



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE PERFILES ANTIGÉNICOS E INMUNOGÉNICOS EN ESCALA DE GENOMA EN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

**PRESENTA:
CECILIA MATA CRUZ**

TUTOR PRINCIPAL:

DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. GLADYS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)

Ciudad de México, Mayo, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

VOCAL: Dr. Enrique Hernández Lemus

VOCAL: Dra. Leticia Rocha Zavaleta

VOCAL: Dra. Marcela Lizano Soberón

SECRETARIO: Dr. Eduardo Alberto García Zepeda

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección y en el laboratorio del Dr. Karen Manoutcharian Airapetian en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos:

La sustentante Cecilia Mata Cruz, desea agradecer:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de beca para la realización de los estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo brindado para asistir al Congreso Nacional de Biotecnología, 2013.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por el otorgamiento de beca para tesis de posgrado.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de ser parte de ella, contribuyendo a mi formación profesional y personal.

Al Doctor Karen Manoutcharian por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por enseñarme que hacer ciencia es más fascinante de lo que imaginaba.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Gladys Del Carmen Fragoso y el Dr. Abraham Landa, por su guía y observaciones en el presente trabajo.

A los miembros del jurado, la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. Marcela Lizano Soberón, Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Dr. Enrique Hernández Lemus y el Dr. Eduardo Alberto García Zepeda, por revisar y enriquecer el presente escrito gracias a sus observaciones.

A la M. en C. María Elena Munguía Zamudio por su guía y apoyo incondicional durante los experimentos realizados.

Dedicatoria:

A mis padres Juana e Hilarario que siempre me han apoyado, nada de esto sería posible sin ustedes. Los amo.

A mis hermanos, Josué y Marcos por estar conmigo siempre y hacerme reír.

A mi amiga Dulce, por todo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Gabriel, Eréndira, Allan, Francisco, Lucía con quienes he pasado momentos muy gratos, además quiero agradecer especialmente al M. en C. Rodolfo Servín por su paciencia y enseñanzas técnicas... y de vida. Gracias a todos por su amistad.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I.INTRODUCCIÓN	2
Cáncer.....	2
Respuesta inmune.....	4
Sistema inmune y cáncer.....	7
Inmunoedición del cáncer.....	9
Mecanismos de evasión tumoral.....	9
Cáncer como problema de salud pública en México y el mundo.....	11
Cáncer de mama.....	13
Factores de riesgos.....	16
Tratamiento.....	17
II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	22
III.DESPLIEGUE EN FAGO M13	22
IV. HIPÓTESIS	24
V.OBJETIVO GENERAL	24
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	26
Subclonación de la biblioteca de cADN de CaMa.....	26
Ligación de los insertos con el fagémido.....	28
División y tamizaje de la biblioteca de cADN desplegada en fago M13.....	29
Obtención de clones individuales.....	31
Purificación de fago en placa.....	31
Modelo murino de cáncer de mama.....	32

Ensayos de proliferación celular.....	32
Purificación de ADN.....	34
Evaluación del efecto antitumoral de clonas individuales seleccionadas en modelo murino de cáncer de mama.....	35
VIII. RESULTADOS.....	36
Construcción de biblioteca de cADN desplegada en fago M13.....	36
Tamizaje de la biblioteca de cADN desplegada en fago M13.....	36
Obtención de clonas individuales.....	38
Caracterización de clonas individuales seleccionadas.....	42
Secuenciación de ADN de clonas.....	43
Experimento 1: Tratamiento terapéutico.....	47
IX. DISCUSIÓN.....	49
X. CONCLUSIONES.....	54
XI. PERSPECTIVAS.....	55
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	56

RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial, los tratamientos que actualmente se ofrecen a los pacientes tales como quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia y cirugía afectan de manera significativa su calidad de vida. Un determinante en el éxito del tratamiento es la detección temprana de la enfermedad, sin embargo en la mayoría de los casos, el paciente se presenta en un estado avanzado. Se necesitan métodos de evaluación para los pacientes con cáncer que sean rápidos, de bajo costo y que además consideren la calidad de vida del paciente.

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de vacunas contra el cáncer, la estrategia consiste en estimular al sistema inmunológico para que sea el responsable de la eliminación de las células tumorales. Se han probado varios inmunógenos, sin embargo el repertorio sigue siendo limitado. El presente trabajo propone una estrategia para caracterizar perfiles antigénicos e inmunogénicos durante el desarrollo de cáncer de mama en modelo murino, basado en la aplicación del despliegue en fagos filamentosos de una biblioteca de cADN de cáncer de mama de ratón. Con el uso de dicha biblioteca y esplenocitos de ratones, se desarrolló un sistema de tamizaje que permitió después de varias rondas de selección identificar epítomos/antígenos que pueden estar involucrados en la respuesta inmune contra el cáncer de mama, de manera que podrían ser posibles blancos de inmunoterapia o marcadores para inmunodiagnóstico.

Al finalizar el tamizaje se caracterizaron 3 clonas diferentes, la clona más destacada presenta homología del 97% con un fragmento de la proteína VIP36 (Lectina de unión a manosa) de ratón y humano. Después de una búsqueda en la bibliografía se encontró un reporte de que dicha proteína se encuentra sobreexpresada en cáncer gástrico. Con base en los resultados obtenidos se demostró que la técnica utilizada es efectiva para identificar antígenos que probablemente están involucrados en el desarrollo de cáncer de mama.

I. INTRODUCCIÓN

Cáncer

«Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer. (WHO.CANCER, 2014).

Mientras las células neoplásicas permanezcan agrupadas en una masa única, no sean capaces de crecer por tiempo indefinido y no invadan los tejidos circundantes sanos se dice que corresponden a un tumor benigno. Un tumor se considera canceroso o maligno cuando sus células continúan creciendo y gradualmente invaden tejido adyacente. La capacidad invasora implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis.

