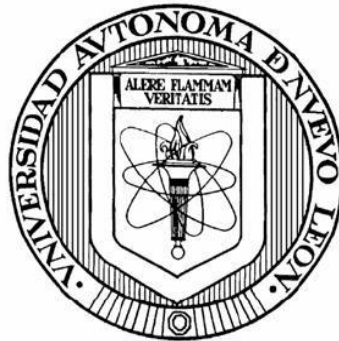


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
EMPLEANDO LISADO TUMORAL COMO AGENTE REDUCTOR

POR

JOSÉ RAÚL RANGEL LÓPEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGIA

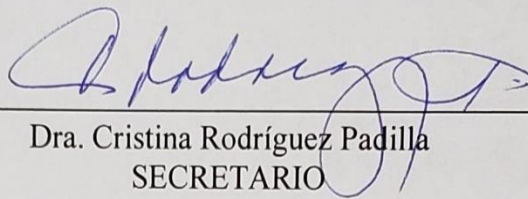
Enero, 2021

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
EMPLEANDO LISADO TUMORAL COMO AGENTE REDUCTOR

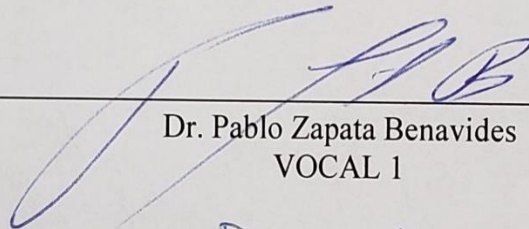
Comité de Tesis



Dra. Diana Ginette Zarate Triviño
PRESIDENTE



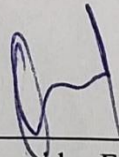
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
SECRETARIO



Dr. Pablo Zapata Benavides
VOCAL 1

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Elia Caballero Hernández
VOCAL 2



Dr. Moisés Armides Franco Molina
VOLCAL 3

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE ORO
EMPLEANDO LISADO TUMORAL COMO AGENTE REDUCTOR

Dirección de Tesis



Dra. Diana Ginette Zarate Triviño
DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme formar parte de su matrícula.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Especialmente a la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla por brindar el apoyo necesario para realizar este trabajo.

Especialmente agradezco por las oportunidades brindadas, el tiempo y esfuerzo, a mi asesora de tesis, Dra. Diana Ginette Zarate Triviño, su manera de enseñar, comprometerse, persistencia y paciencia fueron claves para mi formación como estudiante y mi continuo interés en las ciencias.

A mi Codirector el Dr. Moisés A. Franco Molina por permitirme aprender de su forma de trabajar y guiarme para seguir mejorando en mi formación.

A mi comité de tesis Dr. Pablo Zapata Benavides y Dra. Diana Caballero les agradezco por su colaboración para la culminación de este trabajo.

A mi familia por siempre apoyarme, guiarme y enseñarme cada aspecto a rescatar en mi persona se los debo a ellos.

A mis amigos del laboratorio, Sara, Juan Jose, Bruno, Teodoro, Jennifer, Silvia, Margarita, Edelin, Alejandro y Uriel que siempre estuvieron para ayudarme, aconsejarme y guiarme.

A todos gracias.

DEDICATORIAS.

La presente tesis va dedicada especialmente a mi familia, que forman parte clave en mi desarrollo, académico, moral y emocional, gracias a su apoyo pude concluir y obtener el grado de Maestro en ciencias. A mis padres y hermanos por su apoyo. Sin ustedes este objetivo no habría podido ser cumplido, forman parte de la persona que soy en este momento.

Dedico además esta tesis a quienes tengan la oportunidad de leerla y aprender de ella, tanto de los aciertos como de las mejoras que podrían realizarse de este trabajo, con la esperanza de seguir cultivando el interés y motivación científica en la sociedad mexicana.

ÍNDICE

Contenido

<i>ÍNDICE</i>	6
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. Antecedentes	5
1. El sistema inmune, el mecanismo de defensa que mejor ataca.	5
1.1. Células presentadoras de antígeno.	5
1.1.2. Monocitos y macrófagos.	6
1.1.3. Células Dendríticas (DC)	6
1.2. Linfocitos T	7
1.3. Linfocitos B.	8
1.4. Citocinas y quimiocinas en la respuesta inmune.	10
2. Inmunidad adquirida.	10
2.1. Antitoxinas	11
2.2. Lisados celulares como vacunas.	11
2.2.1. Vacunas vivas	11
2.2.3. Vacunas No-Vivas	12
2.2.4. Microorganismos inactivos.	12
2.2.5. Proteínas, péptidos y polisacáridos.	12
3.1 Perspectiva de las vacunas y terapias contra el cáncer	12
3.2. Lisados tumorales (LT) antigénicos como vacunas múltiples.	13
3.3. Limitaciones y deficiencias del utilizar lisados tumorales.	15
5. Cáncer de Mama.	16
5.1. Definición de cáncer de mama.	16
5.3.1 Tumores receptor estrogénico positivo.	18
5.3.2 Tumores receptor estrogénico negativo Subtipo HER2.	19
5.3.3. Subtipo Basal (Triple negativo).	19
5.4. Tratamientos convencionales contra el cáncer de mama.	20
5.4.1. Cirugía.	20
5.4.4. Terapia endocrina y dirigida a HER2.	20

6. Retos terapéuticos clínicos en los tratamientos de cáncer de mama	21
6.1. Efectos de las terapias convencionales	21
7. vacunas e inmunoterapia contra el cáncer de mama.....	21
7.1. Vacunas basadas en péptidos.....	22
7.2. Vacunas basadas en DC.....	22
7.3. vacunas basadas en células completas.....	22
8. Nanotecnología en la inmunología y la generación de vacunas.	22
8.1 Nanomateriales utilizados en inmunología.	23
8.2. Efecto y modulación de las nanopartículas de oro (AuNps) sobre el sistema inmune.....	24
8.4. Nanopartículas en la generación de vacunas como potenciadores del SI.....	26
9. Nanopartículas en la generación de inmunoterapias contra el cáncer.....	26
4. <i>Justificación</i>	29
5. <i>Hipótesis</i>	30
6. <i>Objetivo del trabajo</i>	31
7. <i>Material y métodos</i>	32
7.1. Establecimiento de la línea celular 4T1 en cultivo	33
7.2. Establecimiento de la línea celular NIH.....	33
7.3. Síntesis de Nanopartículas de oro (citrato de sodio/comerciales).....	33
7.4. Síntesis de nanopartículas de oro reducidas por lisado tumoral.	33
7.5. Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral AuLtNps.	34
7.5.1. Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) por espectroscopia UV-Vis.	34
7.5.2. Análisis de tamaño por Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z.	34
7.5.3. Análisis de tamaño y morfología por Microscopia electrónica de barrido SEM.....	34
7.5.4. Curva de estabilidad mediante PRS.....	35
7.5.5. Curva de estabilidad mediante Tamaño y potencial Z.....	35
7.6. Curva de cuantificación de proteína respecto al tiempo.	35
7.7. Ensayo de citotoxicidad en células NIH 3T3.	35
7.8. Cronograma de inmunización del modelo animal.	36
7.9. Reto de tumor.	36
7.10. Anestesia y eutanasia.	37
7.11. Ensayo de captación de antígeno por macrófagos peritoneales.....	37

7.12. Determinación de la presencia de citocinas proinflamatorias	37
7.13. Evaluación de marcadores celulares en bazo de ratones inmunizados.....	38
7.14. Identificación del perfil de diferenciación de macrófagos en ganglios linfáticos de ratones inmunizados.....	38
7.15. Evaluación de la citotoxicidad específica de linfocitos T	38
7.16. Efecto antitumoral de AuLtNps en ratones Balb/C previamente inmunizados.....	38
7.17. Análisis estadísticos.....	39
8. Resultados.....	40
8.1 Síntesis y caracterización.....	40
8.2 Determinación de la concentración de proteína en AuLtNPs.....	42
8.3 Determinación de la correlación entre PRS, tamaño, potencial Z y concentración de proteína en AuLtNps.....	43
8.4 Determinación de la citotoxicidad de AuLtNps en fibroblastos murinos (NIH)	44
8.5 Determinación de la captación de AuLtNps en macrófagos intraperitoneales de ratón	45
8.6 Presencia de citocinas proinflamatorias en suero de ratones 24 horas después de la segunda inmunización (día -13) y una semana después de la última inmunización (0).....	46
8.8 Análisis de la diferenciación de APCs en ganglios linfáticos de ratones inmunizados.....	47
.....	51
8.9 Evaluación de la citotoxicidad específica de linfocitos T.....	52
8.10 Efectividad antitumoral de AuLtNps en ratones Balb/C previamente inmunizados.....	53
9 DISCUSIÓN	57
10 CONCLUSIONES.....	64
11 PERSPECTIVAS	65
Bibliografía.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Etapas clínicas de los casos clínicos reportados en el seguro popular entre 2008 y 2009</i>	18
<i>Tabla 2 Correlación entre clasificación molecular y respuesta patológica completa en cáncer de mama.</i>	19
<i>Tabla 3 Análisis de potencial Z de nanopartículas de oro</i>	41
<i>Tabla 4. Resumen de datos obtenidos tras la medición a los días 1, 15 y 30.</i>	43
<i>Tabla 5. Análisis de correlación de Person</i>	43
<i>Tabla 6 Implantación tumoral posterior al día experimental dividido por grupo experimental</i>	54
<i>Tabla 7 Análisis de sobrevida de los 6 grupos experimentales representados en días.</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Vía de diferenciación de DC</i>	7
<i>Figura 2 Subtipos de células T</i>	8
<i>Figura 3 Atributos multifuncionales de células B.</i>	9
<i>Figura 4 Proceso de generación de inmunidad a partir de diseño de vacunas</i>	15
<i>Figura 5 Interacción de nanopartículas metálicas con el sistema inmune</i>	24
<i>Figura 6 Porcentaje de poblaciones inmunes en los bazo de ratones tratados a 1, 6, o 24 horas después de la inyección intravenosa de AuNps. (Paulo et al., 2013)</i>	26
<i>Figura 7 Representación gráfica del proceso experimental general.</i>	32
<i>Figura 8. 8 Espectro UV-VIS y tamaño de partículas</i>	40
<i>Figura 9 Microscopia electrónica de transmisión de AuLtNps.</i>	41
<i>Figura 10 Concentración de proteína en AuLtNps</i>	42
<i>Figura 11 Análisis de viabilidad relativa en NIH a 24 horas de tratamiento</i>	44
<i>Figura 12 Microscopia confocal de macrófagos intraperitoneales expuestos a 24 horas de tratamientos.</i>	45
<i>Figura 13 secreción de citocinas 24 después de la segunda inmunización (día -15)</i>	48
<i>Figura 14 . Secreción de citocinas una semana después de la última inmunización (día 0)</i>	48
<i>Figura 15 Análisis de marcadores moleculares en linfocitos provenientes de bazo de ratón inmunizado.</i>	49
<i>Figura 16 Análisis de marcadores moleculares en ganglios linfáticos provenientes de ratones inmunizado</i>	51
<i>Figura 17 Citotoxicidad específica de linfocitos T provenientes de ratones inmunizados</i>	52
<i>Figura 18 Sobrevida al retó tumoral con células 4T1</i>	54
<i>Figura 19 Tiempo de vida medio y análisis de sobrevida</i>	55
<i>Figura 20 Modelo general de interacción por parte de las AuLtNps y el sistema inmune innato y adaptativo en un modelo murino.</i>	56

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

1. AAT (Antígenos asociados a tumor)
2. AuLtNps (Nanopartículas de oro sintetizadas a partir de lisado tumoral)
3. Natural killer (NK)
4. células presentadoras de antígeno (APC)
5. células dendríticas (DC)
6. PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos)
7. Interleucinas (IL)
8. receptor de células T (TCR)
9. GM-CSF (Factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos)
10. LT (Lisado tumoral)
11. HER2 (El receptor de crecimiento humano 2)
12. AuNps (Nanopartículas de oro)
13. AuCsNps (Nanopartículas de oro reducidas por citrato de sodio)
14. AuCsNps+LT (Nanopartículas de oro reducidas por citrato de sodio + lisado tumoral)
- 15. Ady (adyuvante tioglicolato)**

Abstract

In this work, was standardized a method for obtaining metallic nanoparticles, using tumor cells lysate as reducing agent, with an initial size of 20 nm a reached 73 nm at day 30, a Z potential of -27 mV indicating great stability, coupled with gold nanoparticles characteristic PRS at 538 nm. It was determined the protein concentration present in AuLtNps is significantly higher than present in LT, indicating a greater uptake of antigens by AuLtNps. To prove whether this antigen load had an advantage for phagocytosis, the uptake of AuLtNps by intraperitoneal macrophages was analyzed and it was determined that there is a greater uptake by macrophages using AuLtNps, in contrast against LT alone. The presence of pro-inflammatory cytokines was observed in mouse sera immunized with AuLtNps, AuCsNps + LT and LT + Ady, which indicates a correct stimulation after the immunization period, the data correlate with high percentages of CD3, CD4, and CD34+ lymphocytes, whereas the group of mice treated with AuLtNps had an increase in CD8+ and CD22+ lymphocytes, using splenocytes extracted from the spleen. A confirmation of correct stimulation from the immunization period was the increase in CD14, CD80, CD86 and MHC II + APCs, which are responsible for antigen processing and the presentation to T lymphocytes. Specific cytotoxicity presented by splenocytes from spleen exudates of mice immunized with AuLtNps shows a strong proof of correct stimulation, obtaining specific specificity from low ratios such as 1:10 to 1:200 reaching up to 40% specific lysis against 4T1 tumor cells. Finally, the efficiency of AuLtNps to inhibit tumor implantation in a murine model was determined using viable 4T1 cells, reaching 90 days of survival, hence demonstrating the effectiveness as a defensive therapy against triple negative breast cancer.

1. RESUMEN

En este trabajo se estandarizó un método para la obtención de nanopartículas metálicas usando como agente reductor un lisado de células tumorales, las cuales presentan un tamaño de 20 nm y alcanzan los 73 nm al día 30, presentaron una gran estabilidad al obtener un potencial Z de -27 mV al día 30, aunado a un PRS característico a 538 nm. Se determinó que la concentración de proteína presente en las AuLtNps es significativamente mayor a la presente en LT, indicando una captación mayor de antígenos por parte de las AuLtNps. Para comprobar si esta carga de antígenos presentaba una ventaja para la fagocitosis se analizó la captación de AuLtNps por parte de macrófagos intraperitoneales y se determinó que existe una mayor captación por parte de los macrófagos al utilizar AuLtNps al compararlo con el LT por sí solo. se observó la presencia de citocinas proinflamatorias en sueros de ratón inmunizados con AuLtNps, AuCsNps+LT y LT+Ady lo cual indica una correcta estimulación después del periodo de inmunización, además los datos correlacionan con altos porcentajes de linfocitos CD3, CD4, y CD34+, mientras que para el grupo de ratones tratados con AuLtNps se presentó un alza en linfocitos CD8+ y CD22+ esto en esplenocitos extraídos de bazo. una confirmación de la correcta estimulación a partir del periodo de inmunización fue el incremento en APCs CD14, CD80, CD86 y MHC II +, las cuales se encargan del procesamiento antigénico y la presentación de este a los linfocitos T. La citotoxicidad específica que presentaron esplenocitos provenientes de exudados de bazo de ratones inmunizados con AuLtNps es una prueba contundente de su correcta estimulación, obteniendo especificidad específica desde radios bajos como 1:10 hasta 1:200 alcanzando hasta un 40% de lisis específica en contra de células tumorales 4T1. Por último, se determinó la eficiencia de las AuLtNps para inhibir la implantación tumoral en un modelo murino al usar células viables 4T1, alcanzando los 90 día de sobrevivida, demostrando así la efectividad como terapia de protección en contra de la línea celular de cáncer con la cual fueron sintetizadas.

2. INTRODUCCIÓN

La inmunoterapia ha pasado por grandes cambios en los últimos años, se presenta como un tipo de terapia que paso de ser emergente a una de las más implementadas, esto debido a su eficacia y especificidad aunado a que busca restablecer el principal mecanismo de defensa contra virus, patógenos, bacterias y enfermedades. Un caso claro de éxito de la inmunoterapia es la generación de vacunas, las cuales se han implementado desde la aparición del virus de la viruela y descritos someramente desde la aparición de la colera (Alam, 1998), pasando por los antisueros, vacunas atenuadas, de fracciones, antígeno específicas hasta las generadas por ingeniería genética, presentando grandes resultados y avances en el sector salud. Debido a estos resultados con las vacunas y pensando en aplicarlas en una de las enfermedades que aquejan a la humanidad como lo es el cáncer se ha buscado la posibilidad de generar una vacuna que proteja de un posible desarrollo de dicha enfermedad, siendo el cáncer la segunda causa de muerte a nivel mundial según la OMS (OMS, 2016), en México solo se encuentra por debajo de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus, es por esto que se buscan alternativas eficientes y aplicables para un tratamiento contra el cáncer, una de las alternativas que parecía solucionar este problema fue el uso de lisados tumorales, aplicándolos como funciona un lisado de bacterias o virus atenuados para dar inmunidad, en primera instancia parecía funcionar, sin embargo dependían del estado de salud del paciente y el funcionamiento intrínseco del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, en este momento fue cuando se observó que en algunos pacientes funcionaba pero en muchos otros no, esto, debido a la pobre presencia y presentación de antígenos tumorales y neoantígenos por parte de las células presentadoras de antígeno abriendo la posibilidad en la búsqueda de acarreadores y potenciadores que faciliten este proceso (Mosby, 2012). En las últimas décadas se ha estudiado diversas formas de eficientizar la pobre presentación de antígeno al utilizar lisados tumorales. Se ha implementado la combinación de estos lisados con adyuvantes, como sales de aluminio, lípidos, leptinas o polímeros, sin embargo, su incorporación y su eficiencia no es suficiente para justificar el alto costo de manufactura y producción, así como la obtención de las materias primas que son necesarias como la alta cantidad de antígeno puro que es necesario. Por otro lado, la nanotecnología ha buscado dilucidar un método de entrega de antígeno más eficiente, siendo probado con vacunas ya existentes y

observando un aumento en la presentación de antígeno específico y una potenciación en el funcionamiento del sistema inmune sin necesidad de usar adyuvantes. Aunque a la fecha ya existen estudios en los cuales se funcionalizan nanopartículas con lisados tumorales y con otras moléculas potenciadoras del sistema inmune, presentan deficiencias en la preparación del tratamiento, complejidad y altos costos(Luo *et al*, 2015). Debido a estas deficiencias se propone en este trabajo sintetizar nanopartículas de oro reducidas a partir de lisados tumorales, lo cual potenciara la liberación y presentación de antígenos tumorales haciendo el proceso de obtención mucho más sencillo y menos costoso. Con la finalidad de identificar el efecto de estas nanopartículas, serán evaluadas *in vivo* utilizando un modelo murino estudiando el efecto sobre el sistema inmune innato y adaptativo específicamente de las células B y T, así como su capacidad de evitar la implantación y crecimiento tumoral, en un modelo de cáncer de mama murino triple negativo.

3. Antecedentes

1. El sistema inmune, el mecanismo de defensa que mejor ataca.

La defensa de un sistema biológico es uno de los mecanismos más complejos que existen en los organismos superiores, una de las funciones fundamentales para sobrevivir. La inmunidad se divide en innata y adaptativa (adquirida). La inmunidad innata es la primera barrera de defensa que existe entre el huésped y el hospedero, esta inmunidad no tiene un sistema de reconocimiento antigénico específico, otra importante diferencia entre la inmunidad innata y adaptativa es la rapidez en la reacción ante lo extraño, el sistema de defensa innato está constituido por células como, fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células Natural killer (NK) y la cascada del complemento, entre sus funciones principales se encuentra, muerte directa a microorganismos o tumores por lisis, opsonización de microorganismos por fagocitosis, quimiotaxis y activación de leucocitos y regulación de producción de anticuerpos. por otro lado el sistema inmune adaptativo posee un sistema de reconocimiento antigénico específico y memoria inmunológica, un ejemplo de este reconocimiento esta dado por las células B y células T, la diferencia entre estos receptores radica en que las células B reconocen antígenos no procesados, en contraste con las células T que reconocen péptidos lineales pequeños y requieren un procesamiento de antígenos por las células presentadoras de antígeno (APC) (Alam, 1998).

1.1. Células presentadoras de antígeno.

Para la generación de los péptidos pequeños a partir de los antígenos estos deben de ser inalados, comidos o inyectados, ser internalizados por una célula presentadora de antígeno especializada (APCs) y procesada por la vía de endocitosis. Las APCs pueden ser divididas en presentadoras profesionales o amateur. Las presentadoras profesionales son monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC) y células B, realizando una presentación de antígeno como parte integral de la función de generación de una respuesta inmune, otras células como endoteliales, fibroblastos, células gliales y células de la tiroides presentan antígenos solo en condiciones específicas, estas son consideradas APCs amateur (Elsevier Mosby, 2012).

