



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO PROFILÁCTICO  
ANTITUMORAL DE UNA PROTEÍNA VP2 QUIMÉRICA  
MULTIEPITÓPICA EN UN MODELO MÚRIDO DE  
CÁNCER DE MAMA”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Brenda Katerine Nava García

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Leticia Moreno Fierros

Dr. Ángel de Jesús Jiménez Chávez

Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

---

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todos los años de estudio.

A la Dra. Leticia Moreno por su tutoría y su asesoramiento.

Al Dr. Ángel Jiménez por su asesoramiento y su apoyo técnico durante todo el todo el proyecto.

Este proyecto fue realizado con apoyo de Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 1N2233319 y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CB283319.

De igual manera recibí la beca de titulación de alto rendimiento en la convocatoria (2019-2020) y un apoyo del CONACyT de Ayudante de Investigador de Nivel III o emérito (C.V.U 964308).

## AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

---

---

De corazón, a la Dra. Leticia Moreno primeramente por su confianza, por permitirme ser parte de su laboratorio, por compartirme una parte de todo su conocimiento y por su apoyo en todos los sentidos. La admiro como científica y como persona. Muchas gracias por las oportunidades que me ha brindado, por todas sus enseñanzas y por guiarme en el camino de la ciencia.

Al Dr. Ángel Jiménez por toda su dedicación, por las múltiples enseñanzas, vaya que por su paciencia y por siempre estar dispuesto a ayudar. De igual manera gracias por confiar en mí y enseñarme desde cero, por explicarme una y otra vez y otra vez y otra vez con la mejor actitud, por aclararme todas las dudas siempre, por compartirme una parte de tu proyecto, pero, sobre todo, muchas gracias por tu amistad Ángel.

A M. en C. Damaris por su apoyo técnico, por darnos la introducción al laboratorio, por tus revisiones, por tu asesoría y por tu amistad.

Al Dr. Bustos y Dr. Pedroza por las revisiones para afinar mi tesis. Muchas gracias por su tiempo y por sus correcciones.

Al Lab 9: a Alejandro, por tu amistad, pero de igual manera por tus aportes al proyecto, Mauricio, Pedro, David, Toño, Jorge, Dany y Robert por todos los consejos, por siempre hacer aún más divertido hacer ciencia, por las correcciones y cuestionamientos que siempre te ayudan a crecer. Los quiero mucho amigos.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

---

---

Un agradecimiento eterno a mis padres (Norma G.M. y Guillermo N.H.) y a mi hermano (Guillermo N.G.), esto también es suyo, porque sin su apoyo en todos los sentidos...no lo habría logrado. Gracias por formarme, por hacerme quien soy, por su inmenso amor y dedicación a mi educación académica y personal, por siempre aplaudir mis logros y abrazarme en mis fallas, por siempre darme todo lo que tienen, por su trabajo, por su comprensión, por sus regaños, por todas las risas, por nunca dejarme sola. Los amo más que a nada en este mundo y con toda mi alma junto con mis abuelos Teresa y Juan, que nunca los olvido, siempre están conmigo. Nunca podría terminar de agradecer todo lo que me han dado.

Dani, muchas gracias por ser mi compañero en todo, por tu amor y tu apoyo. Siempre haces más divertida la vida. Muchas gracias por siempre estar ahí. Te amo mucho.

A mi amiga de la vida, Rox, por tu amistad y por siempre estar ahí. Te amo Rompope.

A mis amigos de la carrera Pepe, Karen, Pao, Meli y Jhose, que siempre hicieron muy divertida la carrera, por las risas en clase, prácticas de campo y su amistad. Los quiero mucho y ya nos extraño.

# ÍNDICE

---

---

RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Cáncer .....	9
Cáncer de mama triple negativo (TNBC) .....	9
Tratamientos.....	9
Inmunología del cáncer.....	10
Inmunoterapias.....	11
Epítomos.....	12
Sistema de entrega.....	12
Adyuvantes .....	15
JUSTIFICACIÓN .....	15
HIPÓTESIS .....	16
OBJETIVOS .....	16
Objetivo General .....	16
Objetivos Particulares.....	16
MATERIALES Y MÉTODO .....	16
Construcciones VP2 nativa y VP2 quimérica.....	16
Producción y purificación de VP2 y VP2 quiméricas en <i>E.coli</i> recombinantes.....	18
Identificación por Western Blot .....	19
Obtención y purificación de protoxina y toxina Cry1Ac .....	20
Cultivo línea celular 4T1.....	20
Esquema de inmunización e inducción de tumores.....	21
Identificación de anticuerpos por técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	21
Obtención de leucocitos totales de bazo .....	22

Proporción de Linfocitos CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup> y MDSC.....	22
Macrometástasis en pulmón .....	23
RESULTADOS.....	23
Confirmación de identidad de los plásmidos .....	23
Producción de VP2 nativa y VP2QM1.....	25
Purificación de la proteína VP2QM1 y VP2 nativa .....	26
Producción y purificación de la protoxina Cry1Ac .....	28
Respuesta celular.....	29
Respuesta de anticuerpos .....	30
Metástasis en pulmón.....	35
DISCUSIÓN .....	36
CONCLUSIÓN .....	39
LITERATURA CITADA.....	40

## RESUMEN

---

---

El cáncer de mama es una enfermedad que se caracteriza por la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites. Existen diferentes tipos de Cáncer de Mama (BC), dentro de los cuales, se encuentra el triple negativo que se caracteriza por la ausencia de receptores para estrógenos, progesterona y el factor epidérmico humano, suele ser muy agresivo con tendencia a metástasis y una alta probabilidad de reincidencia. Por lo que se han estudiado nuevas alternativas de tratamiento, como lo es la inmunoterapia. Se diseñó un modelo con la proteína estructural VP2 de Parvovirus humano B19 como sistema de entrega, de múltiples epítopes de antígenos asociados a tumor. En este trabajo se evaluó el efecto profiláctico de una proteína VP2 quimérica multiepitópica y un adyuvante Cry1Ac (protoxina de *Bacillus turinghensis*) en un modelo murino de cáncer de mama con la línea celular 4T1, en donde se obtuvo la inhibición total del crecimiento de tumores con el tratamiento de VP2QM1, así como retraso en el crecimiento tumoral en los tratamientos de la construcción VP2QM1 con el adyuvante Cry 1Ac, de igual manera se reconocieron respuestas celulares CD4, CD8, la activación de estos, una disminución en la población MSDC y una respuesta humoral robusta anti Muc 1 (epítipo integrado en la vacuna) y anti VP2QM1.



## ABSTRACT

---

---

Breast cancer is a disease characterized by the rapid generation of abnormal cells that grow beyond its limits. There are different types of Breast Cancer (BC), among which, is the triple negative that is characterized by the absence of receptors for estrogens, progesterone and the human epidermal factor, it is usually very aggressive with a tendency to metastasize and a high probability of recidivism. Therefore, new treatment alternatives have been studied, such as immunotherapy. A model has been designed with the human Parvovirus B19 VP2 structural protein as delivery system, of multiple epitopes of tumor associated antigens. In this work, evaluated the prophylactic effect of a multi-epitopic chimeric VP2 protein and an adjuvant Cry1Ac (*Bacillus thuringiensis* protoxin) in a murine model of breast cancer with the 4T1 cell line, where the total inhibition of cancer growth is found with the treatment of VP2QM1, as well as the delay in tumor growth in the treatments of the VP2QM1 construct with the Cry 1Ac adjuvant, likewise, CD4, CD8 cellular responses were recognized and their activation, a decrease in the MSDC population and a robust humoral response against Muc 1 (antigen integrated in the vaccine) and anti VP2QM1.

## INTRODUCCIÓN

### **Cáncer**

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites y pueden invadir zonas adyacentes del organismo e inducir metástasis. (Bustamante et. Al. 2012). Uno de los principales tumores que afectan a la población mundial es el cáncer de mama.

En 2018 se reportaron 2 088 849 casos nuevos de cáncer de mama y 626 679 muertes a nivel mundial. Para México se reportaron 27 283 casos de incidencia y 6 884 casos de muerte hasta Septiembre del 2018, llevándolo así a ser de los principales tipos de cáncer con mayor incidencia en nuestro país. (Globocan, 2018).

### **Cáncer de mama triple negativo (TNBC)**

Se conocen diferentes tipos de cáncer de mama, entre estos el triple negativo (TNBC). En población latina se han descrito una alta incidencia de este tipo de cáncer, con una frecuencia de 21,3% en Perú; de 24,6% en Venezuela; de 23,1% en México, y de 27% en Brasil. (Vallejos et.al.,2010).

Este tipo de cáncer de mama fue identificado a partir de la evaluación de muestras tumorales con paneles de inmunohistoquímica, en donde se observó que algunas muestras se caracterizaban por la ausencia de expresión de los receptores de estrógeno, de progesterona y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Nielsen et.al. 2004), (Levasy et.al.,2006).

La conducta biológica del TNBC suele ser agresiva debido a que presenta rápida proliferación y una mayor tendencia a presentar metástasis a distancia, comparada con los otros subtipos de cáncer de mama, predominando las metástasis viscerales (hígado, pulmón y sistema nervioso central), asimismo, tiene un curso clínico más agresivo, con recurrencias tempranas y con mayor riesgo de muerte, con respecto a los tumores dependientes de hormonas (Dent et.al., 2007) Además existe una falta de blancos moleculares reconocidos como útiles para la terapia lo que hace que exista poca probabilidad de recuperación (Malorni, et al. 2012).

### **Tratamientos**

Los tratamientos convencionales para este tipo de diagnóstico son la radioterapia; que se basa en el uso de radiaciones ionizantes al tumor (efecto local) para inducir mutaciones y causar lesiones en el DNA (Desoxyribonucleic Acid) y así provocar incapacidad de reproducción o la apoptosis de células tumorales; la sensibilidad a la radioterapia dependerá del ciclo celular en el que se encuentren las células tumorales pero de igual manera puede afectar a las células sanas, habrá efectos secundarios como lo es eritema, fibrosis,

nausea, obstrucción intestinal, hematuria, cistitis, mucositis pérdida de peso, inmunosupresión, entre otros, estos efectos dependerán de la dosis y el tipo de radioterapia que se administre. (Murillo, et.al. 2004).

Otro tratamiento es la quimioterapia, que cabe mencionar induce más efectos secundarios ya que tiene una administración sistémica. Hay diferentes tipos de quimioterapias, su función se basa de igual manera en dañar a la célula durante el proceso de división celular, algunas de sus funciones incluyen la inhibición de angiogénesis, antimetabolitos, inhibidores mitóticos, hormonas y estrógenos, sin embargo, para TNCB quedan descartados los tratamientos con hormonas, debido a que como había mencionado anteriormente se caracterizan por la ausencia de receptores para hormonas; en general sus efectos secundarios son similares a los de la radioterapia, sin embargo estos aparecen en un periodo más corto y suelen ser más agresivos. (Hinojosa, et.al.,2000).

Por otro lado, se encuentra la extirpación tumoral y la mastectomía, de esta manera se elimina la mayor parte del tumor posible o toda la parte dañada por este, no obstante, no es posible la eliminación de todas las células tumorales y se tiene que acompañar con radioterapia o quimioterapia, para así evitar reincidencia o metástasis. Es por ello que se han implementado nuevas alternativas de tratamiento, debido a que los tratamientos convencionales son agresivos, no específicos y con efectos secundarios que repercuten en el pronóstico.

## **Inmunología del cáncer**

El proceso por el cual se desarrollan neoplasias se denomina carcinogénesis, es una acumulación de mutaciones que pueden ser adquiridas *in novo* o heredadas, estas le confieren a la célula tumoral capacidades para tener una mayor sobrevivencia respecto a las células normales, mayor capacidad de reproducirse y heredar esas mutaciones a sus clones. Existen diferentes tipos de mecanismos que le ayudan a la célula neoplásica como son la evasión de apoptosis, angiogénesis sostenida, potencial ilimitado de replicación, independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento, invasividad y metástasis. (Sánchez,2013)

Actualmente se sabe que el papel que tiene el sistema inmune (S.I) en el cáncer es muy importante, ya que se descubrió que se pueden encontrar blancos terapéuticos y antígenos asociados a tumor (de los que hablaré más adelante) que el S.I es capaz de reconocer y eliminar a las células tumorales sin afectar a las células sanas, con un proceso denominado, inmunoedición, que consta de tres pasos fundamentales para evitar o eliminar un tumor.

La primera es la eliminación; el S.I reconoce a la célula tumoral para eliminar por medio de señales de peligro a la célula cancerígena, sin embargo, en ausencia de las señales estas células pueden pasar desapercibidas y así evitar su eliminación y pasar a la fase de equilibrio. Esta fase de equilibrio depende del S.I adaptativo y por presión de selección algunas células se vuelven menos inmunogénicas y con mayor probabilidad de

sobrevida y así es como en esta fase existe una constante eliminación de células cancerígenas y a la vez la creación de células cancerígenas más resistentes, que son las que pasarán a la fase de escape, ya que lograron evitar los mecanismos de supresión tumoral intrínsecos y extrínsecos; en la fase de escape comienza la formación de los tumores y se crea un ambiente de inmunodepresión en el tumor, esta evasión puede ser por la pérdida del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, además pueden adquirir una resistencia contra los mecanismos citotóxicos. Sin embargo, se sabe que existen células T específicas, que son capaces de reconocer epítomos de Tumor Associated Antigens (TAAs) estas células T reconocen una baja afinidad por el complejo péptido-MHC (pMHC) y son capaces de inducir una expansión clonal de manera similar a las células con alta afinidad por dicho complejo, igualmente se ha reportado que epítomos con baja afinidad por el MHC pueden ser reconocidos por linfocitos T con alta avidez e inducir fuertes respuestas antitumorales. (Gross, Graff-Dubois et al. 2004)

## **Inmunoterapias**

Por la capacidad del sistema inmunitario de reconocer y eliminar a las células tumorales, se han desarrollado técnicas que se fundamentan en el uso del sistema inmunológico, a esta técnica se le llama inmunoterapia. Existen diferentes tipos de terapias pasivas y activas. (Moro, et.al. 2017) Por ejemplo, entre las pasivas algunas se basan en el uso de anticuerpos monoclonales contra algún antígeno tumoral por ejemplo anti HER2 o en el uso de anticuerpos bloqueadores de los denominados inmuno check-points, que son moléculas de inmuno-regulación. (Marmé, et.al. 2016) Actualmente se han implementado dos grandes líneas de estrategias para mejorar la respuesta clínica del paciente tratado con inmunoterapia antitumoral.

La primera, relacionada con la aplicación de diferentes sistemas o plataformas de presentación de los TAAs a los linfocitos T específicos, ya sea utilizando péptidos, construcciones génicas y proteínas recombinantes de TAAs en diferentes combinaciones y secuencias para inducir, aumentar o reforzar la respuesta celular antitumoral. Esta estrategia se ha utilizado en conjunto con señales que faciliten la activación y maduración de células dendríticas (DC). La segunda línea es aumentar la dominancia o inmunogenicidad de los TAAs. En esta estrategia puede haber diferentes variantes: a) utilizar la aplicación de TAAs específicos múltiples simultáneos, b) construir antígenos más potentes que los naturales, c) agregar a las construcciones génicas-TAAs, secuencias génicas de señalamiento que faciliten el procesamiento natural y presentación de éstos para aumentar su cantidad en la superficie celular; d) realizar la identificación dinámica de la expresión de los TAAs en la evolución clínica del tumor y utilizarlos como blancos antitumorales e incorporar otros tipos de tratamientos sincronizados a la transferencia de linfocitos T antitumorales autólogos activados *ex vivo*, como el uso de quimioterapia para depletar linfocitos circulantes antes de la transferencia. (Valdespino; et.al. 2003.)