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan, de este modo aquellos que derivan de células epiteliales se denominan carcinomas mientras aquellos que derivan de tejido conectivo como cartílago, hueso o músculo se denominan sarcomas. Otros tipos de cáncer son las leucemias que afectan a las células hematopoyéticas y las que afectan al sistema linfático, linfomas (Alberts, *et al.*, 2004).

Durante el desarrollo de la enfermedad se ha sugerido que las células cancerosas se caracterizan por mostrar seis alteraciones esenciales en la fisiología celular (Hanahan, *et al.*, 2011) conocidas en conjunto como características distintivas del cáncer, las cuales se enuncian a continuación.

Mantenimiento de señales de proliferación. La característica fundamental de las células cancerosas es mantener una proliferación crónica. En un tejido normal existe un cuidadoso control de la producción y liberación de factores de crecimiento

promotores del ciclo celular, de esta manera asegura la homeostasis de tejido. Las células tumorales a través de la desregulación de estas señales, adquieren la capacidad de generar sus propias señales de crecimiento.

Insensibilidad a las señales inhibitorias de proliferación celular. En el tejido normal, las señales antiproliferativas actúan manteniendo a las células en un estado quiescente o bien, situando a las células en un estado postmitótico, en el cual las células se diferencian y no proliferan para mantener la homeostasis (Alberts, *et al.*, 2004).

Las células cancerosas deben eludir estas señales de gran alcance que regulan negativamente la proliferación celular, muchas de estas señales dependen de las acciones de genes supresores de tumores. La mayoría de las señales antiproliferativas son reguladas por las proteínas RB (retinoblastoma), TP53 entre otras; estas operan como punto de control, regulan si la célula prolifera, permanece en senescencia o muere por apoptosis.

Evasión de la apoptosis. La muerte celular programada o apoptosis sirve como una barrera natural contra el cáncer, de manera que aquellas células que no sean necesarias se autoeliminan activando un programa intracelular de muerte. Las células tumorales pueden evadir la apoptosis a través de la pérdida de reguladores proapoptóticos, mediante mutaciones que incluyen al gen supresor de tumor p53, la sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas o por alterar moléculas importantes para desencadenar la muerte celular.

Potencial replicativo ilimitado. Las células cancerosas requieren de un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. El extremo final de los cromosomas, los telómeros, están compuestos de miles de secuencias cortas repetitivas de 6 pares de bases (pb), durante la división celular se pierde parte de este ADN, por lo que la erosión progresiva de los telómeros a través de ciclos sucesivos de replicación ocasiona fusiones entre los extremos finales de los cromosomas, resultando en un desarreglo en el cariotipo asociado con la muerte de la célula afectada. Las células tumorales adquieren un potencial replicativo ilimitado,

logran esta característica mediante la expresión constitutiva de una telomerasa, una ADN polimerasa que adiciona hexanucleótidos repetidos en los extremos finales del ADN telomérico, evitando así la barrera replicativa por la erosión de los telómeros.

Angiogénesis. Al igual que el tejido normal, un tumor requiere de nutrientes y oxígeno así como también una forma de evacuar desechos metabólicos como el dióxido de carbono. La vasculatura generada por el proceso de angiogénesis soluciona esta necesidad (Hanahan, *et al.*, 2011).

Invasión de tejido y metástasis. Para que una célula pueda producir metástasis primero ha de salir del tumor inicial; es una operación compleja, lenta y poco eficiente; muy pocas células del tumor primario lo consiguen. Para producir una metástasis la célula tumoral ha de entrar en el torrente sanguíneo o en un vaso linfático, atravesar la lámina basal y el revestimiento lineal de las células endoteliales que tapizan el vaso, y entrar en la circulación; salir de la circulación en otro lugar, sobrevivir y proliferar en un nuevo ambiente; a menudo las células tumorales que han entrado en un vaso linfático, quedan atrapados en nódulos linfáticos produciendo metástasis en ella (Mehlen, *et al.*, 2006).

Respuesta inmune

El sistema inmune es responsable del reconocimiento y eliminación de agentes patógenos tras una infección, de hecho todos los organismos pluricelulares han de defenderse frente a infecciones causadas por microorganismos como bacterias, hongos, virus y parásitos, además también nos defiende contra la formación de células tumorales. Una vez que se está en contacto con algún agente patógeno o se identifica una célula aberrante se monta una respuesta conjunta y coordinada en contra de dicho agente, llamada respuesta inmune. Nuestro sistema inmunológico está representado por dos de tipos respuestas, una de ellas es la respuesta inmunitaria innata, es la primera línea de defensa, constituye un grupo de mecanismos de defensa contra la enfermedad que no son específicos de un patógeno particular sino que incluyen componentes celulares y moleculares, que reconocen clases de moléculas peculiares a los patógenos que se encuentran con

frecuencia (antígenos). Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes: 1) las barreras físicas y químicas, como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células dendríticas y células asesinas naturales (células NK, del inglés *natural killer cell*); y 3) proteínas séricas, incluido complemento y mediadores de inflamación.

El otro tipo de respuesta, surge como consecuencia y adaptación a la infección, por ello es llamada respuesta inmunitaria adaptativa. La inmunidad adaptativa posee atributos característicos:

- Especificidad antigénica: Reconoce diferencias sutiles entre los antígenos.
- Diversidad: Como resultado de la variabilidad en la estructura de los sitios donde se unen los antígenos en los receptores linfocíticos. El número total de especificidades antigénicas de una persona se conoce como repertorio linfocítico.
- Memoria: capacidad de reconocer a un antígeno después de una exposición previa.
- Tolerancia: capacidad para reconocer antígenos ajenos, responder a ellos y eliminarlos sin reaccionar contra sustancias antigénicas del mismo individuo. (Abbas, 2008).

Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B y sus productos de secreción.

De modo que existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas: la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La inmunidad humoral representada por los linfocitos B protege contra antígenos extracelulares y toxinas, los anticuerpos secretados por los linfocitos B activados son las moléculas efectoras de la inmunidad humoral. Por otra parte, la inmunidad celular representada por los linfocitos T, en la que existen dos poblaciones bien definidas, los linfocitos T CD4+ restringidos al reconocimiento de antígenos asociados a moléculas clase II del MHC y funcionan como colaboradoras (Helper T_H), y los linfocitos T CD8+ restringidos a

moléculas clase I del MHC y funcionan como linfocitos T citotóxicos (CTL), estos últimos tienen una función esencial en la destrucción de células infectadas por virus y células tumorales. Una vez que estas poblaciones de linfocitos han madurado en el timo son liberadas al torrente sanguíneo en busca de antígenos, estos linfocitos no han reconocido al antígeno específico para su receptor de célula T (TCR), por lo que son llamados *naive* (vírgenes). Para que este linfocito virgen lleve a cabo su función efectora debe activarse.

A pesar de esta división es necesario comprender que todo el sistema participa de manera conjunta y dinámica para evitar la enfermedad, erradicar el agente patógeno y restaurar la homeostasis (Abbas, 2008).

Procesamiento y Presentación de Antígenos a los linfocitos T. Todas las células que expresan MHC clase I o clase II pueden presentar péptidos a las células T, sin embargo existen marcadas diferencias tanto en las vías de presentación, el tipo de célula que la realiza y el tipo de antígeno que se expresa como veremos a continuación. Cuando un antígeno es captado por una célula del hospedador, la célula lo degrada (procesa), este antígeno procesado acaba por quedar unido a la proteína MHC, y este complejo va hasta la membrana citoplasmática y se presenta en la superficie de la célula. Se conocen dos mecanismos distintos para el procesamiento del antígeno, uno para la presentación de antígenos de clase I y otro para la presentación de antígenos de clase II. Para los de clase I, los antígenos son producidos en la célula, por ejemplo víricos o tumorales, son degradados en el citoplasma y unidos a moléculas MHC clase I en el retículo endoplasmático, de ahí son transportados a la superficie celular.

Los antígenos presentados por MHC II son generalmente exógenos, en esta vía de presentación las proteínas MHC II se producen en el retículo endoplasmático (RE) y se ensamblan con una proteína bloqueante Ii (cadena invariable) que evita que forme complejos con otros péptidos fabricados en el mismo RE, después MHC II se une al fagolisosoma donde Ii y las proteínas extrañas importadas desde el exterior (vía endocitosis) son digeridas, a continuación el MHC II se une a los péptidos extraños procesados y el complejo se expresa en la superficie celular.

El fenómeno central en la generación de respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células es la activación y expansión clonal de células T. La activación correcta de las células T requiere de tres señales:

Señal 1. Se genera por la interacción del receptor de célula T (TCR) con un péptido antigénico procesado y presentado en el contexto de una molécula de MHC de la célula presentadora de antígeno y de las moléculas correceptoras CD4 o CD8.

Las moléculas MHC clase I se encuentran en cualquier célula nucleada y presentan los péptidos a los linfocitos T CD8+, el péptido procesado es de 8 a 10 aminoácidos.

La expresión de MHC II se restringe solo a Células Presentadoras de Antígenos (CPA) especializadas como son macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Las molécula MHC clase II presentan los péptidos a los linfocitos T CD4+, los péptidos expresados son de 13 a 25 aminoácidos (Vyas, *et al.*, 2008).

Señal 2. La interacción de moléculas coestimuladoras del linfocito con las de la célula presentadora de antígeno. El desarrollo de expansión o anergia clonal depende de la presentación o ausencia de una señal coestimuladora. (Kindt, 2007).

Señal 3. Presencia de citocinas en el microambiente. Los linfocitos T CD4+ cooperadores se diferencian en células efectoras ya sea Th1 o Th2, cuyas funciones están mediadas en gran medida por las citocinas secretadas. En particular, la IL-4 es esencial en el desarrollo de células Th2, los linfocitos con este perfil secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, citocinas que colaboran en la diferenciación del linfocito B en célula plasmática y la producción de anticuerpos. El IFN- γ , IL-12 e IL-18 son importantes en el desarrollo de Th1, células que a su vez también secretan IFN- γ y IL-12, citocinas que participan además en la activación de macrófagos y CTL's.

Sistema inmune y cáncer

El sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar a las células cancerosas, un proceso que se conoce como **inmunovigilancia** (Zitvogel, *et al.*, 2006), esta capacidad de reconocimiento por parte del sistema inmune es gracias a transformaciones en las células producto mutaciones genéticas, dichas células expresan macromoléculas que ahora son reconocidas por el sistema inmune, los llamados **antígenos tumorales**.

Se ha propuesto que los antígenos tumorales tienen una sub-clasificación (Coulie, *et al.*, 2014). Tabla1.

Tabla 1. Clasificación de antígenos tumorales		
Clasificación	Características	
“Antígenos específicos de tumor” o de alta especificidad tumoral	<ul style="list-style-type: none">• Antígenos virales.• Antígenos que resultan de mutaciones o de rearreglos en la secuencia codificante de un gen.• Antígenos que son codificados por genes de líneas germinales.	
“Antígenos asociados a tumor” o de baja especificidad tumoral	Antígenos de diferenciación	<ul style="list-style-type: none">• Son expresados en la célula tumoral y en el tejido normal de origen.
	Antígenos de sobreexpresión	<ul style="list-style-type: none">• Antígenos derivados de proteínas que están sobre-expresadas en células tumorales

Resulta interesante que a pesar de la expresión de antígenos tumorales abundantes y la respuesta inmune inicialmente montada, la mayoría de los cánceres progresan y evaden la destrucción mediada por el sistema inmune hasta ser detectados clínicamente (Gajewski, *et al.*, 2013).

