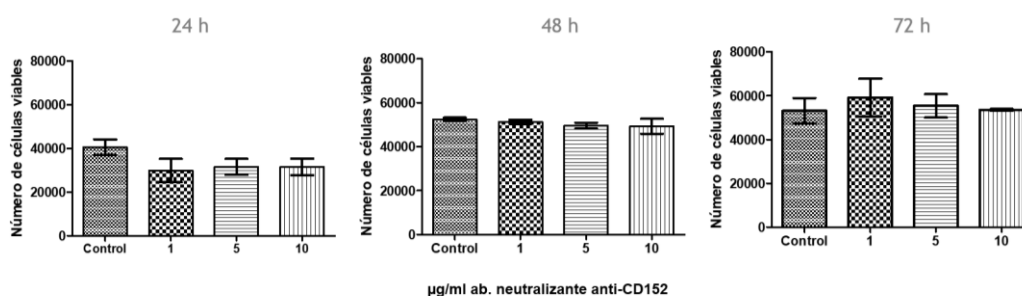


Figura 9. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC70 con bloqueo de CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante anti-CD-152. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones del anticuerpo neutralizante anti-CD-152 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 1, 5, y 10. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de una prueba por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

En la **Figura 9** se muestra el resultado del bloqueo de CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante en la línea HCC70, y en la **Figura 10** el resultado del bloqueo con Ipilimumab. A las 24 horas se observan que a las 3 diferentes concentraciones utilizadas tanto para Ipilimumab como para el anticuerpo neutralizantes anti-CD152 hay disminución en la viabilidad celular en comparación con el control, pero esta disminución no fue estadísticamente significativa. Para ambos tratamientos mostrados en la **Figura 9** y **Figura 10** se aprecia que a partir de las 48 horas las células se recuperan, ya que la viabilidad celular de los tratamientos muestra valores similares al control. La falta de un efecto sobre la viabilidad estadísticamente significativo se puede deber a que esta línea presentó el menor porcentaje de células

CTLA-4+ (7.36%) y la menor expresión de moléculas de CTLA-4 por célula (1.0) por lo tanto el posible efecto que se pudo haber tenido al bloquear CTLA-4 no es cuantificable bajo las condiciones en las que se diseñó el experimento.

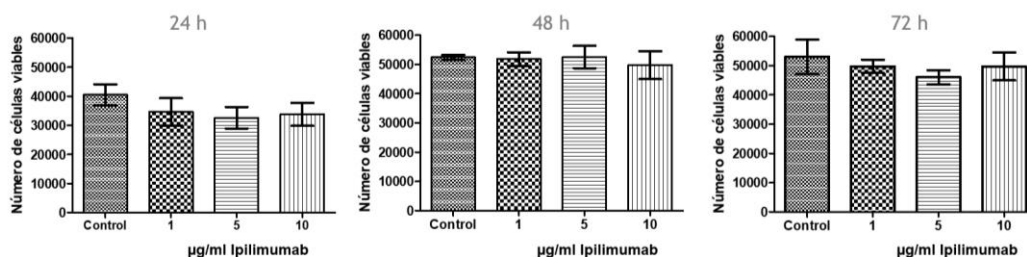


Figura 10. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC70 con bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de Ipilimumab ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 1, 5, y 10. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de dos pruebas independientes por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. $*p < 0.05$ vs control negativo.

La falta de un efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad celular de las líneas celulares HCC1937 y HCC70 donde se bloqueó CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante anti-CD-152, condujo a decidir que los siguientes experimentos solo se realizarían con el tratamiento de Ipilimumab.

En la **Figura 11** se presentan los resultados del ensayo de viabilidad celular de la línea MDA-MB-231, donde se bloqueó CTLA-4 con Ipilimumab. Similar al comportamiento observado para la línea HCC1937, se ve que a las 24 horas a las 3 concentraciones de Ipilimumab probadas (1, 5, y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hay una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa en comparación a su control. A las 48 horas, el mismo efecto persiste, donde el tratamiento con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ipilimumab presenta el menor número de células viables, en otros términos, su viabilidad celular es 29% menor en comparación al control. Sin embargo, a las 72

horas el número de células viables de los tratamientos es cercano al del control, lo que indica que las células después de las 48 horas lograron recuperarse, y continuar proliferando.

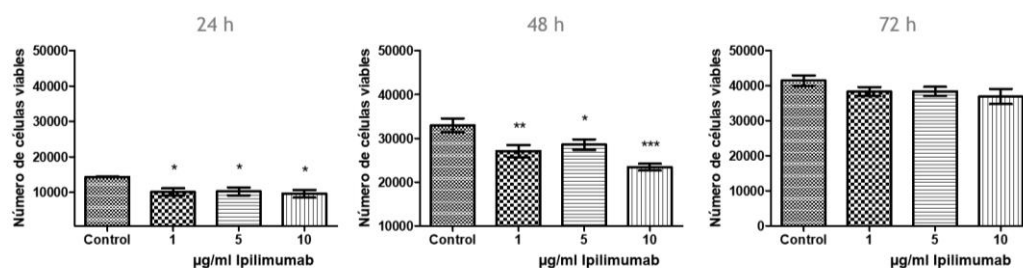


Figura 11. Ensayo de viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 con bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de Ipilimumab ($\mu\text{g/mL}$): 1, 5, y 10. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de tres pruebas independientes por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

Además de limitar que en los siguientes experimentos solo se emplearía Ipilimumab como tratamiento para bloquear CTLA-4, se decidió no hacer los ensayos de viabilidad celular con la línea celular DU4475. Estos experimentos ya fueron realizados por nuestro grupo de investigación pero con concentraciones más elevadas (500 $\mu\text{g/ml}$) [127] a las propuestas en este trabajo. Se prefirió conservar una concentración máxima de 10 $\mu\text{g/ml}$ de Ipilimumab en los experimentos para mantenerse en el rango de concentración de reactivo en los cuales grupos previos de investigación han trabajado, ya sea con anticuerpos anti-CTLA-4 (2000 células de la línea MDA-MB-231 a concentraciones de 1, 2 y 3 $\mu\text{g/ml}$ [140]) o Ipilimumab (incubaron 200,000 células de melanoma con 20 $\mu\text{g/ml}$ de Ipilimumab [119]), facilitando de esta manera la comparación de resultados. Por esta razón, y que no

se observaron efectos significativos sobre la línea HCC70, se decidió continuar trabajando solo con las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231.

Los resultados obtenidos de estos experimentos apoyan que Ipilimumab es capaz de interactuar con el CTLA-4 expresado en líneas celulares de CMTN, y que además CTLA-4 es funcional dentro de la célula. Por otra parte, experimentos previos corroboran que el CTLA-4 expresado en líneas celulares de melanoma es funcional y capaz de interactuar con Ipilimumab [118]; además, que Ipilimumab interactúa a diferentes niveles de intensidad con el CTLA-4 expresado en membrana de las células tumorales, y que el nivel de expresión de CTLA-4 es independiente del estadio de diferenciación de la línea celular primaria de melanoma[119].

En el sistema inmune, una de las funciones de CTLA-4 es la prevención de la muerte celular inducida por activación (Activation Induced Cell Death , AICD por sus siglas en inglés), donde al inhibir a CTLA-4 los LT se encontraban vulnerables a apoptosis [135]. La prevención de AICD es dependiente de la supresión del sistema Fas mediada por PI3K, que induce la activación de Bcl-2 y la inactivación de FKHRL1 (factor de transcripción que regula la expresión de FasL). Este mecanismo está mayormente presente en la evasión de apoptosis de las T_{h2} [136]. Una función de CTLA-4 en la célula tumoral podría ser también la prevención de AICD; ya que el bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab en las líneas HCC1937 y MDA-MB-231 causó una disminución en su viabilidad. Además, está reportado que las líneas de melanoma B16-F0 y B16-F1 (positivas en la expresión de CTLA-4) después de 48 horas de haberlas tratado con 10 µg/ml de un anticuerpo anti-CTLA-4 se observó una inducción notable de apoptosis, con incrementos en muerte celular de $14.68 \pm 4.11\%$ para la línea B16-F0, y $15.92 \pm 2.42\%$ para la línea B16-F1 en comparación con el control [143].

Los resultados obtenidos de los experimentos de viabilidad celular solo nos indican el número de células que siguen viables metabólicamente después de un determinado tiempo de incubación con el tratamiento de Ipilimumab. Pero en

nuestras condiciones experimentales se desconoce si el bloqueo de CTLA-4 causó apoptosis o si frenó a la célula en una etapa de su ciclo celular. Esta reportado que al incubar la línea celular MDA-MB-231 con 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 se redujo la viabilidad celular a las 72 horas ($14.82 \pm 2.17\%$). Y que el bloqueo de CTLA-4 no altera la progresión del ciclo celular, sino que causa apoptosis [120]. Por los resultados similares encontrados en ese trabajo y en el nuestro, podemos sugerir que las células a las que se les bloqueo CTLA-4 realizaron apoptosis, dejando inalteradas a las otras células CTLA-4-, las cuales siguieron proliferando, explicando porque en las *Figura 8 y 11* se ve que a las 72 horas no se ve una disminución de la viabilidad celular de nuestros tratamientos en comparación con el control.

A pesar de obtener resultados interesantes que concuerdan con un efecto previamente reportado, es importante observar que para asegurar que el efecto visto sobre la viabilidad celular causado por Ipilimumab es exclusivo de su interacción con CTLA-4, y no por alguna interacción adicional inespecífica. Para este propósito se hubiera utilizado un control de anticuerpo, uno que cuente con la misma fracción cristalizable que Ipilimumab, para descartar posibles interacciones inespecíficas. Este tipo de control no se utilizó ya que se consideró innecesario, puesto que no hay reportes que indiquen que nuestras líneas celulares utilizadas expresan receptores Fc; sin embargo, existe un reporte que la línea de cáncer de mama T-47D expresa en membrana Fc γ RI (CD64) [144], entonces no se puede descartar completamente que nuestras líneas celulares no expresen algún receptor capaz de interactuar con el fragmento constante de los anticuerpos utilizados, o que existan adicionales interacciones inespecíficas.

Los efectos sobre CTLA-4 descritos en nuestro trabajo y lo reportado para las líneas celulares de melanoma, y la línea de CMTN MDA-MB-231, ayudan a ampliar la visión sobre un nuevo mecanismo no inmunológico con el que cuentan los anticuerpos anti-CTLA-4.

Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab sobre la capacidad invasora

La capacidad de migración e invasión celular es fundamental para la tumorigénesis, y para la realización de una efectiva respuesta inmune. En el caso de las células tumorales involucra la degradación de la matriz extracelular (ECM) de sus alrededores para crear sus propios carriles que les permitirán invadir por aberturas que van de 1-20 μ m [145]. CTLA-4 participa en la migración de T_{h1} hacia CXCL12, CCL19 y CCL4 al aumentar el número de receptores de quimiocinas CCR5 y CCR7. Además, fomenta la migración de T_{h1} hacia nódulos linfáticos y sitios de inflamación[129], [146]. Debido al papel de CTLA-4 en la migración de los linfocitos T se decidió estudiar si el bloqueo de este receptor presente en las células de CMTN tiene un efecto sobre la capacidad invasora de estas células.

En la *Figura 12* se muestran los resultados del ensayo de invasión de las líneas celulares MDA-MB-231 y HCC1937. Para la línea HCC1937 se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control positivo y el negativo. Esto se debe a que el control positivo contiene suero fetal bovino (SFB) como quimioatrayente, y su presencia fomenta la invasión de las células de la cámara superior hacia la inferior. Igualmente, hay una diferencia significativa entre nuestro tratamiento contra el control negativo, ya que igual que el control positivo el tratamiento de ipilimumab tenía como quimioatrayente SFB en la cámara inferior. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento y el control positivo, mostrando que el bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab no altera la capacidad invasora de la línea celular HCC1937. En esta misma figura se ven los resultados para la línea MDA-MB-231. A diferencia con la línea HCC1937, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los controles, o entre los controles y el tratamiento. A pesar de que se observa una diferencia entre el número de células que fueron capaces de invadir de los controles, no se obtuvo significancia estadística debido al rango de variabilidad obtenido en las repeticiones. Comparando el tratamiento de Ipilimumab contra el control

positivo para la línea MDA-MB-231, ambos presentan valores muy cercanos, lo que descarta que el tratamiento con Ipilimumab altera la capacidad invasora de esta línea celular.

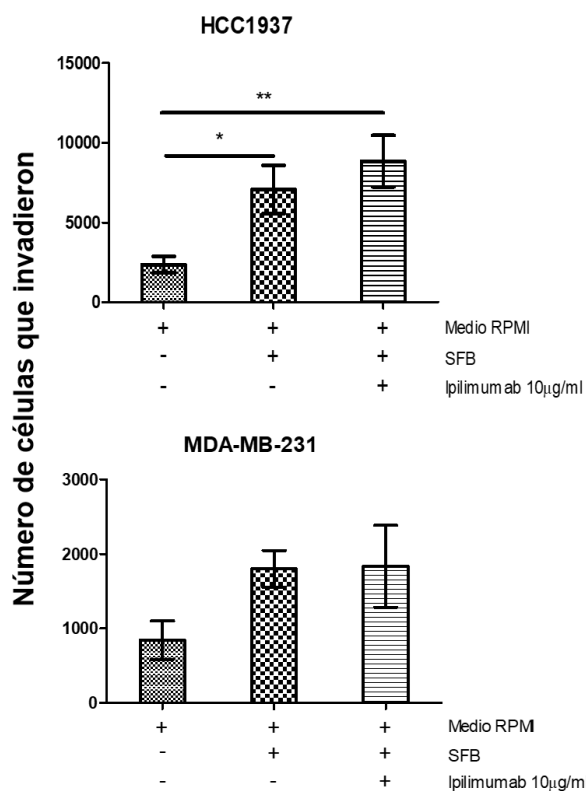


Figura 12. Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab en la capacidad invasora de las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231. Se evaluó la capacidad de invasión de las líneas celulares MDA-MB-231 y HCC1937 en respuesta a su incubación con 10 µg/mL Ipilimumab. Se utilizó SFB como quimioatrayente. La gráfica muestra la media de tres ensayos independientes por triplicado, las barras de error representan el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control.