Entre todas estas nuevas terapias de igual manera se encuentran las vacunas multiepitópicas que utilizan epítomos de antígenos asociados a tumor, las cuales usamos en este trabajo, ya que consiste en utilizar un sistema de entrega, el cual tiene que ser reconocido por el sistema inmunológico, para hacer una presentación de estos y así, aumentar la potencia y duración de la respuesta inmune celular y poder evitar la formación de neoplasias.

## **Epítomos**

Es sabido que las células tumorales expresan antígenos diferenciales, los cuales, están expresados preferencialmente en estas células transformadas; estos antígenos tumorales han surgido como blancos ideales para inducir respuestas específicas hacia tumores, lo que evita que se induzcan respuestas autoinmunes. Gracias a las tecnologías de secuenciación de última generación es posible secuenciar el genoma y/o exoma de muestras de biopsias de tumores en relativamente poco tiempo, con lo que se puede identificar TAAs presentes en la muestra, lo que permite mediante análisis *in silico* seleccionar blancos relevantes para utilizarse en la inmunoterapia. (Jiménez, et.al., 2018)

Durante la progresión tumoral existe inestabilidad genómica, múltiples mutaciones a lo largo de la progresión lleva a que no todas las células en un tumor posean el mismo perfil de expresión. Esta heterogeneidad intra-tumoral, evita que se pueda inducir una respuesta que afecte a todas las células utilizando un solo antígeno, por ello el uso de múltiples epítomos de TAAs puede inducir una respuesta inmune más amplia que incluya a más células tumorales, potenciando así la efectividad de la inmunoterapia, esto es posible gracias a que existen linfocitos que poseen una alta afinidad hacia los epítomos ya que no fueron eliminados por mecanismos de tolerancia central.

En este trabajo se seleccionaron epítomos que estuvieran reportados en cáncer de mama triple negativo tanto en modelo murino como en humano, que estuviesen reportados en un alto porcentaje en este tipo de diagnóstico, que su función tuviera un papel relevante en las células. Los epítomos seleccionados fueron 3 de P53, la cual es una proteína intracelular encargada de la reparación del DNA y un epítomo de MUC1, glicoproteína que se encuentra de manera normal en la célula en la membrana, pero al estar mutada se sobreexpresa, siendo un blanco importante para obtener una respuesta humoral.

## **Sistema de entrega**

Un aspecto relevante para el uso de epítomos de antígenos tumorales en la inmunoterapia del cáncer son los sistemas de entrega, ya que es necesario un agente inmunógeno funcional para que el S.I reconozca a los epítomos seleccionados.

Existen diferentes sistemas de entrega, entre los cuales se encuentran células dendríticas autólogas cargadas con neopítopos (Westdorp, et.al.2016), entrega de antígenos como liposomas (CAF01), emulsiones (MF59), micropartículas de biopolímeros (PGLA), virosomas (Epaxal®, producido por Crucell), entre otros sistemas, estos reportan que son capaces de promover la presentación cruzada de antígenos, inducción de maduración de células dendríticas, estimular la presentación antigénica, estimulación de inmunidad mucosal, por medio de respuestas Th1, Th2 y CTL (respuesta inmune citotóxica). (Siel,et.al.,2014)

En este trabajo se utilizaron Partículas Tipo Virus (VLP's). Numerosos estudios indican la inmunogenicidad de las VLP's es decir, la actividad estimulante de la respuesta inmune. Con este sistema se ha demostrado la activación de las células B y la producción de altos títulos de anticuerpos debido a sus estructuras asimétricas y altamente repetitivas. (Bachmann, et.al, 1993). Lo que indica que las VLP's son capaces de inducir fuertes respuestas inmunitarias humorales y celulares. Con este sistema de entrega se han caracterizado diferentes tipos de VLP's en ensayos preclínicos y clínicos en diferentes tipos de cáncer, como las de VLP's de *Baculovirus*, (He, et.al 2020), VLP's de *Polyomavirus* en un modelo de melanoma (Brinkman et al. 2005), VLP's de MS2 en un modelo de cáncer de mama (Bolli et al., 2018), VLP's de Bacteriophage Q $\beta$  en un modelo de adenocarcinoma (Sungsuwan, Wu y Huang, 2017), etc. En estos ensayos se han reportado que tienen la capacidad de ser ensambladas las VLP's sin afectar su estructura y que son capaces de inducir respuestas inmunitarias robustas, sin embargo, algunos modelos necesitan células procariontas para su ensamblaje, lo que dificulta su producción y aumenta los costos de producción, otros la estructura de la cápside es compleja, por lo que es necesario producir diferentes proteínas, entre otros problemas que complican su uso, por lo que es necesario continuar caracterizando un sistema de entrega capaz de portar gran cantidad de TAA's sin afectar su estructura, inducir respuestas humorales y celulares a la par y ser producido y purificado de manera más práctica y a menores costos

Las VLP's de Parvovirus Humano B19 (*erythroparvovirus primate 1*) se ha reportado que tiene ventajas respecto a otros tipos de VLP's, como los ya mencionadas, debido a su similitud estructural con la partícula viral, su tamaño, sus bajos costos de producción, fácil ensamblaje, su capacidad para portar epítopos de antígenos y su capacidad inmunogénica, ya que, al poder ser reconocida por el S.I puede generar fuertes respuestas inmunitarias por sí sola (Jiménez-Chávez, et.al. 2019) y adicionada con los epítopos, promete ser un buen sistema de entrega de antígenos tumorales.

Se ha reportado que las VLPs del Parvovirus Humano B19 pueden ser formadas por 60 copias de la proteína estructural VP2, la cual puede obtenerse de forma recombinante en *Escherichia coli* (*E.coli*) y puede ser modificada en su región amino terminal para portar diferentes secuencias sin afectar su ensamblaje. Además, esta proteína es obtenida de forma desnaturalizada a partir de cuerpos de inclusión, lo que aumenta sus rendimientos de producción. Puede ser ensamblada en un ambiente *in vitro* libre de células una vez renaturalizadas y son capaces de formar espontáneamente cápsides de ~20 nm de diámetro

(Sánchez, et al. 2012). El tamaño de estas VLPs permite que al ser inyectadas sean captadas por células presentadoras de antígeno, que transportan el antígeno vía linfática a los nódulos, además de procesar y presentarlos a las células T, lo que finalmente conduce a la activación de las células T (Bachmann, et.al,2004). Por lo que estas características perfilan a estas VLPs como un sistema de entrega de bajo costo y altamente eficaz.

Jiménez Chávez, et.al. en 2019 reportó el diseño y el uso terapéutico antitumoral de VLPs de Parvovirus Humano B19 conformadas de VP2 quiméricas multiepitópicas. Los resultados mostraron un efecto significativo antitumoral en un modelo de ratones con cáncer de mama triple negativo, además se indujeron respuestas celulares que fueron capaces de inducir regresión tumoral o protección contra el crecimiento tumoral.

En un trabajo previo del laboratorio se evaluó una construcción con diversos neoepítomos de la línea celular 4T1, tales como Qars, TMTC2, GPRC5 y otro epítomo de Survivina. Asimismo, durante el desarrollo de su Tesis doctoral (Jiménez-Chávez en proceso) desarrolló el diseño de otra construcción de VLPs quiméricas que contiene 3 epítomos de p53 (con diferentes secuencias) y de forma importante incluye un epítome de MUC1, epítomo reconocido por linfocitos B, por lo cual es importante evaluar la capacidad de estas VLPs quiméricas multiepitópicas para inducir respuestas de anticuerpos capaces de evitar la formación de tumoral.

En trabajos previos del laboratorio se realizó una construcción quimérica multiepitópica, nombrada VP2QM1, la cual consiste de un diseño de la cápside de Parvovirus Humano B19, a la cual se le añadieron epítomos de antígenos asociados a tumor (AAT). Para la selección de los epítomos se realizó una búsqueda bibliográfica, en la cual se tomaron criterios como la búsqueda de blancos moleculares y antígenos asociados a tumor que estuvieran presentes en la línea celular 4T1 y de igual manera en humanos; que la mutación estuviera presente en cáncer de mama triple negativo y que estuviera reportada en un alto porcentaje en este tipo de cáncer, así como que su función fuera de importancia para el establecimiento o eliminación de tumores como fallas en el ciclo celular, reparación de DNA, etc. , otro de los criterios necesarios es que los epítomos pudieran ser reconocidos por el MHC-1 de ratones Balb/c y que tuvieran la capacidad de inducir respuestas inmunes.

Los epítomos que se escogieron fueron p53, la cual es una proteína intracelular encargada de la reparación del DNA y está presente en el 70% de los diagnósticos de cáncer de mama, es por ello que se seleccionaron 3 epítomos diferentes de la mutación de esta proteína, ya que además de reportarse en la mayoría de los casos, es un blanco terapéutico importante y se ha reportado que genera respuestas celulares como

linfocitos CD8<sup>+</sup>, los cuales son de suma importancia en el tratamiento de cáncer de mama triple negativo (Umano, et.al. 2001).

Se escogió un epítipo de Muc1, la cual es una mucina glicoproteica transmembranal que se encuentra en el borde apical de un tejido normal, sin embargo, cuando hay algún tipo de neoplasia, estas células sobrepresan una isoforma que se encuentra en toda la membrana plasmática y permite que sea reconocida; se ha reportado que induce respuestas humorales de tipo IgG., por lo que es un blanco importante (Larrain, et.al., 2010).

## Adyuvantes

Los adyuvantes son agentes inmunopotenciadores, a los cuales se les atribuyen 2 funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del hospedero contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y, por otra parte, la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y de la respuesta de los animales de laboratorio durante la inmunización experimental (Morris, et.al., 1999).

Es por ello, que además del sistema de entrega, el uso de un adyuvante, podría incrementar la inmunogenicidad de los antígenos, potenciando así las respuestas inmunes obtenidas. Dentro de los efectos de los adyuvantes se encuentra la activación de células presentadoras de antígeno (APC) y la mejora de la presentación de antígeno por la inducción de señales coestimuladoras. (Abid, 2015).

La proteína Cry1Ac producida por *Bacillus thuringiensis*, ha demostrado ser un fuerte adyuvante con capacidad de activar células presentadoras de antígeno como macrófagos en diferentes sitios mucosos y sistémicos, incrementando la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) e induciendo la producción de citocinas proinflamatorias, especialmente IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 (Moreno-Fierros, et. al, 2013). Además, en un modelo de brucelosis esta proteína fue capaz de inducir respuestas celulares citotóxicas (González, et. al. 2015), las cuales son deseables en el tratamiento contra el cáncer.

La combinación de un buen sistema de entrega que porte múltiples epítopos junto con un fuerte adyuvante podría proveer una opción para inducir respuestas antitumorales en pacientes con cáncer.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta tasa de incidencia, reincidencia y mortalidad, así como la falta de blancos terapéuticos en el cáncer de mama triple negativo; el más agresivo por ser altamente metastásico, es necesario continuar investigando nuevas alternativas de prevención y tratamiento de esta enfermedad.

La aplicación profiláctica de la proteína VP2QM1 que contiene epítopos de p53 y de MUC1 podría reducir la inducción de cáncer en un modelo murino de cáncer de mama TN inducido con la línea 4T y, por lo tanto, representar una herramienta útil para la prevención del cáncer de mama. Por otro lado, a pesar de que se han caracterizado estas VLPs como un sistema de entrega eficiente para lograr inducir un efecto terapéutico antitumoral, es importante caracterizar el efecto profiláctico antitumoral de la construcción VP2QM1 para la



prevención de este tipo de cáncer, así como analizar su capacidad para inducir respuestas celulares (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), su activación (CD69<sup>+</sup>) y humorales (Anticuerpos anti Muc1 y anti VP2 nativa) simultáneamente al incluir epítomos reportados para ambos tipos de respuestas.

## HIPÓTESIS

La inmunización profiláctica con la vacuna VP2 quimérica multiepitópica (VP2QM1) inducirá inmunidad antitumoral, por lo que inhibirá el desarrollo de tumores en las ratones hembra BALB/c. en un modelo experimental de cáncer de mama.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar el efecto profiláctico antitumoral de la proteína VP2 quimérica la cual tiene múltiples epítomos en un modelo murino de cáncer de mama inducido con la línea celular 4T1.

### Objetivos Particulares

- Expresar VP2 nativa y VP2QM1 en *E.coli* BL21
- Ensamblar cápsides de VP2 nativas y VP2QM1
- Evaluar el efecto de la proteína VP2 nativa y VP2QM1 en el crecimiento tumoral en un modelo murino inducido con la línea celular 4T1.
- Identificación de las proporciones de células supresoras derivadas mieloides (MDSC), Linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup>.
- Determinar la respuesta de anticuerpos específicos hacia los epítomos de la construcción VP2QM1.
- Evaluar la metástasis en pulmón de los grupos inmunizados

## MATERIALES Y MÉTODO

### Construcciones VP2 nativa y VP2 quimérica

El gen de la proteína VP2 del Parvovirus humano B19, fue donado por el Dr. Bustos Jaimes de la Facultad de Medicina, dicha construcción contenida en el plásmido pet22b contiene un tag de 6 histidinas en su extremo carboxilo para facilitar su purificación, el plásmido es expresado en *E. coli*. Para el caso de las VP2 quiméricas, se utiliza una construcción diseñada anteriormente en nuestro laboratorio para la cual se seleccionaron epítomos de las proteínas: P53, MUC1, que han sido reconocidos para la línea tumoral 4T1 y para cáncer de mama triple negativo.

La construcción se encuentra igualmente en el plásmido pet22b para su expresión en *E. coli*. BL21 (Jiménez, 2018). Las proteínas de VP2 quimérica con epítomos de P53 y MUC1 se denominó VP2QM1 como se describe en la tabla (Figura. 1). (Jiménez, et.al. 2020).

## EPÍTOPOS SELECCIONADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN VP2QM1

NOMBRE	EPÍTOPOS	TIPO DE RESPUESTA	REFERENCIA
P53	- AIYKKSQHM - LAKTCPVQLWVS - KYMCNSSCM	Linfocitos T CD8	(Umano et al., 2001)
MUC1	- GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH	Anticuerpos	(Tarp et al., 2007)

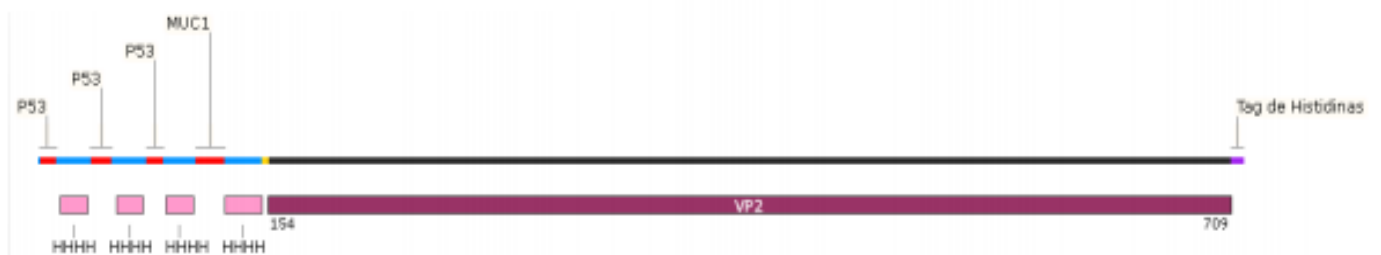


Figura. 1. Tabla de los epítomos seleccionados para el diseño de la construcción quimérica multiepitópica, VP2QM1.