La explicación de cómo es que las células cancerosas evaden la respuesta inmune y progresan es parte de la teoría de inmunoedición del cáncer (Dunn, *et al.*, 2004).

Inmunoección del cáncer

El proceso de inmunoección del cáncer se desarrolla en tres fases: la eliminación, el equilibrio y el escape.

La primera fase, la fase de eliminación también conocida como inmunovigilancia del cáncer, consiste en el reconocimiento de las células transformadas por el sistema inmunológico innato y el sistema inmune adaptativo, lo que lleva a la muerte de estas células.

Si algunas células tumorales no son erradicadas en la fase de eliminación, el proceso puede avanzar a la segunda fase: la fase de equilibrio, una fase en la cual el tumor persiste, sin embargo su proliferación está impedida por la presión que ejerce el sistema inmunológico.

La tercera fase, el escape, comienza cuando el equilibrio entre la respuesta inmune y el tumor se inclina hacia el crecimiento del tumor como resultado del agotamiento inmunológico o la inhibición como consecuencia de la aparición de variantes de células tumorales que permiten que el tumor pueda evadir la respuesta inmune. Esto da como resultado la presencia de células transformadas no inmunogénicas, es decir que son invisibles. Esta fase concluye con la aparición de un tumor que puede ser detectado clínicamente (Dunn, *et. al.*, 2006).

Mecanismos de evasión tumoral

El sistema inmunológico es capaz de reconocer y eliminar las células de cáncer, sin embargo se mantiene bajo control por los receptores inhibitorios y sus respectivos ligandos. Estos puntos de control del sistema inmune que normalmente mantienen la tolerancia y evitan el daño colateral a los tejidos durante la respuesta inmune anti-microbiana, pueden ser utilizados por el cáncer y evadir al sistema inmune (Topalian, *et al.*, 2015).

El desarrollo del tumor es un proceso complejo que implica la interacción entre las células cancerosas, las células del estroma normales y los mecanismos de defensa.

Varios otros factores tales como cambios celulares debido a infección o estrés inducido por enfermedad también pueden contribuir al crecimiento o supresión del tumor (Vinay, *et al.*, 2015).

Dentro de los factores implicados en la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales se destacan en la Tabla 2 (Vinay, *et al.*, 2015):

Tabla 2. Factores implicados en la evasión del sistema inmune	
Células reguladoras	Supresión inmune en el microambiente tumoral mediada por células reguladoras (Treg) y otras células supresoras como las MDSCs (del inglés “myeloid-derived suppressor cells”).
Defectos en la presentación de antígenos	Regulación deficiente en la presentación del antígeno, esto incluye defectos en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC), y mutaciones del proteosoma y TAP (Transporter associated with antigen processing). Esto puede conducir a la incidencia de tumores y la metástasis porque los linfocitos T citotóxicos (CTL) ya no puede reconocer antígenos en las células tumorales.
Mediadores inmunosupresores	Los tumores pueden evadir la vigilancia inmune a través de la producción de varias citocinas y otras moléculas inmunosupresoras que inhiben la activación de las células del sistema inmune, ya sea por las células cancerosas o por las células no cancerosas presentes en el microambiente tumoral. Por ejemplo TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, CSF-1, IL-8, IFNs (interferones) tipo I, VEGF, RCAS1 etc. (Igney, 2002).
Tolerancia	La mayoría de las células tumorales no expresan moléculas coestimuladoras y por lo tanto pueden inducir anergia o tolerancia de las células T.
Apoptosis	Deleción directa de células efectoras del sistema inmune por medio de la expresión de ligandos de inducción de muerte como FasL. Este fenómeno es conocido como contraataque tumoral (Mapara, <i>et. al.</i> , 2004).

Cáncer como problema de salud pública en México y el mundo

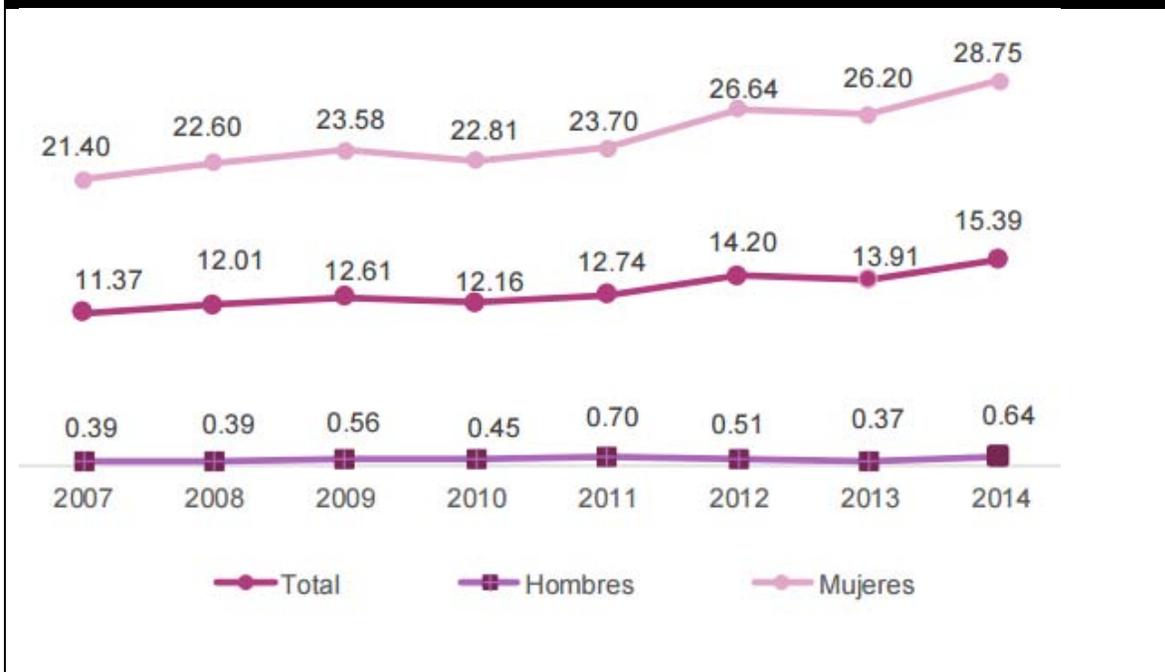
El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012 (GLOBOCAN 2012). Los principales tipos de cáncer se muestran en la tabla siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Tipos de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial 2012	
Pulmonar	1.59 millones de defunciones
Hepático	745 000 defunciones
Gástrico	723 000 defunciones
Colorrectal	694 000 defunciones
Mamario	521 000 defunciones
Cáncer de esófago	400 000 defunciones