1.1.2. Monocitos y macrófagos.

Los monocitos y macrófagos son responsables de la digestión del material exógeno para la presentación de epítomos antigénicos para las células inmunocompetentes. Los monocitos se encuentran en circulación sanguínea, mientras los macrófagos pueden ser encontrados en tejidos, por ejemplo, en cerebro como microglía, células de Kupffer en hígado existe una gran concentración de macrófagos en el cuerpo, estos participan en la inmunidad innata y la respuesta inmune adaptativa. Como parte de la inmunidad innata pueden ser activados por antígenos como los PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), receptores Toll-like y receptores de manosa. En la inmunidad adaptativa los antígenos son reconocidos usando receptores o moléculas intermediarias como los anticuerpos y fragmentos del complemento (Elsevier Mosby, 2012). Como parte de la identificación de estos tipos celulares se utilizan marcadores de membrana o CD, los monocitos a menudo carecen de marcadores para linaje de células T, B, NK y células dendríticas como NK1.1, CD90, CD45R, y CD11c. para monocitos se pueden utilizar marcadores como CD2, CD11b, CD14, CD16, CD14 entre otros (Auffray, Sieweke, & Geissmann, 2009).

1.1.3. Células Dendríticas (DC)

Las DC fueron descritas por Steinman en 1973 describiéndolas como células raras de sangre periférica con dendritas similar a una neurona, estudios posteriores demostraron que las DC son células presentadoras de antígeno profesionales que se encuentran en tejidos linfoides y no linfoides, estas células tienen sus precursores en médula ósea CD35+, las cuales pueden ser diferenciadas en precursores linfoides y precursores de sangre, aunado a esto pueden diferenciarse a partir de monocitos mediante estímulos concretos (Ilustración 1). Para su identificación molecular se utilizan marcadores como CD14, CD83, CMRF44, CD11b, CD103, CD80, CD86 entre otros (Elsevier Mosby, 2012; Voisine, Trinité, & Josien, 2002).

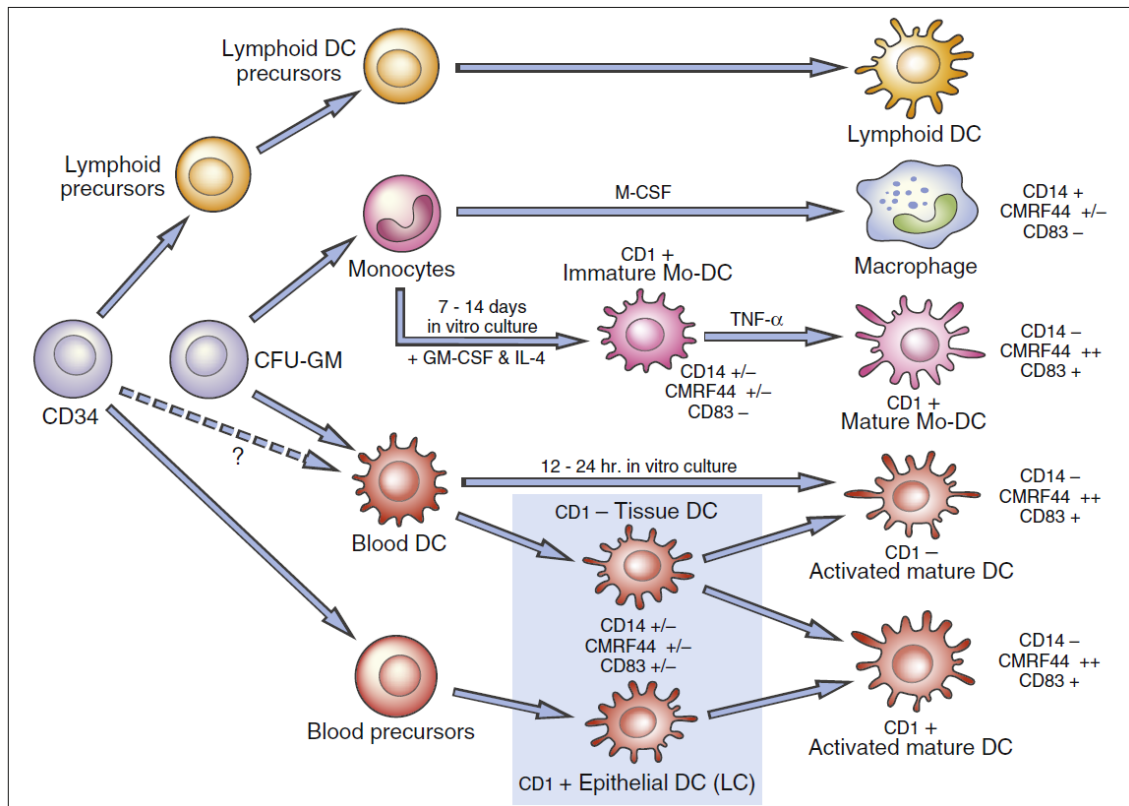


Figura 1 Vía de diferenciación de DC

1.2. Linfocitos T

Los linfocitos T juegan un rol central en la respuesta inmune, células pluripotentes migran hasta el timo en donde ocurre la maduración de las células T, debido a condiciones intrínsecas del timo como el epitelio tímico y algunas citocinas como la interleucina 7 que presenta un papel crítico en el desarrollo de las células T. Los linfocitos T maduros presentan responsabilidades concretas como: reconocimiento antígeno específico, ayudar a las células B en el montaje de la respuesta de anticuerpos antígeno-específico, montaje de una respuesta citotóxica sobre células infectadas, estimulan una respuesta inflamatoria activada por granulocitos y macrófagos, regulan la respuesta inmune, mantienen una memoria inmunológica antígeno-específica y producen citocinas, incluyendo interleucinas y quimiocinas. Todas las células T presentan un receptor específico denominado TCR, este receptor en su forma activa o madura se encuentra en asociación con CD3 un receptor de membrana, esta combinación es esencial para la transducción de

señales, este receptor solo reconoce señales antigénicas específicas, este receptor es generado por recombinación y se pueden llegar a generar hasta 2.9×10^{20} diferentes receptores celulares tipo TCR. Existen diferentes subtipos de células T, para diferenciar entre los tipos se les ha denominado como citotóxicas y cooperadoras (TH), por un lado las citotóxicas o CD8+ requieren unirse a las células mediante MHCI, mientras que las TH expresan CD4+ y se asocian con moléculas MHCII, otro de los subtipos más estudiados son los linfocitos T de memoria los cuales al ser CD4+ expresan CD45RO incluyendo la expresión de CD3+ para todas las células T maduras (Ilustración 2) (Alam, 1998)

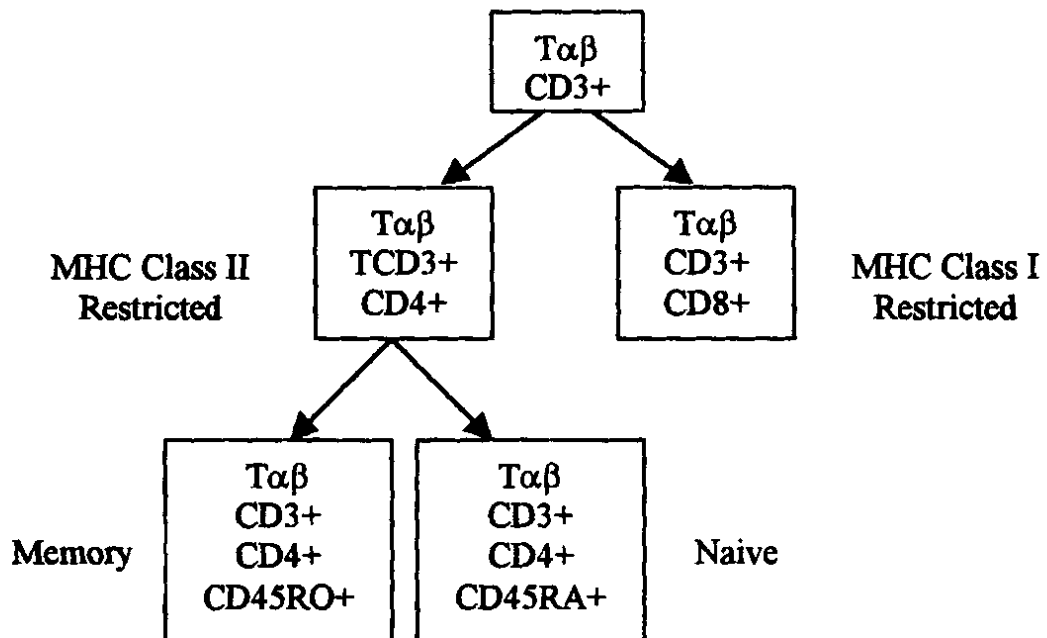


Figure 2. Major subtypes of T-cells.

Figura 2 Subtipos de células T

1.3. Linfocitos B.

Las células B se presentan en un 15% de las células mononucleares de sangre periférica son desarrolladas y diferenciadas en medula ósea por parte de células madre pluripotentes la función más importante de las células B es sin duda la producción de anticuerpos, reconociendo antígenos mediante su forma nativa mediante el complejo de receptor de células B (BCR), al reconocer un antígeno y generar especificidad la señal del

receptor es activada generando una proliferación clonal. Las células B generan cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, en el caso de la IgG se presentan diferentes subclases: IgG1, iGg2, IgG3 e IgG4. Por otro lado, las IgA presenta dos subtipos A1 y A2 (Ilustración 3). Las funciones más importantes de las inmunoglobulinas abarcan la neutralización de patógenos, incluyendo bacterias, hongos, virus, parásitos y toxinas, activan complemento, activan fagocitosis, activan muerte celular por medio de citotoxicidad mediada por dependencia de anticuerpos (ADCC) entre otras funciones (Alam, 1998). Para la identificación de las células B se utilizan diferentes marcadores moleculares de superficie como: CD19 para identificar el linaje de célula B, CD20, CD21, CD22, CD23 para células B maduras, mientras que CD23 se utiliza para identificar células B activadas, por otro lado marcadores como CD34 en sangre periférica permiten identificar si se despertó una activación de las células pluripotentes para la producción de células B (Alam, 1998; Lebien & Tedder, 2019).

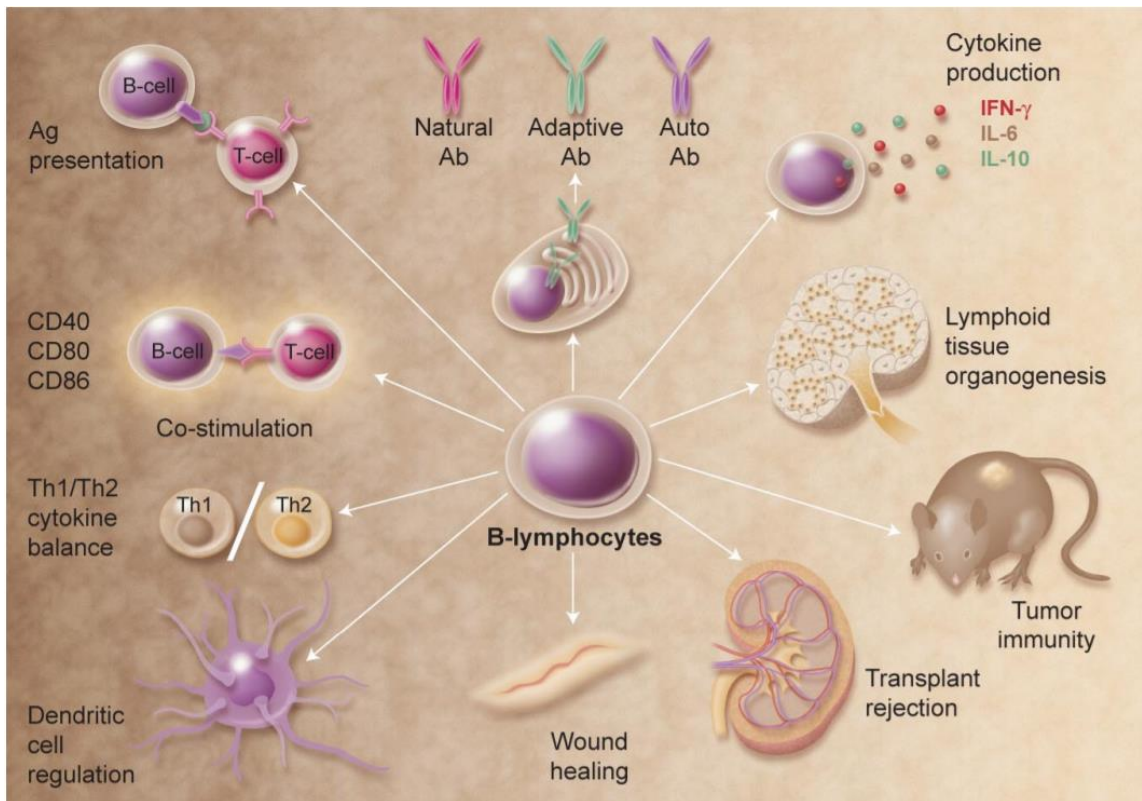


Figura 3 Atributos multifuncionales de células B.

1.4. Citocinas y quimiocinas en la respuesta inmune.

Las citocinas son mediadores proteínicos de la interacción célula-célula, pueden ser producidas por cualquier célula nucleada, sin embargo, la producción de estas moléculas es restringida, por ejemplo, la producción de IL-2 ocurre principalmente en células T. La función más relevante de las citocinas es mantener el equilibrio entre un mecanismo proinflamatorio y antiinflamatorio, estas moléculas recibieron su nombre como Interleucinas (IL) debido a que se suponía que promovían la comunicación con los leucocitos. Estas moléculas se pueden encontrar estimulando células T, NK y B, específicas para procesos antiinflamatorios y proinflamatorios. En el caso de las quimiocinas su función principal es estimular la quimiotaxis de granulocitos, monocitos y linfocitos. Además, juegan un rol crítico en la patogénesis e inflamación. Por ejemplo, la familia de quimiocinas MCP-1-4, presenta la función de llamar y activar monocitos (Alam, 1998).

2. Inmunidad adquirida.

Cuando hablamos de inmunidad adquirida hacemos referencia a la inmunidad que permite responder a cada nuevo evento con cualquier agente externo, teniendo como base interacciones pasadas. Estos términos se conocen desde el año 431 a. C. según describe Tucídides en las guerras del Peloponeso, al describir una gran epidemia que azotaba Atenas remarco que los únicos que no contraían la enfermedad y podían atender a los afectados eran aquellos que ya habían padecido el cuadro clínico. Mientras que en el siglo XVI los turcos y chinos evitaban la aparición de la viruela al realizar pequeños injertos de costras pulverizadas en la piel de los pobladores, de esta manera evitaban el contagio de la viruela, esto fue tomado por el reino unido. Fue hasta el siglo XVIII cuando el doctor Edward Jenner inoculó material de lesiones virales proveniente de vacas, en los brazos de un niño, semanas después, luego de que sufriera un cuadro clínico diarreico, le inoculó el virus vivo y observo que el paciente no había contraído la enfermedad. Para el siglo siguiente XIX, Luis Pasteur llevo a la práctica los trabaos de Jenner y observo que al aplicar cultivos viejos a conejos estos no enfermaban cuando eran inoculados con cultivos nuevos muy virulentos, en honor a Jenner, Pasteur denomino esta técnica Vacuna derivado de la palabra en latín *vacca* (Abul., *et al*, 2008).

2.1. Antitoxinas

A fines del siglo XIX la difteria era una enfermedad contagiosa grave que cobro miles de vidas en Europa y América, esta toxina se desarrolló a partir de la inmunización del toxoide diftérico en un animal sano, para después obtener la sangre y purificar los anticuerpos específicos contra la difteria, por este método se le otorgó el premio Nobel a Von Behring por su trabajo con la antitoxina tetánica de 1890, el cual presento las bases para una nueva disciplina, la inmunología (Kantha, 1990). Actualmente la OMS recomienda que la preparación de esta antitoxinas se prepare a partir de plasma de suero de caballos sanos inmunizados contra la toxina, se utiliza para inmunizaciones pasivas en casos sospechosos de difteria sin esperar la confirmación bacteriológica de la infección (OMS, 2016).

2.2. Lisados celulares como vacunas.

Actualmente la vacunación está posicionada como uno de los tratamientos más efectivas y con mejores resultados desde las últimas décadas, algunos ejemplos de éxito se perciben en la modificación que causaron en los patrones de incidencia y mortalidad de la viruela, polio, sarampión, rubeola, tuberculosis, tos ferina, difteria entre otras son la prueba rotunda de su funcionamiento. Para la producción de vacunas se siguieron por muchos años técnicas clásicas mientras que en la actualidad se busca la generación de vacunas utilizando técnicas moleculares.

2.2.1. Vacunas vivas

Este tipo de vacunas consiste en microorganismos que pueden replicar por sí mismo en el hospedero o que puede infectar células y actuar como inmunógenos sin causar una enfermedad natural. Este tipo de vacunas producen tanto la inmunidad humoral como celular. Algunas de estas vacunas se acercan al concepto de una vacuna ideal, debido al efecto protector que pueden producir una protección duradera con pocos efectos secundarios usando muy pocas dosis (García, 1999).

2.2.2. Vacunas atenuadas

Este tipo de vacunas se caracteriza por usar bacterias o virus que han pasado por diversos procesos para eliminar su capacidad de virulencia, para realizar la atenuación se

pueden utilizar técnicas clásicas y recombinantes. Las primeras incluyen la técnica de pasajes seriados, esto con la finalidad seleccionar las variantes menos virulentas. Una segunda técnica consiste en utilizar virus homólogos a los causantes de enfermedades veterinarias similares a las observadas en seres humanos, llevándolos a una atenuación por diferencia de especie (García, 1999).

2.2.3. Vacunas No-Vivas

Se caracterizan por su incapacidad de multiplicarse en el individuo o en las células y por lo tanto no pueden revertir en el caso de microorganismos su patogenicidad presenta menos efectos adversos en el individuo, no se transmiten de persona a persona y generalmente son más factibles (García, 1999).

2.2.4. Microorganismos inactivos.

Los microorganismos pueden ser inactivados por agentes químicos, por calor o por frío, se pretende generar una respuesta inmune humoral contra muchos componentes de manera que algunos anticuerpos logren neutralizar el patógeno (García, 1999).

2.2.5. Proteínas, péptidos y polisacáridos.

Este tipo de vacunas se elige para muchos patógenos microbianos, consiste en identificar epítomos protectores y sus correspondientes proteínas, las cuales son purificadas, en muchos casos purificadas y posteriormente utilizadas como inmunógenos (García, 1999).

3. Vacunas para cáncer.

3.1 Perspectiva de las vacunas y terapias contra el cáncer

A partir de la identificación de los antígenos asociados a tumor (AAT) se logró el avance en el desarrollo de vacunas contra el cáncer e inmunoterapias. Este tipo de terapias tiene como objetivo estimular la respuesta inmunitaria antitumoral que conduzca a la eliminación del tumor como a la generación de células de memoria que tengan la capacidad de proteger contra una futura reincidencia del tumor. Existe evidencia sustancial para demostrar que es posible lograr una regresión significativa de los tumores

estimulando los linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de AAT y que los pacientes tengan la capacidad de albergar clonas de células T específicas de los antígenos asociados a tumor capaces de mediar la muerte de células tumorales al estimular de manera apropiada. La mayoría de las vacunas contra el cancer están diseñadas para activar CTL específicos de AAT mediante la presentación de antígeno de Células dendríticas, que han sido tratadas con la combinación de AAT e inmunoadyubantes. La terapia se centra en que las células dendríticas proporcionen múltiples señales a las células T CD8+ mediante la exposición a los antígenos asociados a tumor, estas señales incluyen el complejo de interacción mediado por el MHC-péptido afines en DC que interactúen con el receptor de células T (TCR) y de un entorno de citocinas apropiado que pueda influir en la naturaleza de la respuesta inmune, un ejemplo de esto sería un perfil de citocinas que favorece la activación de linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, la generación de respuesta inmune se ve obstaculizada por las células tumorales, que promueve la producción de citocinas inmunosupresoras. Con la finalidad de reducir el impacto de las redes inhibitorias se ha centrado la investigación en la carga y activación de DC tanto *ex vivo* como *in vivo*, para aumentar la potencia de la inmunidad antitumoral de las células. Un ejemplo de este tipo de terapias es la implementada para el cancer de próstata con la terapia Sipuleucel-T® recientemente aprobada por la FDA, esta terapia implica varios procesos como la maduración *ex vivo* de DC mediante la carga de antígenos autólogos con fosfatasa acida prostática fusionada al factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos (GM-CSF) antes de la transferencia adoptiva de pacientes con cáncer (Neller, López, & Schmidt, 2008).

3.2. Lisados tumorales (LT) antigénicos como vacunas múltiples.

Las vacunas de LT y las derivadas de tumores de células completas poseen múltiples AAT lo que expande el repertorio de linfocitos T CD4+ y CD8+ que se pueden activar. Esto provoca una disminución en la posibilidad de evasión inmune por parte del tumor. Sin embargo, al utilizar vacunas que solo usan un solo antígeno asociado a tumor y aunque han demostrado resultados prometedores en ensayos clínicos, cuentan con la desventaja que al solo ser específicos a un antígeno presentan una potencia limitada en la

respuesta de linfocitos T citotóxicos antitumorales, además del mecanismo que presenta la célula de cancer en la cual pierde antígenos tumorales disminuye la eficiencia de esta terapia. El fenómeno de pérdida de antígeno ha sido una de las barreras que presenta la terapia en un ensayo clínico II en pacientes con glioblastoma multiforme, siendo candidatos para una vacuna dirigida contra un péptido específico, revelaron que los pacientes con el glioblastoma que expresaban el péptido y recibieron múltiples vacunas intradérmicas de la vacuna más GMCFS y quimioterapia habían mejorado la supervivencia general, sin embargo, más del 90 % de los pacientes presentaron regresión tumoral. Estas deficiencias permiten observar que tal vez utilizar un conjunto de antígenos asociados a tumor pueda presentar un mejor efecto en fases clínicas. Otra de las ventajas de utilizar multi - antígenos provenientes de lisado tumoral es la aplicación clínica al no estar limitado por la expresión o sobreexpresión de un antígeno en concreto, debido a la gran cantidad de antígenos que presenta puede activar una citotoxicidad mediada por LTC más amplia, sin embargo cuenta con algunas desventajas como el hecho que se dificulta la caracterización de los posibles AAT, además es necesario conjugar la vacuna con algún adyuvante que permita establecer una respuesta inflamatoria aguda y se puedan procesar los antígenos por parte de las DC, o exponer *in vivo* a DC con los LT para después inmunizar al paciente con las DC activadas y específicas, con la finalidad de montar una respuesta dependiente de LT CD8+ contra el tumor (Joshi et al., 2015).