Para hacer la construcción se requirió modificar a la VP2 nativa en su amino terminal para acarrear a los epítomos, también contiene un tag de 6 histidinas, para facilitar su producción y una resistencia a Ampicilina para facilitar su identificación, esta construcción se realizó en un vector Puc1 para ser insertado en una *E.coli* recombinante (BL21)(Figura 2). Se utilizaron linkers formadores de hélices  $\alpha$ , los cuales impiden interacciones entre los epítomos y aumentan su inmunogenicidad, en la Figura.2 se muestra una simulación tridimensional de la estructura (terciaria) en el programa Phyre2 (Jiménez. et.al., 2019)

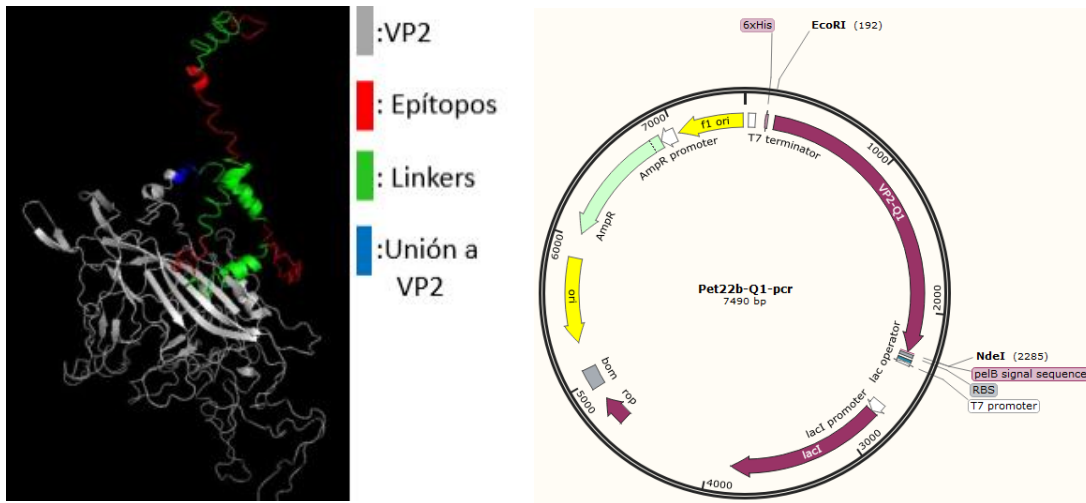


Figura. 2 Mapa del plásmido Pet22B1 de VP2QM1 y Simulación del acomodo de la estructura terciaria de la proteína VP2QM1

### Expresión y selección de VP2QM1 en *E. coli*

Se obtuvieron previamente bacterias competentes de la cepa BL21, las cuales son compatibles para el promotor presente en el vector Pet22+b. Se transformaron las bacterias por medio de choque térmico, de un stock de bacterias competentes almacenadas anteriormente a -80°C, se descongelaron por 15 minutos y se le agregaron 2 µl del plásmido de la construcción VP2QM1 (anteriormente confirmada su identidad por Western Blot), se dejaron nuevamente en hielo durante 15 minutos, posterior a ello se expusieron a 42°C por 45 segundos y después en hielo durante 3 minutos, se le agregó 300 µl de medio Luria Broth (LB) (US Biological Swampscott, MA 01907), se incubaron a 37°C durante 1 hora a 180 rpm., se extendieron 250 µl en placas de medio LB+Ampicilina y se incubaron por 18 horas a 37°C. Se realizó doble selección para asegurar una mayor producción, por lo que se seleccionaron las bacterias aisladas y se cultivaron en medio LB+Ampicilina, posteriormente se hizo una electroforesis para confirmar la expresión de las proteínas y se seleccionaron las colonias con mayor expresión para sembrarlas nuevamente en placas de medio LB+Ampicilina y seleccionar bacterias aisladas para cultivarlas en 250 mL de medio LB+Ampicilina. (Jiménez et.al. 2019)

### Producción y purificación de VP2 y VP2 quiméricas en *E.coli* recombinantes

Para evaluar el efecto profiláctico antitumoral se utilizaron grupos inmunizados de VP2QM1, VP2QM1+Adyuvante Cry1Ac y VP2 nativas, por lo que se requirió la producción y purificación de estas proteínas.

Se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* recombinante las cuales fueron transformadas con el plásmido de VP2 nativas y VP2QM1 fueron crecidas en medio Luria Broth (LB) con 100µg/mL de Ampicilina para hacer un medio selectivo, en condiciones de 37°C por 18 horas, posteriormente se le agregó isopropil β-D-1-

tiogalactopiranosido (IPTG) para una concentración final de 0.2mM por 18 horas adicionales para inducir la producción de la proteína de interés. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 8042 x g a 4° por 10 minutos, el pellet se resuspendió en un buffer de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  50 mM; NaCl 0.3 M; pH 6.3) y fue sonificado con pulsos de 5 segundos de actividad y 5 segundos de descanso por 15 minutos en hielo. Los cuerpos de inclusión formados por la proteína se recuperaron por centrifugación a 6434 x g a 4°C por 20 minutos y se lavaron 3 veces con un buffer A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM: NaCl 0.3 mM, Tritón X—100 al 2%; pH 6.3 3 mM), se sometió a sonicación durante 40 segundos y se centrifugó a 6434 x g durante 10 minutos, se lavó nuevamente con Buffer A+ 3mM DTT y un último lavado con buffer de lisis. La pastilla se solubilizó en 20 mL de buffer de columna y se incubó a 37°C con 200 rpm por 72 horas, la proteína no soluble fue eliminada por centrifugación a 1045 x g por 20 minutos.

Para la purificación de las proteínas VP2 silvestre y VP2 quimérica nombrada VP2QM1 se realizó como se describe en un trabajo anterior (Jiménez –Chávez et al 2019). Ambas proteínas se purificaron en condiciones desnaturalizantes por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados en condiciones desnaturalizantes, en una columna con 10 mL de Resina His de Niquel puro que se equilibró con buffer de columna ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM: NaCl 0.3 mM; GuHCl 3M, Glicerol 5%,  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 Mm) y se cargaron con 3-5 mL de proteína solubilizada a un flujo de 2 mL/min. Posteriormente se lavaron con dos volúmenes de buffer de columna que contenía 20mM de imidazol. Una vez que la D.O. a 280 nm fue 0 o estable. La proteína se eluyó agregando buffer de elución en fracciones de 5 mL. Una alícuota de las fracciones fue dializada en PBS para eliminar el exceso de GuHCL y fue corrida en una electroforesis con un gel SDS-PAGE para confirmar la presencia de la proteína y su pureza. Posterior a esto se calculó la concentración de las proteínas por método de Bradford. Las fracciones que se obtuvieron de proteína pura se concentraron mediante unidades de filtración por centrifugación de 50000 Da, se cuantificaron con el método de Bradford y se diluyeron hasta una concentración de (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) para después continuar con ensamblaje *in vitro* de las proteínas. Se dializó 1.3 mL de proteína pura con una concentración de [0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] contra 50 mL de PBS con Arginina [0.2 M] durante 72 horas, haciendo cambios cada 12 horas para evitar la saturación de Guanidina. Posteriormente las muestras fueron filtradas por 0.22 $\mu\text{m}$  y analizadas mediante dispersión dinámica de luz, donde se buscaron tamaños de partículas de aproximadamente 20-30 nm y se almacenaron a 4°C hasta su uso. (Sánchez, et.al. 2012).

### **Identificación por Western Blot**

Se hizo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa con una cámara de transferencia, se bloqueó con leche al 4% descremada por 12 horas a 4°C, se lavó con PBS Tween al 0.1% y se puso a incubar con un anticuerpo monoclonal primario, en este caso de conejo anti VP2, durante 1 hora, posteriormente se reveló con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con un fluorocromo infrarrojo que emite a 800 nm; se

incubó durante una hora en agitación a temperatura ambiente y se leyó con un escáner Odyssey LiCor. (Ni,et.al.2008).

### **Obtención y purificación de protoxina y toxina Cry1Ac**

Se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* recombinante que contiene un plásmido con el gen que codifica la protoxina Cry1Ac. Las bacterias se cultivaron en medio Luria Broth (US Biological Swampscott, MA 01907) adicionado con Ampicilina (100 µg/mL). Posteriormente se incubó a 37 °C por 48 horas a 300 rpm en agitación constante. Para la cosecha de las bacterias se centrifugó a 8042 x g a 4 °C por 15 minutos y se lavaron dos veces con amortiguador TE (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 1mM, pH 8.0). Posteriormente se lisaron las bacterias incubándolas a 37 °C durante 1 hora con 20 mg/mL de lizozima + sacarosa al 15%, las bacterias se sonicaron durante 10-15 ciclos de 5 minutos cada uno, a una amplitud de 100 Htz. Los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación a 8042 x g a 4 °C por 10 minutos, al término, la pastilla se lavó 5 veces con 50 mL de NaCl 0.5 M más Tritón X-100 al 1%. Después se realizó otra centrifugación bajo las mismas condiciones para re-suspender la pastilla en 30 mL de agua bidestilada a 4 °C. Una vez más se centrifugó a 8042 x g por 15 minutos a 4 °C y se solubilizó la pastilla en 5 mL de amortiguador de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1M, pH 9.6, más 10 mM de DTT) por 30 minutos a 37 °C en agitación a 300 rpm. La protoxina Cry1Ac solubilizada se obtiene por centrifugación a 8042 x g 4 °C por 15 minutos, mediante la recuperación del sobrenadante. Los restos de endotoxinas se eliminaron purificando la proteína mediante una columna de polimixina (BioRad Lab, CA) y se verificó la ausencia de LPS. Finalmente, la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (Rojas, et.al. 2004).

### **Cultivo línea celular 4T1**

La línea celular 4T1, derivada de un carcinoma mamario de ratón BALB/c, fue donada por el Dr. Pedro Ostoa, del departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Ciudad Universitaria. Las células fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% + antibac (penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 lg/mL) y fungicida (0.75 lg/mL)) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en placas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.

## Esquema de inmunización e inducción de tumores.

Evaluamos el efecto profiláctico antitumoral *in vivo* de la construcción VP2QM1 coadministradas con adyuvante Cry1Ac en un modelo murino de cáncer de mama con la línea celular 4T1. Utilizamos un esquema de inmunización, que consistió de tres inmunizaciones profilácticas en dos vías de inmunización, es decir, por cada inmunización se administró una vía intraperitoneal para tener un efecto sistémico y otra vía subcutánea para un efecto local. Se utilizaron 3 grupos de ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad, uno inmunizado con PBS (vehículo), otro con VP2QM1 y finalmente uno con VP2QM1+ Adyuvante Protoxina Cry1Ac (Ady. PCry1Ac), cada grupo con una n=5. Se aplicaron 3 inmunizaciones cada 7 días por 2 vías, una vía s.c. (sub-cutánea) en la sexta mama y otra vía intraperitoneal. En el caso del grupo VP2QM1 se administraron [50 µg/µl] de VP2QM1, para el grupo inmunizado con VP2QM1+P.Cry1Ac se administraron [50 µg/µl] de VP2QM1 + [50 µg/µl] de Ady. PCry1Ac en cada una de las vías, en total se administró [100 µg/µl] de VP2QM1 por ratón en cada inmunización y para el grupo VP2QM1+PCry1Ac, [100 µg/µl] de VP2QM1 y [100 µg/µl] de PCry1Ac por ratón. Siete días posteriores a la última inmunización se inocularon  $3 \times 10^3$  células. Los tumores fueron medidos cada 3er día con un vernier y los valores del tamaño tumoral fueron obtenidos mediante la fórmula  $V = (L \times S^2)/2$  (L= Lado más largo, S= Lado más corto). Todos los ratones fueron sacrificados 30 días después de la inoculación de células 4T1. (Figura 4)

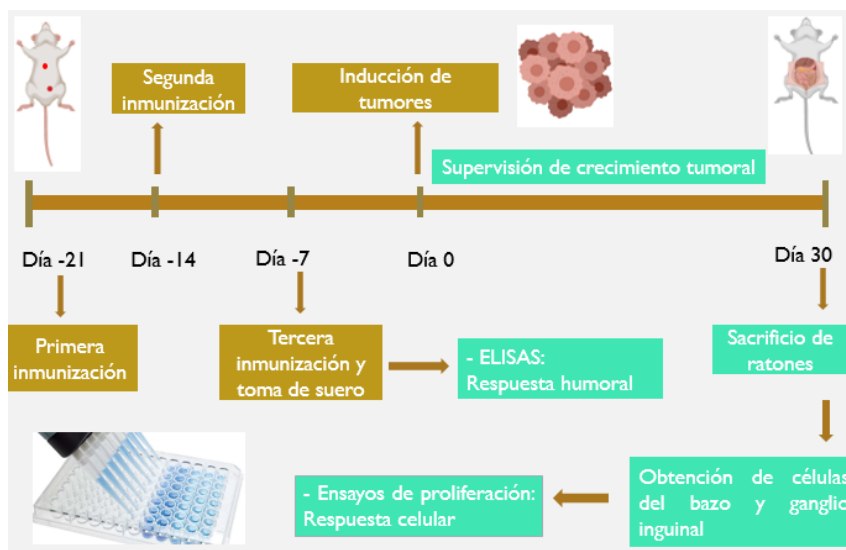


Figura. 4 Esquema de inmunización

## Identificación de anticuerpos por técnica de ELISA (Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay).

Para la identificación de anticuerpos contra MUC1 y VP2QM1 se realizó la técnica de ELISA. Tras 2 inmunizaciones se tomaron sueros de la cola de los grupos de ratones (PBS, VP2QM1 y VP2QM1+ Adyuvante Cry1Ac y de animales sanos). Se recubrieron las placas con péptidos sintéticos del epítipo de MUC1 y con

VP2QM1 en placas de poliestireno de 96 pozos, se agregó una dilución de 10 µg de péptido en 100 µl de Buffer de Carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1mM +  $\text{NaHCO}_3$  3mM, pH 9.6) por pozo para recubrir la placa, se incubaron por 12 horas a 4° C. Se lavaron 3 veces con 250 µl con PBS 1x+Tween 20 (PBS-T) v/v al 0.5%, se bloquearon adicionando 200 µl de leche al 3% durante 2 horas a 4°C, posteriormente se lavaron nuevamente con PBS-T v/v al 0.05% tres veces y se recubrieron los pozos con 100 µl de PBS-T. Se realizaron diluciones seriadas de los sueros en PBS-T empezando con 1:100 (IgG totales), se incubaron 12 horas a 4°C, se lavaron 3 veces con PBS-T 20 al 0.05%. Se agregaron 100 µl a cada pozo de una dilución de 1:1000 de anticuerpos peroxidados anti-IgG de chivo, y se incubaron por una 1 hr a 4°C y se lavaron 3 veces con PBS-T v/v al 5%. Para revelar las placas se le agregó 100 µl de 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)+ $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% a cada pozo, se leyó en un espectrofotómetro de placas (Termo Labsystems) a 405 nm a los 10 minutos y posterior a este, cada 5 minutos hasta los 30 minutos.