Las células MDA-MB-231 se encuentran reportadas como células invasoras [147]; no obstante, el número de células que invadieron no sobrepasa una media de 1800 células en el control positivo. Está reportado que se pueden aislar subpoblaciones celulares de MDA-MB-231 para incrementar su capacidad invasora [148]; esto refleja una heterogeneidad dentro de la misma línea celular, la cual puede explicar los valores bajos obtenidos en nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, la

línea celular HCC1937 es de etapa temprana, y se hubiera esperado números bajos de células que invadieron, pero se obtuvo una media de 7068 células que invadieron en el control positivo y 8775 células en el tratamiento con Ipilimumab. La capacidad de la línea celular HCC1937 ya ha sido evaluada y reportado con porcentajes altos de invasión, y su capacidad invasora se le adjudica a que esta línea celular presenta una mutación en el gen BRCA1[149], [150].

Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab sobre la secreción de IL-2 al medio

Un papel fundamental que tiene CTLA-4 en el linfocito T, es el de disminuir los niveles de producción de IL-2, provocando de esta manera una disminución en la señalización de activación de los LT [50], [78], [151]. Los LT no son los únicos capaces de producir y secretar IL-2, ya que se encuentra reportado que células tumorales de mama y de pulmón también producen IL-2 [152], [153]. Por estas razones, se decidió analizar si nuestras dos líneas celulares son capaces de producir y secretar IL-2 en condiciones normales y con tratamiento de Ipilimumab. En la *Figura 13* se muestran los resultados de este experimento. En ambas gráficas se encuentran las barras de la concentración de IL-2 (ng/mL) presentes en el medio de cultivo RPMI, y en el suero fetal bovino (SFB) solos. El tratamiento de Ipilimumab sobre la línea HCC1937 provoca un incremento en la cantidad de IL-2 secretada al medio. El bloqueo de CTLA-4 provocó que las células secretaran 2.6 ng/ml más que el control positivo. Este comportamiento que hace eco a lo que pasa con el linfocito T cuando CTLA-4 es bloqueado. La línea MDA-MB-231 también es capaz de producir y secretar IL-2; sin embargo, no en altas cantidades. La concentración de IL-2 que aportan en conjunto el SFB y el medio RPMI es de 4.5 ng/mL, y la concentración de IL-2 encontrada en el medio de cultivo de las células del control positivo es de 5.1 ng/mL. A pesar de que la línea celular MDA-MB-231 puede secretar IL-2 al medio, no se

encontró diferencia entre el control de células cultivadas en medio con SFB y las que fueron tratadas con Ipilimumab.

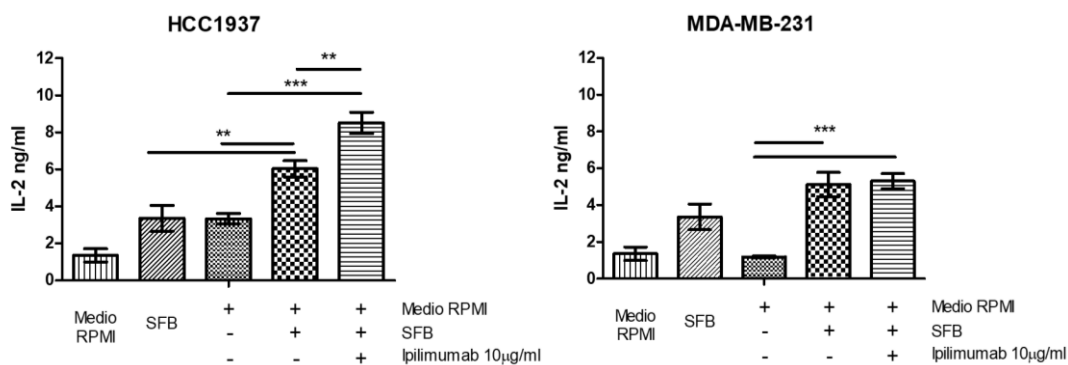


Figura 13. Cuantificación de IL-2 secretada al medio de las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231. Se cuantifico por una ELISA de captura la cantidad de IL-2 que es secretada en un lapso de 48 horas por estímulo del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab. Los controles son células incubadas por el mismo lapso de tiempo, pero en presencia y ausencia de SFB. Adicionalmente se presentan las concentraciones de IL-2 del medio de cultivo RPMI 1640 y del SFB. La grafica muestra la media de tres ensayos independientes por triplicado, las barras de error representan el error estándar de la media Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control.

Se encuentra definido el rol de IL-2 sobre el sistema inmune; sin embargo, poco se conoce del rol definitivo que esta interleucina tiene sobre las células tumorales. Mindiola et al. demostraron que la expresión de IL-2, IL-2R e IL-10 en tejido cervical juegan un papel en el desarrollo de la displasia intraepitelial cervical[154], mientras que la expresión de IL-2 es asociada con proliferación celular en casos de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello [155]. El mecanismo que puede explicar ese efecto es que la IL-2 endógena de las células tumorales puede regular la progresión del ciclo celular por medio de la regulación de niveles de expresión de inhibidores de CDK [156]. Debido a la existencia de una terapia inmunológica basada en la administración de IL-2 con el propósito de la activación de la respuesta inmunológica [157], se puede ver el problema que causaría una respuesta dual por esta terapia. Se hipotetiza que altas concentraciones de IL-2 activan a células del sistema inmune, como linfocitos CD8, CD4 y $\gamma\delta$, y células NK, para favorecer la

eliminación de células tumorales. Contrariamente, bajas concentraciones pueden promover un microambiente inmunoregulatorio que permita a las células tumorales proliferar[158]. Esto sigue representando un problema para la administración de esta terapia, ya que el uso de altas concentraciones de IL-2 puede generar severos efectos secundarios.

A partir de que se observó que HCC1937 y MDA-MB-231 secretan IL-2 al medio, se decidió probar el efecto que podría tener la adición de IL-2 exógena al medio sobre la viabilidad celular. En la *Figura 14* y *15* se presentan los resultados para las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231, respectivamente. A las 24 horas se observan en ambas figuras que la adición de IL-2 exógena no ocasiono diferencias en la viabilidad celular. En cambio, a las 48 horas se puede notar a las concentraciones de 0.04 y 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que la viabilidad celular es menor para ambas líneas celulares. La disminución en la viabilidad celular a las concentraciones de 0.04 y 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se mantuvo hasta las 72 horas, para ambas líneas celulares. Pese a que esas dos concentraciones de IL-2 exógena ejercieron un efecto sobre la viabilidad celular, la menor concentración utilizada (0.004 $\mu\text{g}/\text{ml}$) no tuvo efecto en ninguna de las líneas celulares probadas. Es interesante notar que dos las concentraciones añadidas de IL-2 (0.04 y 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) disminuyeron la viabilidad celular en proporciones similares a las 48 y 72 horas en ambas líneas celulares.

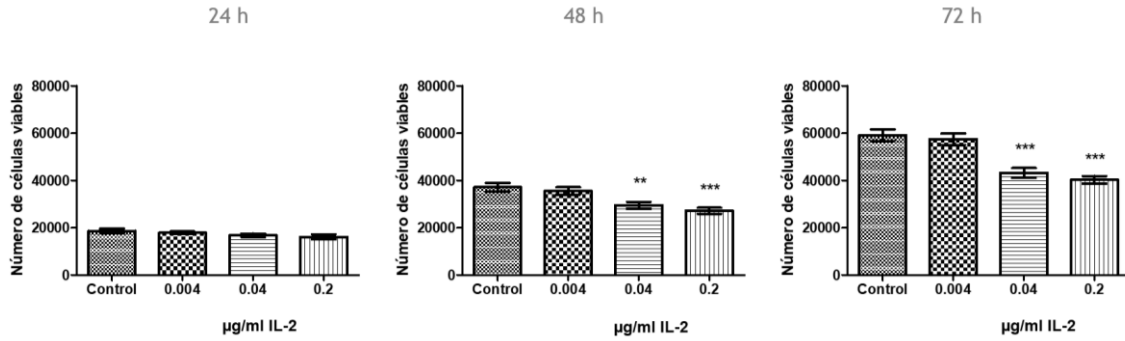


Figura 14. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 en incubación con IL-2 exógena. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de IL-2 exógena ($\mu\text{g/mL}$): 0.004, 0.04, y 0.2. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de tres pruebas independientes por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

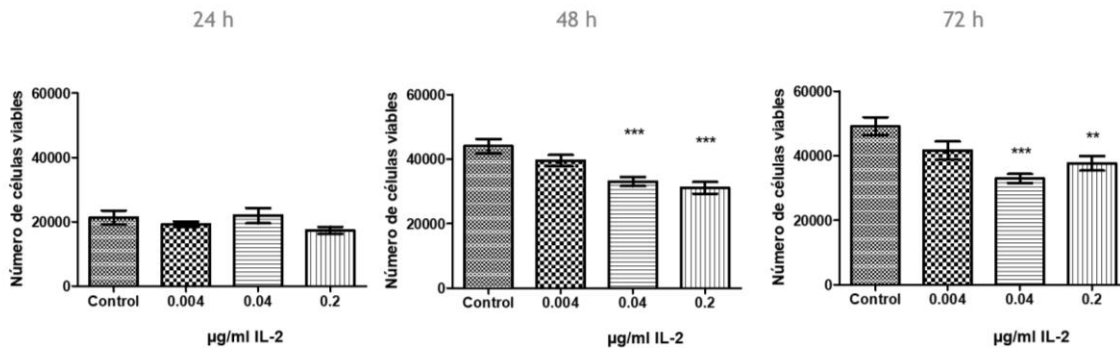


Figura 15. Ensayo de viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 en incubación con IL-2 exógena. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de IL-2 exógena ($\mu\text{g/mL}$): 0.004, 0.04, y 0.2. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de tres pruebas independientes por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

No está reportado el papel que juega IL-2 en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, ya que previamente se desconocía si estas células eran capaces de producir y posteriormente secretar IL-2 al medio, de la misma manera que se ignoraba que al añadir IL-2 exógena se altera su viabilidad celular. Está reportado que en las líneas de cáncer cervical CALO e INBL aparte de expresar IL-2R y secretar IL-2, la adición de IL-2 induce su proliferación celular[159]. No obstante, el efecto de IL-2 exógena sobre líneas tumorales puede variar debido a la concentración de SFB en el medio de cultivo del experimento, el tipo de línea celular, e incluso la concentración que se le añade de esta interleucina. Está reportado que la línea A549 de carcinoma de pulmón con una concentración de 100 IU/ml de rIL-2 y en condiciones de 5% de SFB tuvo un aumento significativo de la proliferación celular (+38%) pero con una concentración de 0.5% de SFB tuvo una disminución de la proliferación celular (-12%). Resultado similar se obtuvo con la línea G361 de melanoma. Pero cuando se estudió con la línea MCF-7 de adenocarcinoma de seno, se observó una disminución del 17% sobre la proliferación celular, independiente de las condiciones del experimento[160].

Efecto del bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab sobre las vías de ERK, Akt, y JNK

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad, y de cuantificación de IL-2 secretada, se decidió analizar cuáles podrían ser las vías de señalización que podrían estar involucradas. La estrategia que se siguió para elegir a las vías de señalización a estudiar fue que se encontrara reportado el papel de CTLA-4 para inducir o suprimir dicha vía dentro del ámbito de los linfocitos T. Se escogieron las vías de Akt, JNK, y ERK.

CTLA-4 es capaz de inducir una señalización positiva sobre los linfocitos T, y se ha comprobado que CTLA-4 se une a PI3K, que conduce a la activación de PDK1 y concluye en la activación de Akt por medio de la fosforilación en Thr308 y Ser473.

Igualmente es capaz de activar la vía de JNK en células linfocitos T CD4+; sin embargo, inhibe a ERK, ya que esta vía tiene un papel primordial en la transcripción de IL-2 [101], [102], [161], [162].

La **Figura 16** muestra las bandas obtenidas para el estudio de las vías de Akt, ERK, y JNK. Cada carril representa un tiempo en el que se incubo la línea celular en cuestión con 10 µg/ml de Ipilimumab, cada análisis se acompañó con el control de la línea celular, que fue extracto de proteína total de células sin tratamiento. Cabe destacar que estos ensayos se repitieron 2 veces (n=2), y en cada ocasión se observó el mismo fenómeno.