De ellos el cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en mujeres con alrededor de 1.38 millones de diagnósticos anualmente (Chavarría, *et al.*, 2012).

En México de 2007 a 2014, la incidencia de cáncer de mama en mujeres ha incrementado, siendo el año 2014 en el que se presenta la incidencia más alta, con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, para los hombres de 20 años y más, se mantiene muy baja y relativamente estable, fluctuando entre 0.39 y 0.64 casos nuevos por año. Así por cada caso nuevo en los varones se detectan 29 en las mujeres. (INEGI, 2015). Tabla 4.

Tabla 4. Incidencia de tumor maligno de mama en población de 20 años y más, por sexo. Serie anual de 2007 a 2014



Fuentes:

Para 2010 a 2014: SSA, CENAVECE (2014). Anuarios de Morbilidad 1984-2014; y CONAPO (2014). Proyecciones de la Población 2010-2050. Procesó INEGI.

Para 2007 a 2009: SSA, CENAVECE (2014). Anuarios de Morbilidad 1984-2014; y CONAPO (2008). Proyecciones de la Población de México 2005-2050. Procesó INEGI.

CENAVECE: Centro Nacional De Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades.

CONAPO: Consejo Nacional de Población.

Al observar las cifras que arroja el análisis de las estadísticas por parte del INEGI en el documento “Estadísticas a propósito del...día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)”, 2015, es evidente la necesidad de desarrollar nuevo planes de salud y de nuevas alternativas terapéuticas.

Cáncer de mama

Morfológicamente la glándula mamaria humana se compone de una red ramificada de ductos que terminan en unidades lobulares o lobulillos. Histológicamente, lobulillos y ductos están revestidos de dos capas de células: la capa interior se compone de células epiteliales luminales secretoras, las cuales son responsables de producir leche durante la lactancia y la capa externa contiene células mioepiteliales con capacidad contráctil. Estas estructuras están separadas de los el tejido circundante, o estroma, por una membrana basal. El estroma circundante comprende macrófagos, fibroblastos, adipocitos y células del sistema inmune, y estructuras organizadas como por ejemplo, vasos sanguíneos, cada uno de los cuales contribuye a la configuración global del microambiente local (Almendro, *et al.*, 2011) (Bertos, *et al.*, 2011). Se aprecia la composición celular del epitelio de la glándula mamaria humana normal en la Figura 1.

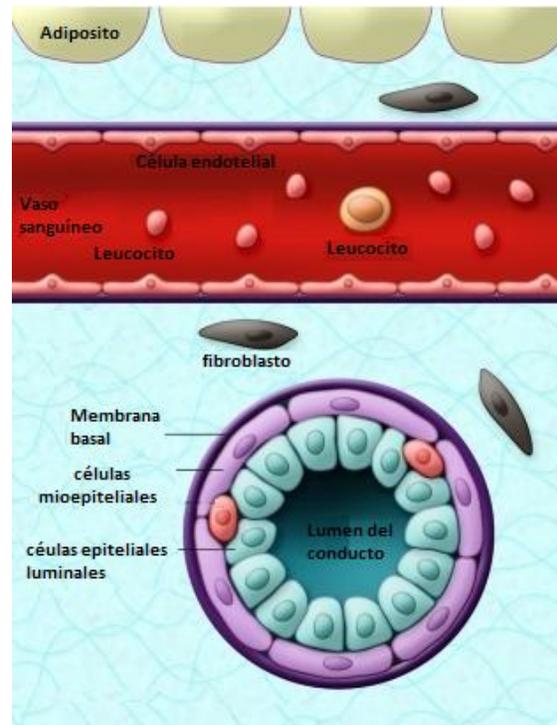


Figura 1. la composición celular del epitelio de la glándula mamaria normal. Modificado de Bertos, *et al.*, 2011.

El cáncer de mama surge del crecimiento descontrolado de las células que revisten los ductos o lobulillos mamarios. (Instituto Nacional de Cáncer. 2014). La historia natural del cáncer involucra su progresión a través de estadios clínicos bien definidos, iniciando con hiperproliferación celular con la subsecuente evolución *in situ* hasta un carcinoma invasivo y finalmente metástasis (Polyak, 2007).