### **Obtención de leucocitos totales de bazo**

Treinta días posteriores a la inoculación de las células tumorales con línea celular 4T1, los ratones fueron sacrificados, y se obtuvieron células de bazo. Los bazos fueron disgregados sobre un filtro de tela de organza y fueron filtrados, las células fueron recuperadas y llevadas a un volumen de 8 mL, centrifugadas a 1206 x g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregaron de 3 a 7 mL (dependiendo del tamaño de la pastilla celular) búfer de lisis de eritrocitos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  50 mM; NaCl 0.3 M; pH 6.3), se re-suspendieron y se dejaron incubar 7 minutos en frío. Se lavaron con 10 mL de PBS frío y centrifugadas a 1206 x g 10 minutos a 4 °C, se agregó 5 mL de medio RPMI y las células fueron nuevamente filtradas con tela de organza y fueron centrifugadas a 1206 x g, 10 minutos a 4 °C, posteriormente se llevan los tubos con la pastilla celular a un volumen de 6 mL de medio RPMI, posteriormente se contaron automáticamente con TC10 Automatic Counter Cell.

### **Proporción de Linfocitos $\text{CD4}^+$ , $\text{CD8}^+$ , $\text{CD4}^+/\text{CD69}^+$ , $\text{CD8}^+/\text{CD69}^+$ y MDSC**

El sacrificio de los ratones se realizó en el día 30, por dislocación cervical. Se extrajeron los pulmones, ganglios inguinales y bazo de cada organismo, los cuales se depositaron en cajas Petri con medio RPMI suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB), se maceraron, se filtraron para la obtención de linfocitos, y se contaron con un contador automático de células Bio-Rad TC10™. Para la identificación de las poblaciones se contaron  $1 \times 10^6$  células, las cuales fueron centrifugadas a 400g por 5 min a 4°C, posteriormente fueron bloqueadas con anti-CD16/32 1µg/mL, en 0.5% BSA-PBS para evitar uniones de anticuerpos no específicos. Se marcaron inmediatamente con anticuerpos específicos para las moléculas CD4 (Anti-mouse CD4-Isotiocianato de fluoresceína [FITC]), CD8 (Anti-mouse CD8-Ficoeritrina [PE]), CD69 (Anti-mouse CD69-FITC), CD11b (Anti-mouse CD11b-FITC) y GR1-APC, cabe mencionar que todo el procedimiento se realizó en un gabinete de flujo laminar y se incubaron a 4° C. Después de la incubación las células fueron lavadas con 1 mL de

Amortiguador de fosfatos con ázida de sodio (PBA) (Albúmina de suero bovino 0.5 gr., azida de sodio 0.01 gr. en 100 ml de H<sub>2</sub>O) y fijadas con 300 µL de *p*-formaldehído al 1% para ser analizadas por citometría de flujo, se analizaron los datos con el software FlowJo 7.6 y GraphPad para hacer el cálculo estadístico ANOVA para observar las diferencias entre tratamientos.

## Macrometástasis en pulmón

Para estimar la macrometástasis en pulmón después del sacrificio en el día 30 se disectaron los pulmones, a los cuales se les inyectó una solución 10% de tinta india por la tráquea, esta anteriormente fue bloqueada con hilo quirúrgico, a los pulmones se les realizaron 3 lavados de una solución Fekete (100 mL= 70% etanol, 10 mL 10% *p*-formaldehído, y 5 mL de ácido acético glacial), para eliminar el exceso de tinta y se incubaron durante 12 horas en la misma solución para fijarlos. Los nódulos metastásicos se contaron manualmente con un microscopio estereoscópico y se fotografiaron. (Jiménez, et.al 2019).

## RESULTADOS

### Confirmación de identidad de los plásmidos

Se realizaron electroforesis de ácidos nucleicos para confirmar la identidad del plásmido pet22B-VP2n (VP2 nativa) y de pet22B-QM1 (VP2 con epítomos) se cortaron con las enzimas de restricción EcoR1 y Nde1. En la Figura 5 se muestra un gel de agarosa con el plásmido de VP2QM1, se puede observar en el carril 1 los cortes del vector con ambas enzimas con una banda en aproximadamente 5000 pares de bases que corresponde al vector y otra en 2500 pb que corresponde al gen de la proteína VP2 nativa, en el segundo carril una banda cerca de 7500pb, ya que se hizo un solo corte con EcoR1 y en el tercer carril el plásmido sin cortar como control, los tamaños moleculares de las bandas obtenidas coinciden con el teórico de 7490 pb para el caso de VP2QM1. En la Figura 6 se muestra el corte del plásmido de VP2 nativa, en la que se hizo un corte con ambas enzimas, se observan bandas aproximadamente de 1500 y 5000 pb, por lo que se confirma la presencia del plásmido de un tamaño de 7000 pb. En comparación de los tamaños del plásmido pet22B-VP2n respecto a pet22B-Q1 VP2 respecto a la VP2QM1 se observa un cambio en los pares de bases de los DNA, debido a la inserción de los múltiples epítomos de la construcción VP2QM1.

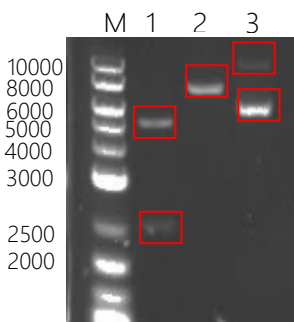


Figura. 5 Digestión del plásmido pet22B-QM1. Se muestra un gel de agarosa en donde en el carril 1 se hicieron dos cortes con las enzimas EcoR1 y Nde1, se observan bandas aproximadamente de 5000 y de 2000 pb, en el carril 2 se hizo un corte con la enzima EcoR1, se observa una banda aproximadamente en el peso de 8000 pb, en el último carril se encuentra el plásmido pet22B sin cortes, para tomarlo de referencia.

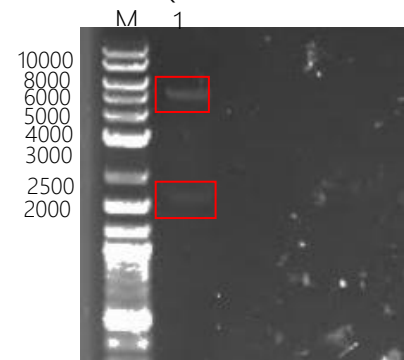


Figura. 6 Digestión del plásmido pet22B-VP2n. Se muestra un gel de agarosa de una electroforesis de ácidos nucleicos de VP2 nativa. En el carril se muestran 2 bandas, ya que fue cortado con ambas enzimas, se observa una banda de aproximadamente 5000 pb y otra de aproximadamente de 1500 pb.



## Expresión de la proteína VP2QM1 y confirmación por Western Blot

Se realizó un ensayo de Western Blot para confirmar la identidad de la proteína VP2QM1, puesto que es probable que existan proteínas del vector que tengan el mismo peso y se comporten de una manera similar a VP2QM1. Para ello, se corrieron dos geles de poliacrilamida SDS PAGE (Figura.7) cargados con 20  $\mu$ L cada pozo en el siguiente orden, carril 1-colonia de bacterias *E. coli* transformadas no inducidas, carril 2- colonia de *E. coli* inducida con IPTG, carril 3-proteína enriquecida, carril 4- proteínas no unidas de la purificación como patrón de comparación, cabe resaltar que la banda de la proteína inducida (carril 2) se ve un incremento en la banda respecto a la banda no inducida (carril 1), esto se debe a la inducción lo que se refleja con una mayor concentración de la proteína. Se hizo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa con una cámara de transferencia, se bloqueó con leche al 4% descremada, se lavó con PBS Tween al 0.1% y se puso a incubar con un anticuerpo monoclonal primario (conejo anti VP2) y se reveló con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con un fluorocromo infrarrojo a 800 nm; se incubó y se leyó con un escáner infrarrojo Odyssey LiCor como se muestra en la Figura 7. El Gel de Poliacrilamida muestra diferentes lavados de la proteína VP2QM1, se realizó el Western Blot para verificar la identidad de la proteína, en el Western Blot se puede observar las bandas con fluorescencia con el mismo peso molecular esperado (75 kD), lo cual indica, que el anticuerpo reconoce la proteína VPQM1 y así confirmamos su peso teórico.

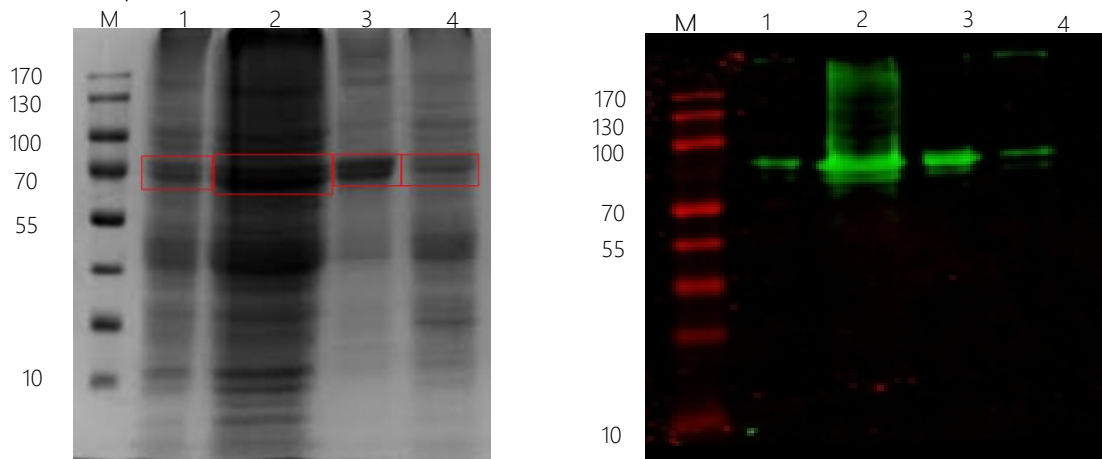


Figura. 7 Expresión de proteína VP2QM1 y confirmación por Western Blot. En el carril 1 se encuentra la colonia no inducida, en el carril 2 una colonia inducida, en el carril 3 la proteína enriquecida y en el carril 4 las proteínas no unidas de la purificación. Se utilizaron anticuerpos anti VP2 para confirmar si la banda sobre expresada de 75 kD después de la inducción con IPTG correspondía con la proteína VP2 química.

## Producción de VP2 nativa y VP2QM1

Para obtener una concentración óptima de la proteína se necesita una sobreexpresión como se muestra en el carril 2 y 3 de la Figura. 8 con una banda de 65 kD, lo que confirma la sobreexpresión de la proteína VP2 nativa. Para el caso de la proteína VP2QM1 se muestra una banda con un peso de 75 kD lo que indica expresión y que las bacterias fueron transformadas exitosamente, sin embargo, fue necesario una segunda selección puesto que el grosor de la banda no muestra la concentración necesaria de la expresión de la proteína respecto a las bandas de VP2 nativa.

Para la segunda selección se creció la colonia con mayor expresión, por lo que se seleccionó la colonia del carril 8, la cual se estirió nuevamente en una caja Petri con medio LB+amp. con las mismas condiciones y se seleccionaron nuevamente colonias aisladas sin colonias satélite, se escogieron 8 colonias y se crecieron nuevamente con 3 mL de medio LB+amp., se indujeron con IPTG [0.2mM] y se corrió un gel SDS PAGE para observar su expresión como se muestra en la Figura. 9, las que obtuvieron mayor expresión fueron las colonias del carril 1 y 2, por lo que se crecieron en mayor volumen de medio LB+amp. y de igual manera con las colonias de bacterias de la proteína VP2 nativa; se corrió nuevamente un gel SDS PAGE.

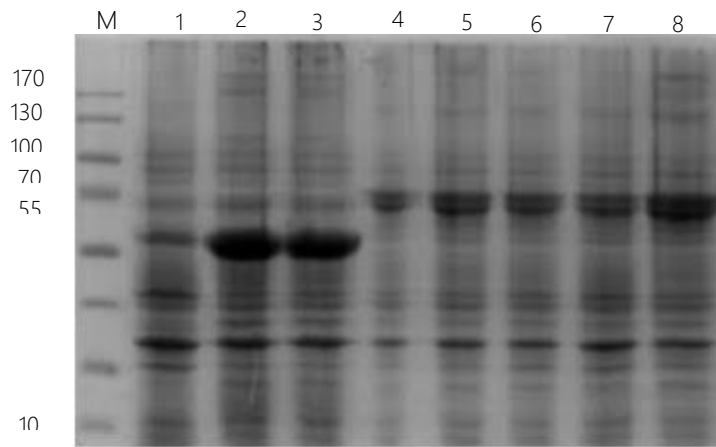


Figura. 8 Expresión de VP2 y VP2QM1 en *E. coli*. Gel de poliácridamida SDS PAGE en donde los carriles 2-3 se puede observar la sobreexpresión de la proteína VP2 Nativa, del carril 4-8 se muestra la expresión de VP2QM1, en el carril 8 se muestra la mejor concentración, sin embargo, no es la concentración óptima, puesto que se realizó una segunda selección.

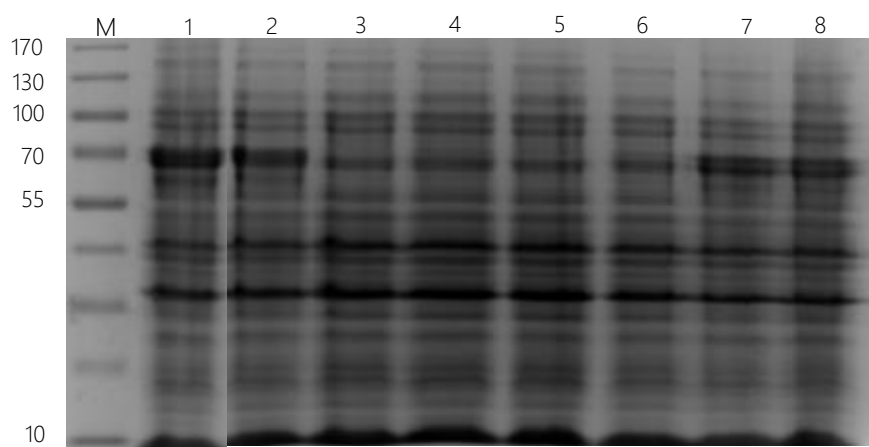


Figura. 9 Doble selección de la proteína VP2QM1. Gel de poliácridamida SDS PAGE en donde se cargaron los carriles con VP2QM1 de la doble selección de la colonia que había expresado mayor concentración de proteína para lograr una sobreexpresión como se muestra en el carril 1 y 2 con una banda de aproximadamente 75 kD, lo que corresponde al peso de la VP2QM1 (76.7 kD).