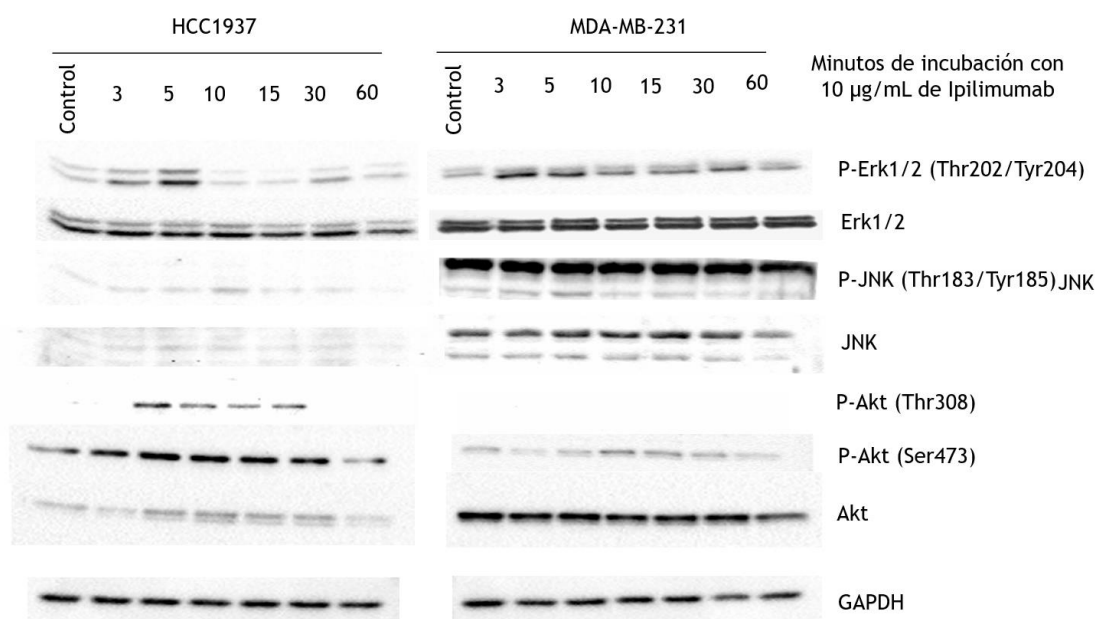


Figura 16. Perfil de expresión de las proteínas ERK, JNK, y Akt en las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos de estimulación con Ipilimumab. Ensayo de western blot donde se muestran las bandas obtenidas para las proteínas GAPDH (control de carga), P-ERK 1/2, ERK 1/2, P-JNK, JNK, P-Akt (Thr308 y Ser 473) y Akt, cada banda corresponde al tiempo marcado con el que las células fueron incubadas con 10 µg/ml de Ipilimumab.

En la **Figura 16** se observa que en la línea HCC1937 se activan las vías de ERK y JNK, lo cual refleja los efectos que hemos estado observando sobre esta línea cuando se le aplica el tratamiento con Ipilimumab. En el LT cuando se bloquea la actividad de

CTLA-4, las vías de señalización previamente inhibidas se activan, como la de ERK, involucrada en la estimulación de la transcripción de IL-2. Esto podría explicar porque las células HCC1937 incubadas con Ipilimumab son capaces de secretar una mayor cantidad de IL-2 que su control. Conjuntamente, JNK está implicado en la inducción de la transcripción del gen de IL-2, lo cual puede sumar a lo previamente mencionado [161]. A pesar de ver una posible correlación entre el efecto que causa el bloqueo sobre la secreción de IL-2 y las vías de señalización involucradas para la línea HCC1937, esto no se observa tan claro para la línea MDA-MB-231, ya que ERK se encuentra constitutivamente activo, igual que JNK, lo cual complica el poder apreciar algún cambio evidente, encima que no hubo cambio en la cantidad de IL-2 secretada a partir del bloqueo de CTLA-4.

Akt es una proteína cinasa específica de serina y treonina que fosforila a efectores para la supervivencia celular, proliferación, y vías metabólicas[163]. A partir de que se observó una disminución de la viabilidad celular con el bloqueo de CTLA-4 sobre las dos líneas, se hubiera esperado ver una inhibición de esta vía; sin embargo, la activación observada tanto en HCC1937 como en MDA-MB-231 va de acuerdo en que CTLA-4 es capaz de regularla tanto en estos tipos celulares como en el contexto del linfocito T.

Al momento de este trabajo, no se encontró un trabajo previo que reporte el efecto que tiene el bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab sobre las vías de Akt, ERK, y JNK. Existen principalmente dos trabajos que reportan activación de vías en células tumorales a partir de la activación o bloqueo de CTLA-4, uno de estos fue el realizado por Contardi et al. mostrando que la interacción de CTLA-4 con proteínas recombinantes de sus ligandos causaba una incisión sobre la caspasa 8, y activación sobre la caspasa efectora 3[118]. El segundo trabajo publicado en 2019, reporta que la expresión de CTLA-4 en células de melanoma se encuentra regulado por la vía de IFNG, siendo STAT1 el principal factor de transcripción responsable de mediar la expresión de CTLA-4 por IFNG, asimismo, que la activación constitutiva de vías de

las MAPK en melanoma incrementa la expresión de CTLA-4 de manera independiente a la vía de IFNG [164]. Este último dato podría explicar el alto porcentaje de expresión de CTLA-4 para la línea MDA-MB-231 (24.5%) en relación con la activación constitutiva de ERK y JNK.

Expresión de CD80 y CD86 en células de carcinoma mamario triple negativo

La expresión de CTLA-4 y otras moléculas de puntos de control en células tumorales podría representar otro mecanismo por el cual estas células evaden y suprimen al sistema inmune. Se ha demostrado extensivamente que moléculas inmunoreguladoras se encuentran expresadas en una variedad de tumores humanos y murinos[165]. CD80 y CD86 (ligandos naturales de CTLA-4) comúnmente encontrados en células presentadoras de antígeno como células dendríticas, linfocitos B, y macrófagos, han sido encontradas en bajos niveles de expresión en una variedad de líneas celulares por medio de citometría de flujo[166]. La expresión de CD80 y CD86 en el carcinoma nasofaríngeo se asoció con un mejor resultado clínico. Por el contrario, la expresión de CD86 en las células de mieloma y de leucemia mieloide aguda se ha relacionado con un pronóstico adverso. Mientras que la expresión en células de melanoma no hubo correlación con el resultado clínico [126]. Por estos motivos se decidió evaluar si también se encuentran expresados estos ligandos en las líneas de HCC1937 y MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo. Esta reportado su expresión en células tumorales renales, carcinomas gástricos y colorrectales [125], [126], pero no ha habido reportes de su expresión en cáncer de mama.

En la *Figura 17 y 18* se muestran los resultados de citometría de flujo del análisis de expresión de CD80 y CD86 en membrana de las líneas celulares MDA-MB-231 y HCC1937 (n=1). Ambas líneas celulares expresan ambos ligandos en la membrana, siendo CD86 el de mayor abundancia. La línea MDA-MB-231 tuvo 8.97 % de células CD80+ y 45.1% de células CD86+. En el caso de la línea HCC1937, fueron 8.35% de

células CD80+ y 14.4% células CD86+. Para el estudio de la expresión de CD80 y CD86 se obtuvieron del análisis los valores del incremento en veces de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de ambos ligandos y para cada línea celular. Éstos fueron para el ligando CD80: 2.13 para MDA-MB-231 y 1.89 para HCC1937, y para el ligando CD86: 2.20 para MDA-MB-231 y 1.86 para HCC1937. Los valores del incremento en veces de MFI se obtienen a partir de la razón de la media de la intensidad de fluorescencia de los eventos positivos para CD80 o CD86 sobre la media de la intensidad de fluorescencia de los eventos negativos para CD80 o CD86 de cada línea celular. Estos valores correlacionan el número de anticuerpos que reconocen y unen a un determinado antígeno, como CD80/CD86, permitiendo la cuantificación de la expresión de antígeno por célula [132], [133].

Este es el primer reporte de que los ligandos de CTLA-4 se encuentran expresados en líneas de carcinoma mamario triple negativo, lo cual nos podría sugerir una posible interacción entre ellos, y que el bloquear a CTLA-4 altera dicha interacción.

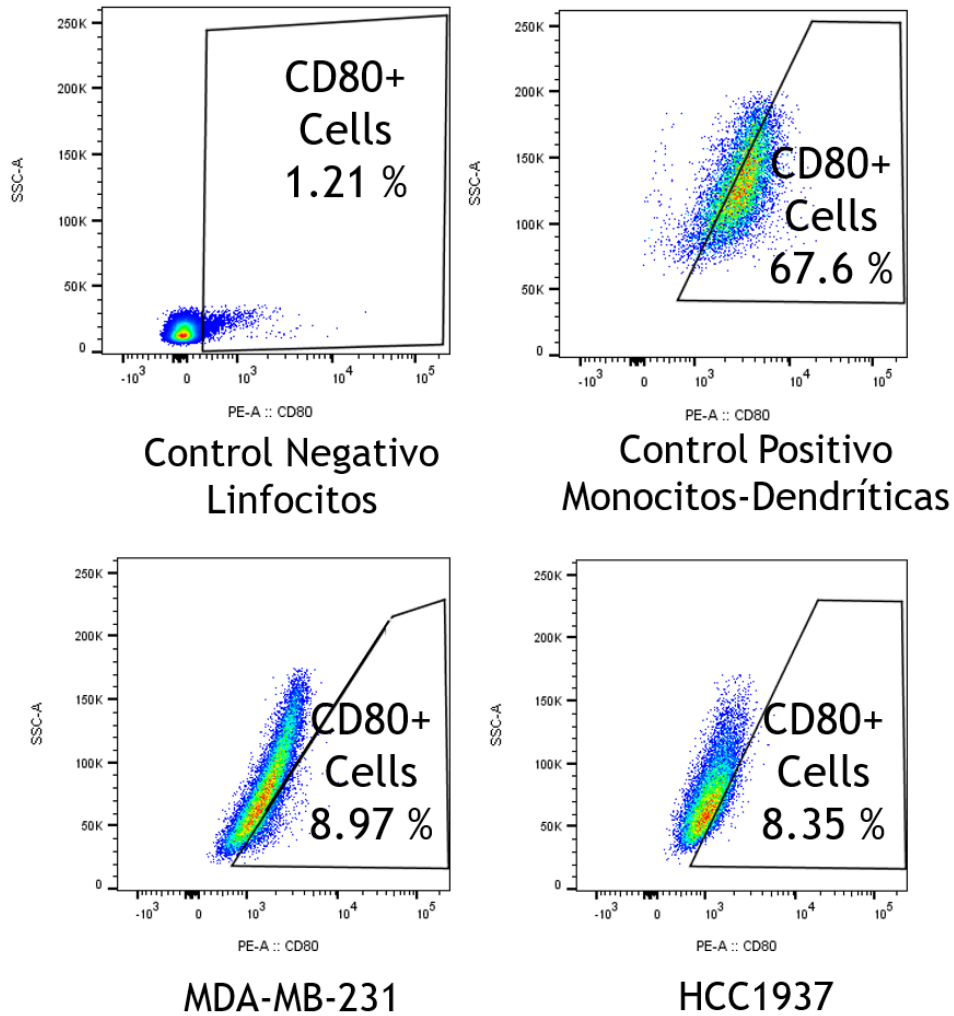


Figura 17. Expresión membranar de CD80 en monocitos-dendríticas y líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Ensayo de citometría de flujo con tinción membranar donde se evaluaron las líneas celulares MDA-MB-231, y HCC1937 ($n=1$). Se utilizaron como control de la expresión de CD80 y CD86 a monocitos-dendríticas, y se utilizaron linfocitos como control negativo de la expresión de dichas moléculas.