El tipo de cáncer de mama más común es el carcinoma ductal invasivo, reportando el 75% de los casos, mientras que el carcinoma lobular invasivo representa el siguiente tipo histológico más frecuente de tumor de mama, en alrededor de 10%

de los casos. En conjunto, estas dos categorías constituyen la gran mayoría de los cánceres de mama, el resto se consideran “tipos especiales” (Bertos, *et al.*, 2011).

La unión Internacional para el control de cáncer (UICC, *Union for International Cancer Control*) emite un sistema estándar acordado internacionalmente para describir y clasificar las etapas y la progresión del cáncer.

El denominado sistema TNM nos indica lo siguiente:

Tabla 5. Sistema estándar acordado internacionalmente para describir y clasificar las etapas y la progresión del cáncer TNM	
T	La categoría describe la extensión anatómica del cáncer de mama.
N	La categoría describe la afectación de los ganglios linfáticos regionales, ganglios mamarios axilares o internos.
M	La categoría se describe la presencia de diseminación metastásica a distancia por ejemplo a pulmón, el hígado y el hueso.

Adicionalmente, en los últimos años se han hecho estudios con microarreglos como PAM50 (del inglés *prediction analysis of microarray*) y además ensayos inmunohistoquímicos que llevan a la conclusión de que existe cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama: Luminal A, Luminal B, Basal y aquel que sobreexpresa HER2 (Strehl, *et al.*, 2011). En la tabla 6 se observa la correlación que existe entre la clasificación molecular y la clasificación inmunohistoquímica para cáncer de mama (Onitilo, *et al.*, 2009).

Tabla 6. Clasificación molecular e inmunohistoquímica para el cáncer de mama

Clasificación molecular	ER	PR	Her-2
Luminal A	+	+	-
	-	+	-
	-	-	+
Luminal B	+	+	+
	-	+	+
	+	-	+
Tipo Basal	-	-	-
Sobre-expresa Her-2	-	-	+
No se indica el nivel de expresión, solo indica presencia del receptor ER: Receptor de Estrógenos PR: Receptor de progesterona Her-2: Receptor 2 para el crecimiento epidérmico humano			

En la práctica clínica conocer la información sobre el tipo de cáncer se utiliza de manera integral con la finalidad de clasificar con precisión los tumores en el estadio, el pronóstico y tratamiento. Biomarcadores como el receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y la expresión de HER2 determinan si los pacientes son candidatos para terapia adyuvante y tienen un significado pronóstico y predictivo en cáncer de mama porque tienen implicaciones importantes para el crecimiento del tumor y patrones metastásicos (Cadoo, *et al.*, 2013).

Factores de riesgo

Los factores de riesgo para desarrollo del cáncer de mama se distinguen en cuatro grandes grupos:

Tabla 7. Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama	
Biológicos	<ul style="list-style-type: none">• Sexo femenino• Envejecimiento, a mayor edad mayor riesgo• Historia personal o familiar de cáncer de mama en madre, hijas o hermanas.• Antecedentes de hallazgos de hiperplasia ductal atípica, imagen radial o estrellada, así como carcinoma lobulillar in situ por biopsia.• Vida menstrual de más de 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años),• Densidad mamaria• Ser portador conocido de los genes BRCA1 o BRCA2
Ambientales	<ul style="list-style-type: none">• Exposición a radiaciones ionizantes principalmente durante el desarrollo o crecimiento (in útero, en la adolescencia)• Tratamiento con radioterapia en tórax
De historia reproductiva	<ul style="list-style-type: none">• Nuligesta• Primer embarazo a término después de los 30 años de edad• Terapia hormonal en la peri o postmenopausia por más de cinco años.
De estilos de vida.	<ul style="list-style-type: none">• Alimentación rica en carbohidratos y baja en fibra.• Dieta rica en grasas tanto animales como ácidos grasos <i>trans</i>.• Obesidad, principalmente en la postmenopausia.• Sedentarismo.• Consumo de alcohol mayor a 15 ml/día.• Tabaquismo.

Es importante mencionar que en el 70% de las mujeres con cáncer de mama, no se logra identificar un factor de riesgo conocido (NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011).

Tratamiento

En México de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama, las decisiones terapéuticas del cáncer de mama se deben formular de acuerdo con la etapa clínica, reporte histopatológico, condiciones generales de salud de la paciente y su estado hormonal.

Los métodos terapéuticos que en la actualidad se emplean para tratar el cáncer mamario son:

- **Cirugía**
- **radioterapia**
- **Quimioterapia**
- **Hormonoterapia**
- **Biológicos.**

De ellos, la cirugía y la radioterapia tienen una acción local; en la quimioterapia, la hormonoterapia y los tratamientos biológicos, la acción es sistémica (NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011).

La mayoría de las mujeres que tienen CDIS (carcinoma ductal *in situ*) que pueden ser tratados con una operación tienen tres opciones de cirugía (Instituto Nacional de Cáncer, EE.UU. 2014).

- **Mastectomía parcial**
- **Mastectomía total**
- **Mastectomía radical modificada.**

Tanto la mastectomía y la cirugía conservadora de seno con radiación son tratamientos estándar para el cáncer de mama en estadios tempranos. Sin embargo, mientras que la cirugía conservadora de la mama es más común en países desarrollados como los EE.UU. con alrededor del 37% de los casos, en países en vías de desarrollo la mastectomía total es mucho más común, en gran parte debido a una detección más avanzada de la enfermedad, pero también a causa de la poca disponibilidad de terapias de radiación y por la falta de recursos

humanos. Un informe del INCAN (Instituto Nacional de Cancerología) mostró una tasa de 85% mastectomía total en su institución (Chávarri, *et al.*, 2012).

La radioterapia (también llamada terapia con rayos X o irradiación) es el uso de radiación ionizante para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. También existen radiofármacos e implantes que cumplen la misma función. La radioterapia lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano del derredor (Instituto Nacional de Cáncer, EE.UU. 2014).