En la Figura. 10 se muestra que se obtuvo de manera satisfactoria su producción con la doble selección; obteniendo una mejor sobreexpresión de la proteína. En el carril 2 se observa que hubo una mayor expresión, sin embargo, se utilizaron ambas colonias para asegurar una mejor producción.

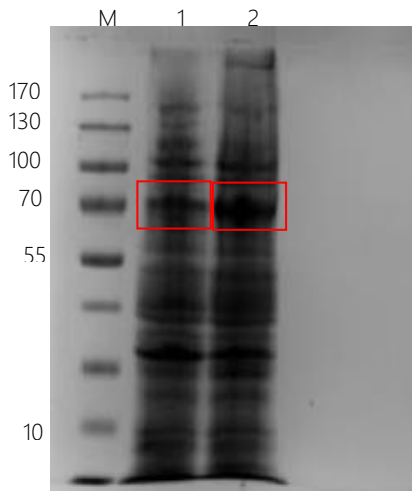


Figura 10 Sobreexpresión de VP2QM1. En el carril 1 y 2 se cargaron las muestras de la proteína VP2QM1 que se crecieron para la producción, a pesar de que se obtuvo una mayor sobreexpresión de la colonia del carril 2 se utilizaron ambas colonias (cuadros rojos), para asegurar una mejor producción, ambas bandas corresponden al peso estimado anteriormente, por lo que se confirma de igual manera la identidad de la proteína.

### Purificación de la proteína VP2QM1 y VP2 nativa

La purificación de la proteína VP2QM1 se realizó por cromatografía de afinidad con columnas de Níquel y de Cobalto con la misma metodología. Se pasaron 3 mL de la proteína solubilizada por la columna, en la que se lavaron con buffers de fosfatos con imidazol y por último con un buffer de elusión con una concentración muy alta de Imidazol para lograr remover la proteína pura, posteriormente se corrió un gel SDS PAGE para verificar la pureza de la proteína y la eficacia del método, como se muestra en la Figura. 11; en el carril 2 se cargó muestra de VP2 enriquecida, se puede observar que aún hay presencia de bandas inespecíficas, el carril 1 se cargó con muestra de la proteína no unida, sin embargo, se observa que aún hay una concentración alta de la proteína de interés, por lo que fue necesario modificar el protocolo previamente estandarizado para la proteína VP2 nativa.

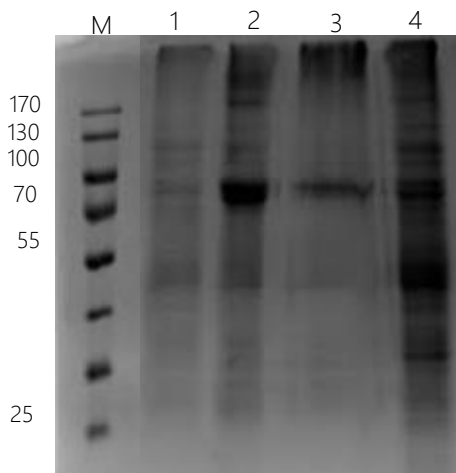


Figura. 11 Purificación de la proteína VP2QM1. En el carril 1 se muestra las proteínas no unidas con la resina de Cobalto, en el carril 2 se muestran las proteínas concentradas de VP2QM1, en el 3 el sobrante de la membrana y, por último, en el carril 4 la solución no unida de la columna de Níquel.

Puesto que la concentración del remanente del VP2QM1 en la solución de las proteínas no unidas es alta se modificaron las concentraciones de cloruro de guanidinio (GuHCl) para desnaturalizar la proteína por completo y facilitar la unión de la proteína a la columna, de igual manera se aumentó el número de veces que se pasa la proteína por la columna antes de los lavados para favorecer su unión. Para obtener una mayor pureza se aumentó la concentración de Imidazol en los lavados, lo que promueve que las proteínas inespecíficas que se observan en el carril 2 de la Figura. 11 se remuevan. En la Figura 12 se puede observar la segunda purificación con las modificaciones mencionadas previamente, a pesar de las modificaciones se sigue observando la presencia de proteína en el solubilizado no unido y bandas inespecíficas, por lo que se sigue trabajando en la estandarización del método. Finalmente se cuantificó la proteína pura obtenida para tener una aproximación por el método de Bradford, en el que se estimó [1.32  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] al pasar 3 mL por la columna de Níquel.

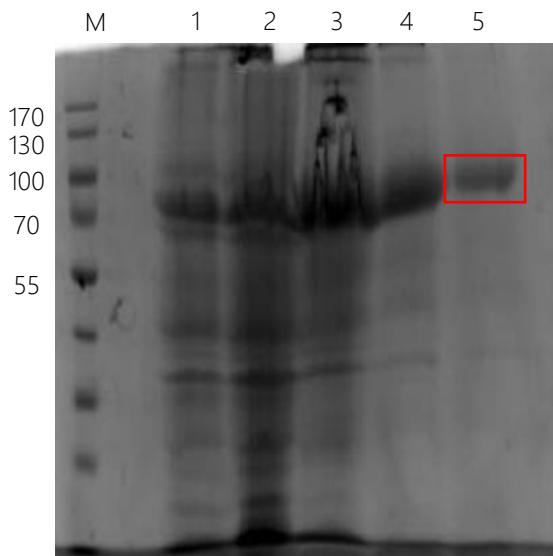


Figura. 12 Purificación de la proteína VP2QM1. En los carriles 1-4 se muestran los lavados de proteínas, en el carril 5 se encuentra la proteína VP2QM1 pura.

### **Las cápsides de Parvovirus Humano B19 son capaces de formas cápsides posterior a la modificación de sus monómeros.**

El ensamblaje *in vitro* de las proteínas VP2QM1 se realizó mediante diálisis con una membrana de 6000 Da de poro. Se dializó 1.3 mL de proteína pura con una concentración de [0.5 mg/mL] contra 3 X 50 mL de PBS con arginina [0.2 M], durante 72 horas, haciendo cambios cada 12 horas para evitar la saturación de guanidina. Posteriormente las muestras fueron filtradas por 0.22  $\mu\text{m}$  y analizadas mediante dispersión dinámica de luz (DLS), donde se buscaron tamaños de partícula de aproximadamente 20-30 nm. Como se muestra en el histograma (Figura 13) las poblaciones corresponden al tamaño esperado.

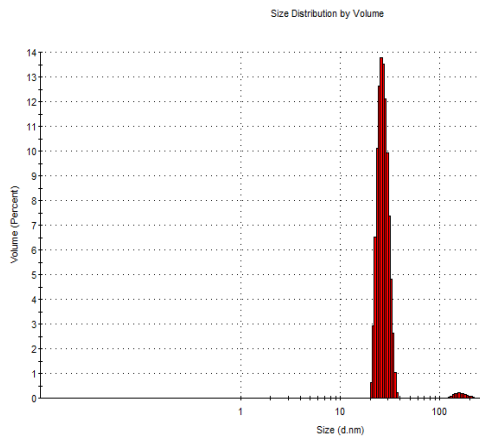


Figura. 13 Histograma de las poblaciones de las proteínas VP2QM1 ensambladas leídas en un dispersor dinámico de luz, con un tamaño aproximado de 20-30

### Producción y purificación de la protoxina Cry1Ac

Para la producción de la protoxina de Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* se utilizó una cepa recombinante de *E. coli* que contiene un plásmido con el gen que codifica la protoxina Cry1Ac. Las bacterias se cultivaron en medio LB+Ampicilina. La protoxina Cry1Ac solubilizada se obtiene por centrifugación, mediante la recuperación del sobrenadante. Los restos de endotoxinas se eliminaron purificando la proteína mediante una columna de polimixina. Finalmente, la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, en la se obtuvo una concentración de [9.6 µg/µl) y la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS PAGE como se muestra en la Figura. 14, en el carril 1 se observa la protoxina, lo que confirma su identidad, puesto que su peso teórico estimado es de 130 kDa.

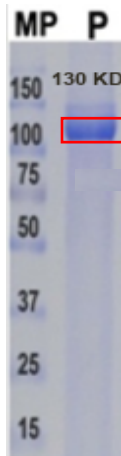


Figura. 14 Purificación de la protoxina y toxina Cry1Ac. En el carril 1 se muestra la protoxina con un peso de 130 kD.

### Las proteínas VPQM1 y VP2QM1+Adyuvante Cry1Ac fueron capaces de retrasar e inhibir respectivamente el crecimiento tumoral en los ratones inmunizados.

Para evaluar el efecto profiláctico antitumoral se administraron 3 inmunizaciones una cada 7 días de 100µl de PBS, VLP nativa, VP2QM1 y 100 µg VP2QM1+100 µg de adyuvante PCry1Ac por dos vías: subcutánea en la sexta mama de los ratones para obtener una respuesta local e intraperitoneal para una respuesta sistémica. Siete días después de la última inmunización se indujeron los tumores con  $3 \times 10^3$  células de la línea celular 4T1. En la Figura 15 A) en la sexta mama de los ratones. Se puede observar la gráfica de crecimiento

tumoral, los tumores se midieron con un vernier cada 3 días después de la inducción de tumores con la línea celular 4T1 durante 30 días.

En el grupo de VP2QM1 se obtuvo una protección antitumoral total, ya que los ratones no mostraron crecimiento de tumores. El grupo que fue inmunizado con VLP VP2MQ1 + adyuvante Cry1Ac mostraron una disminución significativa en el crecimiento tumoral en comparación al grupo control (PBS), como se muestra en la Figura 15 E.

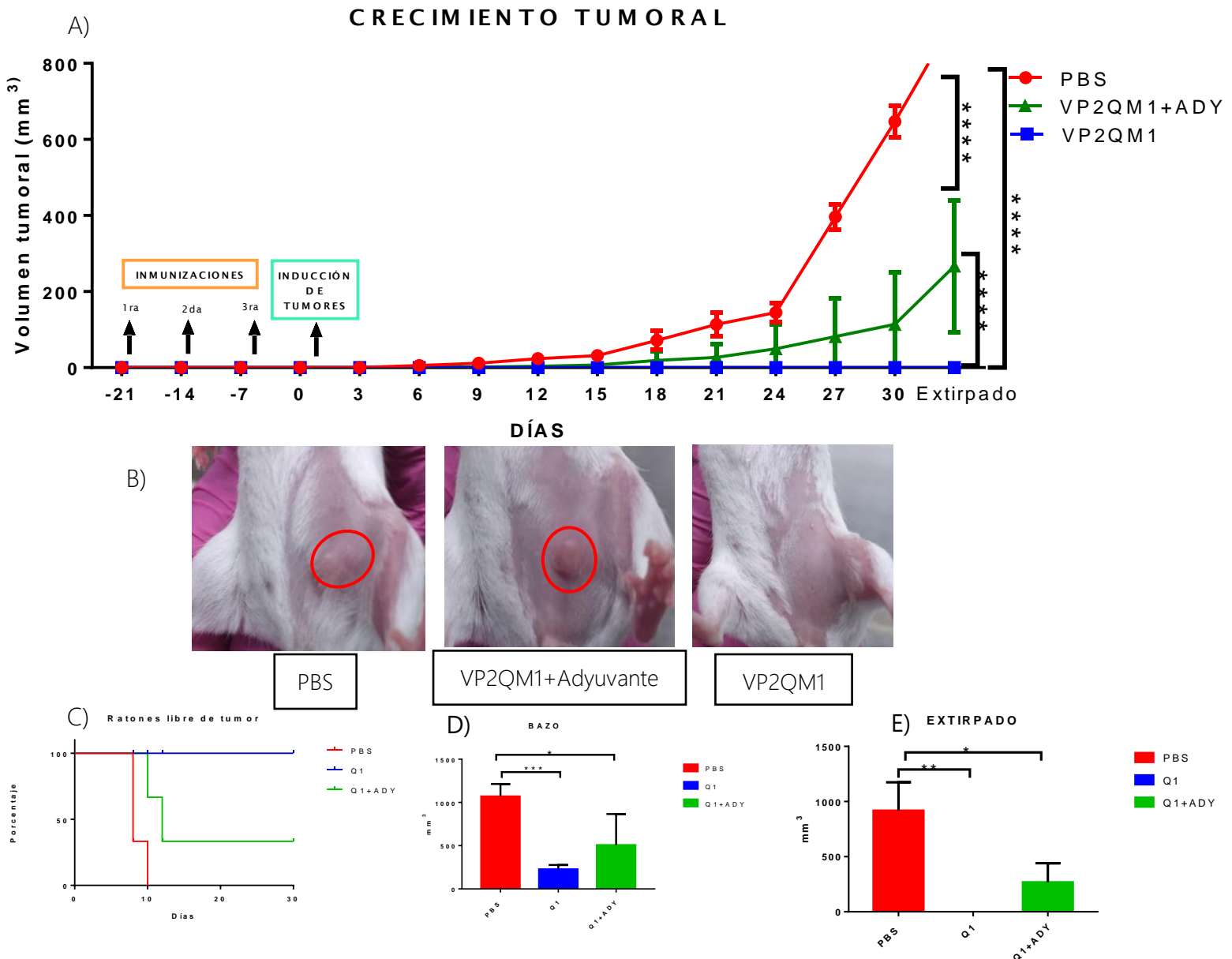


Figura. 15 Efecto profiláctico antitumoral de VLP' s VP2QM1 coadministradas con adyuvante Cry1Ac con un profiláctico de inmunización. Ratones BALB/c grupos VP2QM1, VP2QM1+adyuvante Cry1Ac, PBS vía intraperitoneal y una subcutánea, que posteriormente se inocularon células de la línea 4T1. El crecimiento de los tumores fue monitoreado cada 3er día. A) Crecimiento tumoral, cada punto representa la media del crecimiento tumoral por grupo experimental. B) Fotografías de los tumores de los ratones en el día 21. C) Ratones libres de tumor 30 días después haber inducido tumores. ANOVA y prueba de comparación múltiple de Dunnett.  $P < 0.01$   $n=5$  en PBS,  $n=5$  VP2QM1 y  $n=5$  VP2QM1 + adyuvante Cry1Ac. \*, \*\*\* Indica diferencias significativas en donde  $p \leq 0.05$  o  $0.01$  respectivamente.

En el panel B se puede observar los tumores de los ratones inmunizados en el día 21, se puede ver claramente que el tumor del PBS es más grande que el de los inmunizados con VP2QM1+Adyuvante y que VP2QM1 está libre de tumor, lo cual está representado gráficamente en la Figura C, donde de igual manera se muestra el día en que hubo la primera aparición del tumor visible, que fue aproximadamente a partir del día 9 y 10. En la gráfica D se observa el crecimiento de los bazos de los organismos, se obtuvo una diferencia significativa de VP2QM1 Y VP2QM1+Ady respecto al PBS. En la Figura E se encuentra el tamaño que tuvo el tumor cuando se extirpo en el día 30, hay una diferencia significativa para ambos grupos respecto al grupo que se le administró PBS.