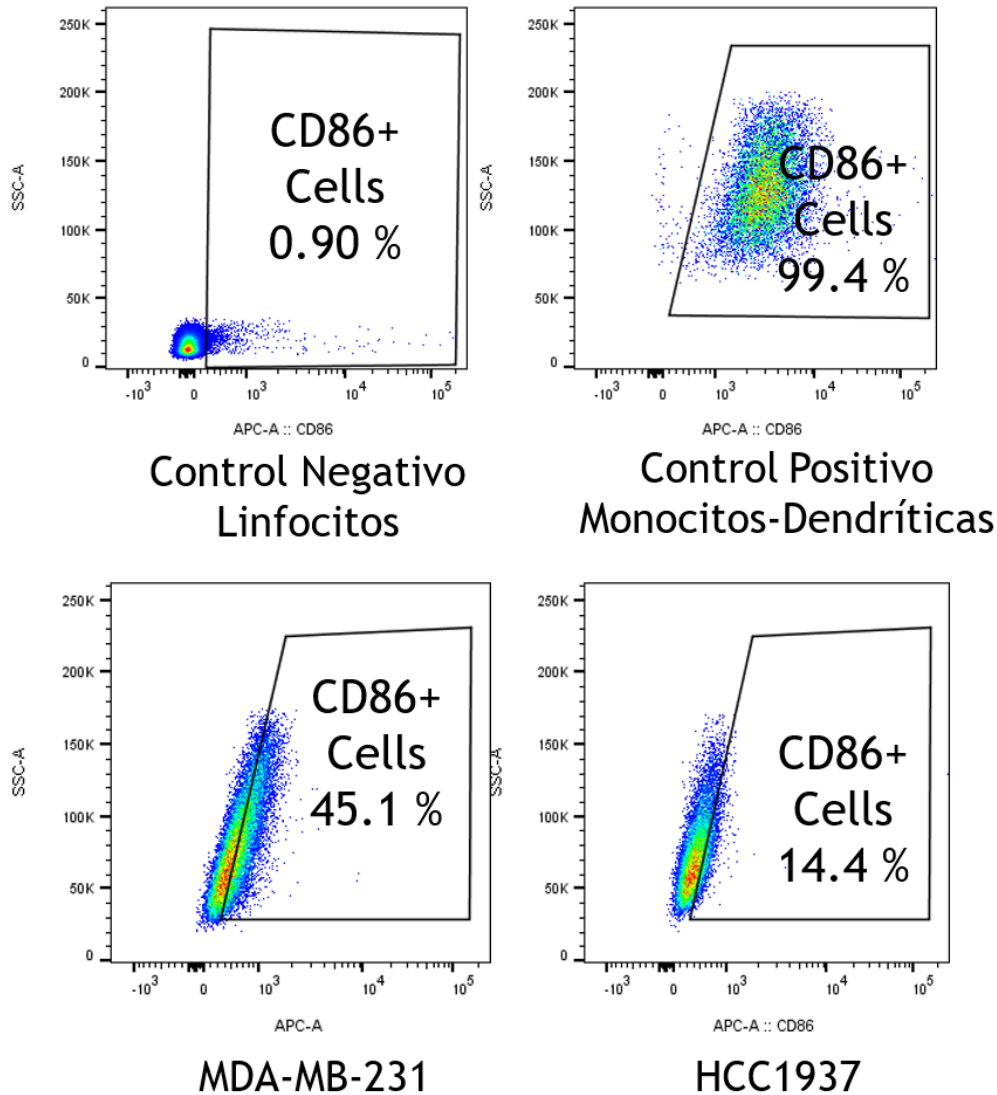


Figura 18. *Expresión membranar de CD86 en monocitos-dendríticas y líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Ensayo de citometría de flujo con tinción membranar donde se evaluaron las líneas celulares MDA-MB-231, y HCC1937 (n=1). Se utilizaron como control de la expresión de CD80 y CD86 a monocitos-dendríticas, y se utilizaron linfocitos como control negativo de la expresión de dichas moléculas.*

Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando sobre la viabilidad celular

Al ver que hay un efecto al bloquear CTLA-4 con Ipilimumab, se decidió estudiar el efecto que ocasionaría si en lugar de bloquear, se añadiera al medio una proteína recombinante de uno de los ligandos de CTLA-4. En este caso se escogió una

proteína recombinante de CD80 (rCD80), ya que es ligando con el que tiene mayor afinidad CTLA-4 [167].

En la **Figura 19** se muestran los resultados de la viabilidad celular de la línea HCC1937 con interacción de CTLA-4 con rCD80. Se probaron 3 concentraciones de rCD80 (0.025, 0.15, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de éstas se encontró que a las 24 horas la única que ejerció un efecto sobre la viabilidad celular fue la de 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Bajo esta concentración y a las 24 horas se disminuyó la viabilidad celular en un 16.8 % en comparación con su control sin tratamiento; sin embargo, este efecto no se mantuvo después de este tiempo, ya que a las 48 y 72 horas las células se recuperaron, es decir, que continuaron proliferando. Respecto a las otras concentraciones probadas, ninguna ejerció un efecto sobre la viabilidad celular de la línea HCC1937 en los tiempos posteriores.

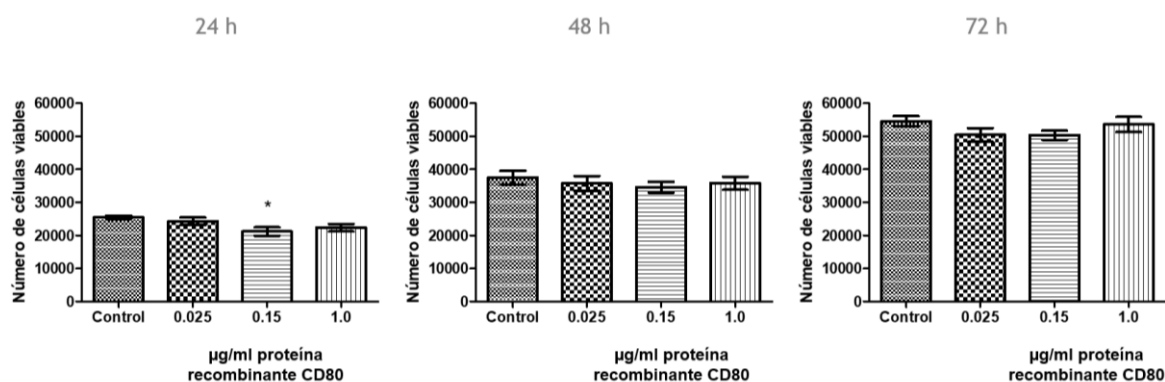


Figura 19. Ensayo de viabilidad celular de la línea HCC1937 con interacción de CTLA-4 con una proteína recombinante de CD80. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de la proteína recombinante CD80 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 0.025, 0.15, y 1. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de tres pruebas independientes por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

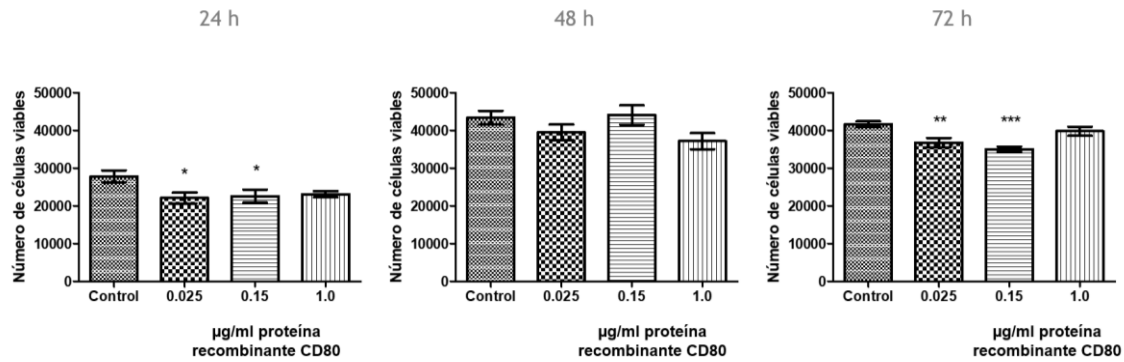


Figura 20. Ensayo de viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 con interacción de CTLA-4 con una proteína recombinante de CD80. Las células fueron tratadas con las siguientes concentraciones de la proteína recombinante CD80 ($\mu\text{g}/\text{mL}$): 0.025, 0.15, y 1. El control son células sin tratamiento, pero que recibieron el mismo procedimiento que las que si fueron tratadas. La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores reportados representan la media de tres pruebas independientes por triplicado. Las barras de error indican el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control negativo.

En la **Figura 20** se muestran los resultados de la viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 con interacción de CTLA-4 con rCD80. En el caso de esta línea las concentraciones de 0.025 y 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ disminuyeron la viabilidad celular a las 24 y 72 horas. A las 24 horas la concentración de 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ disminuyó la viabilidad celular en un 20.6%, mientras que la concentración de 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ la disminuyó la viabilidad en un 18.8%. El efecto sobre la viabilidad celular de estas concentraciones no se aprecia a las 48 horas, esto se puede deber a la dispersión de los datos obtenidos. A las 72 horas, bajo esas mismas concentraciones hay disminución de la viabilidad celular, en un 11.76% para la concentración de 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y 16.02% para la concentración de 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La concentración más alta de rCD80 probada, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, no ejerció un efecto sobre la viabilidad que fuera significativo bajo nuestro análisis estadístico, aunque en la **Figura 20** se puede notar disminución en la viabilidad celular.

Es interesante ver como las dos líneas celulares que actuaron de manera similar con el tratamiento de Ipilimumab, presentan relativamente diferentes comportamientos

a la hora de añadir un tratamiento con rCD80. Esta diferencia se puede deber que tal vez esta proteína no interactúa con la misma afinidad por CTLA-4 que con la que actúa Ipilimumab, o adicionalmente que causa un efecto diferente.

Solo se encuentra un experimento similar al realizado reportado en la literatura. A la línea de osteosarcoma HOS se le incubo por 48 horas en medio ya sea en presencia de proteína recombinante para CD80, CD86, CD28 o CTLA-4, usando a estos últimos como controles negativos. Se observó que rCD80 y rCD86 indujeron apoptosis de manera dependiente a la dosis, donde los mayores efectos se notaron a una concentración de 25 µg/ml para ambas proteínas [118]. Comparando ambos resultados, las células triple negativo pudieron alcanzar un efecto medible y constante a partir de dosis menores (0.025 y 0.15 µg/ml) de r CD80, pero es posible que este efecto se hubiera podido incrementar al aumentar la dosis.

Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando sobre la secreción de IL-2 al medio

Se desconoce si la interacción del CTLA-4 presente en células tumorales con uno de sus ligandos es capaz de afectar la capacidad de secretar IL-2 de la célula tumoral. Por ello se decidió evaluar el efecto de rCD80 sobre la cantidad de IL-2 secretada por medio de una ELISA de captura, donde las células fueron incubadas por 48 horas a diferentes condiciones experimentales y con tratamiento de rCD80 a una concentración de 0.15 µg/ml. Se eligió esta concentración porque fue en la que se observó un efecto significativo sobre ambas líneas celulares. En la *Figura 21* se muestran los resultados para las líneas MDA-MB-231 y HCC1937. En ambas gráficas se encuentran las barras de la concentración de IL-2 (ng/mL) presentes en el medio de cultivo RPMI, y en el suero fetal bovino (SFB) solos.

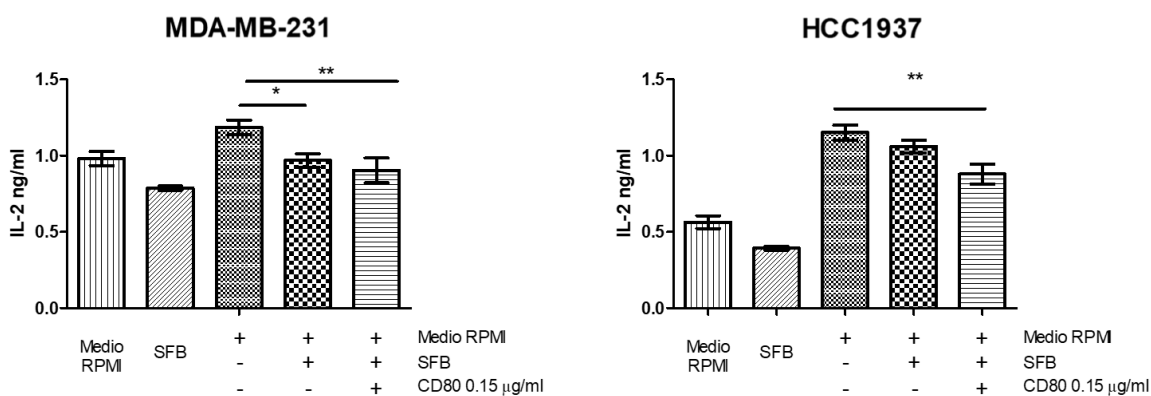


Figura 21. Cuantificación de IL-2 secretada al medio de las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231. Se cuantifico por una ELISA de captura la cantidad de IL-2 que es secretada en un lapso de 48 horas por estímulo de la interacción de CTLA-4 con la proteína recombinante CD80. Los controles son células incubadas por el mismo lapso, pero en presencia y ausencia de SFB. Adicionalmente se presentan las concentraciones de IL-2 del medio de cultivo RPMI 1640 y del SFB. La grafica muestra la media de tres ensayos independientes por triplicado, las barras de error representan el error estándar de la media. Se realizó una comparación múltiple (prueba de Dunnett) entre el control y los tratamientos. * $p < 0.05$ vs control

A diferencia del bloqueo con Ipilimumab, el tratamiento con el ligando de CTLA-4 no tuvo un efecto significativo sobre la cantidad de IL-2 secretada en ninguna de las dos líneas celulares. Para la línea MDA-MB-231 parece que el tratamiento de rCD80 causa que se secrete menos IL-2 al medio, pero el valor obtenido proviene del SFB y del medio RPMI, y es igual al obtenido del control de células sin tratamiento. lo interesante de esta línea es que produjo y secretó IL-2 al medio en condiciones sin SFB. Por parte de la línea HCC1937, las células que no fueron incubadas con SFB secretaron una mayor cantidad de IL-2 medio, y las células que fueron incubadas con SFB también fueron capaces de secretar IL-2 (10% más de IL-2 que la sumatoria de las concentraciones encontradas en el SFB y el medio de cultivo RPMI); sin embargo, las células tratadas no secretaron IL-2 al medio, pero se desconoce si fueron o no capaces de producirlo.

El bloqueo de CTLA-4 con Ipilimumab ocasiono que la línea HCC1937 fuera capaz de secretar mayor cantidad de IL-2 al medio, pero no tuvo efecto sobre la línea MDA-MB-231. El tratamiento de rCD80 provocó que la línea HCC1937 no secretara IL-2 al medio, donde este resultado posiblemente indique que la activación de CTLA-4 por medio de su interacción con rCD80 juegue un rol similar al del linfocito T en la célula tumoral, ya que disminuye los niveles de producción de IL-2, que consecuentemente impide su secreción al medio.