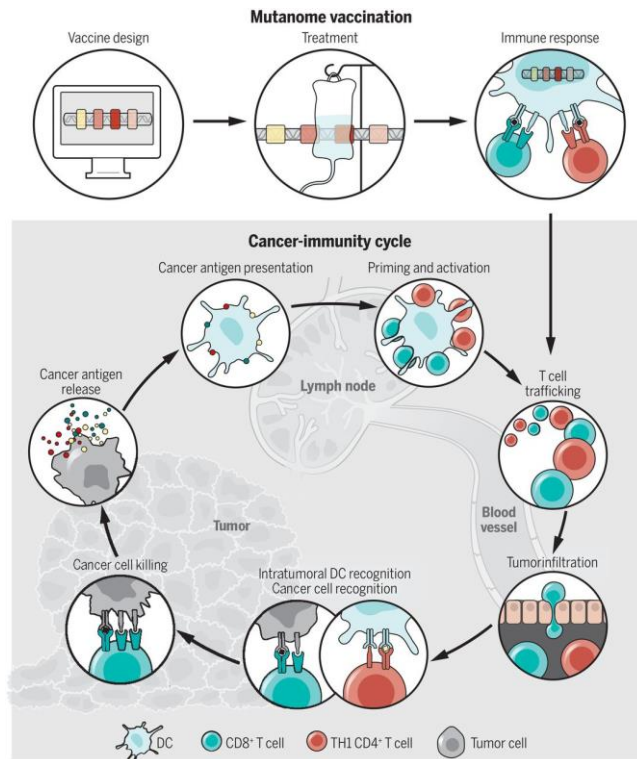


Figura 4 Proceso de generación de inmunidad a partir de diseño de vacunas

3.3. Limitaciones y deficiencias del utilizar lisados tumorales.

Aunque utilizar lisados tumorales permite una asociación de antígenos por MHC I y MHC II lo cual induce una respuesta inmune integral depende del tipo de antígenos que se utilicen es la respuesta que se podría montar. Los lisados tumorales presentan como desventajas como la inducción de una transformación tolerogénica a las citocinas en DC, lo cual inactiva la presentación de antígeno. Los antígenos purificados asociados a tumor presentan otras desventajas como la nula inducción de la maduración de DC, no induce una respuesta inmune potente en linfocitos T cooperadores CD4+ presenta pequeñas cantidades de múltiples antígenos. Presenta la desventaja de una dependencia en montar una respuesta inflamatoria en primera instancia, debido a que procesos antiinflamatorios están relacionados con mal pronóstico en cáncer (González et al., 2015). Aunado a lo antes mencionado una de las consideraciones que se debe de tomar en cuenta es la cantidad de lisado que se implementa en la vacuna, esto debido a la existencia de un síndrome denominado como síndrome de lisado tumoral, este tipo de efectos solo se presenta en tumores sólidos y se caracteriza por una inflamación excesiva así como falla hepática, esto se observó por primera vez en un paciente metastásico con meduloblastoma, el cual

recibió quimioterapia y al segundo día de la terapia presento los síntomas de TSL, este tipo de síndrome puede desencadenar en complicaciones fatales, debido al aumento de potasio libre, LDH, creatinina entre otras. Este tipo de síndromes se presenta cuando las células de cáncer son destruidas en un periodo de tiempo muy corto ya sea por dosis elevada de quimioterapéuticos o por la inmunización de algún lisado tumoral preformado al utilizar grandes cantidades (Sørensen, 2003).

5. Cáncer de Mama.

5.1. Definición de cáncer de mama.

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células, puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo, este crecimiento denominado tumor, tiene la capacidad de invadir tejidos circundantes, aunque aún no se tiene claro una causa por la cual se genera este padecimiento se establecieron factores de riesgo que pueden encaminar al desarrollo de cáncer algunos de estos factores son: consumo de alcohol, exposición al humo de tabaco, factores genéticos hereditarios, por mencionar algunos. Existen tres principales tratamientos con los cuales se combate esta enfermedad, el principal es la cirugía, radioterapia y quimioterapia.

5.2. Epidemiología del cáncer de mama.

Según la OMS el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Según datos de American Cancer Society en el 2019 se han reportado 268,000 casos de cáncer lo cual corresponde al 30% de los casos reportados, mientras que las muertes estimadas llegan a 66,022 correspondiente al 23% de las muertes (ilustración 5). Aunque la incidencia de casos ha bajado en los últimos años pasando de 33.2 casos por 100,000 a 20.0 casos, este progreso se le atribuye a la detección temprana y los nuevos tratamientos efectivos, disminuyendo

hasta 1.8% la muerte por cancer al año (American Cancer Society, 2019). Sin embargo en países en vías de desarrollo como México esta disminución de muerte anual no se ve reflejada, al contrario el número de casos aumenta con cada año al igual que el número de muertes registradas, fue en el 2003 cuando México reformo la ley para que el seguro popular cubriera al cáncer de mama, a partir de esto en el 2017 Reynoso-Noverón y colaboradores generaron un perfil epidemiológico con datos del seguro popular, analizaron 4,300 casos de cáncer de mama, identificaron que el 53% de esos pacientes al momento del análisis presentaban la enfermedad avanzada mientras que el 13% presentaban la enfermedad en el estadio IV. Demostrando que la mayoría de los casos eran diagnosticados en etapas avanzadas de cáncer (Reynoso-Neveon et al., 2019). Se tiene registro de que solo el 45% de la población en México tiene acceso a un servicio de salud que cubra el cáncer de mama, esta condición ocasiona un retraso en el diagnóstico, en el país 66% de los pacientes con cáncer reciben el diagnostico en etapas localmente avanzadas (tabla 1) (Arce-salinas et al., 2012). El perfil de expresión genético reveló tres subtipos de cáncer de mama receptor estrógeno + (RE), el luminal A, el B y el C. el receptor de estrógeno – comprende HER2, al tipo basal y al tipo normal, este último podría representar una extensión del perfil de expresión entre HER2 y el tipo basal. Además, se utilizan los marcadores de RE, RP, HER2neu, HER1.

Tabla 1 Etapas clínicas de los casos clínicos reportados en el seguro popular entre 2008 y 2009

Etapa clínica	2008	2009	Total (%)
<i>In situ</i>	16	5	21 (1.7)
I	42	42	84 (6.7)
IIA	84	95	179 (14.4)
IIB	118	108	226 (18.1)
IIIA	128	125	253 (20.3)
IIIB	92	112	210 (16.8)
IIIC	21	22	43 (3.4)
IV	64	79	143 (11.5)
Sarcomas/phyllodes	11	11	22 (1.7)
No valorables	15	51	66 (5.4)
Total	597	650	1247 (100)
HER2 positivo	121	128	249 (20)
Triple negativo	129	140	269 (21.6)
RE+ o RP +	358	380	738 (58.4)

5.3 Subtipos moleculares del cáncer de mama.

A partir de la posibilidad de identificar variantes genéticas puntuales en las células se identificaron los genes diferenciales entre las células de cáncer y las células sanas, esto surgió a partir de un estudio realizado por Van't y colaboradores en el 2002 en donde realizaron la predicción del perfil genético y sus resultados clínicos propiciaron la proposición de un método para seleccionar a pacientes que puedan beneficiarse de los diferentes tratamientos disponibles como la quimioterapia.

5.3.1 Tumores receptor estrogénico positivo.

Menos del 20% de los tumores luminales tienen mutaciones en el gen p53 y frecuentemente son grado 1. Existen dos subtipos: luminal A y B. el luminal A tiene alta expresión de genes relacionados con la proliferación celular comparado con el luminal B. como características clínicas el subtipo luminal A es el más frecuente y corresponde al 67% de los tumores, los luminal B tienden a ser de más alto grado, ambos subtipos son de buen pronóstico, sin embargo, el luminal B tiene pero pronostico que el A. estos son tratados con inmunoterapia debido a que no responden bien a quimioterapia convencional (Zepeda-castilla, *et al.*, 2008).

5.3.2 Tumores receptor estrogénico negativo Subtipo HER2.

Los tumores con sobreexpresión de HER2 se caracterizan por la sobreexpresión de otros genes dentro del amplicon ERBB2 como GRB7, similar a los tumores de subtipo basal, los subtipos HER2 presentan una alta proporción de mutaciones en p53 y usualmente son de grado 3. No se ha demostrado una asociación entre el subtipo HER2 con la edad, la raza ni con ningún otro factor de riesgo. Este subtipo celular está implicado en un pronóstico pobre. Muestra una alta sensibilidad a quimioterapia neoadyuvante basado en antraciclina y taxanos, encontrando respuestas patológicas completamente más alta a los luminales (Zepeda-castilla et al., 2008).

5.3.3. Subtipo Basal (Triple negativo).

Este subtipo es llamado así por su patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y en las células mioepiteliales normales del tejido mamario, este parecido es producto a la falta de expresión de RE y genes relacionados a baja expresión de HER2, por inmunohistoquímica también se le ha denominado triple negativo, por no expresar RE, RP ni HER2, este subtipo se ha asociado a mutaciones de BRCA1, se ha demostrado que células luminales normales que expresan citoqueratina 5/6, estas células mediante transformación maligna originan el fenotipo basal de cáncer de mama, estos tumores suelen ser muy agresivos, con mutaciones en p53 de alto grado. La mayoría de las mujeres con mutación de BRCA1 generalmente desarrollan este subtipo, más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas (39%), presentan el peor pronóstico, no es susceptible a tratamientos blanco-convencionales, sin embargo presenta sensibilidad a quimioterapia (tabla 2) (Zepeda-castilla et al., 2008).

Tabla 2 Correlación entre clasificación molecular y respuesta patológica completa en cáncer de mama.

Dato molecular	Respuesta patológica completa			
	No		Sí	
	n	% (IC 95 %)	n	% (IC 95 %)
Luminal subtipo A/B	28	93 (78-99)	2	7 (1-22)
Tipo mama normal	10	100 (29-100)	0	0 (0-31)
ERBB2+	11	55 (32-77)	9	45 (23-68)
Subtipo basal	12	55 (32-76)	10	45 (24-68)

p < 0.001. Modificado de Clin Cancer Res 2005;11(16):5682.

5.4. Tratamientos convencionales contra el cáncer de mama.

5.4.1. Cirugía

Por estándar la cirugía en tumores sólidos localizados es la primera opción, siendo la cirugía conservatoria de seno en primera instancia o mastectomía con la finalidad de eliminar tanto cancer como sea posible, para averiguar si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos debajo del brazo es necesaria una biopsia de ganglio linfático centinela o disección de ganglio axilar, pasando después a una Resección de sitios metastásicos y la ooforectomía (Villarreal et al., 2017).

5.4.2. Radioterapia.

Tratamiento que usa rayos o partículas de alta energía (como rayos X) para eliminar las células del cáncer, para el cancer de mama se utiliza radioterapia externa y radiación interna (braquiterapia). En México la radioterapia adyuvante utiliza 50Gy (sesiones de 25x2Gy) +10 Gy de refuerzo (Villarreal et al., 2017).

5.4.3. Quimioterapia.

La quimioterapia es utilizada en diferentes puntos de la enfermedad, principalmente en tres etapas. Después de la cirugía (quimioterapia adyuvante), se utiliza para trata de eliminar las células cancerosas que puedan haber quedado o que se hayan propagado, pero que no puede verse, ni siquiera en estudios de imagen. Antes de la cirugía (quimioterapia neoadyuvante) se emplea para reducir el tamaño del tumor de modo que se pueda extirpar mediante una cirugía menos extensa. Es utilizada la quimioterapia para cáncer de seno avanzado, puede ser utilizada como tratamiento principal para las mujeres cuyo cáncer se había propagado fuera del seno y del área axilar cuando se hizo el diagnostico o después de los tratamientos iniciales. Algunos de los agentes químicos más utilizados son 5-FU, doxorrubicina, ciclofosfamida, epirubicina, metotrexato, paclitaxel, docetaxel, carboplatino entre otros (Villarreal-garza et al., 2017).

5.4.4. Terapia endocrina y dirigida a HER2.

1 de cada 5 mujeres con cancer de mama presentan esta proteína en su superficie, en México se utilizan dos fármacos Trastuzumab el cual es un anticuerpo monoclonal dirigido a HER2, puede ser utilizado solo o en combinación, se administra de manera intravenosa por sesiones que van de 30 a 90 minutos. El otro fármaco que se utiliza es

Lapatinib, el cual es un inhibidor de cinasa que se administra en forma de pastilla diariamente, utilizada en cancer de mama de etapas avanzadas. En el caso de los subtipos que son positivos para los receptores de estrógeno y progesterona alterados es posible utilizar fármacos dirigidos a estos receptores, algunos de los utilizados en México son, tamoxifeno, anastrozol, letrozol, entre otras (Villarreal-garza et al., 2017).

6. Retos terapéuticos clínicos en los tratamientos de cáncer de mama

6.1. Efectos de las terapias convencionales

La principal desventaja de los tratamientos contra el cancer de mama radica en sus efectos secundarios adversos, estos afectan a las personas de diferentes maneras, dos personas a quienes se les administran los mismos medicamentos pueden sentirse completamente diferentes. La principal preocupación proviene de los agentes quimioterapéuticos convencionales, estos pueden presentar efectos en diversos órganos y tejidos del cuerpo. Por ejemplo, presenta un efecto secundario sobre la sangre, específicamente las células sanguíneas sanas del cuerpo, en concreto afecta a los glóbulos blancos, rojos y plaquetas esto al afectar la capacidad de la medula ósea para producir esta célula. La anemia también es un efecto adverso muy común y tiene como consecuencias, que el paciente se sienta cansado, sin aliento, mareado, hasta llegar al punto de una trasfusión de sangre. La pérdida de cabello es quizá el efecto secundario más angustiante de la quimioterapia, esta depende de la cantidad de medicamentos quimioterapéuticos utilizados. la radioterapia puede acarrear efectos como boca seca, dificultad para salivar problemas dentales, vómitos, náuseas, diarrea. Además de estos efectos a nivel de alimentación la quimioterapia produce perdida del apetito, diarrea, estreñimiento, sequedad de mucosas, pérdida de peso y cambios en la percepción de los sabores(Alonso et al., 2014; Peña, 2017).

7. vacunas e inmunoterapia contra el cáncer de mama.

La factibilidad de generar una vacuna contra el cáncer de mama es alta, debido a la gran cantidad de AAT que se pueden encontrar, algunos de los ya usados son el antígeno carcinoembrionario, el cual está implicado en la adhesión celular expresada durante el desarrollo fetal. El receptor de crecimiento humano 2 (HER2) el cual se sobre expresa en las células de cáncer de mama y esta correlacionado con un pronóstico adverso. La glucoproteína MUC-1 la cual se encuentra sobre expresada en el 70% de los cánceres de

mama. Entre otros que son menos específicos del cáncer de mama, pero si están presentes en la mayoría de los cánceres como HTERT o p53.

7.1. Vacunas basadas en péptidos.

Este tipo de vacunas fueron de las principales terapias utilizadas como emergentes en la inmunoterapia contra el cancer de mama, presentan la ventaja de ser fácilmente producidas y son de fácil entrega, de baja toxicidad, es posible controlar la respuesta inmunológica fácilmente. Sin embargo, cuentan con limitaciones como: requiere un aumento de la inoculación para mantener la memoria inmunológica restringida por HLA, requiere un adyuvante adecuado, respuesta restringida por uno o pocos epítomos(Milani, Sangiolo, Aglietta, & Valabrega, 2014).

7.2. Vacunas basadas en DC.

Este tipo de vacunas fueron propuestas para solucionar problemas atribuidos a las vacunas basadas en péptidos, este tipo de vacuna no está restringida por HLA, es capaz de provocar memoria inmunológica, respuesta humoral y citotóxica. El único inconveniente que presenta radica en su método debido a que es técnicamente desafiante, requiere expansión, maduración y activación de células dendríticas(Milani et al., 2014).

7.3. vacunas basadas en células completas.

Las vacunas basadas en células completas permite provocar una respuesta contra un amplio espectro de antígenos, tanto específicos de una estirpe tumoral como generales de tumor, no está restringida por HLA y presenta un método simple de obtención, aunque presenta las limitantes como la dificultad en monitorear la respuesta, riesgo de toxicidad y requiere la manipulación celular sea inmunogénica(Milani et al., 2014).

8. Nanotecnología en la inmunología y la generación de vacunas.

En os últimos años ha emergido un campo emergente encaminado al uso de nanomateriales en el campo de la inmunidad e inmunoterapia. Avances significantes en el campo de la nanomedicina han permitido establecer a la nanotecnología como una herramienta que puede ser utilizada para manipular y sondear respuestas inmunes. Esto incluye su uso como sistemas de liberación de vacuas y modulación del sistema inmune, algunos de los estudios se han basado en comprender como los nanomateriales interactúan con las células inmunes con la finalidad de explotar estos materiales como nuevas

herramientas terapéuticas. La era moderna de la inmunoterapia se encamina en eliminar el cáncer con el uso de herramientas que manipulen el sistema inmune, ahora esto es una realidad a nivel clínico. Los nanomateriales presentan un gran potencial como agentes terapéuticos. Se ha destacado la vacunación terapéutica como una promesa para el tratamiento del cáncer, sin embargo, hasta ahora ha sido decepcionante el éxito limitado en pacientes, esto debido a la incapacidad de montar una respuesta inmune efectiva. En esta deficiencia es donde las Nanopartículas presentan una gran ventaja como sistema de administración de vacunas, incluyendo encapsulación de antígeno, su capacidad para dirigir la entrega de antígenos a células inmunes y su inmunogenicidad intrínseca. Los principales estudios se basan en la interacción del nanomaterial con las DC siendo las células presentadoras de antígeno por excelencia y las responsables de iniciar una inmunidad. Algunas de las formas en las que se ha propuesto administrar estos conjugados ha sido, subcutáneo, intramuscular, en mucosas incluyendo administración vía oral y nasal lo cual depende del tipo de terapia a seguir (Justine D. Mintern., 2018).

8.1 Nanomateriales utilizados en inmunología.

Los nanomateriales por definición deben de presentar un tamaño en su superficie de entre 1-100nm acorde a la definición de la ISO/TC 229. Presentan propiedades fisicoquímicas que son diferentes a su material a tamaño macro, debido principalmente a un mayor grado de reactividad superficial y la capacidad de ser permeables a la membrana celular, aunque estas condiciones producen estrés a nivel celular. Las principales rutas por la cual los nanomateriales migran en el cuerpo humano son las siguientes: Endocitosis, los nanomateriales se internalizan mediados por la membrana celular. Este tipo de traspaso ocurre principalmente con los materiales hidrofóbicos. Nanopartículas con un tamaño menor a los 5nm pueden cruzar a través de los canales de membrana, se sabe que las nanopartículas tienen la capacidad de estimular el sistema inmune. Algunos de los materiales con los cuales ya se ha trabajado y estudiado su impacto en el sistema inmune son los siguientes: basados en nanopartículas de TiO_2 que van de tamaños de 200nm a 15nm, entre los efectos que presentan se encuentra inducción de ROS, inducción de monocitos, inflamación sistémica, en el caso de las más pequeñas, inducción de apoptosis y necrosis en macrófagos. Otro tipo de partículas utilizadas ampliamente son las de oro (AuNps), estas se han utilizado con tamaños de 2 a 100nm, se han encontrado capturadas

por células de Kupffer y macrófagos en bazo, además se ha encontrado que modulan de manera positiva una respuesta inflamatoria, debido a la liberación de IL-1, 2, 4, 6, 8, 10, GM-CSF, TNF e INF(Jang, Lim, & Choi, 2010).