### Respuesta de anticuerpos hacia MUC1 en los grupos inmunizados con VP2QM1

Para la búsqueda de anticuerpos específicos contra las VLP y del epítipo MUC1 se tomaron los sueros del grupo de ratones PBS y VP2QM1 después de dos inmunizaciones y se analizaron con la técnica de ELISA. Los títulos de anticuerpos se calcularon tomando el valor más bajo del control negativo y posterior a esto se determinó el título para cada grupo, los datos se analizaron con el programa GraphPad.

## ANTICUERPOS IgG TOTALES

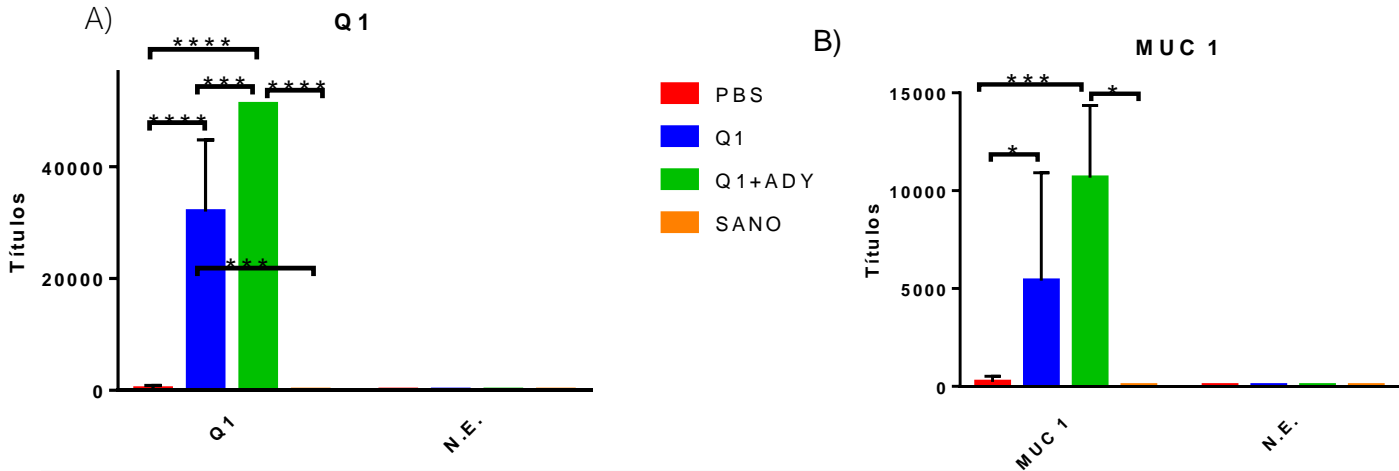


Figura.16 Anticuerpos anti VLPs y anti MUC1. Respuesta de anticuerpos anti VP2QM1, un péptido no específico (N.E.) y Muc1 en sueros de ratones inmunizados con VLP VP2 nativa, VLP VP2QM1, adyuvante Cry1Ac y Muc1. Los ratones se inmunizaron vía intraperitoneal y subcutánea cada 7 días durante 3 semanas. Se muestran los títulos de anticuerpos para VLP VP2QM1, para un péptido no específico y para Muc1 estimados por ELISA.

Estos resultados muestran que la inmunización con VP2QM1, VP2QM1 + adyuvante Cry1Ac, VP2QM1, induce altos títulos de anticuerpos contra VLP y Muc1, sin embargo, para el péptido inespecífico no hay una respuesta significativa. Por lo que se cumple el objetivo de obtener respuestas humorales para todas las construcciones, teniendo una mayor respuesta por parte del grupo inmunizado con VP2QM1 + Adyuvante Cry1Ac contra VP2QM1 ensambladas, es decir, cápsidas completas. También se observa una respuesta para el péptido de Muc1, siendo un blanco para inducir una buena respuesta humoral como se observa en la Figura.16

### La inmunización con VLPs VP2QM1 disminuye la proporción de MDSC.

Se analizó la proporción de linfocitos TCD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y su activación (CD69<sup>+</sup>) por citometría de flujo en los bazo y tumores de los ratones de los grupos inmunizados debido a que estas poblaciones son de importancia en TNBC. Tienden a una inmunosupresión, por ende, a una disminución en las células blanco, como CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> encargadas de la eliminación tumoral, así como un aumento en la población de MSDC (CD11b<sup>+</sup>/GR1<sup>+</sup>), ya que es una población que promueve el reclutamiento de Linfocitos para evadir una respuesta inmunológica. Es por esto, que analizamos la proporción de estas células, para poder hacer una comparación entre los grupos inmunizados con los diferentes tratamientos respecto al grupo control.

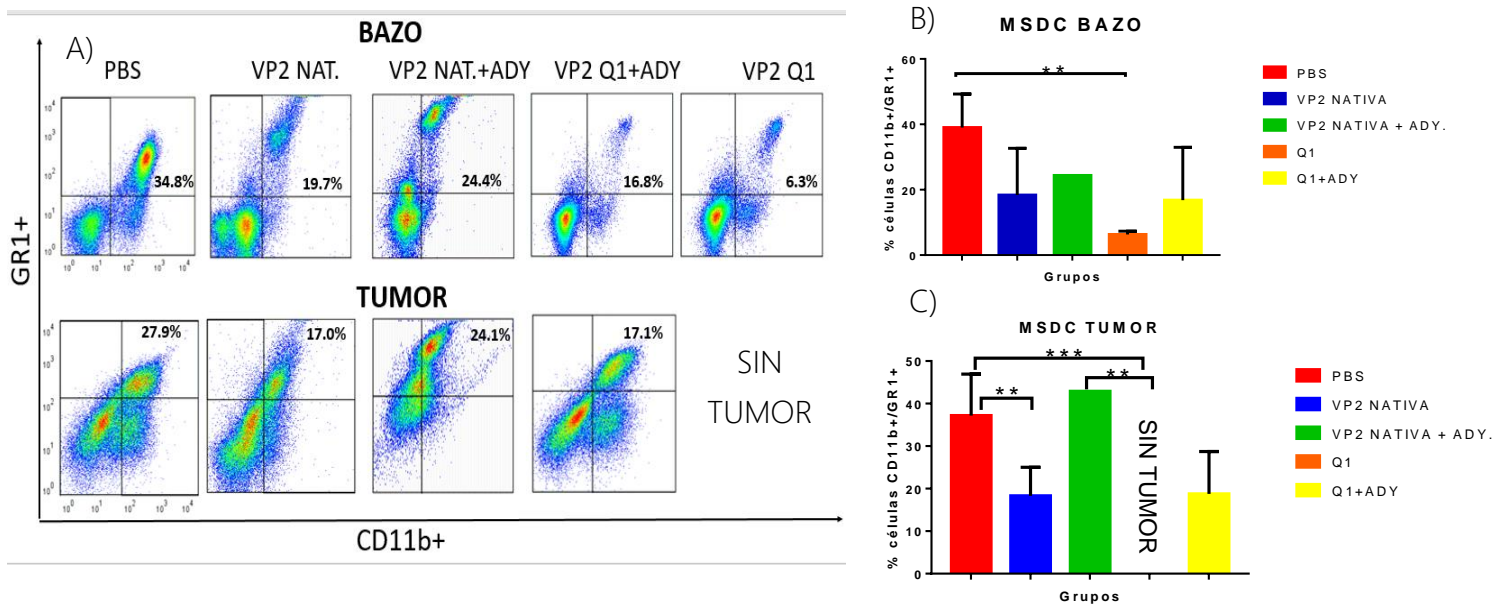


Figura.17 Proporción de MDSC (CD11b<sup>+</sup>/GR1<sup>+</sup>) en bazo y tumor de ratones con los diferentes tratamientos. Las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de superficie anti-Gr1 y anti-CD11b. A) "Dot plots" representativos de la proporción de la población MSDC (cuadro) de los diferentes tratamientos y porcentaje indica la media. B) Proporción de MSDC en el bazo de los diferentes tratamientos. C) Grafica de barra de la proporción de MSDC en el tumor de los diferentes tratamientos. Estadístico: ANOVA seguido de prueba de comparación múltiple de Dunnett. \* Indica diferencias significativas respecto al grupo señalado.



En la Figura 17 B se muestra una gráfica donde se puede observar que hay una significativa disminución de la población MDSC en el grupo de ratones inmunizados con VP2QM1 respecto a los ratones del grupo control (PBS) en bazo. En los grupos de VP2, VP2+Adyuvante Cry1Ac y VP2QM1+Adyuvante Cry1Ac los porcentajes son similares y se observa una tendencia de disminución, lo cual es importante para mantener las proporciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ y, por ende, un mejor pronóstico, ya que estas células son de relevancia en el diagnóstico de cáncer de mama triple negativo. En la gráfica 17 C se muestran las poblaciones de MDSC para tumor, en el caso del grupo inmunizado con VP2QM1 no hubo crecimiento tumoral, por lo que no se muestra en la gráfica, sin embargo, se puede notar una tendencia similar entre los grupos inmunizados con VP2QM1+Adyuvante y VP2 nativa, con esto podemos inferir que esto podría ser una de las razones por las cuales hay una disminución en el tamaño del tumor en estos grupos (Figura.15)

**La inmunización con VLP con VP2QM1 mantiene la proporción de linfocitos CD3+ y CD8+ en bazo y tumor.**

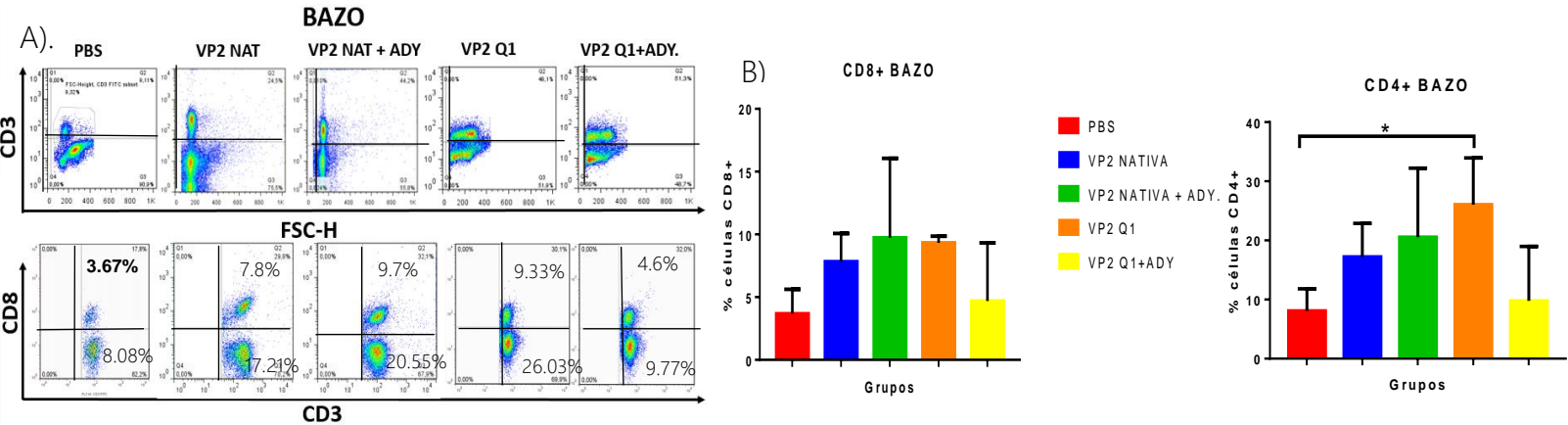


Figura. 18 Proporción linfocitos TCD3+ y TCD8+ en bazo de los grupos de ratones inmunizados con los diferentes tratamientos. Las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de superficie anti-CD3 y anti-CD8. A) Dotplots representativos de la proporción de linfocitos TCD3+ y TCD8+ de los diferentes tratamientos y porcentaje indica la media ± SEM. B) Gráfica de barras representativa de la proporción de CD8+ y CD4+ en el bazo de los grupos inmunizados con los diferentes tratamientos. \* Indica diferencias significativas respecto al grupo señalado.

En la Figura.18 A se muestran los Dotplots donde se encuentran las poblaciones de Linfocitos CD3+ y CD8+ en bazo, en la segunda columna se observa la población específica de CD3+ y CD8+, cabe mencionar que inferimos que la población de CD3+ cuando se aparta la población CD8+ son CD4+. En los grupos de VP2 nativa y VP2 nativa+adyuvante se observa un aumento en ambas poblaciones de linfocitos T mejoría con respecto al control negativo y en el caso de la VP2QM1 y VP2QM1+adyuvante fueron los grupos en donde se observa una mejor respuesta. En la Figura 18 B se muestra que hay una diferencia significativa entre el grupo PBS y la VP2QM1, esto podía ser una razón por la cual no hubo presencia de tumores en esta

población que concuerda con lo que se muestra en la Figura 15 donde también hubo una significativa disminución de la población MDSC. A pesar de que la protección con VP2QM1+adyuvante y VP2 nativa fue menor a la VP2QM1 si hubo una mejoría en el pronóstico tanto de MDSC como de linfocitos CD4+ y CD8+.

De igual manera al evaluar la proporción de linfocitos en el tejido tumoral se puede notar que hay una mayor proporción de linfocitos CD3+/CD8+ en VP2QM1+adyuvante en la Figura.19. El grupo con VP2QM1 no presentó tumores, por ello no hay resultados de dicho grupo. Se puede observar que hay un cambio significativo en los grupos de VP2QM1 respecto al grupo con PBS y VP2 nativa.

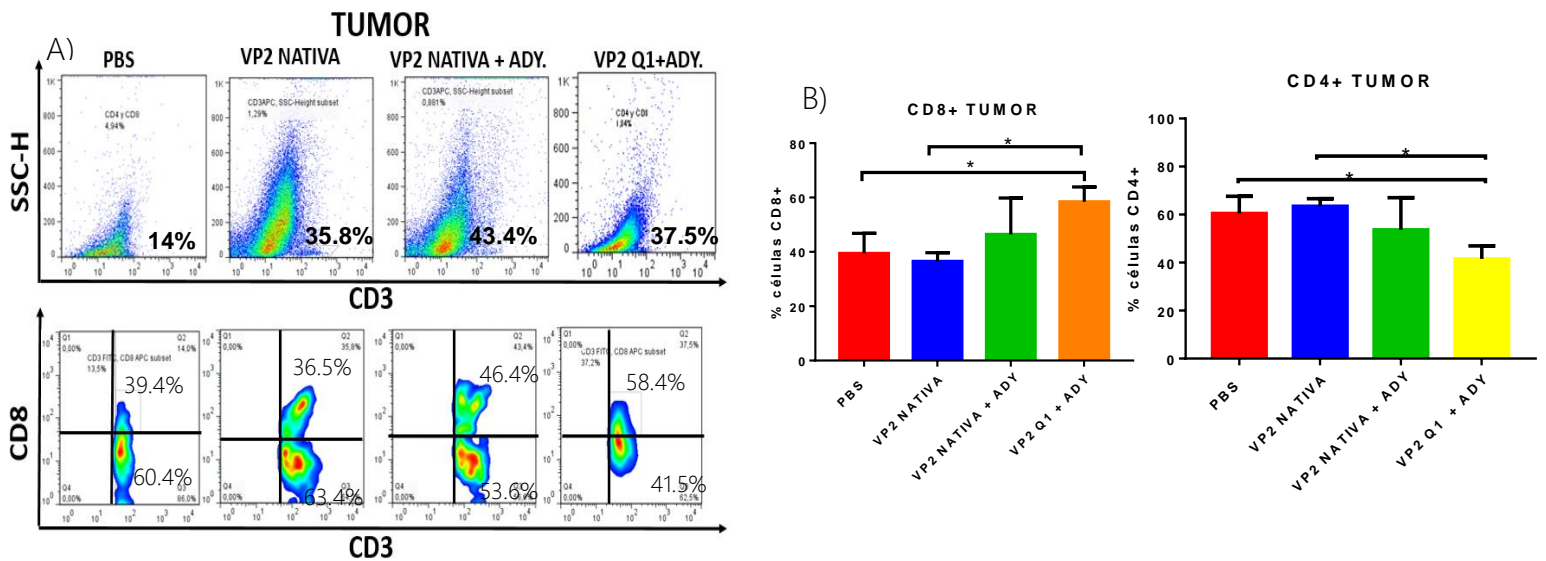


Figura. 19 Proporción linfocitos TCD3+/CD69+ y TCD8+/CD69+ en bazo de los grupos de ratones inmunizados con los diferentes tratamientos. Las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de superficie anti- CD69. A) Dotplots representativos de la proporción de linfocitos TCD3+/CD69+ y TCD8+/CD69+ de los diferentes tratamientos y porcentaje indica la media ±SEM. B) Gráfica de barras representativas de la proporción de CD4+/CD69+ y CD8+/CD69+ en el bazo de los grupos inmunizados con los diferentes tratamientos. \* Indica diferencias significativas respecto al grupo señalado.