Efecto de la interacción de CTLA-4 con su ligando sobre las vías de ERK y Akt

A partir de las observaciones acumuladas de los experimentos con tratamiento de rCD80, se decidió analizar si esta interacción tendría un efecto sobre las vías de ERK y Akt. Se decidió no continuar el análisis con la vía de JNK puesto que no se vieron efectos evidentes sobre esta con el tratamiento de Ipilimumab. La *Figura 22* muestra las bandas obtenidas para el estudio de las vías de Akt y ERK. Cada carril representa un tiempo en el que se incubó la línea celular en cuestión con 0.15 µg/ml de rCD80, cada análisis se acompañó con el control de la línea celular, que fue extracto de proteína total de células sin tratamiento. Cabe destacar que estos ensayos se repitieron dos veces (n=2), y en cada ocasión se observó el mismo fenómeno.

La interacción de rCD80 con CTLA-4 causa un efecto similar sobre la línea HCC1937 al observado con Ipilimumab, ya que se observa una activación de la vía de ERK en el tiempo 10 minutos; pero no se ve un efecto evidente sobre la vía de Akt, ya que no hay fosforilación en su dominio de Thr308, y solo una fosforilación constitutiva en Ser473. La activación completa de Akt requiere de la fosforilación de Thr308 y Ser473[168], en tanto que en otros subtipos de cáncer, como el cáncer de pulmón de células no pequeñas detallan que la fosforilación en Thr308 es el regulador primario de la activación de Akt [169]. Esta diferencia en la activación de Akt es importante, ya que el bloqueo de Ipilimumab causo una activación completa de Akt en la línea

HCC1937, pero rCD80 solo una activación parcial. Por parte de la línea MDA-MB-231, aun se observa la activación constitutiva de la vía de ERK, pero que a los 10 minutos se pudiera ver una posible amplificación a su activación en comparación a los tiempos previos. En cambio, para Akt, presenta un comportamiento similar al de la línea HCC1937, sin fosforilación en el dominio de Thr308 y fosforilación constante en el dominio de Ser473.

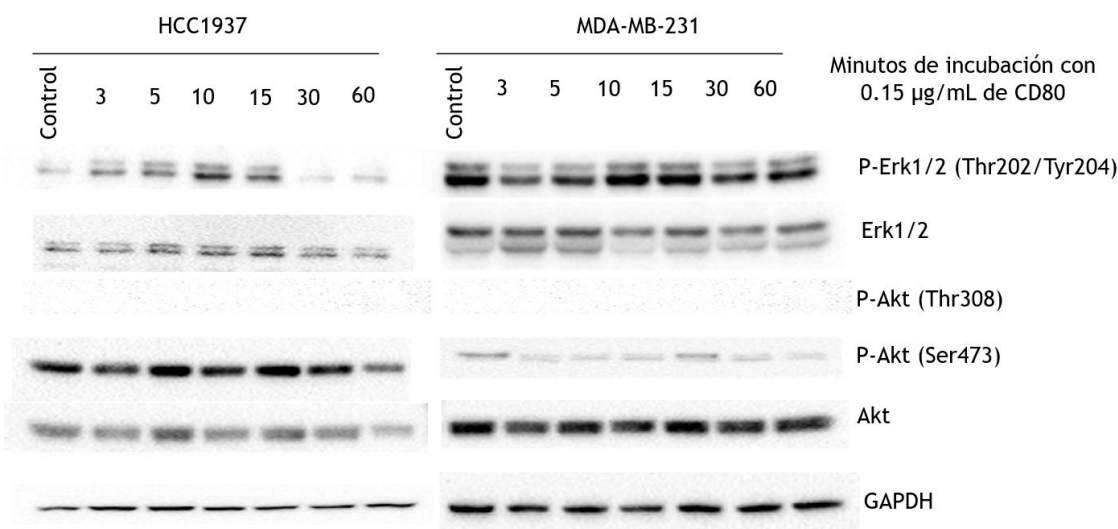


Figura 22. Perfil de expresión de las proteínas ERK, y Akt en las líneas celulares HCC1937 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos de estimulación con CD80. Ensayo de western blot donde se muestran las bandas obtenidas para las proteínas GAPDH (control de carga), P-ERK 1/2, ERK 1/2, P-Akt (Thr308 y Ser 473) y Akt, cada banda corresponde al tiempo marcado con el que las células fueron incubadas con 0.15 µg/ml de la proteína recombinante CD80.

Al momento de la realización de este trabajo no se encontraron reportes de las vías de señalización activadas en las células tumorales por causa de la interacción de CTLA-4 con su ligando CD80, siendo este el primer reporte de que CTLA-4 es funcional en células de cáncer de mama triple negativo, y que de acuerdo con que si es bloqueado con Ipilimumab o activado por su ligando CD80 se presentan efectos diferentes sobre la célula.

Resumen de resultados

En resumen, se encontró que el receptor CTLA-4 se encuentra expresado en las líneas DU4475, MDA-MB-231, HCC70 y HCC1937 de cáncer de mama triple negativo. De estas 4, las líneas MDA-MB-231 y HCC1937 mostraron una disminución significativa en su viabilidad celular al ser incubadas con Ipilimumab. A pesar de ello, no se encontró efecto alguno de este tratamiento sobre la capacidad invasora de las células. No obstante, se demostró que ambas líneas celulares son capaces de secretar IL-2 al medio, y que para la línea HCC1937 aumenta la cantidad de IL-2 secretada cuando se bloquea CTLA-4 con Ipilimumab. Adicionalmente, el bloqueo de CTLA-4 causa que se active la vía de ERK y Akt en la línea HCC1937, pero no se ve un efecto claro del bloqueo de CTLA-4 sobre la activación/inhibición de las vías de ERK, JNK, y Akt para la línea MDA-MB-231.

Por otro lado, se demostró que los ligandos de CTLA-4, CD80 y CD86 se encuentran expresados en MDA-MB-231 y HCC1937. Y que al incubar las células con rCD80 se disminuía la viabilidad celular, pero con un efecto menor a comparación con el tratamiento de Ipilimumab. Además, el tratamiento con rCD80 provocó una disminución en la cantidad de IL-2 secretada al medio para la línea HCC1937, pero no para la línea MDA-MB-231. Respecto a las vías de señalización, se observó activación en la vía de ERK en ambas líneas, y una activación parcial de Akt.

Hasta donde conocemos este es el primer reporte de la actividad de CTLA-4 sobre células de carcinoma mamario triple negativo, donde no solo se reporta su expresión, y los efectos que puede ocasionar el bloqueo y activación de este receptor sobre 3 importantes vías de señalización, sino que también encontramos que estas células son capaces de secretar IL-2 al medio y son sensibles a IL-2 exógena. Estos resultados muestran un posible rol activo de CTLA-4 sobre el sustento o progresión carcinogénica en las células tumorales positivas en su expresión, ya que podría

mostrar un mecanismo de evasión inmunitaria previamente no considerado desde que se implementó Ipilimumab como terapia inmunológica.

Conclusión

Se acepta la hipótesis de investigación, ya que las líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo expresan CTLA-4, CD80 y CD86. Además, que el bloqueo de CTLA-4 con el anticuerpo neutralizante Ipilimumab genera una disminución en la viabilidad celular, un aumento en la cantidad de IL-2 secretada al medio, y activación de las vías de señalización de ERK y AKT. No obstante, no genera efecto sobre la capacidad invasora de las líneas celulares. Conjuntamente, la activación de CTLA-4 por interacción de su ligando, una proteína recombinante de CD80, provoca disminución de la viabilidad celular y de la concentración de IL-2 secretada al medio de cultivo. Adicionalmente, que esta interacción provoca activación de la vía de ERK, y activación parcial en la vía de Akt.

Perspectivas

Pese a que la expresión de CTLA-4 en una variedad de células tumorales se encuentra reportada desde el 2005 [118], y que en el 2013 se mostró que células de melanoma son capaces de interactuar con Ipilimumab[119], este tema no se encuentra lo suficientemente estudiado, ya que no se está considerando el papel que puede tener CTLA-4 en la progresión tumoral o evasión del sistema inmune en el microambiente tumoral. A partir de los estudios y discusiones presentados en este trabajo, las perspectivas de trabajos futuros se orientan principalmente en 3 direcciones.

Encontramos que la interacción de CTLA-4 con Ipilimumab o CD80 causa efectos diferenciales en las líneas celulares MDA-MB-231 y HCC1937 sobre las vías de ERK, Akt, y JNK, pero para probar que estas vías son las principales participantes en los efectos vistos sobre la viabilidad celular y la secreción de IL-2 sería necesario el diseño de un experimento donde se bloqueen estas vías y a CTLA-4 para acertar si el efecto visto es ocasionado por la activación o inhibición de dichas vías. La inhibición de ERK y JNK serían especialmente importantes para poder apreciar de manera clara el papel que puedan tener estas sobre los efectos de CTLA-4 en la línea MDA-MB-231, puesto que esta línea celular tenía altos niveles de activación constitutiva de estas vías. Adicionalmente, sería interesante expandir el estudio de las vías de señalización a otras posibles vías que podrían estar involucradas en los fenómenos celulares observados.

Una de nuestras observaciones más notables es que los ligandos de CTLA-4, CD80 y CD86, se encuentran expresados en membrana de las dos líneas celulares estudiadas que también expresaban CTLA-4 de manera intracelular. Sería importante evaluar si estos ligandos son capaces de interactuar con CTLA-4 en membrana causando un ciclo de retroalimentación de ambas moléculas que

beneficiara a la célula en algún proceso carcinogénico, o que pudiera jugar un papel en la evasión inmunológica.

Los experimentos realizados se hicieron con líneas celulares en condiciones simples e ideales para su crecimiento, pero se podrían obtener observaciones más valiosas a partir de la introducción de co-cultivos con células del sistema inmune. Ya que se tiene reportado que el CTLA-4 expresado en células de carcinoma mamario triple negativo afecta el fenotipo maduro de células dendríticas, y que su bloqueo revierte dicho efecto [140]. Este diseño experimental sería especialmente interesante, ya que se pueden tomar en cuenta moléculas previamente no considerados, como la IL-2 endógena secretada por la célula tumoral, y la expresión de los ligandos CD80 y CD86 en membrana.

Estos experimentos adicionales darían un mayor acercamiento del papel que puede jugar CTLA-4 en el microambiente tumoral, permitiendo dilucidar con mayor claridad el rol completo que tiene este receptor no solo sobre las células del sistema inmune, sino también sobre las células tumorales, lo que en el futuro podría permitir saber cómo explotar toda la información recabada para su uso terapéutico en pacientes con cáncer de mama triple negativo.

Anexos

Estrategia de citometría de flujo

A continuación, se muestra la estrategia seguida para la adquisición de los datos del análisis por citometría de flujo. Se utiliza de ejemplo el proceso empleado para la adquisición de los datos para la evaluación de la expresión de CD80 y CD86 (ligandos de CTLA-4) en membrana de la línea celular HCC1937. Se utilizó como control positivo de dichos ligandos a monocitos y células dendríticas. Se utilizarán los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal humanizado utilizado para el análisis de la expresión de CD80 (B7-1) acoplado a ficoeritrina (PE), y el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado para el análisis de la expresión de CD86 (B7-2) acoplado a alofococianina (APC).

Para poder llevar a cabo un análisis simultáneo de la expresión de estos ligandos sobre la línea celular HCC1937 se debe de tomar en cuenta que los espectros de absorción y emisión de los fluorocromos presentes en los anticuerpos pueden empalmarse (*Figura 23*). Para corregir esto, se realiza un proceso de compensación, el cual utiliza controles que corrigen la superposición espectral de un fluorocromo en el espectro de fluorescencia de otro fluorocromo. Primero se seleccionó nuestra población de interés del control de células dendríticas y monocitos (*Figura 24a*). Segundo, se leyeron los controles incubados de manera individual con cada uno de los anticuerpos correspondientes. Esto permite realizar ajustes en la recolección de la información (ajustes en voltajes) para solo detectar la fluorescencia en el canal de interés (PE o APC), a partir de esto, se obtiene solamente la fluorescencia del detector de interés. Posteriormente, en un mismo plot podemos observar las células positivas para cada ligando (*Figura 24b*).

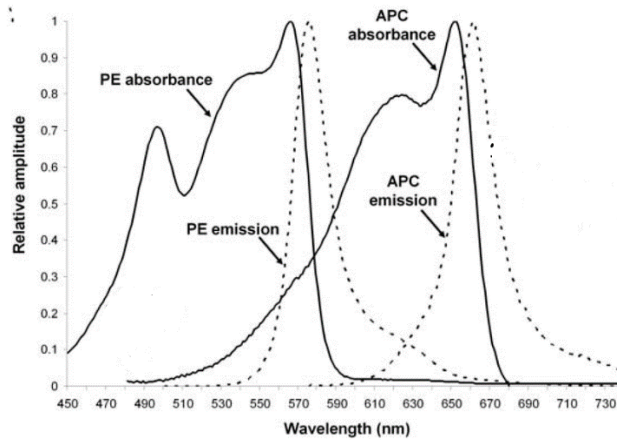


Figura 23. Espectro de absorción y emisión de los fluorocromos PE y APC. PE (ficoeritrina: pico de excitación a 565 nm y pico de emisión 575 nm) y APC (aloficocianina: pico de excitación a 650 nm y pico de emisión 660 nm).