La quimioterapia consiste en el uso de fármacos para evitar que las células del cáncer sigan proliferando. Evita que el cáncer se extienda o retrasa el crecimiento tumoral. También puede destruir las células cancerosas que han invadido otras partes del cuerpo (Instituto Nacional de Cáncer, EE.UU. 2014).

La terapia hormonal (llamada también hormonoterapia, tratamiento hormonal o terapia endocrina) hace más lento o detiene el crecimiento de tumores sensibles a las hormonas ya que bloquea la capacidad del cuerpo para producir hormonas o que interfiere en la actividad hormonal. Los tumores que no son sensibles a las hormonas no reaccionan a la terapia hormonal.

Se han formulado varias estrategias para tratar el cáncer de seno sensible a las hormonas, entre las cuales se incluyen las siguientes:

Bloqueo de la función de los ovarios: el estrógeno estimula el crecimiento de los tumores de la mama y puesto que los ovarios son la fuente principal de estrógeno en mujeres premenopáusicas, las concentraciones de estrógeno en estas mujeres pueden reducirse al eliminar o suprimir la función de los ovarios. El bloqueo de la función de los ovarios se llama ablación ovárica. Ejemplos de fármacos supresores de la función ovárica que han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos, (FDA), son la Goserelina y la Leuprolida.

Bloqueo de la producción de estrógeno: Los fármacos llamados inhibidores de aromatasa pueden usarse para bloquear la actividad de una enzima llamada aromatasa, el cuerpo la usa para producir estrógeno en los ovarios y en otros tejidos. Los inhibidores de aromatasa se usan principalmente en mujeres posmenopáusicas ya que los ovarios de mujeres premenopáusicas producen demasiada aromatasa para que los inhibidores puedan bloquearla eficazmente. Sin embargo, estos fármacos pueden usarse en mujeres premenopáusicas si se administran junto con un fármaco que suprime la función de los ovarios.

Ejemplos de inhibidores de aromatasa aprobados por la FDA son el Anastrozol y el Letrozol los cuales desactivan temporalmente la aromatasa, y el Exemestano, el cual desactiva la enzima en forma permanente.

Bloqueo de los efectos del estrógeno: Varios tipos de fármacos interfieren con la capacidad del estrógeno para estimular el crecimiento de las células de cáncer de seno:

Moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM) se unen a receptores de estrógeno, lo que impide que el estrógeno se una a ellos. Ejemplos de SERM aprobados por la FDA son el Tamoxifeno, el Raloxifeno y el Toremifeno. El Tamoxifeno se ha usado por más de 30 años para tratar el cáncer de seno con receptores de hormonas (Instituto Nacional de Cáncer, EE.UU. 2014).

Tratamiento biológico para el cáncer de mama. Dentro de las terapias biológicas se encuentra el uso de anticuerpos o segmentos de material genético (ARN o ADN), que actúan directamente sobre las células cancerosas, además está el uso de vacunas para estimular el sistema inmunológico del cuerpo y que éste actúe contra las células cancerosas; a este tipo de terapia se conoce como inmunoterapia.

La inmunoterapia está ganando impulso, pues se basa en la marcada especificidad que tiene el sistema inmunológico para el reconocimiento de antígenos así como rechazar tumores y prevenir su reaparición (Coulie, *et al.*, 2014). Interesantes resultados clínicos se han obtenido utilizando vacunas contra el cáncer, y anticuerpos que estimulan la actividad de los linfocitos T. La evidencia sugiere que

estimular la inmunidad adaptativa brinda beneficios clínicos en el tratamiento a largo plazo como la quimioterapia y la radioterapia pero sin los efectos secundarios adversos. La base de estos estudios clínicos es que los pacientes con cáncer producen linfocitos T que reconocen antígenos específicos del tumor. Sin embargo, a pesar de lo prometedora que resulta la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer, y específicamente del cáncer de mama, actualmente la FDA solo ha aprobado algunos anticuerpos monoclonales humanizados para el tratamiento de la enfermedad, se muestran en la Tabla 8 (Instituto Nacional de Cáncer. EE.UU., 2014).

Tabla 8. Terapias dirigidas contra cáncer de mama aprobados por la FDA		
Trastuzumab (Herceptina®)	Anticuerpo monoclonal	El mecanismo de acción del trastuzumab no se comprende en su totalidad, pero una posibilidad probable es que impida que el HER-2 envíe señales que promuevan crecimiento.
Pertuzumab (Perjeta™)	Anticuerpo monoclonal en combinación con trastuzumab y docetaxel	Se une al HER-2 en una región distinta del trastuzumab. Evita que HER-2 interactúe con otros receptores, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), para enviar señales que promuevan crecimiento.
Lapatinib (Tykerb®)	Fármaco de molécula pequeña	Inhibe varias tirosinas cinasas, incluso la actividad de la tirosina cinasa del HER-2. El tratamiento con lapatinib impide que las señales del HER-2 activen el crecimiento celular.

Como podemos apreciar en la tabla el blanco molecular utilizado en la inmunoterapia contra el cáncer es Her-2, una proteína que pertenece a la familia de factores de crecimiento epidermal. Esta proteína está sobreexpresada en aproximadamente el 20% de los casos de cáncer de seno. Su presencia tiene implicaciones para el pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Biológicamente la sobreexpresión de Her-2 está asociada con un incremento en la proliferación

celular, movilidad, angiogénesis, así como capacidad invasiva y resistencia a apoptosis (Cadoo, *et al.*, 2013).

Las terapias dirigidas contra Her-2 no son efectivas para todas las pacientes que expresan el receptor, aunado a esto, como se describió previamente no todas las pacientes expresan este tipo de receptor.