En las poblaciones de linfocitos CD3<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> marcadas con CD69<sup>+</sup> del grupo VP2QM1 tuvieron un aumento significativo en bazo.

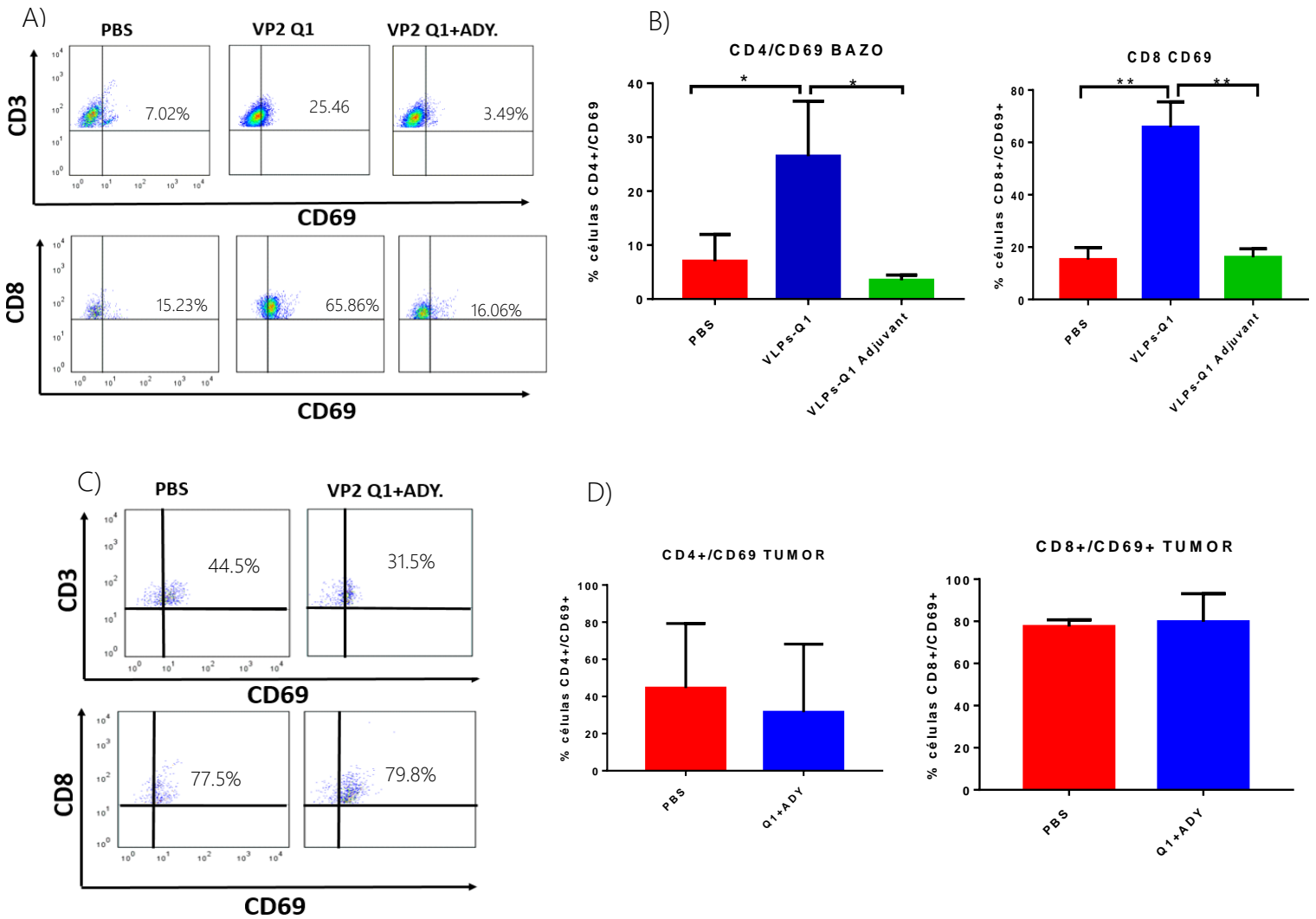


Figura. 20 Incremento en la proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> en los tumores de ratones inmunizados con VLPs de VP2 nativa y VP2QM1 en presencia de adyuvante en tumor de los grupos de ratones inmunizados con los diferentes tratamientos. Leucocitos de tumor de los ratones inmunizados cultivados en placas de 96 pozos (2 x 10<sup>6</sup> células). 72 horas después, las células fueron recuperadas y teñidas con anticuerpos de superficie anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD69. A) Dotplots representativos de la proporción de linfocitos TCD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> en bazo de los diferentes tratamientos y porcentaje indica la media ±SEM. B) Gráfica de barras representativa de la proporción de CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> en el bazo de los grupos inmunizados con los diferentes tratamientos. C) Dotplots representativos de la proporción de linfocitos TCD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> en bazo de los diferentes tratamientos y porcentaje indica la media ±SEM D) Gráfica de barras representativas de la proporción de CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> en el bazo de los grupos inmunizados con los diferentes tratamientos. \* Indica diferencias significativas respecto al grupo señalado.

Respecto a la activación de linfocitos CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> en bazo hay una mayor activación en el grupo VP2QM1 respecto al grupo PBS como se muestra gráficamente en la Figura 20. Referente a linfocitos

CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/ CD69<sup>+</sup> en tumor hay un comportamiento similar en la activación en el grupo VP2QM1+Ady. y el PBS, para el caso de VP2QM1 no se muestra ya que no hubo presencia de tumores.

**Los grupos inmunizados con VP2QM1 no presentan nódulos metastásicos en pulmón, mientras que la inmunización con VP2QM1+Adyuvante Cry1A/c presenta un retraso significativo en la aparición de nódulos metastásicos en pulmón respecto al grupo control.**

Para estimar la macrometástasis en pulmón después del sacrificio en el día 30 se extirparon los pulmones, los cuales se tiñeron con tinta india por la tráquea, a los pulmones se les realizaron lavados con solución Fekete y se incubaron durante 12 horas en la misma solución para fijarlos. Los nódulos metastásicos se contaron manualmente con un microscopio estereoscópico.

El grupo VP2QM1 no presento nódulos metastásicos en pulmón y cabe resaltar que fue el grupo que tampoco presento tumor. En el grupo VP2QM1+Adyuvante Cry1A/c se encontró una media de 2 a 3 nódulos por organismo, presentando un retraso significativo respecto al grupo control (PBS), con una media de 14 nódulos por organismo. En la Figura 21 se muestran fotografías de los pulmones extirpados con nódulos metastásicos circudados con rojo. En la Figura 22 se observa la gráfica de barras, así como las diferencias significativas entre los grupos.

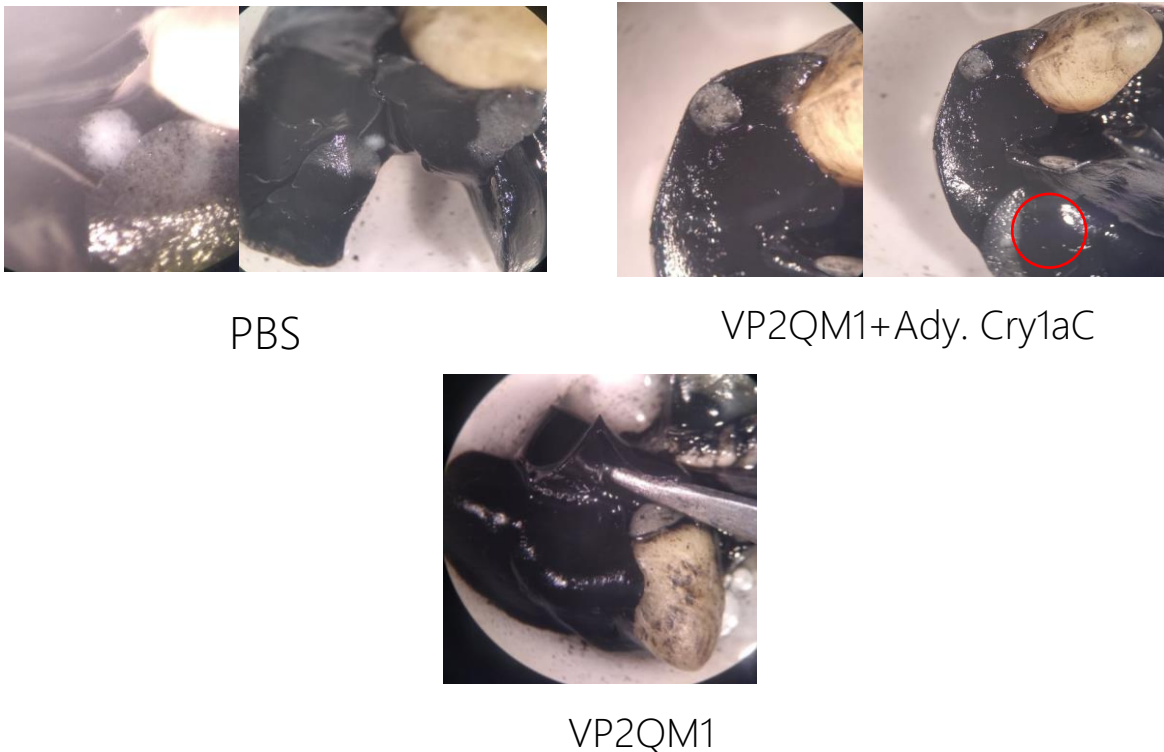


Figura 21 Fotografías en microscopio estereoscópico de pulmones teñidos con tinta India y fijados con *p*-formaldehído y ácido glacial. Nódulos metastásicos en círculo rojo

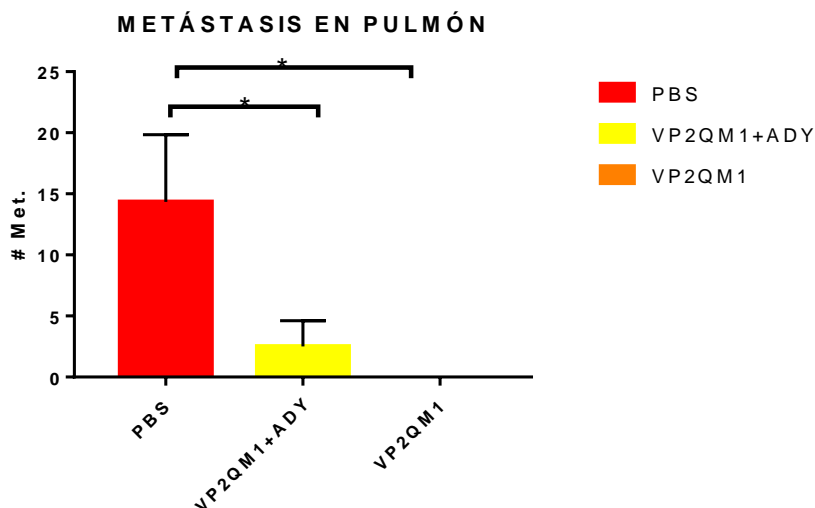


Figura.22 Gráfica de metástasis en pulmón de los diferentes tratamientos y porcentaje que indica la media  $\pm$ SEM

\* Indica diferencias significativas respecto al grupo señalado.

## DISCUSIÓN

Debido a la falta de tratamientos para cáncer de mama triple negativo se diseñó esta vacuna antitumoral de una proteína de VP2 (de Parvovirus Humano B19) quimérica multiepitópica, que se evaluó en un modelo murino. Se decidió utilizar este sistema de entrega debido a que presenta ventajas respecto a otro tipo de sistemas de entrega. La cápside de Parvovirus Humano B19 tiene una simetría icosaédrica, que se forma con 60 copias de proteínas estructurales y está constituida únicamente por dos proteínas, 5% de VP1 y 95% de VP2, lo que facilita su ensamblaje, además de poder agregar L- Arginina para una mayor estabilidad coloidal, así como poder ensamblarse de manera *in vitro* sin necesidad de células procariontes, como ya se ha mencionado, en este trabajo se realizó en una cepa recombinante de *E. coli* BL21. Otra de sus ventajas, es que la modificación de sus monómeros no afecta su ensamblaje, es decir, que es capaz de presentar múltiples péptidos en su superficie (Bustos, 2019), además de que su tamaño (20 nms) facilita su reconocimiento respecto a VLP's de mayor tamaño (>200 nms) que necesitan a células presentadoras de antígeno como células dendríticas para poder ser reconocidas en un periodo aproximado de 24 horas (Bachman, et.al. 2010), a diferencia de las VLP's de Parvovirus Humano B19, que migran directamente a los nódulos linfáticos como lo reporta Jiménez et.al. 2019.

Respecto a la producción y purificación de la proteína VP2QM1, VP2 nativa y el Adyuvante Cry1A/c. Se realizaron diferentes técnicas. El peso de la proteína VP2 nativa corresponde con el peso reportado de 60 KDa (Bustos, e.t.al. 2012). Tomando en cuenta el peso de la proteína VP2 nativa y de los epítomos de 15 kDa, para obtener este peso se obtuvo la secuencia de los aminoácidos, se realizó un ensayo *in silico* y se

corroboró con electroforesis de la proteína pura, por lo que el peso teórico de la proteína VP2QM1 es de 75 kDa, lo que corresponde a lo calculado.

Respecto a la purificación se realizó por el método de cromatografía de afinidad reportado por Sánchez-Rodríguez, et. al. 2012 para la proteína VP2 nativa, sin embargo, se modificaron algunas condiciones de lavado en la proteína VP2QM1, esto se puede deber a que la proteína VP2QM1 se solubilizaba en los primeros lavados a diferencia de la proteína VP2 nativa, donde se hacen cuerpos de inclusión, por lo que no era necesaria solubilizar la pastilla y la mayor concentración de VP2QM1 se encontraba en el segundo o tercer lavado, como se muestra en la Figura.12. Este comportamiento podría explicarse debido a la alta cantidad de ácido glutámico y lisina, lo que puede aumentar su solubilidad (Jiménez, et.al. 2020). Respecto al ensamblaje de las proteínas VP2 nativas y VP2QM1 de igual manera se realizó conforme a lo reportado por Sánchez-Rodríguez et.a.l, 2012, donde se requería que más del 90% de las poblaciones medidas por el DLS, fueran de 20 a 30 nm.