8.2. Efecto y modulación de las nanopartículas de oro (AuNps) sobre el sistema inmune.

La utilización de nanomateriales con dimensiones esféricas o semiesférica al menos en el área relacionado a la biología e inmunología, recae en la forma en el que el sistema inmune a evolucionado para capturar y procesar partículas similares a los virus (nanosized). Estas partículas se filtran y se acumulan en los órganos linfoides, como los ganglios linfáticos y el bazo, esta tarea es llevada a cabo por las células presentadoras de

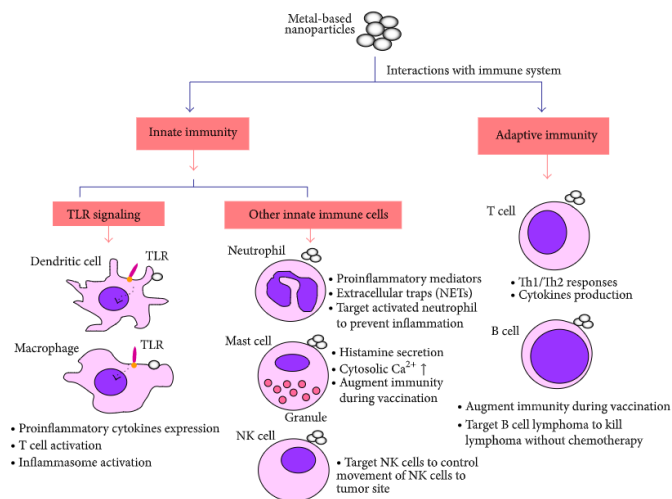


Figura 5 Interacción de nanopartículas metálicas con el sistema inmune

antígeno o APCs, los cuales fagocitan fácilmente las nanopartículas que se encuentran en un rango de entre 50nm a 1µm de tamaño, se ha demostrado que el uso de conjugados multímeros partícula-proteína potencian la respuesta inmune tanto celular como humoral, al llegar a interactuar con los receptores de células B activando la inmunidad humoral (Kishimoto & Maldonado, 2018). El uso de Nps metálicas como oro y plata presenta un efecto sistémico al entrar en contacto con células inmunes innatas como es el caso de macrófagos o DC, se sabe que este tipo de partículas puede activar tanto el sistema inmune innato y adaptativo, al entrar en contacto con los receptores tipo toll o TLR desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias, la activación de los linfocitos T y una activación del inflammasoma, además puede generar efectos en neutrófilos, mastocitos y

células NK. Mientras que para el sistema inmune adaptativo activa las células T tanto Th1 como Th2 desencadenando una expresión de citocinas (ilustración 5). Al ser las nanopartículas conjugadas con algún antígeno específico tienen la capacidad de activar células B dirigiéndolas a ser específicas contra antígeno (Luo et al., 2015).

Dependiendo de la vía de administración de las nanopartículas se pueden montar diversas reacciones defensivas por parte del hospedero algunas de estas reacciones son la activación del complemento, inflamación y producción de anticuerpos. Uno de los fenómenos más estudiado es la endocitosis, se sabe que este proceso depende de la composición de la superficie en la partícula, además del tamaño, esencialmente el proceso es mediado por receptores o independiente de ellos, dependiendo de la superficie de la partícula, cuando esta llega a medir por arriba de los 5µm son mediadas por la vía clásica de fagocitosis. En el caso de las partículas con tamaños entre 50 y 150 nm se da la endocitosis mediada por caveola, la cual es un tipo especial de bolsa lipídica de la membrana plasmática de las células, este mecanismo puede ser dependiente de clatrin o independiente (Ilustración 6) (Boraschi *et al.*, 2012).

8.3. Nanopartículas de oro y su distribución fisiológica

Mattos-Almeida y colaboradores en el 2013 estudiaron el efecto de administrar AuNps de manera intravenosa en ratones con tumor, mediante un marcaje con Cy5 en Nps de 50nm identificaron la presencia de estas partículas en diferentes células del sistema inmune, sorprendentemente aproximadamente el 30% de las Nps detectadas fueron absorbidas por las células B a las 24 horas posteriores a la inmunización, aproximadamente 10% en granulocitos, 18% en células dendríticas y 18% en células T, además se detectó el 3% de las partículas dentro de las células supresoras derivadas de mieloides, además concluyeron que no existía una diferencia en la distribución a la 1, 6 y 24 horas (Ilustración 7), lo cual indica que las poblaciones celulares portan las partículas y migren a través del bazo (Paulo et al., 2013).

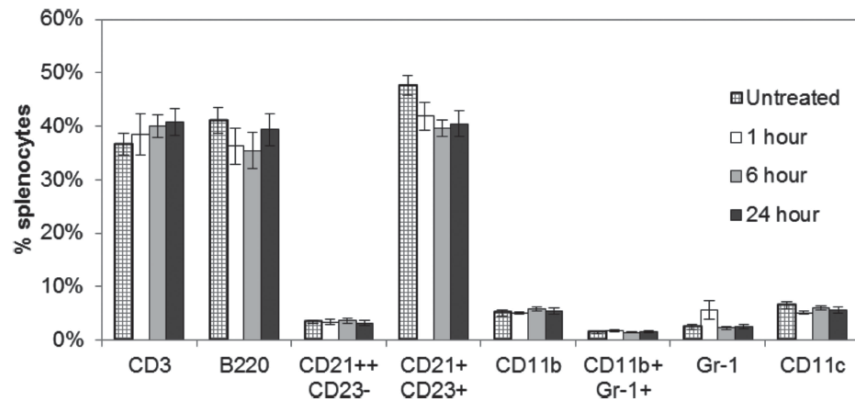


Figura 6 Porcentaje de poblaciones inmunes en los bazo de ratones tratados a 1, 6, o 24 horas después de la inyección intravenosa de AuNps. (Paulo et al., 2013)

8.4. Nanopartículas en la generación de vacunas como potenciadores del SI

Niikura y colaboradores en el 2013 estudiaron el efecto de AuNps con dos tamaños las cuales cargaban la proteína E del virus del hoste del Nilo (WNV) como antígeno, reportaron que Nps esféricas de 40 nm inducen altos niveles de anticuerpos específicos de antígeno (WNV) y que producen niveles significativos de IL-1 β , IL-18, demostrando que la activación de inflamación es dependiente de la secreción de estas citocinas, sus resultados sugieren que las AuNps son efectivos adyuvantes para vacunas y potenciadores del sistema inmune y que depende del tamaño de partícula la eficacia de la misma (Niikura et al., 2013).

9. Nanopartículas en la generación de inmunoterapias contra el cáncer.

Debido a la relevancia que presentaron las Nps como acarreadores de antígenos y potenciadores del SI, existen investigaciones en donde se conjuntan los AAT y las nanopartículas con la finalidad de resolver la poca respuesta que generan por sí solos los AAT, sin los riesgos de un adyuvante convencional como la toxicidad. Sukyung Ahn y colaboradores en el 2014 utilizaron el antígeno B de la fibronectina el cual está asociado a tumor y lo conjugaron con AuNps, sorpresivamente observaron que no presentaba una toxicidad en macrófagos además se observó un incremento altamente significativo en la expresión de TNF- α al utilizar las Nps conjugadas, se registró una disminución en el tamaño de tumor de sus sujetos experimentales tratados con Nps y un aumento en la expresión de IL-2 e IFN- γ concluyendo que las Nps de oro permiten el suministro eficiente

de antígeno a las células dendríticas y luego activan dichas células para facilitar la presentación de antígeno induciendo una respuesta de linfocitos T específicos de antígeno (Ahn et al., 2014) . por otro lado Gross y colaboradores en el 2014 sintetizaron micropartículas basadas en Lisados tumorales como una vacuna para reducir la metástasis espontánea del cáncer de mama en un modelo murino, en su trabajo inmunizaron a un grupo de ratones con su tratamiento para después realizar un reto de tumor, encontraron que el 100% de sus ratones control desarrollaron cáncer de pulmón debido a la metástasis, mientras que su grupo de Nps y LT se redujo la metástasis hasta un 42% y no genero autoinmunidad (Gross, *et al.*, 2014). Con la finalidad de mejorar la eficiencia terapéutica de las Nps cargadas con LT se ha optado por tomar de blanco directo a las células dendríticas. Shi y colaboradores en el 2016 sintetizaron nanopartículas de quitosano cargado con lisado tumoral y recubiertas con manosa, esto para hacerlas más específicas a las células dendríticas. Tras evaluar el efecto de su vacuna en un modelo murino de melanoma observaron que, al cargar las Nps con manosa se aumenta la captura de las partículas por las CD y macrófagos, además después de inmunizar y realizar el reto de tumor observaron que los ratones tratados con las partículas cargadas con LT y manosa delimitaron el crecimiento de tumor comparado con los controles, atribuido a la citotoxicidad específica por los linfocitos T (G. Shi et al., 2017). Qian y colaboradores son algunos de los pocos autores que mencionan el uso de una nanovacuna en este caso ellos sintetizan pequeños péptidos altamente antigénicos, los cuales usan dirigidos a células dendríticas localizadas dentro de los ganglios linfáticos drenantes, observaron el correcto procesamiento por parte de las CD en los ganglios linfáticos por lo cual concluyen que este tipo de construcciones proporcionan un potencial para aplicaciones clínicas en la inmunoterapia contra el cáncer (Qian *et al.*, 2016). Con la finalidad de potenciar el efecto adyuvante del fosfato de aluminio Gan y colaboradores en el 2020 reformularon el fosfato de aluminio para pasarlo de microescala a nanoescala las cuales fueron cargadas con membrana de células tumorales B16F10 y CpG, al realizar este proceso estas nanopartículas mostraron una mayor inmunogenicidad, dispersión y movilidad, además se dirigieron a ganglios linfáticos, estimulando el sistema inmune antitumoral en contra de la línea células B16F10 tanto humoral como celular, al administrar de manera

subcutánea las nanopartículas de fosfato de aluminio recubiertas con membrana de células tumorales B16F10 en un modelo murino (Gan et al., 2020).

4. Justificación

Aunque hasta la fecha ya existen nanopartículas como acarreadores de antígenos asociados a tumor, y otros sistemas de liberación controlada, presentan deficiencias en su formulación y eficacia en la interacción con células presentadoras de antígenos. Debido a esta deficiencia en la presentación de antígenos que promueven los lisados tumorales, para montar una respuesta inmune efectiva, se propone potenciar el efecto desarrollando nanopartículas de oro, empleando como agente reductor un lisado tumoral de cáncer de mama de la línea 4T1, con el fin de mejorar la interacción entre los AAT y el sistema inmune, para su implementación terapéutica, reduciendo costos y dificultades en las formulaciones existentes.

5. Hipótesis

Las nanopartículas de oro reducidas a partir de lisados tumorales potencian la presentación de antígenos y maximizan la respuesta producida por el sistema inmune innato y adaptativo, previniendo la aparición y posible progresión de tumor.

6. Objetivo del trabajo

Objetivo general

Evaluar el potencial inmunogénico de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de un lisado tumoral en un modelo murino con cáncer de mama utilizando la línea celular 4T1.

6.1. Objetivos específicos

- I. Obtener nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral y caracterizar por espectroscopia UV-VIS, DLS y Microscopia electrónica.
- II. Determinar la concentración de proteína en AuLtNps mediante BCA por espectroscopia UV-VIS.
- III. Detectar la captación de AuLtNps utilizando macrófagos peritoneales de ratón mediante microscopia confocal.
- IV. Determinar la presencia de citosinas proinflamatorias en suero de ratón al día -13 y al día 0, así como un análisis de la presencia de marcadores específicos CD3, CD4, CD8, CD22 y CD34 en esplenocitos.
- V. Identificar los perfiles de expresión de los marcadores de membrana CD14, 11b, 11C, CD80, CD86 y MHCII por citometría de flujo en macrófagos extraídos de ganglios linfáticos de los ratones inmunizados, al día 0.
- VI. Determinar la citotoxicidad específica de linfocitos T proveniente de bazo de ratón sensibilizados, en contra de la línea celular 4T1 *in vitro*.
- VII. Evaluar el efecto antitumoral de AuLtNps en ratones BALB/c previamente inmunizado al ser retados con la línea celular 4T1.

7. Material y métodos

Material

Medio de cultivo IMDM y DMEM (Gibco®), Cloruro de oro (III) hidratado (Sigma®), MTT (Methylthiazole Tetrazolium), anticuerpos anti, CD3-FITC, CD8-PE, CD8-APC, HLA-APC, CD14-FITC, CD80-FITC, CD86-PE, CD11b-FITC, CD11c-PE y MHC II. Se utilizará la línea celular 4T1(ATCC®) (Cáncer de mama murino), línea celular NIH-3T3 (Fibroblastos de ratón) (ATCC®). Se dispuso de 54 ratones hembra de 8 a 12 semana de edad divididos en 9 grupos.

Diseño experimental general

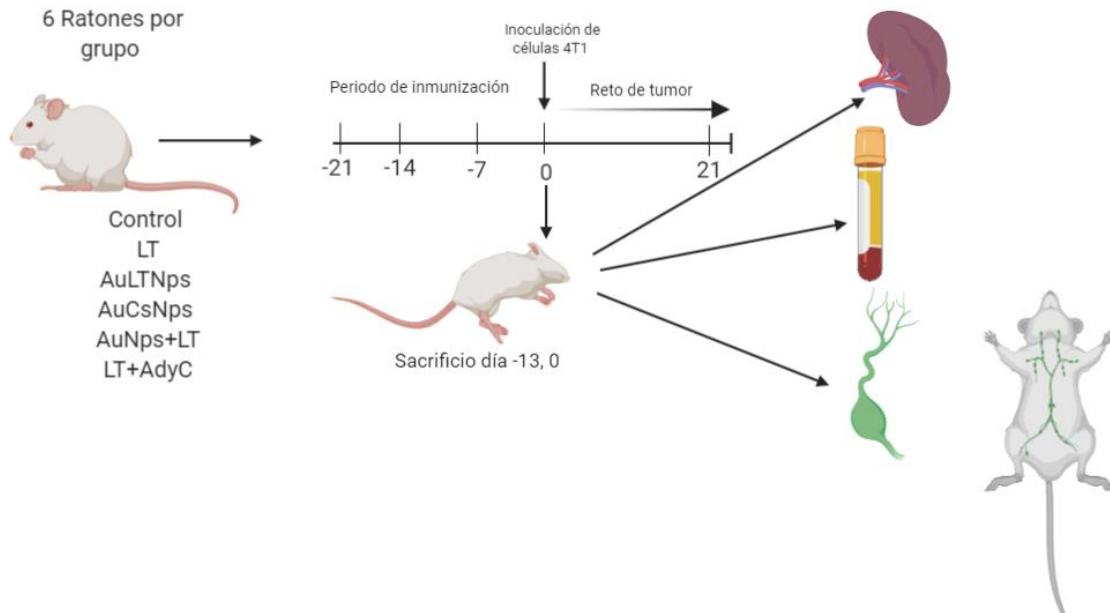


Figura 7 Representación gráfica del proceso experimental general.

En el cual se observan los 6 grupos experimentales y el cronograma de inmunización, el cual consta de 3 inmunizaciones al día -21, -14 y -7, dejando una semana de descanso antes del reto tumoral (día 0), antes del reto se sacrificaron 2 ratones por grupo para extraer el bazo, ganglios linfáticos y suero para experimentos subsiguientes.

7.1. Mantenimiento de la línea celular 4T1 en cultivo

En condiciones de incubación de 37°C, 85% de humedad relativa, 5% CO₂, fueron cultivadas las células 4T1 en frascos de 25cm³ con forma inclinada y con ventilación, para su desarrollo y mantenimiento se utilizó medio IMDM suplementado al 10% con suero fetal bovino, 1% antibiótico antimicótico.

7.2. Mantenimiento de la línea celular NIH.

Se mantuvo en condiciones de incubación a 37°C, 85% de humedad relativa, 5% CO₂, se cultivaron en frascos de 25cm³ con forma inclinada y con ventilación, para su desarrollo y mantenimiento se utilizará medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino, 1% antibiótico antimicótico.

7.3. Síntesis de nanopartículas de oro (citrato de sodio)

Para este trabajo se sintetizaron dos tipos de partículas de oro, el primer tipo fue reducido a partir de citrato de sodio, preparando una solución de HAuCl₄ al 2_mM, además de una solución de citrato de sodio al 1%, la cual se colocó en un vaso de precipitado de 25mL un volumen de 9mL de HAuCl₄ al 2_mM y 1mL de citrato de sodio al 1%, se mezclara vigorosamente y se expuso a luz UV en un Crosslinker Ultravioleta a una intensidad de 6000μj/cm², por 30 minutos, se dejándose reposar por 24 horas a temperatura ambiente y se refrigeró para su posterior uso, estas partículas fueron utilizadas como un control experimental.

7.4. Síntesis de nanopartículas de oro reducidas por lisado tumoral.

Las nanopartículas de oro reducidas a partir de un lisado de células tumorales (4T1), fueron obtenidas a partir de un cierto número de células viables las cuales fueron lisadas por sonicación expuestas a 3 rondas de 10 minutos, el resultante se mesclo con una solución de HAuCl₄ a una concentración de 2mM, se agüita vigorosamente por 2 minutos y se expone la solución resultante a luz UV utilizando un Crosslinker Ultravioleta a una intensidad de 6000μj/cm² por 30 minutos, se deja reposar en refrigeración y se almacena como mínimo una semana antes de su utilización.

7.5. Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral AuLtNps.

7.5.1. Plasmón de Resonancia Superficial (PRS) por espectroscopia UV-Vis.

Para obtener el PRS se utilizó un Nanodrop 200c se tomó una gota de la muestra y se colocó en el pedestal del equipo, en principio, el equipo realizara un barrido del espectro visible (200-750nm), al poseer las partículas metálicas en tamaños nanométricos un plasmón característico en el caso del oro abarca de 510 a 550nm, es posible identificar la existencia de partículas de oro en estado nanométrico.

7.5.2. Análisis de tamaño por Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z.

Para este ensayo se realizaron tres diluciones seriadas de una muestra concentrada de AuLtNps, se colocaron en celdas para espectroscopia y se introdujo en el equipo Z sizer (Zetasizer Nano) se realizaron tres corridas de cada muestra y se obtendrá la medición promedio, esto se repitió al día 1, 5, 12, 15, 24 y 30, mediante la dispersión del haz de luz que provoca un láser en el equipo es posible calcular el tamaño de las partículas en solución a partir del movimiento browniano de las partículas. Por otro lado, el mismo equipo tiene la capacidad de medir la carga superficial neta de las partículas a partir del potencial Z, esto a partir de utilizar una celda especial por la cual se hace pasar una ligera corriente eléctrica, de esta manera el equipo arroja los datos de potencial Z en mv, para este ensayo se utilizó la muestra con la mejor estabilidad de partículas y menor PDI.

7.5.3. Análisis de tamaño y morfología por Microscopia electrónica de barrido SEM

Para corroborar el tamaño de partícula y visualizar la forma y acomodo atómico de los elementos se colocó una muestra de las AuLtNps sobre un porta muestra para SEM y se llevó a analizar al microscopio electrónico de barrido, el archivo arrojado fue analizado utilizando el software Gwyddion, para obtener los histogramas de tamaño correspondientes.

7.5.4. Curva de estabilidad mediante PRS.

Con la finalidad de demostrar la estabilidad de las Nps se llevaron a cabo mediciones cada 3 días del PRS y se calculó la diferencia entre las intensidades obtenidas y la tendencia con la que cuentan dichas absorbancias.

7.5.5. Curva de estabilidad mediante Tamaño y potencial Z.

Con la finalidad de demostrar la estabilidad de las Nps se llevó a cabo mediciones cada 3 días del tamaño y potencial Z hasta llegar a un mes de mediciones y se calculó la diferencia entre las intensidades obtenidas.

7.6. Curva de cuantificación de proteína respecto al tiempo.

Para cuantificar la cantidad de proteína que contienen las AuLtNps se utilizó un kit de BCA por espectroscopia UV-VIS, se tomaron 25 μ L de las AuLtNps y se mezclaron con 200 μ L de la solución del kit y se incubaron a 37°C por 30 minutos para después analizar la absorbancia por espectroscopia UV-VIS mediante la opción de análisis por BCA en el cual se observa la absorbancia máxima de las muestras a 563nm y se cuantifica a partir de dicha intensidad la concentración de proteína, para este ensayo se midió cada tercer día durante un mes, además en cada medición se utilizaron tres muestras.

7.7. Ensayo de citotoxicidad en células NIH 3T3.

Se colocaron 5,000 células NIH 3T3 viables por pozo en una placa de 96, se llevaron a un volumen final de 100 μ L de medio DMEM suplementado (SFB 10%) las cuales se mantuvieron por 24 horas a condiciones de incubación estándar, pasado el tiempo fueron expuestas a las siguientes concentraciones: 15, 35, 75, 120, 180 y 300 μ M de nanopartículas de oro reducidas por lisado tumoral (AuLtNps), al igual el volumen que se tome del tratamiento de AuLtNps fue tomado para correr los controles de lisado tumoral, HAuCl₄ y AuCsNps, se expusieron las células a dichos tratamientos por 24 horas y se utilizara el reactivo de MTT para estimar la viabilidad celular relativa a partir de la absorbancia, se colocó el reactivo en cada pozo que contenía células y se dejó incubar por 3 horas, pasado el tiempo se retiró el medio y se colocaron 100 μ L de DMSO para lisar las

células en la placa y poder analizar el cambio de coloración en cada pozo de la placa, en principio si las células están metabólicamente activas convertirán el reactivo de MTT en cristales de formazan que al entrar en contacto con el DMSO serán disueltos y se podrá analizar la diferencia en la absorbancia la cual fue analizada en un lector de microplacas ELISA, la fórmula para calcular la viabilidad relativa se expresa a continuación:

$$vibilidad = \frac{Absorbancia\ del\ tratamiento}{Absorbancia\ del\ control} \times 100$$

7.8. Cronograma de inmunización del modelo animal.

Se utilizaron 8 grupos experimentales, **control** (PBS), **Lisado tumoral** (LT), Nps de **citrate de sodio/comerciales** (AuCsNps), **Nps de Lisado tumoral** (AuLtNps), **AuCsNps+LT**, **AuLtNps+AdyL18** (adyuvante L18), **LT+ adyuvante comercial** y **AuCsNps+AdyL18**, los culés estaban conformados de 6 ratones hembra Balb/C de entre 6 a 12 semanas de edad, siguiendo el periodo de inmunización descrito por Shi y colaboradores en el 2016 (Shi, *et al.*, 2017), inyectando a los ratones una vez por semana durante tres semanas con una semana de descanso antes de las pruebas posteriores, en cada caso se inmunizo sin sobrepasar un volumen máximo de 200µL por ratón.