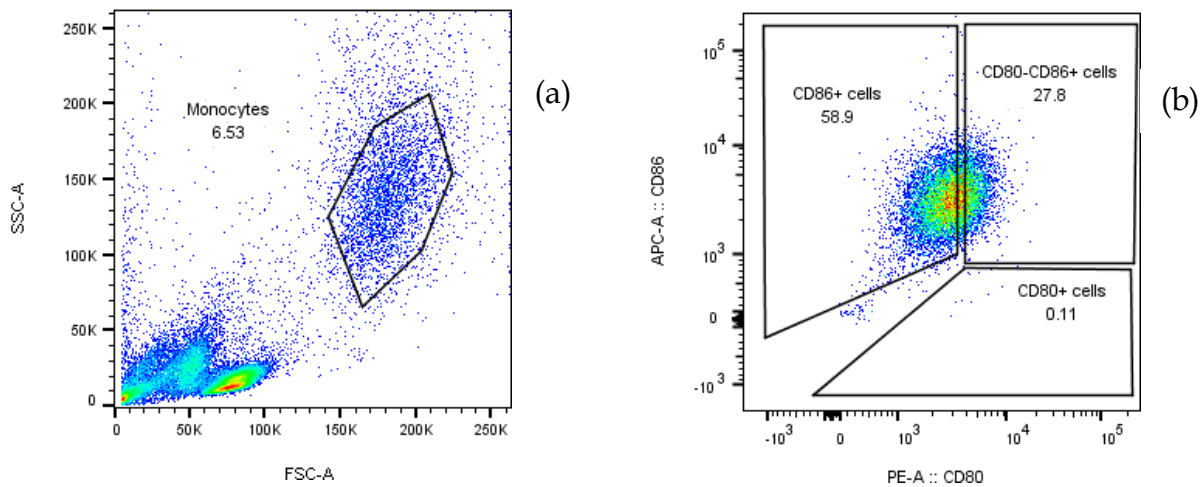


Figura 24. Proceso de compensación del control. Selección de la población de interés del control de células dendríticas y monocitos a partir de su control de autofluorescencia (plot de tamaño contra área) (a). Plot de células positivas para los ligandos CD80 y CD86 (b).

En la **Figura 25** se observan los plots obtenidos de las poblaciones positivas de CD80 y CD86 por separado. Los valores presentados se obtuvieron a partir de los valores obtenidos de sus plots de células sencillas (singletes). La mayoría de nuestras células dendríticas y monocitos expresan CD86, mientras que solo una fracción de ellas expresa CD80 en membrana.

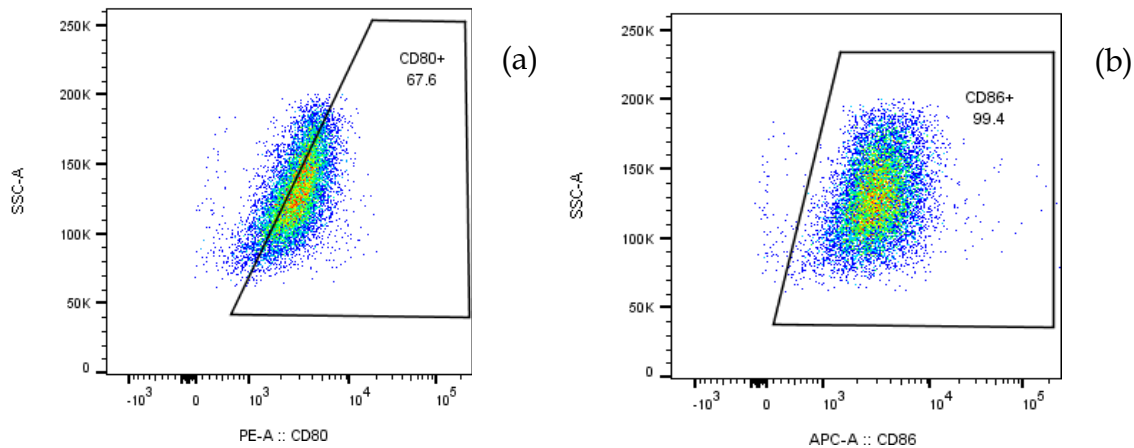


Figura 25. Porcentajes de células positivas para CD80 y CD86 en el control. Porcentajes de monocitos y células dendríticas positivos para la expresión de CD80 (a) y CD86 (b) (plot de células positivas para los ligandos CD80/CD86 contra área).

En el análisis de la línea celular HCC1937, se identificó primero la población de interés a partir de su control de autofluorescencia (**Figura 26a**). Después por medio de un plot de tamaño de área (FSC-A) contra tamaño de altura (FSC-H) se discriminó a las células que fueron evaluadas de manera individual de aquellas que pasaron como aglomerados (**Figura 26b**). Ya que a partir del control se delimitaron los parámetros para solo obtener la fluorescencia del detector de interés se obtuvo en un mismo plot las células de la línea HCC1937 positivas para cada ligando (**Figura 26c**).

Por último, en la **Figura 27** se muestran los plots de los porcentajes de células HCC1937 que son positivas para CD80 y CD86.

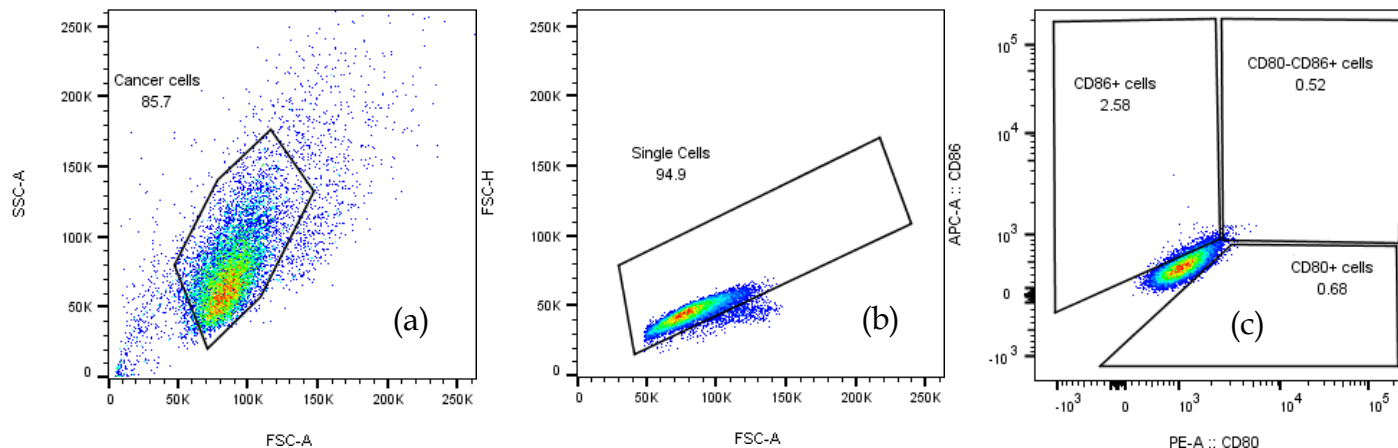


Figura 26. Proceso de análisis de la expresión de los ligandos CD80 y CD86 en membrana de la línea celular HCC1937. Selección de la población de interés de HCC1937 a partir de su control de autofluorescencia (plot de tamaño contra área) (a). Plot de FSC-A contra FSC-H para la discriminación de células únicas analizadas y aglomerados celulares (b). Plot de células positivas para los ligandos CD80 y CD86 (c).

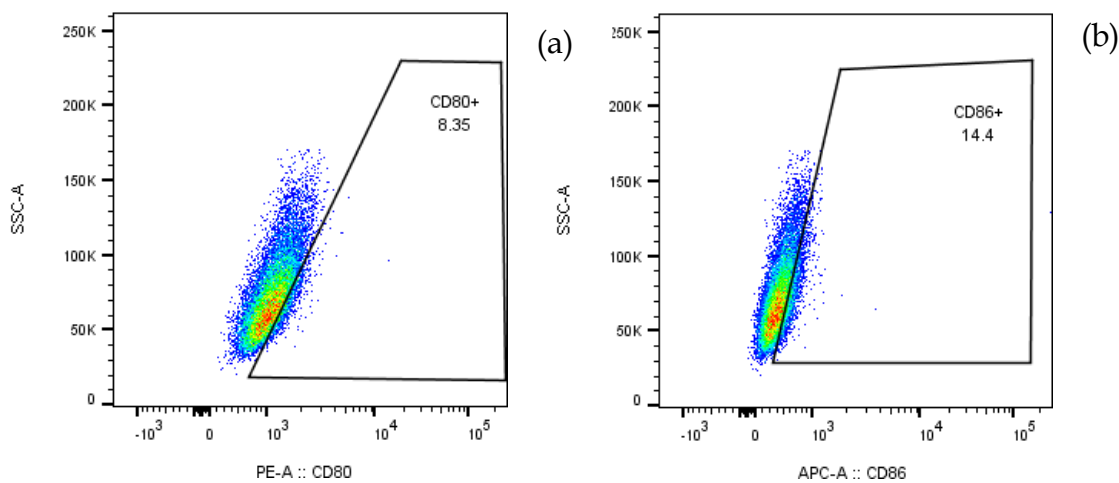


Figura 27. Porcentajes de células positivas para CD80 y CD86 en la línea celular HCC1937. Porcentajes de células HCC1937 positivos para la expresión de CD80 (a) y CD86 (b) (plot de células positivas para los ligandos CD80/CD86 contra área).

Referencias

- [1] Instituto Nacional del Cáncer (NIH), "Definición de cáncer - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute." [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cancer>. [Accessed: 10-Mar-2019].
- [2] A. Mohar-Betancourt, N. Reynoso-Noverón, D. Armas-Texta, C. Gutiérrez-Delgado, and J. A. Torres-Domínguez, "Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies," *J. Glob. Oncol.*, vol. 3, no. 6, pp. 740-748, 2017.
- [3] Internatioanl Agency for Research on Cancer, "The Global Cancer Observatory," 2019.
- [4] F. Aldaco-Sarvide *et al.*, "Mortality from cancer in Mexico: 2015 update," *Gac. Mex. Oncol.*, vol. 17, no. 1, pp. 28-34, 2018.
- [5] M. Shipitsin *et al.*, "Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 259-273, 2007.
- [6] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 68, pp. 394-424, 2018.
- [7] A. Jemal, F. Bray, and J. Ferlay, "Global Cancer Statistics: 2011," *CA Cancer J Clin*, vol. 49, no. 2, pp. 1,33-64, 1999.
- [8] K. Polyak, "Breast cancer : origins and evolution," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 11, pp. 3155-63, 2007.
- [9] C. Desmedt *et al.*, "Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 16, pp. 5158-5165, 2008.
- [10] C. M. Perou *et al.*, "Molecular portraits of human breast tumours.," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747-752, 2000.
- [11] M. Dowsett *et al.*, "Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis," *Lancet Oncol.*, vol. 11, no. 4, pp. 339-349, 2010.
- [12] T. J. Eberlein, "Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study," *Yearb. Surg.*, vol. 2007, no. 21, pp. 304-305, 2007.
- [13] A. Di Leo *et al.*, "New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe.," *Breast*, vol. 24, 2015.
- [14] X. Dai, L. Xiang, T. Li, and Z. Bai, "Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes," *J. Cancer*, vol. 7, no. 10, pp. 1281-1294, 2016.
- [15] Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario,

“Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Séptima revisión, Colima 2017.” pp. 1-141, 2017.

- [16] X. Dai¹ and B. S. , Ting Li¹ , Zhonghu Bai¹ , Yankun Yang¹ , Xiuxia Liu¹ , Jinling Zhan¹, “Review Article Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends,” *Am J Cancer Res*, vol. 5, no. 10, pp. 2929-2943, 2015.
- [17] I. Tapia-salas, D. Motola-kuba, F. Chable-montero, G. Alvarado-luna, and Ó. Arrieta-rodriguez, “Poor survival in triple negative breast cancer,” vol. 23, no. March, pp. 34-37, 2016.
- [18] F. Lara-Medina *et al.*, “Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: High prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity,” *Cancer*, vol. 117, no. 16, pp. 3658-3669, 2011.
- [19] G. Pérez-rodríguez, “Prevalence of breast cancer sub-types by immunohistochemistry in patients in the Regional General Hospital 72 , Instituto Mexicano del Seguro Social &,” *Cirugía y Cir. (English Ed.)*, vol. 83, no. 3, pp. 193-198, 2015.
- [20] F. Lumachi, A. Brunello, M. Maruzzo, U. Basso, and S. Basso, “Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 5, pp. 596-604, 2013.
- [21] M. Thill, C. Kraft, and M. Friedrich, “Targeted Therapy in HER2-Positive Breast Cancer,” *Oncol. Res. Treat.*, vol. 39, no. 5, pp. 295-302, 2016.
- [22] M. C. Figueroa-Magalhaes, D. Jelovac, R. Connolly, and A. C. Wolff, “Treatment of HER2-positive Breast Cancer,” vol. 23, no. 2, pp. 128-136, 2014.
- [23] H. Mayer, Zaharia; Gómez, “CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO: UNA ENFERMEDAD DE DIFÍCIL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO,” *Rev Peru Med Exp Salus Pública*, vol. 30, no. 4, pp. 649-656, 2013.
- [24] Y. Yue, K. Astvatsaturyan, X. Cui, X. Zhang, B. Fraa, and S. Bose, “Stratification of prognosis of triple-negative breast cancer patients using combinatorial biomarkers,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, pp. 1-13, 2016.
- [25] S. Badve *et al.*, “Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists,” *Mod. Pathol.*, vol. 24, no. 2, pp. 157-167, 2011.
- [26] J. Date *et al.*, “Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC,” *Am J Cancer Res*, vol. 6, no. 9, pp. 1864-1872, 2016.
- [27] F. Bertucci *et al.*, “How basal are triple-negative breast cancers?,” *Int. J. Cancer*, vol. 123, no. 1, pp. 236-240, 2008.
- [28] M. van de Vijver *et al.*, “Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 119, no. 1, pp. 119-126, 2009.
- [29] M. Mullins *et al.*, “Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic

Subtypes," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1160–1167, 2009.