En la Figura.13 se puede observar que la mayoría de las poblaciones fueron del tamaño mencionado, lo que concuerda con el peso en su conformación nativa por Sánchez, sin embargo, se obtuvo una población de >100 nm, inferimos que podrían ser agregados de cápsides.

En el crecimiento tumoral se obtuvo una protección del 100% ante el crecimiento de tumores inducidos por la línea celular 4T1, como se observa en la Figura.15, el cambio es significativo para todos los tratamientos respecto al PBS. La hipótesis alterna se acepta, la construcción estaba diseñada para obtener respuestas humorales y celulares, lo cual se alcanzó con títulos significativos anti Muc1 y antiVP2QM1, así como la identificación de linfocitos CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> y una marcada disminución en la población MSDC.

Respecto al grupo inmunizado con VP2QM1+Ady. Protoxina Cry1Ac se obtuvo un retraso en el establecimiento de tumores respecto al grupo control, así como en el crecimiento de los mismos y la metástasis distal en pulmón, cabe mencionar que es un resultado importante, ya que en la búsqueda de anticuerpos anti Muc1 fue el grupo con mayores títulos de anticuerpos, de igual manera se obtuvo una buena respuesta celular por lo que inferimos que podría ser un buen tratamiento, por lo que se sugiere la administración por otra vía.

En la búsqueda de títulos de anticuerpos IgG anti Muc1 se obtuvieron altos títulos en los grupos VP2QM1 y VP2QM1+Ady., lo que indica que el epítipo es capaz de generar una respuesta humoral. Las respuestas de anticuerpos IgG en el diagnóstico de cáncer de mama triple negativo son importantes, ya que puede producir una respuesta de las células Natural Killers (NK) generando una respuesta citotóxica mediada por anticuerpos, esta respuesta es de suma importancia, ya que las células NK son las encargadas de reconocer

a las células propias transformadas. El anticuerpo al unirse con los receptores Fc de la célula NK activa el mecanismo citotóxico e induce la liberación de granzimas y perforinas, por otro lado, son productoras de citosinas como IFN  $\gamma$ , lo que facilita a los macrófagos fagocitar a la célula tumoral y así mejorar la presentación de antígeno o bien, estos macrófagos conducen a la producción de IL-12 que aumenta la capacidad citotóxica de las NK. (Konta, 2017).

Posterior a la esto, se midió la población de las células supresoras derivadas mieloides (MDSC), ya que son una población de células inmaduras supresoras del sistema inmune principalmente de Linfocitos T, Natural Killers y dendríticas. Las células MDSC favorecen el desarrollo de tumores y metástasis, ya que les otorga una ventaja a las células tumorales evitando su destrucción por la falta de proliferación de las células del sistema inmune (Malvici, 2010), como se observa en el panel B de la Figura 17 hay una mayor cantidad de células MSDC en Bazo en el grupo PBS y un cambio significativo respecto al grupo VP2QM1, esto podría ser una razón por la cual la cantidad Linfocitos T CD8<sup>+</sup> muestra una disminución respecto al grupos control.

De igual manera se evaluó la proporción de Linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD69<sup>+</sup>, anteriormente mencionaba que son las células del sistema inmune más importantes para este tipo de diagnóstico, esto se debe a que los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> reconocen oligopéptidos inmunogénicos tumorales y realizan la principal respuesta efectora contra los tumores. Los Linfocitos T CD8<sup>+</sup> responden contra antígenos tumorales presentados como oligopéptidos de 8-10 aminoácidos y cuando los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de memoria reconocen las células con los péptidos-TAAs se establece la inmunosinapsis y liberan directamente perforinas y granzimas para provocar lisis a la célula tumoral (Valdespino,et.al.2003).

Respecto a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen diferentes funciones. Una función importante es la de estimular la producción de anticuerpos produciendo señales coestimuladoras para Linfocitos B, lo que es relevante para un efecto profiláctico, ya que se pueden generar Linfocitos B de memoria y así, generar una respuesta más eficaz y rápida ante la existencia de una célula tumoral. Sin embargo, otra de las funciones de las células CD4<sup>+</sup> (Linfocitos T reguladores, Treg) es modular la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup> efectoras, estas pueden bloquear la activación de células CD8<sup>+</sup> citotóxicas y CD4<sup>+</sup> efectoras, existen diferentes mecanismos, como la expresión de CTLA-4, donde los Treg pueden regular negativamente la expresión de las moléculas de co-estimulación lo que conduce a un estado de inmunosupresión, dicho esto, se podría explicar el aumento de células CD4<sup>+</sup> específicamente en tumor en el grupo control como se muestra en las Figuras 18 y 19, así como en la activación de estos (CD69<sup>+</sup>) (Malvicini, 2010).

En la Figura 18 en los grupos de VP2 nativa y VP2 nativa+adyuvante se observa un aumento en las proporciones de la población de linfocitos con respecto al control negativo, sin embargo, para en el caso de la VP2QM1 y VP2QM1+adyuvante fueron los grupos en donde se observa una mejor respuesta, en la Figura. 16 B se muestra que hay una diferencia significativa entre el grupo PBS y la VP2QM1, esto podía ser

una razón por la cual no hubo presencia de tumores en esta población que concuerda con lo que se muestra en la Figura 17 donde también hubo una significativa disminución de la población MDSC y con la activación (CD69<sup>+</sup>) de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> como se puede observar en la tercer y cuarta columna de la Figura 18 y a pesar de que la protección con VP2QM1+adyuvante y VP2 nativa fue menor a la VP2QM1 si hubo una mejoría en el pronóstico tanto de MDSC como de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, como ya lo había mencionado, quizá se podría evaluar esos grupos en otra ruta de inmunización para optimizar las respuestas.

## CONCLUSIÓN

- Se obtuvo la inhibición total del establecimiento de tumores inducidos con la línea celular 4T1 en un modelo murino con la administración de la proteína VP2QM1 e igualmente la inhibición total de la metástasis de pulmón.
- Se observó un retraso en el establecimiento y crecimiento de los tumores, así como el retraso de la metástasis distal en pulmón con la administración de la proteína VP2QM1+Adyuvante Cry1Ac, como se había mencionado anteriormente se sugiere la administración por otra vía para obtener una protección total.
- Se obtuvo una respuesta humoral robusta. En la búsqueda de anticuerpos se obtuvieron altos títulos de anticuerpos anti Muc 1 y anti VP2 QM1 en los grupos de VP2QM1+Ady y VP2QM1, lo que demuestra que la construcción es capaz de ser reconocida y de generar altos títulos de anticuerpos tanto para el epítipo Muc1, como para la construcción VP2QM1.
- Respecto a la respuesta celular se observó el mayor porcentaje de células CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> en tumor en el grupo VP2QM1+Ady. Cry1A/c, cabe destacar que el grupo con mejor respuesta fue el grupo VP2QM1, sin embargo, no presentó tumor, por lo que se omite esta prueba para dicho grupo. En la búsqueda de células CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> el grupo que obtuvo la respuesta representativa fue el grupo VP2QM1, de igual manera, en la búsqueda de células CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> en bazo el grupo que tuvo mayor porcentaje fue VP2QM1.
- Con base en estos resultados, se concluye que el grupo VP2QM1 cumplió con la activación (marcador CD69<sup>+</sup>) de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, una disminución de la población MDSC y altos títulos de anticuerpos IgG totales, esto podría explicar la ausencia del establecimiento del tumor, por lo que es importante seguir con la evaluación de la construcción VP2QM1, así como con la caracterización de sistemas de entrega eficaces, como las cápsidas de Parvovirus Humano B19.



## LITERATURA CITADA

- Abid H. Bandy, Salika Jeelani & Victor J. Hruby, Cancer vaccine adjuvants – recent clinical progress and future perspectives, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2015, 37:1, 1-11.
- Á.de.J. Jiménez-Chávez, L. Moreno-Fierros and I. Bustos-Jaimes, Therapy with multi-epitope virus-like particles of B19 parvovirus reduce tumor growth and lung metastasis in an aggressive breast cancer mouse model, *Vaccine*, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.06>.
- Bachmann, M. F., & Dyer, M. R. (2004). Therapeutic vaccination for chronic diseases: A new class of drugs in sight. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 81–88.
- Bachmann, M., Jennings, G. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* 10, 787–796 (2010). <https://doi.org/10.1038/nri2868>
- Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Kündig, T. M., Bürki, K., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science*, 262, 1448–1451.
- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annual Review of Immunology*, 15, 235–270.
- Bustamante L. M., Marín, S. J. y Cardona, D. (2012). Mortalidad por cáncer: segunda causa de muerte del adulto mayor en Medellín, 2002-2006. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 17-25.
- Bustos-Jaimes I, Soto-Roman RA, Gutierrez-Landa IA, Valadez-Garcia J, Segovia-Trinidad CL. Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19. *J Biotechnol* 2017;263:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.09.014>.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 Pt 1):4429-34
- González GE, García HA, Flores MR, Lopez SR, Moreno FL, 2015, The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a model mouse, *Vet Microbiol*. 2015; 175 (2-4): 382-8.
- González-González E, García-Hernández AL, Flores-Mejía R, López-Santiago R, Moreno-Fierros L. The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Vet Microbiol*. 2015 Feb 25;175(2-4):382-8.. Epub 2014 Dec 3. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.021 impact factor 2.72 ISSN: 0378-1135.

- Gross-David A., Graff-Dubois S., Opolone-P., Cornet-S., Alves-P., Bennaceur-Griscelli A., Faure-O., Guillaume-P., Firat-H., Chouaib-S., Lemonnier-Francois A., Davoust-J., Miconnet-I., Vonderheide-Robert H., Kosmatopoulos K. (2004), High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy, *J Clin Invest.* 2004;113(3):425-433.
- H. Westdorp, A.J. Gorris, S. Boudewijns, T. Bisseling, A.L. de Goede, M. M. van Rossum, M.J.L. Ligtenberg, G. Schreibelt, I.D. Nagtegaal, C. G. Figdor, W. Gerritsen, N. Hoogerbrugge, I.J.M. de Vries. (2016) Preventive dendritic cell vaccination in healthy Lynch syndrome mutation carriers. *Annals of Oncology* 27 (Supplement 6): vi359–vi378. doi:10.1093/annonc/mdw378.10
- He, Q., Cao, Z., Wang, P. et al. Efficient application of a baculovirus-silkworm larvae expression system for obtaining porcine circovirus type 2 virus-like particles for a vaccine. *Arch Virol* 165, 2301–2309 (2020). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00705-020-04754-9>
- Hinojosa-García LM, Dueñas-González A, Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cervicouterino, *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, Volumen 46, Número 1, Enero-Febrero 2000, pp. 47-57.
- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon, France: IARC; 2018
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018 “Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 De Febrero)” .
- Jiménez C. A. J. (en proceso). Diseño de una vacuna multiepitópica con VLPs del parvovirus B19 en un modelo murino de cáncer de mama. Tesis de Doctorado. Laboratorio de Inmunología de mucosas en Unidad de Biomedicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Konta Andrea-A.(2017) Tesis de grado “Células Natural Killer Y Cáncer” , Universidad Complutense, 20.
- Larrain MT, Colussi A, Demichelis SO, Segal-Eiras A, Croce MV. (2010). MUC1 asociada con el cáncer de mama: relación con la respuesta inmune humoral de pacientes. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Médicas*. Volumen 2. Número 2. Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
- Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(2):264-71.

- Mads A. Tarp, Anne Louise Sørensen, Ulla Mandel, Hans Paulsen, Joy Burchell, Joyce Taylor-Papadimitriou, Henrik Clausen, Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat, *Glycobiology*, Volume 17, Issue 2, February 2007, Pages 197–209, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl061>
- Malorni, L., P. B. Shetty, C. De Angelis, S. Hilsenbeck, M. F. Rimawi, R. Elledge, C. K. Osborne, S. De Placido and G. Arpino (2012). "Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up." *Breast Cancer Res Treat.* 136(3): 795-804.
- Malvicii M, Puchulo G, Matar P, Mazzolini G. Inmunoterapia del Cáncer. Importancia de controlar la inmunosupresión, *Medicina (Buenos Aires)* 2010; 70: 565-570
- Marmé F: Immunotherapy in Breast Cancer. *Oncol Res Treat* 2016;39:335-345. doi: 10.1159/000446340.
- Moreno-Fierros L, Garcia H, Ilhuitzatzí A, Rivera S, Torres M, Rubio I, Legorreta H, Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  cytokines. *Int Immunopharmacol* 2013; 4: 1051-66.
- Moro, Fernando (2017): Fundamentos moleculares y celulares de la inmunoterapia. Usos actuales y perspectivas de futuro. Journal contribution. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5101153.v1>
- Morris Quevedo, Humberto Joaquín, Martínez Manrique, Clara, Abdala Díaz, Roberto T, & Campos Orama, Denia. (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 18(2), 130-137. Recuperado en 26 de marzo de 2020.
- Murillo María T, Valentín Vicente, Valentín M, Síntomas asociados al tratamiento con radioterapia, *Psicooncología*, Volumen 1, Número 2-3, 2004, pp.151-168.
- Ni, D., Xu, P., Sabanayagam, D., & Gallagher, S.R. (2008). Protein Blotting: Immunoblotting *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5367-74. 3.
- Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 2004;72:4368–75. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4368-4375.2004>.

- Sánchez N. Catherine, Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer, Revista Médica Clínica Las Condes, Volume 24, Issue 4, 2013, Pages 553-562, ISSN 0716-8640.
- Sánchez-Rodríguez SP, Munch-Anguiano L, Echeverría O, Vázquez-Nin G, Mora-Pale M, Dordick JS, et al. Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie* 2012;94:870–8. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.006>.
- Siel, D., Vidal, S., & Sáenz, L. (2014). Principales sistemas de entrega de antígenos en Medicina Veterinaria y Humana. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 29(1), Pág. 50-69. doi:10.5354/0719-5273.2014.32410.
- Söderlund Maria, Brown Caroline S., Willy J. M. Spaan, Lea Hedman, Klaus Hedman; Epitope Type-Specific IgG Responses to Capsid Proteins VP1 and VP2 of Human Parvovirus B19, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 172, Issue 6, 1 December 1995, Pages 1431–1436,
- Vallejos CS, Gómez HL, Cruz WR, Pinto JA, Dyer RR, Velarde R, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin Breast Cancer*. 2010;10(4):294-300.
- Valdespino-Gómez VH, Rocha-Zavaleta L: Inmunoterapia mediada por Linfocitos T en pacientes con cáncer, *Cirugía y Cirujanos*, Volumen 71, Número 3, Mayo -Junio 2003, Pages 235-244.
- Umamo, Y., Tsunoda, T., Tanaka, H. et al. Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53. *Br J Cancer* 84, 1052–1057 (2001). <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1715>