7.9. Reto de tumor.

Después de una semana de la última inmunización se inoculo de manera subcutánea en la glándula mamaria de manera gentil utilizando una jeringa de 1mL y una ajuga de 27-G, tomando en cuenta que el bisel de la ajuga debe estar hacia arriba, inoculando una cantidad de 500,000 células viables 4T1 resuspendidas en 50µL de medio de cultivo IMDM suplementado con SFB (Pulaski & Ostrand., 2000), se dio seguimiento a la implantación del tumor así como su crecimiento y desarrollo, se realizaron mediciones cada 3 días del peso y volumen tumoral, se estableció como máximo 21 días de seguimiento previo a la inoculación del tumor, si alguno de los ratones mostro dolor excesivo o incapacidad para alimentarse o moverse este fue sacrificado de acuerdo a las normas pertinentes.

7.10. Anestesia y eutanasia.

Tanto para los ratones de los grupos de reto de tumor (4 ratones) y de inmunización (3 ratones) se llevaron a cabo los cuidados necesarios que establece la NOM-062-ZOO-1999, en el caso de los ratones del ensayo de inmunización al llegar al día - 6 de inmunización fueron anestesiados utilizando una mezcla de Ketamina 100mg/kg y xylizine 10mg/kg, realizando una prueba de respuesta a estímulo punzando una de las almohadillas de la pata del ratón, al asegurar la anestesia total se prosiguió a realizar una punción cardiaca utilizando una jeringa de 1mL con aguja de 25G, la sangre colectada fue almacenada en tubos con anticoagulante para su utilización, después de obtener la sangre se realizara una dislocación cervical y se prosiguió con la obtención del bazo y los macrófagos peritoneales del ratón.

7.11. Ensayo de captación de antígeno por macrófagos peritoneales

Para este ensayo se utilizó medio DMEM sin suplementar a una temperatura de 4°C, una jeringa de 10mL, un mechero y utensilios quirúrgicos como tijeras pinzas y bisturí, se realizó un corte en la parte de la piel que cubre el vientre el ratón y se retiró la piel de la periferia que cubre el peritoneo con cuidado de no romper o pinchar dicha membrana, utilizando la jeringa se cargara un volumen total de 7mL de medio en el interior del peritoneo, se agüita suavemente y se retirara el contenido intraperitoneal del ratón en un tubo de 14mL el cual es centrifugado a 1350 RPM por 10 minutos, se realiza un conteo de las células obtenidas y se colocan en una placa de 6 pozos y lo restante se expondrá a diferentes marcadores celulares, en una placa de 6 pozos se colocan alrededor de 100,000 células, estas se dejaran en incubación estándar por 4 días con medio DMEM suplementado, pasado el tiempo se colocan las AuLtNps, LT, PBS, AuCsNps, estos conjugados a FTIC. Se dejan interactuar por 24 horas y fueron analizados por microscopia confocal.

7.12. Determinación de la presencia de citocinas proinflamatorias

Después de extraída la sangre por punción cardiaca fue centrifugada para separar el suero y fue analizado por citometría de flujo utilizando un kit de citocinas proinflamatorias CBA de la marca BD, por citometría de flujo.

7.13. Evaluación de marcadores celulares en bazo de ratones inmunizados.

Después de la extracción del bazo se perfundieron utilizando PBS para obtener las células linfoides del tejido, las células se colocaron en tubos de 2 mL los cuales se incubaron con los marcadores de membrana, CD4, CD3, CD8, CD22 y CD34 a una concentración de 1µg/mL para su evaluación por citometría de flujo.

7.14. Identificación del perfil de diferenciación de macrófagos en ganglios linfáticos de ratones inmunizados.

Al día 0 de inmunización en todos los grupos experimentales y después del sacrificio se extrajeron los ganglios periféricos correspondientes a la región axilar y al linguinal, se realizaron perfusiones con PBS por lo menos se pasaron 5mL, en cada ganglio hasta obtener una solución turbia, después se realizó un conteo y se colocaron un mínimo de 100,000 células por ensayo, utilizando los marcadores de membrana CD14, CD11c, CD11b, CD80, CD86 y MHCII a una concentración de 1µg/mL para su posterior análisis por citometría de flujo.

7.15. Evaluación de la citotoxicidad específica de linfocitos T

Después de la extracción del bazo se disgregara mecánicamente y se utiliza un gradiente de densidad con ficol para obtener las células linfoides del tejido, las cuales fueron cultivados en una placa de 24 pozos y posteriormente expuestos a diferentes relaciones en contra de células 4T1 viables, se utilizaron las combinaciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000, se dejaron en cultivo por 24 horas y fue utilizado el marcador de viabilidad 7AAD el cual es un intercalador de DNA que solo fluórese en células muertas o dañadas las cuales se analizaron por citometría de flujo.

7.16. Efecto antitumoral de AuLtNps en ratones Balb/C previamente inmunizados.

De los grupos previamente inmunizados Control (1), LT (2), AuCsNps (3), AuLtNps (4), AuCsNps+LT (5), LT+Ady Comercial (6), AuCsNps+AdyL18 (7) y AuLtNps+AfyL18(8), después del periodo de recuperación de una semana de la última inmunización fueron inoculados con 5×10^5 células 4T1 viables de manera subcutánea en la glándula mamaria, para posteriormente observar la aparición del tumor, en el caso del desarrollo tumoral se llevó a cabo el control del peso de los

ratones cada tercer día, la evaluación del desarrollo tumoral se extendió hasta el día 21 posterior a la inoculación de las células, evaluando el volumen tumoral, peso final del tumor y posible metástasis, para establecer la curva de supervivencia, de implantación y desarrollo tumoral.

7.17. Análisis estadísticos

Los datos son representados como medias \pm desviación estándar. Las diferencias entre el grupo control y grupos experimentales fueron analizados usando una prueba de T- de student's, mientras que las diferencias entre los grupos determinaron mediante una ANOV one-way, analizados mediante el software GraphPad 8.

8. Resultados

8.1 Síntesis y caracterización

Para identificar la formación de Nps metálicas se utilizó espectroscopia UV-VIS para determinar el plasmón de resonancia superficial característico de las Nps de oro, al analizar la muestra al día 1, 26 y 31 se comprobó la estabilidad al presentar una absorbancia máxima a los 537 nm la cual se mantuvo constante desde el día uno con una intensidad de 0.6 UR (unidades relativas), hasta alcanzar 1.2 UR al día 31 (figura 1a). ya identificado el PRS lo siguiente fue determinar el tamaño de partícula, mediante dispersión de luz dinámica o DLS, de este modo se determinó que las AuLtNps comienzan en el día 1 de síntesis con un tamaño de 20 nm, pasando a 36.72 nm para el día 7, el cual se mantuvo para el día 18 y para el día 31 alcanzaron un tamaño de 77.39 nm, lo cual indica que el aumento de tamaño es dependiente del tiempo (figura 1b).

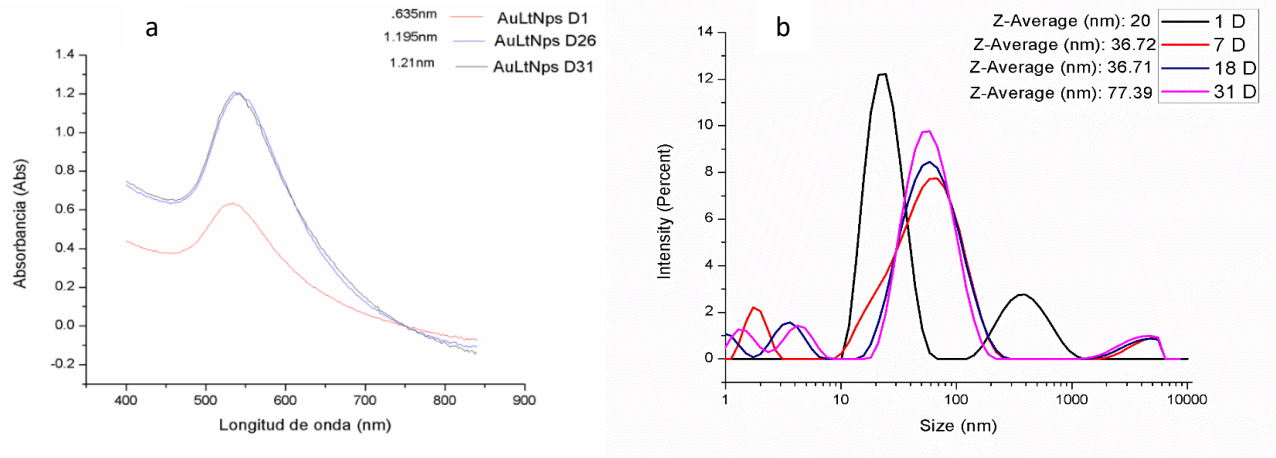


Figura 8. Espectro UV-VIS y tamaño de partículas

Representación gráfica correspondiente a la lectura de PRS (a) de la muestra de AuLtNps a los días 1 (rojo), 26 (azul) y 31 (gris) indicando la estabilidad de la síntesis. Representación gráfica de los tamaños obtenidos (b) de la muestra de AuLtNps a los días 1 con 20 nm (negro), 7 días con 36.72 nm (azul), 18 días con 36.371 nm (azul) y al día 31 con 77.39 nm (rosa).

El siguiente paso de la caracterización fue la determinación del potencial Z, este parámetro se determinó mediante DLS a los 1, 7, 18 y 31 días para determinar la estabilidad de la partícula en relación con el medio. Se identificó un aumento en la carga superficial de las AuLtNps dependiente del tiempo, al comenzar con una carga neta de -18.9 mV para el día 1, -20.1 mV para el día 7, -21.4 para el día 18 hasta llegar a -27.6 para el día 31 (tabla 3)

lo cual indica un aumento en la fuerza de repulsión de las partículas corroborando que no existe una aglomeración de las partículas a través del tiempo.

Tabla 3 Análisis de potencial Z de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral en un periodo de 30 días posteriores a la síntesis

Día post-síntesis	Potencial Z (mV):
1	-18.9
7	-20.1
18	-21.4
31	-27.6

Para poder observar la morfología de las AuLtNps se utilizó Microscopía electrónica de transmisión (TEM), de esta forma fue posible determinar la morfología y tamaño de las Nps al día 1 de síntesis. Se observó una morfología esférica y característica de partículas con núcleo metálico y recubiertas (figura 2a). Utilizando la imagen de microscopia se realizó un análisis de tamaño de partícula (figura 2b) identificando que la mayoría de las partículas se encuentran entre 9 y 16 nm.

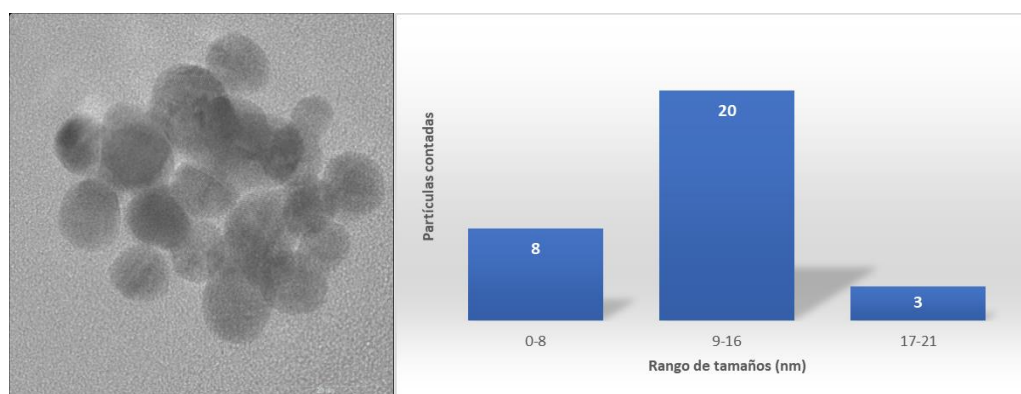


Figura 9 Microscopia electrónica de transmisión de AuLtNps. La muestra fue colectada al día 1 de síntesis, posteriormente se empleó una celda para su análisis por TEM, a la derecha se muestra la representación gráfica del conteo de partículas a partir de la microscopia

8.2 Determinación de la concentración de proteína en AuLtNPs

Se determinó la concentración de proteína en dos soluciones de Nps a pHs de 8.5 y 9, empleando un control de lisado tumoral, esto para determinar si el crecimiento de las nanopartículas que resulto ser dependiente del tiempo estaba relacionado con la concentración de proteína total. Al comparar la concentración de proteína de ambas síntesis en relación con el control se observó diferencia significativa la cual fue más evidente al día 31 de la evaluación. No se obtuvo una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre ambas síntesis, sin embargo, las nanopartículas obtenidas a pH 9 mostraron un ligero aumento en la concentración de proteína (figura 3).

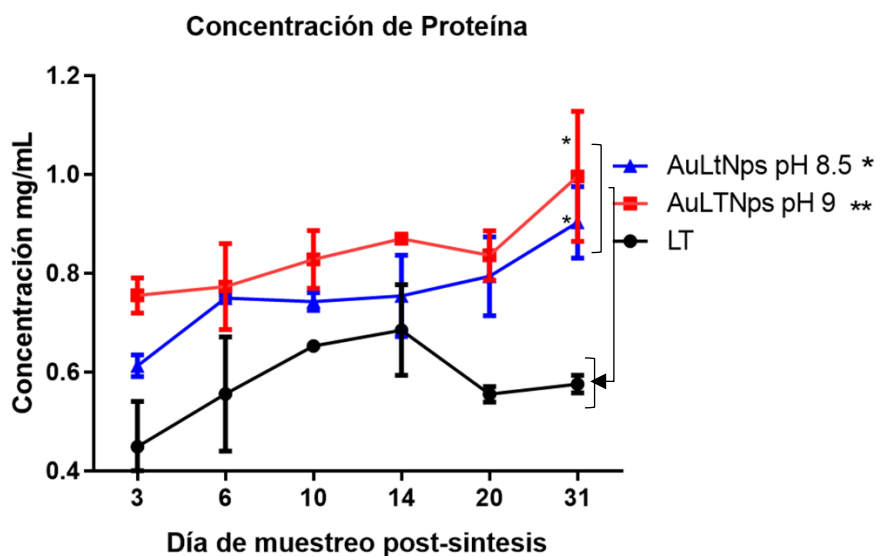


Figura 10 Concentración de proteína en AuLtNps

Se muestran dos síntesis de AuLtNps con 2 diferentes pH, a 8.5 en azul y a pH 9 en rojo, además se agregó un control de LT, es apreciable en el eje de las x los días de muestreo los cuales corresponden a los días 3, 6, 10, 14, 20 y 21 posteriores a la síntesis, en los cuales fue determinada la concentración de proteína de cada muestra, destacando que en el caso de ambas síntesis la concentración de proteína es mayor a la de LT desde el día 3

8.3 Determinación de la correlación entre PRS, tamaño, potencial Z y concentración de proteína en AuLtNps

Para determinar si efectivamente existía una correlación positiva entre el aumento de intensidad del PRS, incremento de tamaño de partícula, carga superficial y concentración de proteína de las AuLtNps (tabla 4), se realizó un análisis de correlación de Pearson mediante el paquete estadístico GraphPad 8, el cual indico que existe una correlación positiva entre todas las variables analizadas y que existe una fuerte correlación entre el tamaño y potencial Z (tabla 5).

Tabla 5. Resumen de datos obtenidos tras la medición a los días 1, 15 y 30 de las AuLtNps por espectroscopia UV-VIS (PRS), dispersión de luz dinámica (para tamaño y potencial z) y análisis de concentración de proteína (por BCA). Se aprecia como la estabilidad de las partículas de dependiente del tiempo al igual que su tamaño y concentración de proteína.

Día de muestreo	PRS (Abs)	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	Concentración de proteína mg/mL
1	.635	20	-18.9	0.6126
15	.865	36.7	-21.4	0.754
30	1.21	77.3	-27.6	0.902

Tabla 4. Análisis de correlación de Person

Correlation Pearson r	A	B	C	D
	PRS	Tamaño	Potencial Z	Concentración de proteína
PRS	1.000	0.993	-0.993	0.995
Tamaño	0.993	1.000	-1.000	0.975
Potencial Z	-0.993	-1.000	1.000	-0.976
Concentración de proteína	0.995	0.975	-0.976	1.000

8.4 Determinación de la citotoxicidad de AuLtNps en fibroblastos murinos (NIH)

Para determinar si las AuLtNps no presentan riesgo para las células fibroblásticas al momento de la inmunización se realizó un análisis de citotoxicidad a 24 horas de exposición con los siguientes tratamientos: LT (a), AuCsNps (b), H_{AuCl₄}(c) y AuLtNps (d) utilizando concentraciones que van desde 10 μ M hasta 400 μ M (figura 4). En todos los tratamientos se identificó una citotoxicidad dosis dependiente siendo las AuCsNps las cuales presentaron un efecto citotóxico mayor a partir de 70 μ M (b) seguidas por el H_{AuCl₄} el cual a altas concentraciones resulta ser altamente citotóxico (c), mientras que en el caso de las AuLtNps (d) se observa como permanece la viabilidad en concentraciones incluso de 400 μ M.

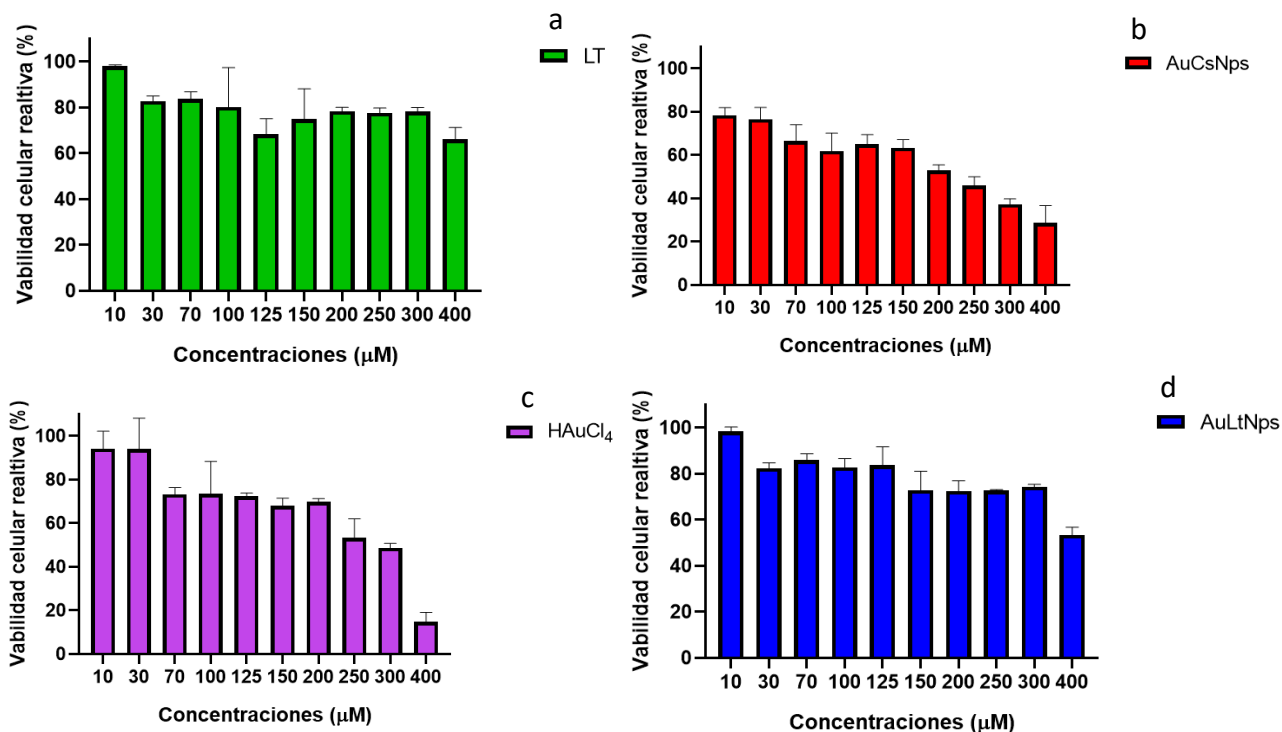


Figura 11 Análisis de viabilidad relativa en NIH a 24 horas de tratamiento. Se muestra la representación gráfica de un ensayo de viabilidad en células NIH expuestas a 4 diferentes tratamientos por 24 horas, en verde se muestra al grupo tratado con LT (a), en rojo el grupo tratado con AuCsNps (b), en morado el grupo tratado con H_{AuCl₄} (c) y en azul el grupo tratado con AuLtNps (d), en todos los casos se utilizaron concentraciones en μ M que van de 10 a 400, las cuales fueron tomadas en base a la cantidad de H_{AuCl₄} que presentan las síntesis de partículas y extrapoladas en volumen para el grupo de LT.

8.5 Determinación de la captación de AuLtNps en macrófagos intraperitoneales de ratón

Con la finalidad de identificar si las AuLtNps son captadas por macrófagos murinos, se realizó una extracción y cultivo de macrófagos intraperitoneales, los cuales fueron expuestos por 24 horas a los siguientes tratamientos LT+FITC, CsNps+FITC, CsNps+Lt+Fitc, AuLtNps+FITC y como control FITC (figura 5) posteriormente se removió el medio y fueron marcados con DAPI como contraste (puntos azules) para ser fijados y visualizados bajo el microscopio confocal. De esta manera se identificó que los macrófagos captaron con mayor eficiencia las AuLtNps en comparación al LT, al observar el traslape de los campos visuales se puede apreciar la fluorescencia del interior de la célula (AuLtNps) o que recubre por completo a los macrófagos peritoneales (CsNps+FITC) lo cual indica que existe una captación.