- [30] G. Mandujano-guizado and J. A. D. La Cruz-vargas, "CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS ASOCIADAS A PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO EN UN HOSPITAL DE REFERENCIA PERUANO , 2012- 2018," vol. 19, no. 3, pp. 53–59, 2019.
- [31] S. J. Serrano-Gómez, L. Fejerman, and J. Zabaleta, "Breast Cancer in Latinas: A focus on intrinsic subtypes distribution," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 27, no. 1, pp. 3–10, 2018.
- [32] H. Jose, Y. Villaseñor, and I. Pérez, "Cáncer de mama triple negativo. Experiencia en pacientes del INCAN," *Rev. INCAN*, no. 1, pp. 1–11, 2013.
- [33] J. M. Lebert, R. Lester, E. Powell, M. Seal, and J. McCarthy, "Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer," *Curr. Oncol.*, vol. 25, no. June, pp. S142–S150, 2018.
- [34] R. A. Übersichtsarbeit and Z. Elsayaf, "Breast Care Triple-Negative Breast Cancer : Clinical and Histological Correlations," pp. 273–278, 2011.
- [35] R. Gerson, F. Alban, and A. Villalobos, "Recurrencia y supervivencia en cáncer mamario temprano con inmunofenotipo triple-negativo," vol. 144, no. 1, pp. 27–34, 2008.
- [36] O. Guzmán and E. José, "Cáncer de mama triple negativo, estado actual," *Rev. Espec. Médico -Quirúrgicas*, vol. 15, no. 4, pp. 228–236, 2010.
- [37] C. Hernández-álvarez, C. Romo-aguirre, and C. O. Iturbide, "Cáncer de mama triple negativo: frecuencia y características en el Hospital Ángeles Pedregal," *Acta méd. Grup. Ángeles*, vol. 15, no. 4, pp. 269–274, 2017.
- [38] C. Caglevic *et al.*, "Cáncer de Mama Triple Negativo : Realidad en Chile y en Latino América," no. 1.
- [39] R. Dent *et al.*, "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence," *Imaging, Diagnosis, Progn.*, vol. 13, no. 15, pp. 4429–4435, 2007.
- [40] S. Y. Hwang, S. Park, and Y. Kwon, "Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer," *Pharmacol. Ther.*, vol. 199, pp. 30–57, 2019.
- [41] B. D. B. Lehmann *et al.*, "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 7, pp. 2750–2767, 2011.
- [42] A. Prat, B. Adamo, M. C. U. Cheang, C. K. Anders, L. A. Carey, and C. M. Perou, "Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer," *Oncologist*, vol. 18, no. 2, pp. 123–133, 2013.
- [43] M. D. Burstein *et al.*, "Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. i, pp. 1688–1698, 2014.

- [44] M. Kalimutho, K. Parsons, D. Mittal, J. A. López, S. Srihari, and K. K. Khanna, "Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. xx, pp. 1-25, 2015.
- [45] G. Bianchini, J. M. Balko, I. A. Mayer, and M. E. Sanders, "Triple-negative breast cancer : challenges and opportunities of a heterogeneous disease," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 13, no. 11, pp. 674-690, 2016.
- [46] J. Stagg and B. Allard, "Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: latest research and clinical prospects.," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 5, no. 3, pp. 169-81, 2013.
- [47] C. Robert *et al.*, "Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 26, pp. 2521-2532, 2015.
- [48] E. B. Garon *et al.*, "Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 21, pp. 2018-2028, 2015.
- [49] J. Bellmunt *et al.*, "Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 11, pp. 1015-1026, 2017.
- [50] J. D. Wolchok and Y. Saenger, "The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation.," *Oncologist*, vol. 13 Suppl 4, no. suppl 4, pp. 2-9, 2008.
- [51] K. S. Peggs, S. A. Quezada, A. J. Korman, and J. P. Allison, "Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 18, no. 2, pp. 206-213, 2006.
- [52] M. A. Perales *et al.*, "Strategies to overcome immune ignorance and tolerance," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 63-71, 2002.
- [53] J. M. Pitt, A. Marabelle, A. Eggermont, J. C. Soria, G. Kroemer, and L. Zitvogel, "Targeting the tumor microenvironment: Removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy," *Ann. Oncol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1482-1492, 2016.
- [54] E. I. Buchbinder and A. Desai, "CTLA-4 and PD-1 Pathways," *Am. J. Clin. Oncol.*, vol. 39, no. 1, pp. 98-106, 2016.
- [55] M. Steins *et al.*, "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 17, pp. 1627-1639, 2015.
- [56] G. S. *et al.*, "Nivolumab Monotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. 25, pp. 2980-2987, 2016.
- [57] R. J. Motzer *et al.*, "Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 19, pp. 1803-1813, 2015.
- [58] H. Schmidt *et al.*, " Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation ," *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 4, pp. 320-330, 2014.
- [59] Z. Liu, M. Li, and Z. Jiang, "A Comprehensive Immunologic Portrait of Triple-

- Negative Breast Cancer," *Transl. Oncol.*, vol. 11, no. 2, pp. 311–329, 2018.
- [60] N. Chokr, "iMedPub Journals Immune Checkpoint Inhibitors in Triple Negative Breast Cancer : What is the Evidence ? Abstract The immunogenic nature of triple negative," pp. 1–6, 2018.
- [61] E. M. I. M. E. Al-foheidi, "The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer : a meta-analysis," pp. 3–5, 2014.
- [62] C. K. Anders, V. Abramson, T. Tan, and R. Dent, "The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer: From Biology to Novel Therapeutics," *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.*, vol. 36, pp. 34–42, 2016.
- [63] M. S. Gordon *et al.*, "Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients," *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 563–567, 2014.
- [64] L. Y. Dirix *et al.*, "Abstract S1-04: Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: A phase Ib JAVELIN solid tumor trial," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 4 Supplement, pp. S1-04 LP-S1-04, Feb. 2016.
- [65] P. Schmid *et al.*, "Abstract 2986: Atezolizumab in metastatic TNBC (mTNBC): Long-term clinical outcomes and biomarker analyses," *Cancer Res.*, vol. 77, no. 13 Supplement, pp. 2986 LP – 2986, Jul. 2017.
- [66] V. Karantza *et al.*, "Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study," *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, no. 21, pp. 2460–2467, 2016.
- [67] D. A. Yardley, "Nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery," *J. Control. Release*, vol. 170, no. 3, pp. 365–372, 2013.
- [68] P. Schmid *et al.*, "Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, no. 22, pp. 2108–2121, 2018.
- [69] A.-S. Heimes and M. Schimidt, "Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer," *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 18, no. 5, pp. 595–603, 2018.
- [70] M. F. Tolba and H. A. Omar, "Immunotherapy, an evolving approach for the management of triple negative breast cancer: Converting non-responders to responders," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 122, no. September 2017, pp. 202–207, 2018.
- [71] M. Gnant, C. Thomssen, and N. Harbeck, "St. Gallen/Vienna 2015: A brief summary of the consensus discussion," *Breast Care*, vol. 10, no. 2, pp. 124–130, 2015.
- [72] L. Voorwerk, M. Kat, and M. Kok, "Towards predictive biomarkers for immunotherapy response in breast cancer patients," *Breast Cancer Manag.*, vol. 7, no. 1, 2018.
- [73] J. D. Wolchok *et al.*, "Development of ipilimumab: A novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1291, no. 1, 2013.

- [74] J. F. Brunet *et al.*, "A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4.," *Nature*, vol. 328, no. 6127, pp. 267-70, 1987.
- [75] M. Mattci, P. Golstein, and M. Lefranc, "Human Ig superfamily CTLA-4 gene : chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains *," pp. 1901-1905, 1988.
- [76] T. Lindsten *et al.*, "Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells.," *J. Immunol.*, vol. 151, no. 7, pp. 3489 LP - 3499, Oct. 1993.
- [77] W. a Teft, M. G. Kirchhof, and J. Madrenas, "A molecular perspective of CTLA-4 function.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 24, pp. 65-97, 2006.
- [78] C. E. Rudd, "The reverse stop-signal model for CTLA4 function.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 2, pp. 153-160, 2008.
- [79] T. EA, F. Borriello, S. AN, L. WP, B. JA, and S. AH, "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4," *Immunity*, vol. 3, p. 541, 1995.
- [80] E. Hite *et al.*, "Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in CtlA-4," *Science (80-.)*, vol. 323, no. January, pp. 141-144, 1995.
- [81] T. Saito, "Negative regulation of T cell activation," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 10, pp. 313-321, 1998.
- [82] P. S. Linsley, J. L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. A. Ledbetter, and R. Peach, "Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors [published erratum appears in *Immunity* 1995 Feb;2(2):following 203]," *Immunity*, vol. 1, no. 9, pp. 793-801, 1994.
- [83] B. M. Carreno and M. Collins, "The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, pp. 29-53, 2002.
- [84] M. M. Rangel-Sosa, E. Aguilar-Córdova, and A. Rojas-Martínez, "Immunotherapy and gene therapy as novel treatments for cancer," *Colomb. medica (Cali, Colomb.)*, vol. 48, no. 3, pp. 138-147, 2017.
- [85] D. M. Sansom, "CD28, CTLA-4 and their ligands: Who does what and to whom?," *Immunology*, vol. 101, no. 2, pp. 169-177, 2000.
- [86] H. Schneider and C. E. Rudd, "Diverse mechanisms regulate the surface expression of immunotherapeutic target CTLA-4," *Frontiers in Immunology*, vol. 5, no. DEC. 2014.
- [87] L. S. K. Walker and D. M. Sansom, "The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 12, pp. 852-63, 2011.
- [88] W. A. Teft, T. A. Chau, and J. Madrenas, "Structure-Function analysis of the CTLA-4 interaction with PP2A.," *BMC Immunol.*, vol. 10, p. 23, 2009.
- [89] B. Rowshanravan, N. Halliday, and D. M. Sansom, "CTLA-4: A moving target in

immunotherapy," *Blood*, vol. 131, no. 1, pp. 58–67, 2018.

- [90] H. Ueda *et al.*, "Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease," *Nature*, vol. 423, no. 6939, pp. 506–511, May 2003.
- [91] L. Vijayakrishnan *et al.*, "An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells," *Immunity*, vol. 20, no. 5, pp. 563–575, May 2004.
- [92] M.-L. Alegre, K. A. Frauwirth, and C. B. Thompson, "T-Cell Regulation By Cd28 and Ctla-4," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 1, no. 3, pp. 220–228, 2001.
- [93] Y. Kloog, "Cytotoxic-T-Lymphocyte Antigen 4 Receptor Signaling for Lymphocyte Adhesion Is Mediated by C3G and Rap1," vol. 34, no. 6, pp. 978–988, 2014.
- [94] H. Schneider *et al.*, "Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4," *Science (80-.)*, vol. 313, no. September, pp. 1972–1975, 2006.
- [95] M. F. Bachmann *et al.*, "Cutting Edge: Lymphoproliferative Disease in the Absence of CTLA-4 Is Not T Cell Autonomous," *J. Immunol.*, vol. 163, pp. 1128–1131, 1999.
- [96] F. Fallarino *et al.*, "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells," vol. 4, no. 12, pp. 1206–1212, 2003.
- [97] B. W. Chen, W. Jin, and S. M. Wahl, "Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells," *Exp. Med.*, vol. 188, no. 10, 1998.
- [98] T. J. Sullivan *et al.*, "Lack of a role for transforming growth factor-B in cytotoxic T lymphocyte antigen-4-mediated inhibition of T cell activation," *PNAS*, vol. 98, no. 5, 2001.
- [99] G. Magistrelli, P. Jeannin, N. Herbault, B. De Coignac, J. Bonnefoy, and Y. Delneste, "A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, pp. 3596–3602, 1999.
- [100] D. Gardner, L. E. Jeffery, and D. M. Sansom, "Understanding the CD28 / CTLA-4 (CD152) Pathway and Its Implications for Costimulatory Blockade," pp. 1985–1991, 2014.
- [101] C. E. Rudd and H. Schneider, "Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 7, pp. 544–556, 2003.
- [102] C. E. Rudd, A. Taylor, and H. Schneider, "CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction," vol. 229, no. 1, pp. 12–26, 2014.
- [103] C. U. Blank and A. Enk, "Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies," vol. 27, no. 1, pp. 3–10, 2014.
- [104] S. P. Patel and S. E. Woodman, "Profile of ipilimumab and its role in the treatment of metastatic melanoma," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 5, pp. 489–495, 2011.
- [105] L. Festino, V. Vanella, M. Strudel, and P. A. Ascierto, *Molecular Mechanisms Underlying the Action of Ipilimumab Against Metastatic Melanoma*, vol. 1. Elsevier Inc.,

2017.