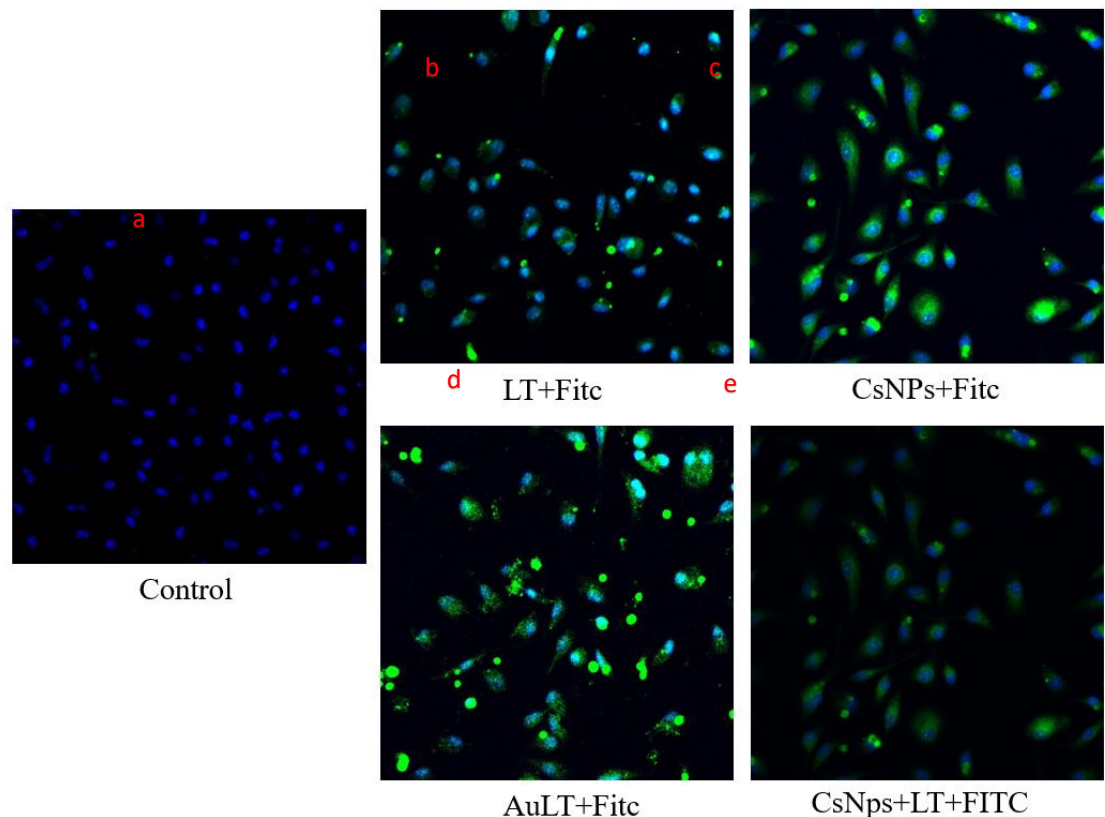


Figura 12 Microscopia confocal de macrófagos intraperitoneales expuestos a 24 horas de tratamientos. En verde se observa la fluorescencia de FITC mientras que en azul DAPI la cual marca el núcleo celular, a) control de células intraperitoneales de ratón sano, b) macrófagos peritoneales tratados por 24 horas con LT conjugado a FITC, c) macrófagos peritoneales tratados por 24 horas con AuCsNps conjugado a FITC, d) macrófagos peritoneales tratados por 24 horas con AuLtNps conjugado a FITC, e) macrófagos peritoneales tratados por 24 horas con AuCsNps+LT conjugado a FITC.

8.6 Presencia de citocinas proinflamatorias en suero de ratones 24 horas después de la segunda inmunización (día -13) y una semana después de la última inmunización (0).

Al analizar la secreción de citocinas en sueros de ratones después de 24 horas posteriores a la segunda inmunización (día -13) con los diferentes tratamientos, se observó que los ratones inmunizados con AuLtNps y LT+Ady presentaron una secreción mayor de citocinas proinflamatorias (IFN, TNF, IL-6, IL-10 e IL-12p70) mientras que para MCP-1 se vio una alta secreción en el grupo tratado únicamente con AuLtNps (Figura 6). Para determinar si la exposición prolongada a los diferentes tratamientos no provocaba un efecto inflamatorio crónico, se analizaron los sueros una semana después a la última inmunización (día 0), determinando que la secreción de IL-6, IL-10 e IFN no presentaban variación respecto al control, mientras que la secreción de TNF, IL-12p70 y MCP-1 presentaron variaciones respecto al control, sin embargo, la secreción de citocinas disminuyó respecto al día -13. Además, fue notorio un aumento en la secreción de IL-12p70 en todos los tratamientos a excepción del grupo control (Figura 7).

8.7 Evaluación de marcadores celulares en bazo de ratones inmunizados una semana después de la última inmunización (día 0).

Una semana después de la última inmunización (día 0) se sacrificaron 2 ratones por grupo a los cuales se les extrajo el bazo. Las células fueron disgregadas para posteriormente ser marcadas con anti-CD3, 4, 8, 22 y 34 con la finalidad de observar si se llevó a cabo una activación del linaje linfocitario después de las inmunizaciones y si esa respuesta perduraba. Se presentó un aumento en la proporción de células CD3, CD8, y CD22, mientras que la proporción de células CD34+ se mantuvieron constantes entre tratamientos, en el caso de la proporción de células CD3+ se observó un aumento significativo para todos los tratamientos a excepción del grupo con LT comparado con el control. La proporción de células CD8+ mostró una diferencia altamente significativa entre el tratamiento con AuLtNps en contra de todos los grupos, esto mismo paso en el caso del marcador CD22+ en el cual la proporción de células positivas para este marcador se vio incrementado hasta 3 veces más en comparación con los otros tratamientos (figura 8).

8.8 Análisis de la diferenciación de APCs en ganglios linfáticos de ratones inmunizados.

Después de una semana de la última inmunización se sacrificaron 3 ratones por grupo a los cuales les fueron extraídos los ganglios linfáticos periféricos, para ser perfundidos con PBS y obtener las diferentes poblaciones celulares. Estas células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD80, 11c, 11b, MHC-II y CD14, los cuales son marcadores de células presentadoras de antígeno (APCs).

Se identificó un aumento altamente significativo para CD80 entre los grupos de AuCsNps, AuLtNps, LT+Ady y AuCsNps+LT comparados con el control. Para la proporción de células CD86 solo existió una diferencia significativa para el grupo tratado con AuLtNps en relación al control. En el caso de la proporción de células CD11c+ y CD11b+ no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque si existió una variación entre todos. Las células con marcaje positivo para MHC II presentaron un aumento significativo en el grupo de AuLtNps comparados con el control y por último para el caso de las proporciones de células CD14+ se observó un aumento significativo en el grupo de AuLtNps comparado con el control en contraste con las células tratadas con AuCsNps, las cuales mostraron una disminución notable (figura 9).

24 horas después de la segunda inmunización.

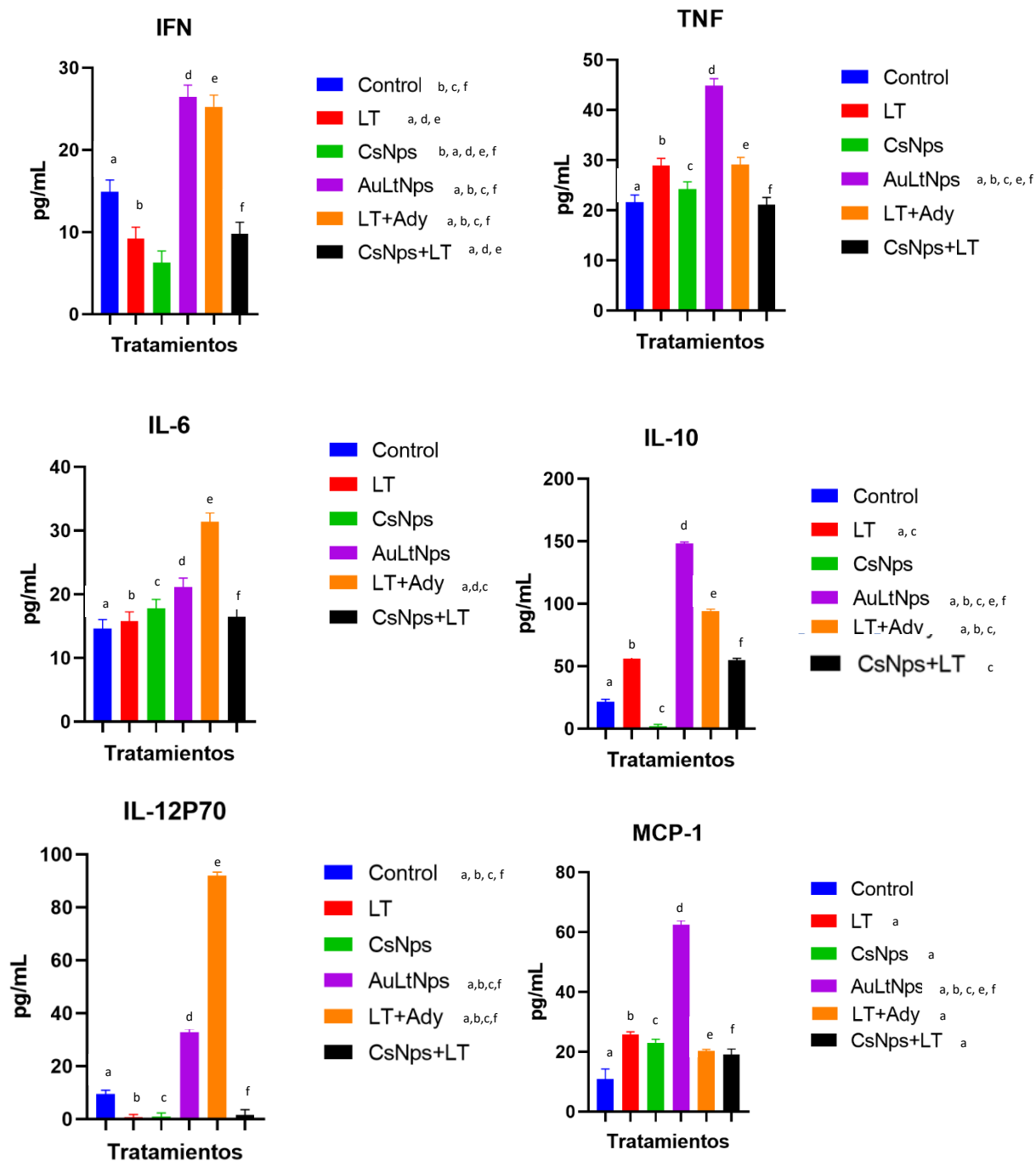


Figura 13 secreción de citocinas 24 después de la segunda inmunización (día -15)

Representación gráfica de las 6 citocinas proinflamatorias analizadas en los 6 grupos experimentales (Control, LT, CsNps, AuLtNps, LT+Ady y CsNps+LT). después de obtener la muestra de sangre de 3 ratones por grupo, se analizó la secreción de citocinas mediante el kit de CBA de la marca BD por citometría de flujo, los resultados son la media de los 3 ratones por grupo. La diferencia significativa entre grupos está representada con las letras con las cuales cada grupo presentó una diferencia estadística significativa $p \geq 0.05$.

Análisis una semana después de la última inmunización (día 0)

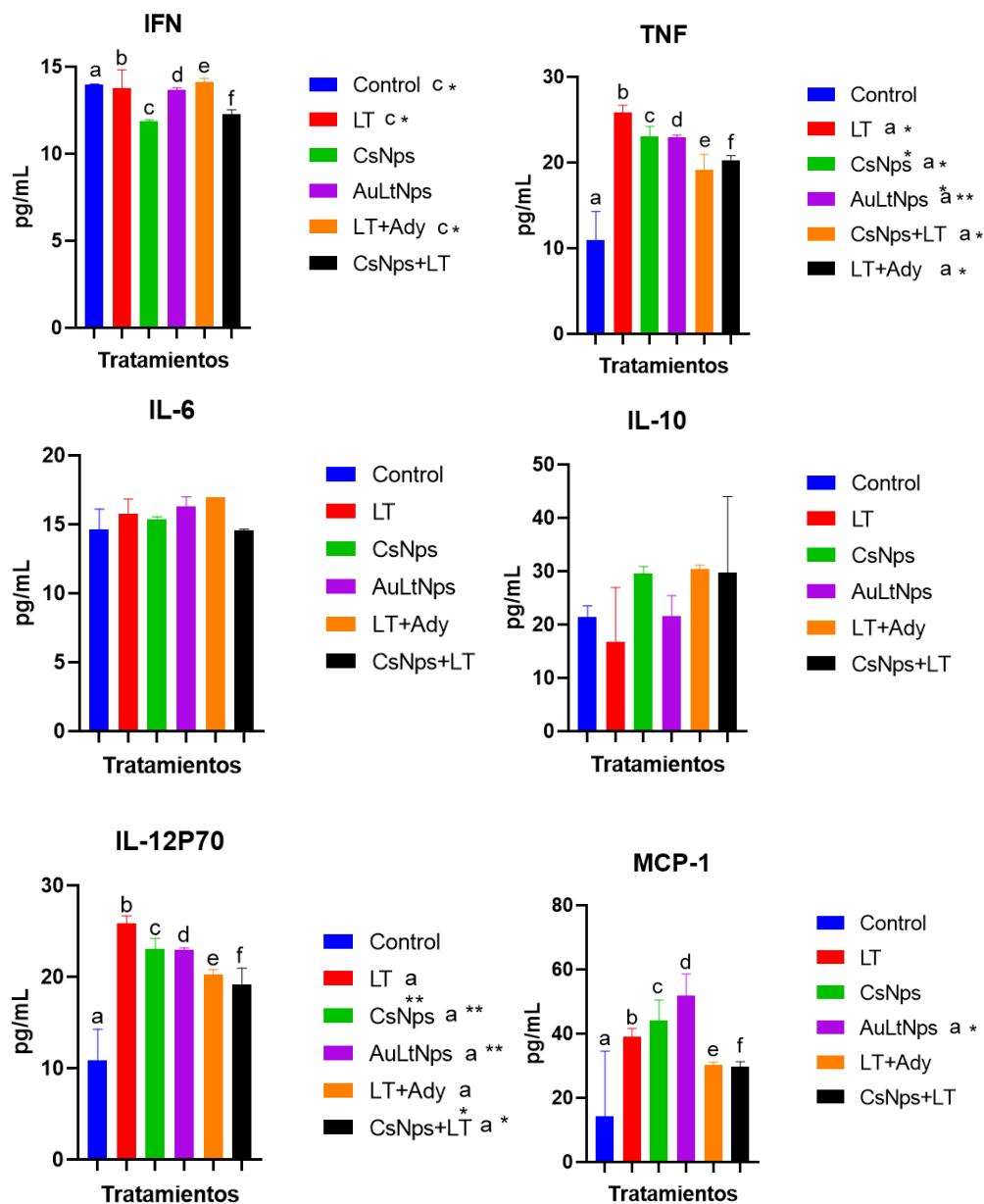


Figura 14. Secreción de citocinas una semana después de la última inmunización (día 0). Representación gráfica de las 6 citocinas proinflamatorias analizadas en los 6 grupos experimentales (Control, LT, CsNps, AuLtNps, LT+Ady y CsNps+LT). Después de obtener la muestra de sangre de 3 ratones por grupo, se analizó la secreción de citocinas mediante el kit de CBA de la marca BD por citometría de flujo, los resultados son la media de los 3 ratones por grupo. La diferencia significativa entre grupos está representada con las letras con las cuales cada grupo presentó una diferencia estadística significativa ≥ 0.05 .

Marcadores celulares en bazo de ratones inmunizados una semana después de la última inmunización (día 0).

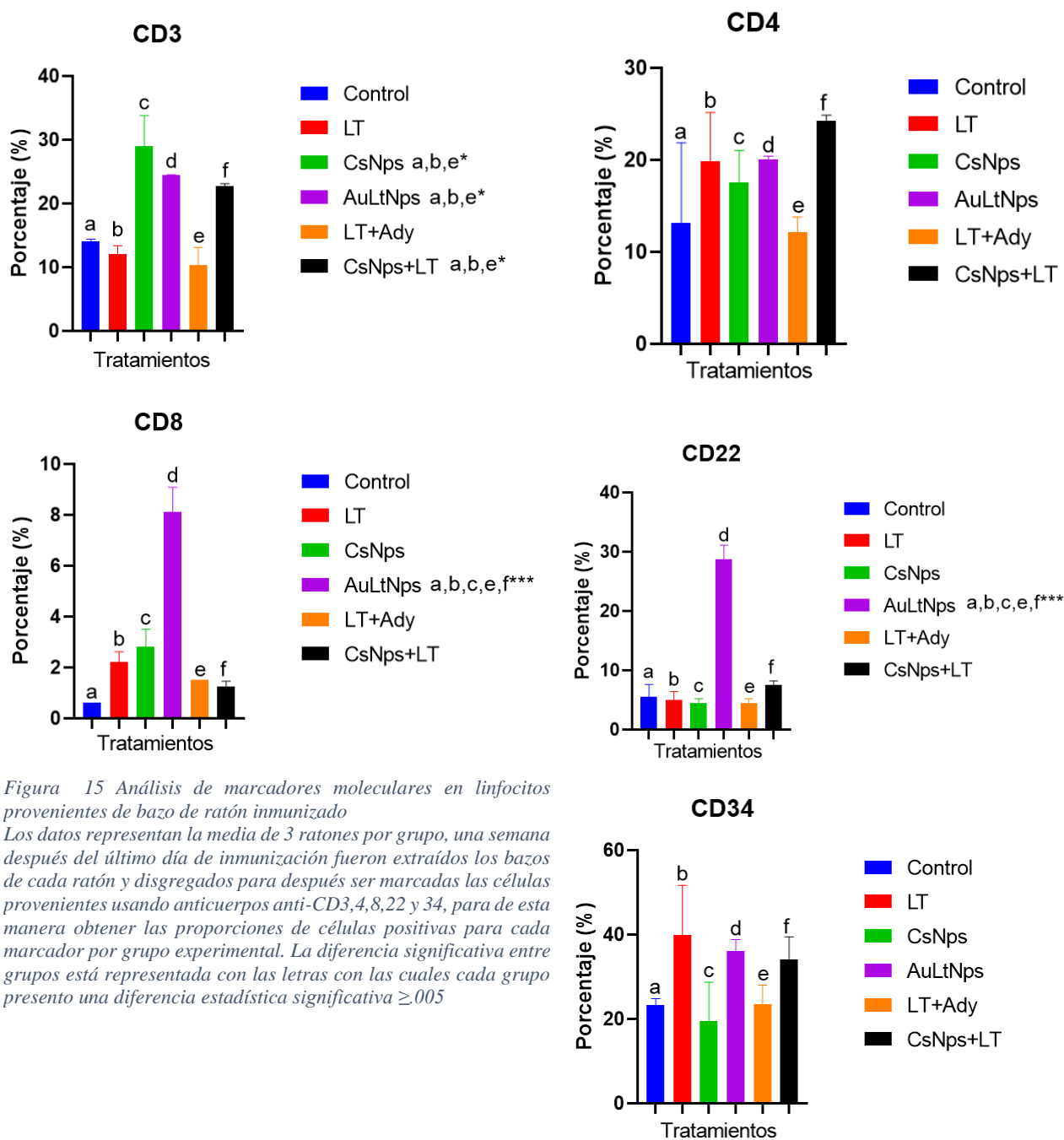


Figura 15 Análisis de marcadores moleculares en linfocitos provenientes de bazo de ratón inmunizado
 Los datos representan la media de 3 ratones por grupo, una semana después del último día de inmunización fueron extraídos los bazos de cada ratón y disgregados para después ser marcadas las células provenientes usando anticuerpos anti-CD3,4,8,22 y 34, para de esta manera obtener las proporciones de células positivas para cada marcador por grupo experimental. La diferencia significativa entre grupos está representada con las letras con las cuales cada grupo presento una diferencia estadística significativa $\geq .005$

Análisis de la diferenciación de APCs en ganglios linfáticos de ratones inmunizados al día 0.

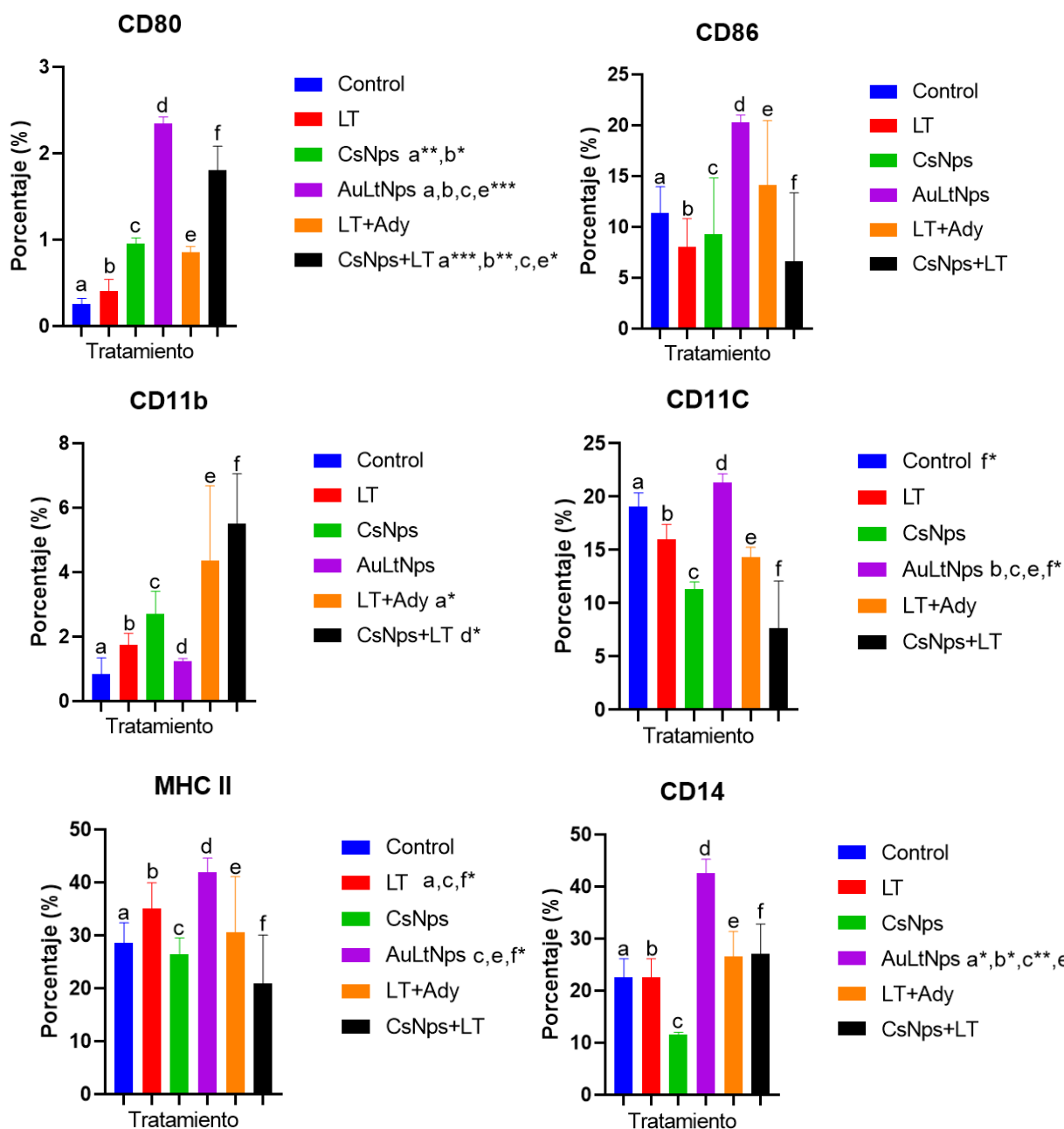


Figura 16 Análisis de marcadores moleculares en ganglios linfáticos provenientes de ratones inmunizado. Los datos representan la media de 3 ratones por grupo, una semana después del último día de inmunización fueron extraídos los ganglios linfáticos periféricos de cada ratón y disgregados para después ser marcadas las células provenientes usando anticuerpos anti-CD80, 86, 11b, 11c, 14 y MHC para de esta manera obtener las proporciones de células positivas para cada marcador por grupo experimental. La diferencia significativa entre grupos está representada con las letras con las cuales cada grupo presento una diferencia estadística significativa ≥ 0.05

8.9 Evaluación de la citotoxicidad específica de linfocitos T.

Después de identificar las proporciones de linfocitos T en bazo de ratones inmunizados se prosiguió a determinar la capacidad de lisis específica que presentaban los esplenocitos extraídos de bazos de ratones inmunizados al cultivarse en los radios 1:1, 1:10, 1:100 y 1:200 (4T1: esplenocitos). Después de mantenerse en incubación por 24 horas, se observó que no existía una diferencia significativa entre el grupo control y los tratamientos exceptuando al grupo de AuLTNps, en el cual el porcentaje de lisis específica alcanzó hasta el 40% para los radios de 1:100 y 1:200 (figura 10).

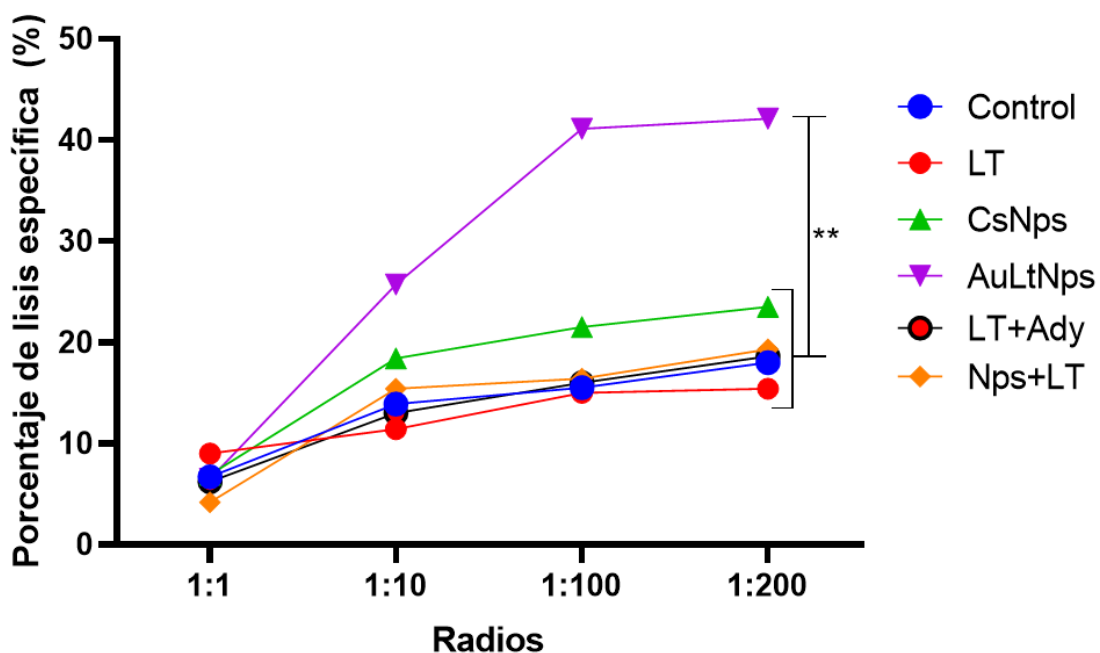


Figura 17 Citotoxicidad específica de linfocitos T provenientes de ratones inmunizados. Una semana después de la última inmunización a los ratones sacrificados con anterioridad se tomó una muestra de células provenientes de bazo las cuales fueron colocados en radios de 1:1, 1:10, 1:100 y 1:200 en contra de las células viables 4T1, las cuales estuvieron en contacto por 24 horas, en la gráfica se muestran los datos representativos de 3 experimentos independientes. $p \geq 0.05$

8.10 Efectividad antitumoral de AuLtNps en ratones Balb/C previamente inmunizados.

Para determinar el efecto antitumoral de los tratamientos se prosiguió a realizar el reto de tumor al inocular 5,000 células 4T1 viables en la zona mamaria de los ratones (ortotópico). Se registró como día de implantación tumoral el día en el cual el tumor fue palpable en la zona inoculada, para el grupo control la implantación se registró al día 7 en todos los ratones, para el grupo de LT el tumor se implanto al día 7 para 3 ratones y al 10 para 1, para el grupo de CsNps y LT+Ady se registró la implantación al día 6, mientras que para el grupo de CsNps+LT la implantación se observó hasta el día 10, para el grupo de AuLtNps no se registró una implantación (tabla 6) solo una leve inflamación en la zona de inoculación al segundo día de la misma (tabla 6).

Todos los grupos experimentales se mantuvieron en observación por un mínimo de 21 días, sin presentar cambios significativos en peso, pero si un deterioro apreciable de salud en algunos grupos experimentales, esto condujo al sacrificio del todos los individuos del grupo control al día 21, de igual manera sucedió con el grupo de LT los cuales fueron sacrificados al día 21 ya que presentaron metástasis. Para el grupo de CsNps un ratón murió al día 16 y los 3 restantes fueron sacrificados al día 28, en el caso de los ratones del grupo LT+Ady solo 2 ratones llegaron a los 27 días de vida mientras que 1 murió al día 5 y otro al 11. El grupo de CsNps+LT se sacrificó al día 18 debido al deterioro general que presentaban, Los 4 individuos tratados con AuLtNps sobrepasaron los 90 días sin presentar manifestaciones de aparición tumoral o metástasis (tabla 7. figura 11).

El grupo de los ratones control presentó un tiempo de vida medio de 21 días, mientras que para el grupo de LT fue de 20.5, para el grupo de CsNps de 16 días, en el caso del grupo de CsNps+LT y LT+Ady alcanzaron 28 y 27 días respectivamente, por último, el grupo de AuLtNps alcanzo los 90 días como tiempo de vida media (figura 12).

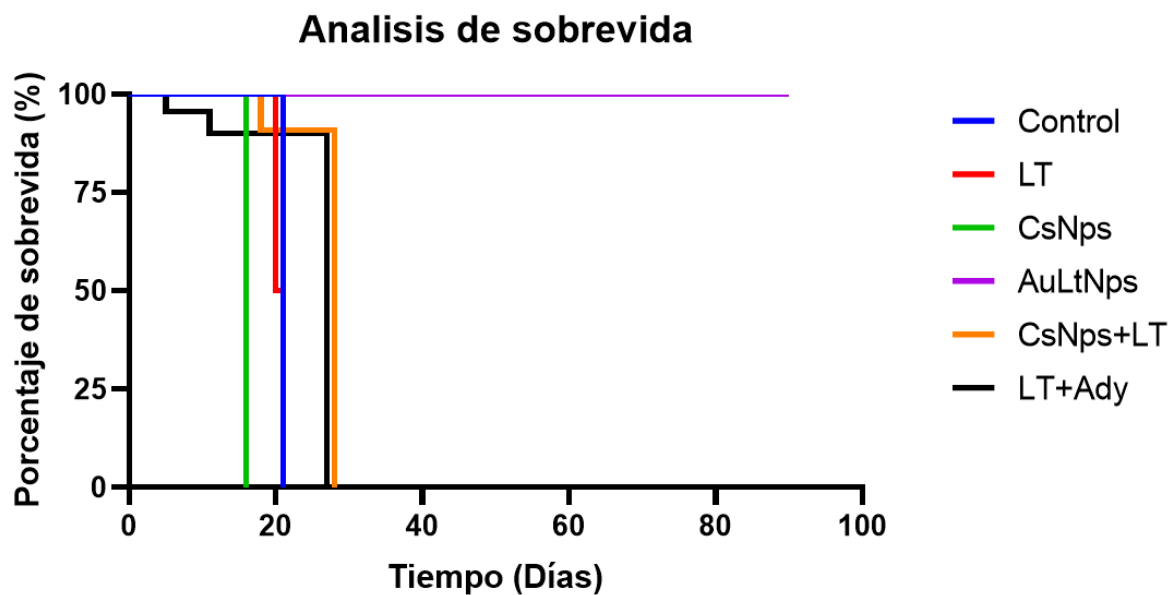
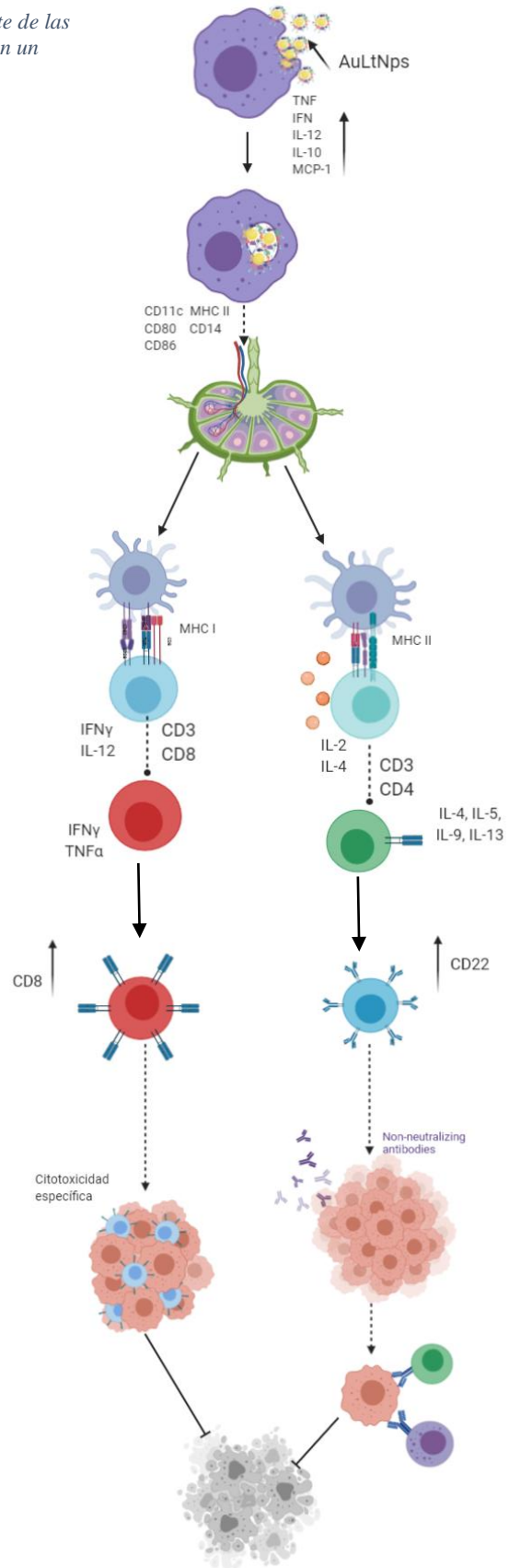


Figura 19 Tiempo de vida medio y análisis de sobrevivida
 Representación gráfica del tiempo de vida medio (4 ratones por grupo), se observa como el grupo que menos días sobrevivió fue el CsNps con 16 días, seguido del grupo LT y control con 20.5 y 21 días respectivamente, para el grupo de CsNps+LT y LT+Ady alcanzaron los 28 y 27 días respectivamente, mientras que el grupo de AuLtNps alcanzó los 90 días.

Figura 20 Modelo general de interacción por parte de las AuLNps y el sistema inmune innato y adaptativo en un modelo murino.



9 DISCUSIÓN

Se estandarizó caracterizó y evaluó un nuevo método de síntesis de nanopartículas de oro utilizando HAuCl_4 como metal precursor y lisado tumoral como agente reductor, este método a diferencia de los existentes permite generar partículas estables con el uso de estos dos agentes únicamente, simplificando el proceso de obtención y los precios involucrados en la misma, el primer parámetro a analizar fue el plasmón de resonancia superficial (PRS) característico de partículas metálicas, se observó una longitud máxima de absorción a 538 nm, lo cual indica un desplazamiento a la derecha del plasmón característico del oro en estado nanométrico (520 nm), el cual se ha reportado para síntesis con compuestos biológicos o Nps de oro funcionalizadas con péptidos o proteínas (Amendola, Pilot, Frasconi, Maragò, & Iatì, 2017), además aumenta la intensidad de la absorbancia conforme pasa el tiempo lo cual indica incremento en el rendimiento de reacción, el cual alcanza su máximo a los 30 días posteriores a la síntesis. Correspondiente al aumento en intensidad del PRS ocurre algo similar con el tamaño de partícula iniciando en 20 nm, pasando por los 36 nm hasta alcanzar 77 nm para el día 30, lo cual indica un aumento dependiente del tiempo post-síntesis el cual presenta una correlación positiva con el PRS y la carga de partícula (Person ≤ 0.05). Al observar el incremento en potencial Z (Carga neta de la partícula) fue de -18.9 mV y a los 30 días alcanzo una carga de -27.6 mV lo cual indica que esta síntesis auto controla la estabilidad de las partículas aumentando las fuerzas de repulsión entre ellas sin utilizar un agente estabilizador (Lévy, Shaheen, Cesbron, & Sée, 2010),. Para corroborar la formación de las Nps y observar su morfología se realizó una microscopia electrónica de transmisión (TEM) en la cual se aprecian las Nps con un tamaño entre 9 y 16 nm al día 1 de síntesis, además es notoria la presencia de un recubrimiento de origen proteico por secciones más oscuras y claras alternadas, la variación de tamaño entre DLS y TEM es un fenómeno común que ocurre por el secado de la muestra (Kozlowski, Ragupathi, & Dyer, 2018), en este caso la variación entre los tamaños del día 1 (DLS vs TEM) es de apenas 4 nm. Para corroborar si el aumento de tamaño se debía a una mayor captación de proteína libre por parte de las partículas, se analizó la concentración de proteína en la solución de Nps a diferentes días por el transcurso de un mes, de esta manera se demostró al

comparar las Nps con la solución de LT que desde el día 1 de síntesis la solución de Nps presentaba una mayor concentración de proteína, la cual fue aumentando a medida que pasaba el tiempo, comenzando en 0.8 mg/mL hasta alcanzar cerca de 1 mg/mL al día 30, este fenómeno de captación de proteína por la partícula es conocido como corona de proteínas; en este fenómeno la carga neta de la partícula atrae proteínas de la solución con carga opuesta, esta interacción forma la capa dura, después las proteínas más externas de las Nps interaccionan con otras proteínas lo cual forma la capa blanda, aunque estas interacciones no son permanentes las cargas presentes en la partícula indican que es suficiente para mantener la solución en condiciones estables mientras se mantengan las condiciones iniciales, esto explica el incremento de la concentración de proteína conforme pasa el tiempo aunque no se agregue más proteína a la muestra (Lundqvist et al., 2011; Pino et al., 2014), un fenómeno similar fue observado en la concentración de ADN o RNA por un polímero catiónico (Günel et al., 2018; Kondinskaia & Gurtovenko, 2018). Aunque en principio este fenómeno de captación de proteínas podría ser malo para liberación controlada de moléculas, para este caso específico resulta ser conveniente, debido a que al encontrarse mayor cantidad de proteínas (antígenos) en las nanopartículas, al ser fagocitadas por las APCs permite la absorción de más variantes antigénicas confinados en una nanopartícula.

Para establecer si en realidad las AuLtNps se captaban por las APCs se realizó un análisis de captación en el cual macrófagos intraperitoneales fueron expuestos a LT, AuLtNps, AuCsNps y AuCsNps+LT para determinar si el efecto de captación se debía a las Nps o al LT. Se observó que aunque el lisado tumoral es captado normalmente por los macrófagos intraperitoneales este efecto se vio potenciado al utilizar nanopartículas de AuLtNps y AuCsNps, sin embargo, al combinar AuCsNps+LT la captación fue menor en relación a las AuLtNps, esto fue demostrado por microscopia confocal al tomar los campos focales en Z se observa como en las células tratadas con AuLtNps presentan una interferencia en la fluorescencia, lo cual no ocurre para el tratamiento de AuCsNps pero sí para LT, lo cual sugiere que esta distorsión o interferencia es una señal que proviene del interior de la célula y no de la superficie celular, además, se observa claramente el traslape al usar DAPI para núcleo el cual al

combinarse con el verde forman el color celeste que es apreciado en las células tratadas con LT y AuLtNps pero no en las AuCsNps lo cual es similar a lo reportado por Gao-Na Shi y colaboradores en el 2016 (G. N. Shi et al., 2017). Este experimento corrobora la interacción entre las AuLtNps y las APCs.

Para establecer si al inmunizar un ratón de la cepa Balb/c se presentaban indicios de un montaje de la respuesta inmune, los sueros de los ratones 24 horas después de la segunda inmunización (día -13) fueron analizados, observado un aumento en la secreción de IFN, IL-10 e IL-12p70 para el grupo de AuLtNps y LT+Ady, mientras que TNF y MCP-1 solo presento un aumento significativo en el grupo AuLtNps respecto a todos los grupos, los valores de IL-6 solo presentaron un aumento en el tratamiento con LT+Ady respecto a todos los grupos. El incremento en la secreción de IFN mejora la actividad tumoricida mediada por monocitos y otras células del sistema inmune (Bekisz et al., 2013). La liberación de TNF por macrófagos parece ser crucial para la formación y mantenimiento de granulomas y juega un papel crítico en la defensa de los organismos intracelulares contra la invasión. El TNF también participa en el tráfico de leucocitos y la eliminación de complejos inmunitarios. El papel del TNF en el cáncer no se conoce completamente, pero parece estar relacionado con sus diferentes concentraciones en las distintas etapas de la tumorigénesis. Un aumento en la secreción de IL-10 está relacionado con la proliferación de células T CD8+ murinas y al combinarla con IL-2 aumenta su actividad citolítica, además estudios *in vitro* han demostrado que los efectos coestimuladores de la IL-10 a la par de la inmunización con antígenos promueve la proliferación de células T específicas de antígeno, tanto antes como después de la inmunización antigénica, además se ha asociado el aumento de perforina intracelular en células expuestas a IL-10. Aunque se ha relacionado la secreción de IL-10 con anergia de células T específico de antígeno se ha demostrado que presenta una correlación entre la alta secreción de IL-10 y una baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, (MHC II) en las APCs inhibiendo la vía de estimulación MHC-CD28 en células T (IL-10), lo cual no sucede en el caso de los ratones inmunizados con AuLtNps al presentar hasta un 40% de MHC II positivas lo cual se relaciona con una activación de la inmunidad humoral y presentación de antígeno activa. La secreción de IL-12p70 es determinante

en la inmunidad celular y humoral, producida principalmente por APCs, induce producción de interferón y desencadena la activación de células T CD4+ con fenotipo de Th1, además juega un papel importante en el tráfico y la migración de células T induciendo moléculas de adhesión funcional, como la expresión del ligando de selectina P y E en células Th1, las cuales son reclutadas selectivamente en sitios donde se necesitan respuestas inmunes del tipo Th1 (Hamza, Barnett, & Li, 2010).