- [106] A. Ribas *et al.*, "Phase III Randomized Clinical Trial Comparing Tremelimumab With Standard-of-Care Chemotherapy in Patients With Advanced Melanoma," *Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 5, 2013.
- [107] M. J. Selby *et al.*, "Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 1, no. July, pp. 32–43, 2013.
- [108] P. Bruhns, "Review article Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models," *Blood*, vol. 119, no. 24, pp. 5640–5650, 2019.
- [109] J. D. Wolchok and Y. Saenger, "The Mechanism of Anti-CTLA-4 Activity and the Negative Regulation of T-Cell Activation," *Oncologist*, vol. 13, no. Supplement 4, pp. 2–9, 2008.
- [110] I. A. E. Yervoy, "DATA SHEET YERVOY® (ipilimumab) 5mg per 1mL concentrate solution for infusion," pp. 1–28.
- [111] E. Romano *et al.*, "Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 19, pp. 6140–6145, 2015.
- [112] Y. Zhang *et al.*, "Hijacking antibody-induced CTLA-4 lysosomal degradation for safer and more effective cancer immunotherapy," *Cell Res.*, no. May, 2019.
- [113] N. M. Ayoub, K. M. Al-shami, and R. J. Yaghan, "Immunotherapy for HER2-positive breast cancer : recent advances and combination therapeutic approaches," pp. 53–69, 2019.
- [114] K. a Kaufman, J. a Bowen, a F. Tsai, J. a Bluestone, J. S. Hunt, and C. Ober, "The CTLA-4 gene is expressed in placental fibroblasts.," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 5, no. 1, pp. 84–7, 1999.
- [115] K. Nagaraju *et al.*, "Costimulatory markers in muscle of patients with idiopathic inflammatory myopathies and in cultured muscle cells," *Clin Immunol.*, vol. 92, no. 1521–6616, pp. 161–169, 1999.
- [116] X. B. Wang, R. Giscombe, Z. Yan, T. Heiden, D. Xu, and a. K. Lefvert, "Expression of CTLA-4 by human monocytes," *Scand. J. Immunol.*, vol. 55, pp. 53–60, 2002.
- [117] M. P. Pistillo *et al.*, "CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells," *Blood*, vol. 101, no. 1, pp. 202–209, 2003.
- [118] E. Contardi *et al.*, "CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction.," *Int. J. Cancer*, vol. 117, no. 4, pp. 538–50, 2005.
- [119] S. Laurent *et al.*, "The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF- α production.," *J. Transl. Med.*, vol. 11, no. 1, p. 108, 2013.

- [120] X. Chen, Q. Shao, S. Hao, Z. Zhao, and Y. Wang, "CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function," vol. 8, no. 8, pp. 13703-13715, 2017.
- [121] H. Yu, J. Yang, S. Jiao, Y. Li, W. Zhang, and J. Wang, "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis," *Cancer Immunol. Immunother.*, pp. 853-860, 2015.
- [122] N. Erfani, M. Razmkhah, A. Ghaderi, N. Erfani, M. Razmkhah, and A. Ghaderi, "Circulating Soluble CTLA4 (sCTLA4) Is Elevated in Patients With Breast Cancer Circulating Soluble CTLA4 (sCTLA4) Is Elevated in," vol. 7907, no. April, pp. 4-9, 2017.
- [123] H. Mao *et al.*, "New Insights of CTLA-4 into Its Biological Function in Breast Cancer," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 10, pp. 728-736, 2010.
- [124] Y. Zhao, W. Yang, Y. Huang, R. Cui, X. Li, and B. Li, "Evolving Roles for Targeting CTLA-4 in Cancer Immunotherapy," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 47, no. 2, pp. 721-734, 2018.
- [125] J. Li, Y. Yang, H. Inoue, M. Mori, and T. Akiyoshi, "The expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 in human carcinoma cell lines: its regulation by interferon gamma and interleukin-10," *Cancer Immunol Immunother*, pp. 213-219, 1996.
- [126] A. Flörcken, M. Johannsen, T. Nguyen-hoai, A. Gerhardt, K. Miller, and B. Dörken, "Immunomodulatory molecules in renal cell cancer : CD80 and CD86 are expressed on tumor cells," *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 10, no. 2, pp. 1443-1454, 2017.
- [127] M.-G. C. Navarrete-Bernal and L. Rocha-Zavaleta, "ESTUDIO DEL EFECTO DEL BLOQUEO DE CTLA-4 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO," ITESM, 2016.
- [128] J. G. Egen and J. P. Allison, "Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Accumulation in the Immunological Synapse Is Regulated by TCR Signal Strength," *Immunity*, vol. 16, pp. 23-35, 2002.
- [129] K. Knieke *et al.*, "CD152 (CTLA-4) Determines CD4 T Cell Migration In Vitro and In Vivo," *PLoS One*, vol. 4, no. 5, pp. 1-11, 2009.
- [130] X. B. Wang, C. Y. Zheng, R. Giscombe, and A. K. Lefvert, "Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on human peripheral T cells," *Scand. J. Immunol.*, vol. 54, no. 5, pp. 453-458, 2001.
- [131] C. R. Kleiveland, "Chapter 15. Peripheral Blood Mononuclear Cells," in *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, 2015, pp. 1-327.
- [132] A. Mittag and A. Tárnok, "Basics of standardization and calibration in cytometry - A review," *J. Biophotonics*, vol. 2, no. 8-9, pp. 470-481, 2009.
- [133] O. Mizrahi, E. Ish Shalom, M. Baniyash, and Y. Klieger, "Quantitative Flow Cytometry: Concerns and Recommendations in Clinic and Research," *Cytom. Part B*

- *Clin. Cytom.*, vol. 94, no. 2, pp. 211-218, 2018.

- [134] R. Hulspas, M. R. G. O’Gorman, B. L. Wood, J. W. Gratama, and D. Robert Sutherland, “Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry,” *Cytom. Part B - Clin. Cytom.*, vol. 76, no. 6, pp. 355-364, 2009.
- [135] L. Koenderman, “Inside-out control of Fc-receptors,” *Front. Immunol.*, vol. 10, no. MAR, pp. 1-11, 2019.
- [136] N. Baumgarth and M. Roederer, “A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping,” *J. Immunol. Methods*, vol. 243, pp. 77-97, 2000.
- [137] M. N. Andersen, S. N. H. Al-Karradi, T. W. Kragstrup, and M. Hokland, “Elimination of erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors on human monocytes and macrophages,” *Cytom. Part A*, vol. 89, no. 11, pp. 1001-1009, 2016.
- [138] U. A. Ramagopal, W. Liu, S. C. Garrett-thomson, J. B. Bonanno, and Q. Yan, “Structural basis for cancer immunotherapy by the first-in-class checkpoint inhibitor ipilimumab,” 2017.
- [139] J. K. L. Yang LiuPan ZhengKenneth May, “Human monoclonal anti-ctla4 antibodies in cancer treatment,” 2007.
- [140] X. Chen, Q. Shao, S. Hao, Z. Zhao, and Y. Wang, “CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 8, pp. 13703-13715, 2017.
- [141] P. Pandiyan, D. Gärtner, O. Soezeri, A. Radbruch, K. Schulze-osthoff, and M. C. Brunner-weinzierl, “CD152 (CTLA-4) Determines the Unequal Resistance of Th1 and Th2 Cells against Activation-induced Cell Death by a Mechanism Requiring PI3 Kinase Function,” *Exp. Med.*, vol. 199, no. 6, pp. 831-842, 2004.
- [142] D. D. Joyce, “CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulation,” *J. Exp. Med.*, vol. 43, no. 2, pp. 329-375, 1996.
- [143] B. Zhang, J. Dang, D. Ba, C. Wang, J. Han, and F. Zheng, “Potential function of CTLA-4 in the tumorigenic capacity of melanoma stem cells,” *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 5, pp. 6163-6170, 2018.
- [144] M. B. Nelson, J. K. Nyhus, K. I. Oravec-Wilson, and E. Barbera-Guillem, “Tumor cells express FcγRI which contributes to tumor cell growth and a metastatic phenotype,” *Neoplasia*, vol. 3, no. 2, pp. 115-124, 2001.
- [145] C. D. Paul, P. Mistriotis, and K. Konstantopoulos, “Cancer cell motility : lessons from migration in confined spaces,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 17, no. 2, pp. 131-140, 2016.
- [146] M. C. Brunner-weinzierl and C. E. Rudd, “CTLA-4 and PD-1 Control of T-Cell Motility and Migration : Implications for Tumor Immunotherapy,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. November, pp. 1-8, 2018.
- [147] L. A. G. Ordon, K. T. M. Ulligan, H. M. A. Ones, M. A. Dams, R. A. W. Alker, and J. L. J. Ones, “BREAST CELL INVASIVE POTENTIAL RELATES TO THE

- MYOEPIHELIAL PHENOTYPE," *Int. J. Cancer*, vol. 16, no. January, pp. 8–16, 2003.
- [148] A. Amaro *et al.*, "A highly invasive subpopulation of MDA-MB-231 breast cancer cells shows accelerated growth , differential chemoresistance , features of apocrine tumors and reduced tumorigenicity in vivo," *Oncotarget*, vol. 7, no. 42, 2016.
- [149] S. K. Sengodan *et al.*, "BRCA1 regulation on β -hCG : a mechanism for tumorigenicity in BRCA1 defective breast cancer," *Oncogenesis*, vol. 6, no. July, pp. 1–13, 2017.
- [150] S. K. Hemalatha *et al.*, "Brcal Defective Breast Cancer Cells Induce in vitro Transformation of Cancer Associated Fibroblasts (CAFs) to Metastasis Associated Fibroblasts (MAF)," *Nat. Sci. Reports*, vol. 8, no. September, pp. 1–14, 2018.
- [151] M. F. Krummel and J. P. Allison, "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 6, pp. 2533–40, 1996.
- [152] I. García-tuñón, M. Ricote, A. Ruiz, B. Fraile, R. Paniagua, and M. Royuela, "Interleukin-2 and its receptor complex (α , β and γ chains) in in situ and infiltrative human breast cancer : an immunohistochemical comparative study Research article," pp. 1–7, 2004.
- [153] A. Kasprzak, K. Olejniczak, W. Przybyszewska, and M. Zabel, "Cellular expression of interleukin 2 (IL-2) and its receptor (IL-2R , CD25) in lung tumours," *VIA MEDICA*, vol. 66, no. 3, pp. 159–166, 2007.
- [154] R. Mindiola, D. Callejas, M. Araujo, and M. Delgado, "Increased number of IL-2 , IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix .," vol. 49, no. 4, pp. 533–545, 2008.
- [155] T. E. Reichert, S. Watkins, J. Stanson, J. T. Johnson, and T. L. Whiteside, "Endogenous IL-2 in Cancer Cells : A Marker of Cellular Proliferation," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 46, no. 5, pp. 603–611, 1998.
- [156] T. E. Reichert *et al.*, "Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression.," *Oncogene*, vol. 19, no. 4, pp. 514–25, 2000.
- [157] T. Jiang, C. Zhou, and S. Ren, "Role of IL-2 in cancer immunotherapy," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 6, pp. 1–10, 2016.
- [158] A. Valle-mendiola, A. Gutiérrez-hoya, M. C. Lagunas-cruz, B. Weiss-steider, and I. Soto-cruz, "Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer : Its Role in Cervical Cancer," *Madiators Inflamm.*, vol. 2016, 2016.
- [159] R. Rangel-corona, T. Corona-ortega, I. Soto-cruz, A. López-labra, and T. Pablo-arcos, "Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor," *Cytokine*, vol. 50, no. 3, pp. 273–277, 2010.
- [160] D. N. M. N. M. Kernhantz, M. E. Flett, S. D. Heys, D. J. D. H. F. Sewell, and F. Walker, "INTERLEUKIN 2 RECEPTOR EXPRESSION AND INTERLEUKIN 2 LOCALISATION IN HUMAN SOLID TUMOUR CELLS IN SZTU AND IN VITRO :

EVIDENCE FOR A DIRECT ROLE IN THE REGULATION OF TUMOUR CELL PROLIFERATION," *Int. J. Cancer*, vol. 60, pp. 766–772, 1995.

- [161] R. Concepcion, R. Calvo, D. Amsen, and A. M. Kruisbeek, "Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) Interferes with Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) and Jun NH 2-terminal Kinase (JNK) Activation, but Does Not Affect Phosphorylation of T Cell Receptor ? and ZAP70," *Cell*, vol. 186, no. 10, 1997.
- [162] H. Schneider, E. Valk, R. Leung, and C. E. Rudd, "CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/ AKT) sustains T-cell anergy without cell death," *PLoS One*, vol. 3, no. 12, pp. 1–8, 2008.
- [163] K. S. Saini *et al.*, "Targeting the PI3K / AKT / mTOR and Raf / MEK / ERK pathways in the treatment of breast cancer," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 39, no. 8, pp. 935–946, 2013.
- [164] X. Mo *et al.*, "Interferon- γ signaling in melanocytes and melanoma cells regulates expression of CTLA-4," *Cancer Res.*, vol. 78, no. 2, pp. 436–450, 2019.
- [165] I. Tirapu *et al.*, "Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 4, pp. 2442–2450, 2006.
- [166] J. S. Weber, "Tumor evasion may occur via expression of regulatory molecules: A case for CTLA-4 in melanoma," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 128, no. 12, pp. 2750–2752, 2008.
- [167] P. E. Fields *et al.*, "B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 10, pp. 5268–5275, 1998.
- [168] B. D. Manning and A. Toker, "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network," *Cell*, vol. 169, no. 3, pp. 381–405, 2017.
- [169] E. E. Vincent *et al.*, "Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 104, no. 11, pp. 1755–1761, 2011.