Solo el grupo de ratones inmunizados con LT+Ady presentaron una alta secreción de IL-6 la cual está asociada a la maduración final de células B productoras de anticuerpos, aunque también se le ha asociado con la inducción de crecimiento y diferenciación de células T (Naseem, Iqbal, & Munir, 2016), efecto que se observa, comúnmente al utilizar tioglicolato el cual estimula la producción de macrófagos inflamatorios que promueven una liberación de IL-6 y otras citocinas al estar en presencia de un antígeno para montar la presentación del mismo (Deshmane, Kremlev, Amini, & Sawaya, 2009). En el caso del grupo de ratones inmunizados con AuLtNps se observó una alta secreción de MCP-1 la cual es clave en la regulación de la migración y la infiltración de monocitos/macrófagos, se ha demostrado que esta estimulación promueve la migración de monocitos al torrente sanguíneo a través del endotelio vascular, proceso fundamental de la vigilancia inmunológica y típico de una respuesta inflamatoria (MCP-1). Al analizar los sueros de los ratones una semana después de la última inmunización se observó que los niveles de IFN, IL-6, IL-10, se normalizaron con respecto al control sin tratar, mientras que la secreción de TNF, IL-12p70 y MCP-1 no presentaba diferencia entre grupos pero si contra el control, siendo MCP-1 la que presentaba mayores niveles de secreción en el grupo de AuLtNps lo cual se podría relacionar con un proceso de inmunovigilancia activo para este grupo y en menor medida para los restantes incluido el control (Brown et al., 2007).

Con el fin de identificar si el protocolo de inmunización generó un efecto generalizado sobre el sistema inmune se analizaron los ganglios linfáticos periféricos y los bazo de los ratones tratados de cada grupo, las células extraídas de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados con AuLtNps mostraron un incremento evidente en la proporción de células CD80+, CD86+, CD14+ y MHCII+ además de una baja en la proporción de células CD11b, lo cual indica que una semana después de la última

inmunización aún se presentan indicios de una maduración de APCs al comparar las proporciones entre el control y el tratamiento, además se observó un aumento en la proporción de células CD80+, Cd11b, CD11c, CD14 y MHCII en los ratones inmunizados con AuCsNps y AuCsNps+LT aunque fueron menores los porcentajes al compararlos contra AuLtNps sin presentan diferencia en relación al control, lo que evidencia que parte del efecto de activación es mediado por las AuNps, y se potencia al conjugar LT con las mismas, esto posiblemente se debe a que las AuLtNps generan un sistema de activación combinado mejorando la captación del lisado tumoral en conjunto con el efecto inmunomodulador de la partícula por si misma

Algo a considerar es que, aunque el LT no modifico significativamente el porcentaje de APCs activadas, se observó un aumento de MHC II lo cual indica que existe o existió un proceso de presentación de antígeno en ganglios linfáticos periféricos. El análisis de los exudados de bazo de los mismos grupos experimentales mostraron un aumento en el porcentaje de células CD3+ para AuLtNps, AuCsNps y AuCsNps+LT, lo cual indica una activación de linfocitos T, por otro lado aunque si existió una variación en las células CD4+ presentes en el bazo no hubo diferencia significativa entre grupos, sin embargo, al analizar el porcentaje de células CD8+ las cuales se catalogan como linfocitos T citotóxicos, solo se encontraron altos porcentajes en bazo de ratones inmunizados con AuLtNps, duplicando incluso el porcentaje de este tipo celular en los demás grupos, otro indicio que muestra la correcta activación de la inmunidad humoral es el alto porcentaje de células CD22+ que se obtuvo solo para el grupo tratado con AuLtNps lo cual indica una alta presencia de linfocitos B maduros en bazo.

Para desarrollar el estudio *in vivo*, fue necesario identificar si el incremento en la población de linfocitos T CD8+ presentaba especificidad contra la línea celular 4T1, con la cual se realizaría el ensayo de reto de tumor, al colocar en un cocultivo los linfocitos provenientes de los bazo de todos los grupos experimentales en contra de la línea celular 4T1 a diferentes radios (1:1, 1:10, 1:100 y 1:200) se observó que solo los exudados de bazo provenientes de los ratones tratados con AuLtNps presentaban lisis específica a partir del radio 1:10 con un 25 % hasta alcanzar cerca de un 40% de lisis en contra de la línea celular 4T1 al radio 1:100, mientras que los exudados

provenientes de los bazos de AuCsNps, LT y AuCsNps+LT presentaron entre un 15 y 20% de lisis específica al radio 1:200 en contraste con el control que se mantuvo muy cerca al 10% desde el radio 1:1 hasta el 1:200. Estos resultados indican que después de un periodo de inmunización con AuLtNps se monta un procesamiento de antígenos activando APCs y presentando el antígeno a linfocitos T los cuales reconocen el antígeno y se activan siendo ahora específicos de antígeno encontrándose en órganos linfoides y en circulación sanguínea (Guermontprez, Valladeau, Zitvogel, Théry, & Amigorena, 2002), por lo que, al momento de tomar el exudado de bazo estarán presentes estos linfocitos específicos de antígeno en este caso específicos en contra de la línea celular 4T1 (Dranoff, n.d.). Posterior a esto se prosiguió a montar el ensayo de reto de tumor en el cual se evaluó el tiempo de implantación tumoral y la sobrevida de los grupos experimentales previamente inmunizados, el tumor fue inoculado con 500,000 células viables de la línea 4T1 de manera ortotópica en la mama inferior de las ratonas (Zhang et al., 2018). En el grupo control se detectó la implantación tumoral al día 7, en el caso del grupo de LT fue al día 7 (n=1) y día 10 (n=3), en el grupo de AuLtNps no se presentó una implantación tumoral detectable a la vista o al tacto para ninguno de los individuos, mientras que para los grupos de AuCsNps y LT+Ady se detectó la implantación en el día 6, por último, el grupo de AuCsNps+LT presento la implantación al día 9 (n=4). Se puede destacar que el único tratamiento que tuvo efecto de inhibir la implantación tumoral fue el expuesto a las AuLtNps, mientras que al utilizar la mezcla de AuCsNps+LT se aplazó 3 días la implantación tumoral comparado con el grupo de Nps solas (AuCsNps) al igual que al control por 2 días. Otro detalle importante es que el grupo de LT no mostro homogeneidad, ya que no presentan el mismo efecto en todos los sujetos de estudio (González et al., 2014). El tiempo de sobrevida en este ensayo estuvo delimitado por la aparición de metástasis y el decaimiento de los animales de estudio lo cual llevo a sacrificio a la mayoría de los grupos experimentales, en el caso del grupo control y LT todos los animales fueron sacrificados al día 21 debido a las condiciones de metástasis que presentaban, principalmente a cavidad peritoneal, mientras que el grupo de AuCsNps llego a los 18 días para los 4 ratones utilizados. El grupo de AuCsNps+LT tres ratones murieron al día 16 y uno hasta el día 28 y el grupo de LT+Ady presento alta variabilidad ya que

un ratón murió al día cinco, otro al 11 y dos llegaron al día 27, se cree que el ratón que murió al día cinco y 11 fue a causa de una hiper reacción en contra de las células tumorales ya que solo se detectó metástasis en los ratones sacrificados al día 27 sin embargo es necesario hacer más análisis para comprobarlo. Al realizar el análisis de sobrevivencia para los grupos experimentales, control, LT, AuCsNps, AuLtNps, AuCsNps+LT y LT+Ady se determinó como tiempo de vida media los siguientes: 21, 20.5, 16, 90, 28, 27 respectivamente, de lo cual destaca que el hecho de utilizar la mezcla de AuCsNps+LT presenta una efectividad similar al utilizar un adyuvante como el tioglicolato para potenciar la inmunidad del ratón, además se presenta un efecto ya reportado con anterioridad en donde al utilizar AuCsNps sin ningún recubrimiento no presentaron efecto alguno sobre el crecimiento y desarrollo tumoral, al contrario solo redujeron el tiempo de vida medio del grupo experimental. Para el grupo de ratones inmunizados con AuLtNps se tomó como fecha límite los 90 días posteriores a la inoculación del tumor debido a la edad de los ratones, pero cabe destacar que no se encontraron indicios de desarrollo tumoral o metástasis en este grupo experimental.

Los datos en conjunto evidencian que el aumento de células presentadoras de antígeno para los grupos de AuLtNps, AuCsNps y LT+Ady correlacionan con un tiempo de sobrevivencia mayor al igual que el patrón de proinflamación que mostraban al secretar TNF, IL-12p70 y MCP-1 tanto a las 24 horas como una semana después de la última inmunización. Las AuLtNps mostraron un perfil proinflamatorio de secreción de citocinas presentando un aumento en su población de linfocitos T CD3, CD8+ y CD3, CD4+, además de un incremento en la proporción de células CD22+, lo que sugiere que las nanopartículas obtenidas empleando lisado tumoral como agente reductor generan una activación de la inmunidad humoral a la par de la celular, lo cual permitiría utilizar esta síntesis como una alternativa terapéutica real, para disminuir los casos de reincidencia de cáncer en pacientes que acaban de pasar por una remoción tumoral quirúrgica.

10 CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral, llegando a presentar un tamaño de hasta 73 nm, un PRS a 538 nm y potencial Z de -27 m/V demostrando así la estabilidad obtenida. Se identificó que la concentración de proteína en solución aumenta a la par del tiempo de síntesis confirmando que el crecimiento de las Nps se debe a la carga de proteínas en su superficie. Se corroboró la captación de las AuLtNps por parte de macrófagos intraperitoneales de ratón, la cual es mayor a la presentada por el LT libre. Se identificó la presencia de citocinas proinflamatorias en sueros de ratón inmunizados con AuLtNps, AuCsNps+LT y LT+Ady lo cual indica una correcta estimulación después del periodo de inmunización, además los datos correlacionan con altos porcentajes de linfocitos CD3, CD4, y CD34+, mientras que para el grupo de ratones tratados con AuLtNps se presentó un alza en linfocitos CD8+ y CD22+ esto en esplenocitos extraídos de bazo. Una confirmación de la correcta estimulación a partir del periodo de inmunización fue el incremento en APCs CD14, CD80, CD86 y MHC II +, las cuales se encargan del procesamiento antigénico y la presentación de este a los linfocitos T. Al evaluar el efecto antitumoral de las AuLtNps fue contrastante la nula implantación tumoral en un modelo murino previamente inmunizado y posteriormente inoculado con células 4T1 viables. Por lo cual las nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral potencian la presentación de antígenos y maximizan la respuesta producida por el sistema inmune innato y adaptativo previniendo la implantación tumoral.

11 PERSPECTIVAS

- Determinar los efectos de la interacción de nanopartículas sintetizadas a partir de lisados tumorales, con APCs, LT, LB y células sanas in vitro.
- Identificar los órganos en los cuales se acumulan diversos tipos de partículas de oro dependiendo del agente reductor en un modelo murino.
- Obtener una síntesis estable a partir de un lisado tumoral extraído de un tumor implantado en un modelo murino, para confirmar la traslación del método de síntesis al área clínica.
- Esclarecer el mecanismo de presentación de antígenos al utilizar nanopartículas como acarreadores de estos.

Bibliografía

- Ahn, S., Lee, I., Kang, S., Kim, D., Choi, M., Saw, P. E., ... Jon, S. (2014). Gold Nanoparticles Displaying Tumor-Associated Self- Antigens as a Potential Vaccine for Cancer Immunotherapy. *Materials Views*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300597>
- Alam, R. (1998). A Brief Review of the Sympathomimetica. *ALLERGY AND IMMUNOLOGY*, 25(1), 727–738. <https://doi.org/10.1272/jnms1923.19.1>
- Alonso, S., Célix, S., Alonso, J., Valledor, R., Torre, D., Castellanos, S. A., ... De, M. (2014). Efectos adversos metabólicos y nutricionales asociados a la terapia biológica del cáncer. *Nutrición Hospitalaria*. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.2.7023>
- Amendola, V., Pilot, R., Frasconi, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics Condensed Matter*, 29(20). <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>
- American Cancer Society. (2019). Cancer Facts & Figures 2019. *American Cancer Society*.
- Arce-salinas, C., Lara-medina, F. U., Alvarado-miranda, A., Castañeda-soto, N., Bargalló-rocha, E., Ramírez-ugalde, M. T., ... Mohar-betancourt, A. (2012). Evaluación del tratamiento del cáncer de mama en una institución del tercer nivel con el Seguro Popular , México. *Revista de Investigación Clínica*, 64, 9–16.
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>

- Bekisz, J., Sato, Y., Johnson, C., Husain, S. R., Puri, R. K., & Zoon, K. C. (2013). Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 33(4), 154–161. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0167>
- Boraschi, D., Costantino, L., & Italiani, P. (2012). Interaction of nanoparticles with immunocompetent cells : nanosafety considerations. *Nanomedicine*, 7, 121–131.
- Brown, C. E., Vishwanath, R. P., Aguilar, B., Starr, R., Najbauer, J., Aboody, K. S., & Jensen, M. C. (2007). Tumor-Derived Chemokine MCP-1/CCL2 Is Sufficient for Mediating Tumor Tropism of Adoptively Transferred T Cells. *The Journal of Immunology*, 179(5), 3332–3341. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.3332>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–325. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Dranoff, G. (n.d.). *GM-CSF-based cancer vaccines*. (5), 147–154. Elsevier Mosby, M. (2012). Chapter 5 Antigen-Presenting Cells. In *In Immunology for Pharmacy* (pp. 45–55). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06947-2.10005-7>
- Gan, J., Du, G., He, C., Jiang, M., Mou, X., Xue, J., & Sun, X. (2020). Tumor cell membrane enveloped aluminum phosphate nanoparticles for enhanced cancer vaccination. *Journal of Controlled Release*, 326(April), 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.008>
- González, F. E., Gleisner, A., Falcón-Beas, F., Osorio, F., López, M. N., & Salazar-Onfray, F. (2014). Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*,

- 10(11), 3261–3269. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.982996>
- González, F. E., Gleisner, A., Falcón-beas, F., Osorio, F., López, M. N., Salazar-onfray, F., ... Mercedes, N. L. (2015). Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Human Vaccines & Immunotherapeutics ISSN:*, 5515.
<https://doi.org/10.4161/21645515.2014.982996>
- Gross, B. P., Wongrakpanich, A., Francis, M. B., Salem, A. K., & Norian, L. A. (2014). A Therapeutic Microparticle-Based Tumor Lysate Vaccine Reduces Spontaneous Metastases in Murine Breast Cancer. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 16(6), 1194–1203.
<https://doi.org/10.1208/s12248-014-9662-z>
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 20(February 2002), 621–667.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828>
- Günel, G., Kip, Ç., Eda Öğüt, S., İlhan, H., Kibar, G., & Tuncel, A. (2018). Comparative DNA isolation behaviours of silica and polymer based sorbents in batch fashion: monodisperse silica microspheres with bimodal pore size distribution as a new sorbent for DNA isolation. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(1), 178–184.
<https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1304404>
- Hamza, T., Barnett, J. B., & Li, B. (2010). Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(3), 789–806.
<https://doi.org/10.3390/ijms11030789>
- Jang, J., Lim, D., & Choi, I. (2010). The Impact of Nanomaterials in Immune System. *Immune Network*, 10(3), 85–91.

<https://doi.org/10.4110/in.2010.10.3.85>

Joshi, V. B., Geary, S. M., Gross, B. P., Wongrakpanich, A., Norian, L. A., & Salem, A. K. (2015). Tumor lysate-loaded biodegradable microparticles as cancer vaccines. *NIH*, *13*(1), 9–15.

<https://doi.org/10.1586/14760584.2014.851606>.Tumor

Justine D. Mintern. (2018). Introduction to the Special Issue :

Nanomaterials in Immunology. *Molecular Immunology Journal*, *98*(Introduction to the Special), 5890.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.04.012>

Kantha, S. S. (1990). A Centennial Review; the 1890 Tetanus Antitoxin Paper of von Behring and Kitasato and the Related Developments. *El Keio Journal of Medicine*, 35–39.

Kishimoto, T. K., & Maldonado, R. A. (2018). Nanoparticles for the induction of Antigen-Specific immunological Tolerance. *Frontiers in Immunology*, *9*(February). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00230>

Kondinskaia, D. A., & Gurtovenko, A. A. (2018). Supramolecular complexes of DNA with cationic polymers: The effect of polymer concentration. *Polymer*, *142*, 277–284.

<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.03.048>

Kozlowski, R., Ragupathi, A., & Dyer, R. B. (2018). Characterizing the Surface Coverage of Protein-Gold Nanoparticle Bioconjugates. *Bioconjugate Chemistry*, *29*(8), 2691–2700.

<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00366>

Lebien, T. W., & Tedder, T. F. (2019). B lymphocytes : how they develop and function. *Blood*, *112*(5), 1570–1581. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>.

Lévy, R., Shaheen, U., Cesbron, Y., & Sée, V. (2010). Gold nanoparticles

- delivery in mammalian live cells: a critical review. *Nano Reviews*, *1*(1), 4889. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.4889>
- Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggård, T., Flanagan, M. B., Lynch, I., ... Dawson, K. (2011). The evolution of the protein corona around nanoparticles: A test study. *ACS Nano*, *5*(9), 7503–7509. <https://doi.org/10.1021/nn202458g>
- Luo, Y., Chang, L. W., & Lin, P. (2015). Metal-Based Nanoparticles and the Immune System : Activation , Inflammation , and Potential Applications. *Hindawi Publishing Corporation*, 12.
- Milani, A., Sangiolo, D., Aglietta, M., & Valabrega, G. (2014). Recent advances in the development of breast cancer vaccines. *Dove Press Journal: Breast Cancer: Targets and Therapy*, 159–168.
- Naseem, S., Iqbal, R., & Munir, T. (2016). Role of Interleukin-6 in Immunity : A Review. *International Journal of Life Sciences Research*, *4*(2), 268–274.
- Neller, M. A., López, J. A., & Schmidt, C. W. (2008). Antigens for cancer immunotherapy. *Seminars in Immunology*, *20*, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2008.09.006>
- Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., & Orba, Y. (2013). Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform : Influence of Size and Shape on Immunological Responses In Vitro and In Vivo Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform : Influence of Size and Shape on Immunological Responses In Vitro and In Vivo. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/nn3057005>
- OMS. (2016). Sueros e inmunoglobulinas. *Formulario Modelo de La OMS*, *1*, 20–60.
- Paulo, J., Almeida, M., Lin, A. Y., Langsner, R. J., Eckels, P., Foster, A. E.,

- & Drezek, R. A. (2013). In Vivo Immune Cell Distribution of Gold Nanoparticles in Naïve and Tumor Bearing Mice. ..*Small-Journal*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/sml.201301998>
- Peña, J. C. T. (2017). Complicaciones debidas al tratamiento oncológico que afectan a la nutrición. In *Soporte Nutricional en el Paciente Oncológico*.
- Pino, P. Del, Pelaz, B., Zhang, Q., Maffre, P., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J. (2014). Protein corona formation around nanoparticles - From the past to the future. *Materials Horizons*, 1(3), 301–313. <https://doi.org/10.1039/c3mh00106g>
- Qian, Y., Jin, H., Qiao, S., Dai, Y., & Huang, C. (2016). Biomaterials Targeting dendritic cells in lymph node with an antigen peptide-based nanovaccine for cancer immunotherapy. *Biomaterials*, 98, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.008>
- Reynoso-Neveron, N., Villarreal-garza, C., Soto-perez-de-, E., Arce-salinas, C., Matus-santos, J., Alvarado-miranda, A., ... Lara-medina, F. (2019). Clinical and Epidemiological Profile of Breast Cancer in Mexico : Results of the Seguro Popular. *American Society of Clinical Oncology*, 3(6), 757–764. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007377>
- Shi, G. N., Zhang, C. N., Xu, R., Niu, J. F., Song, H. J., Zhang, X. Y., ... Kong, D. L. (2017). Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine. *Biomaterials*, 113, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.047>
- Shi, G., Zhang, C., Xu, R., Niu, J., Song, H., Zhang, X., ... Wei, X. (2017). Biomaterials Enhanced antitumor immunity by targeting dendritic cells with tumor cell lysate-loaded chitosan nanoparticles vaccine.

Biomaterials, 113, 191–202.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.047>

Sørensen, L. B. Æ. J. B. (2003). Acute tumor lysis syndrome in solid tumors – a case report and review of the literature. *Cancer Chemother Pharmacol*, 51, 187–192. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0556-x>

Villarreal-garza, C., Mohar, A., Bargallo-rocha, J. E., Lasa-gonsebatt, F., Reynoso-noverón, N., Matus-santos, J., ... Soto-perez-de-celis, E. (2017). Molecular Subtypes and Prognosis in Young Mexican Women With Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, (June), 95–102.

<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.11.007>

Voisine, C., Trinité, B., & Josien, R. (2002). Dendritic cells. *Revue Francaise Des Laboratoires*, 2002(341), 31–42.

[https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(02\)80179-2](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(02)80179-2)

Zepeda-castilla, E., Recinos-money, E., Cuéllar-hubbe, M., Robles-vidal, C. D., & Maafs-molina, E. (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama Ernesto. *Cirugía y Cirujanos*, (1), 87–93.

Zhang, Y., Zhang, G. L., Sun, X., Cao, K. X., Ma, C., Nan, N., ... Wang, X. M. (2018). Establishment of a murine breast tumor model by subcutaneous or orthotopic implantation. *Oncology Letters*, 15(5), 6233–6240. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8113>