A pesar de los esfuerzos para brindar a los pacientes un tratamiento que incremente sus posibilidades de sobrevivir a la enfermedad y con la mejor calidad de vida, a nivel mundial queda mucho por hacer, por investigar y legislar para que toda la población tenga acceso a diagnóstico y tratamiento oportuno de la enfermedad. Hasta ahora no se cuenta con una vacuna para el cáncer de mama; la única vacuna aprobada por la FDA para el tratamiento terapéutico del cáncer es Sipuleucel-T (Provenge®, producida por Dendreon), y está aprobada para su uso en algunos hombres con cáncer metastásico de próstata. Está diseñada para estimular una respuesta inmunitaria a la fosfatasa ácida prostática (prostatic acid phosphatase, PAP), un antígeno que se encuentra en la mayoría de las células cancerosas de próstata. En un estudio clínico, Sipuleucel-T alargó la supervivencia de hombres con un cierto tipo de cáncer metastásico de próstata en cerca de 4 meses (Kantoff, *et al.*, 2010).

Existen otras vacunas de tipo profiláctico para el cáncer como es el caso de la vacuna contra el Virus del Papiloma Humano (VPH). Dos vacunas profilácticas contra el VPH se han autorizado, Gardasil® (Sanofi Pasteur MSD) /Silgard® (Merck Sharp & Dohme), una vacuna tetravalente contra los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18 que se aprobó a finales de 2006 y Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals), una vacuna bivalente aprobada en 2007 para la inmunización contra los tipos de VPH 16 y 18. Ambas vacunas contienen subunidades inactivadas no infecciosas, y protegen contra los tipos de VPH de alto riesgo 16 y 18, responsables de más del 70% de los casos de cáncer cervical, además también protege contra el VPH 6 y 11, que causan la mayoría de los casos de verrugas genitales (Stillo, *et al.*, 2015).

II. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El cáncer es un problema de salud pública que afecta a mujeres y hombres de todo el mundo, en nuestro país representa una de las principales causas de muerte entre la población de mujeres. Se necesitan métodos de evaluación para los pacientes con cáncer que sean rápidos, de bajo costo y que además consideren la calidad de vida del paciente. A lo largo de los últimos años se han realizado numerosos intentos para ofrecer nuevos y mejores tratamientos, una estrategia prometedora implica ampliar el repertorio de antígenos reconocidos por el sistema inmune que sean candidatos para un tratamiento específico de la enfermedad. Siguiendo esta misma línea, el presente trabajo propone el despliegue en fago filamentoso M13 de una biblioteca de cáncer de mama de ratón para la búsqueda de nuevos antígenos relacionados con el desarrollo de cáncer de mama, con valor diagnóstico, pronóstico, y posibles componentes para vacunas.

La amplia variabilidad genética y antigénica es el principal obstáculo para el desarrollo de vacunas contra el cáncer y patógenos antigénicamente variables (Pedroza, *et al.*, 2009). Los esfuerzos por encontrar un tratamiento efectivo contra el cáncer se ven frenados por la falta de un conocimiento más extenso sobre las interacciones entre el sistema inmune y las células cancerosas. El sistema de despliegue en fago M13 permite probar de manera simultánea las propiedades antigénicas de cientos de péptidos como posibles antígenos relacionados con el cáncer de mama.

III. DESPLIEGUE EN FAGO

La técnica de despliegue en fago se utiliza para expresar proteínas o péptidos foráneos fusionados a una de las proteínas de cubierta del fago. El fago M13 es el más utilizado para este fin.

En este sistema las moléculas foráneas se expresan de manera más frecuente fusionadas a la proteína minoritaria de la cubierta del fago, la proteína pIII (3-5 copias por fago) o fusionados a la proteína mayoritaria de la cubierta, pVIII (2700 copias). La generación de grandes bibliotecas de fagos que expresan péptidos al azar, así como bibliotecas de expresión de ADN genómico y cADN derivados de

patógenos se están convirtiendo en importantes fuentes para la identificación de genes codificantes de proteínas o dominios implicados en la patogénesis e interacciones huésped- patógeno, así como para el aislamiento de antígenos candidatos para vacunas o diagnóstico (González, *et al.*, 2010).

Los fagos son fáciles de manejar, resisten distintas condiciones de estrés como las altas temperaturas, disolventes orgánicos, químicos, pH extremos. Las partículas de fago son altamente inmunogénicas por lo que no requieren adyuvante. Además, como partículas antigénicas, pueden ser procesados por ambas rutas del complejo mayor de histocompatibilidad (clase I y II), y por tanto son capaces de inducir una respuesta humoral y celular (Manoutcharian, 2005).

El fago M13 (Figura 2) pertenece al género de los Inovirus, contiene ADN de cadena sencilla, en él se encuentra toda información necesaria para la síntesis de sus once proteínas, cinco de ellas forman parte de la cápside del virus: pIII, pVI, pVII pIX y pVIII. El ADN sintético o nativo de interés es clonado en el gen que codifica para la proteína de cubierta donde quiere expresarse el péptido, esto en el genoma del fago o en un fagémido; sin embargo la clonación dentro del genoma puede resultar en problemas con la técnica, por ejemplo la inestabilidad del fago si péptidos largos son fusionados a pVIII. Para evitar el problema se utiliza un fagémido, dando como resultado la síntesis de fagos híbridos con una mezcla variable de proteína de cubierta silvestre y proteína de cubierta fusionada a péptido foráneo; se cree que la causa de esta variabilidad de expresión depende de diversos factores tales como el tamaño, la composición de aminoácidos y la forma en que se pliega el péptido foráneo (Jacobsson, *et al.*, 2003) (Pande, *et al.* 2010).

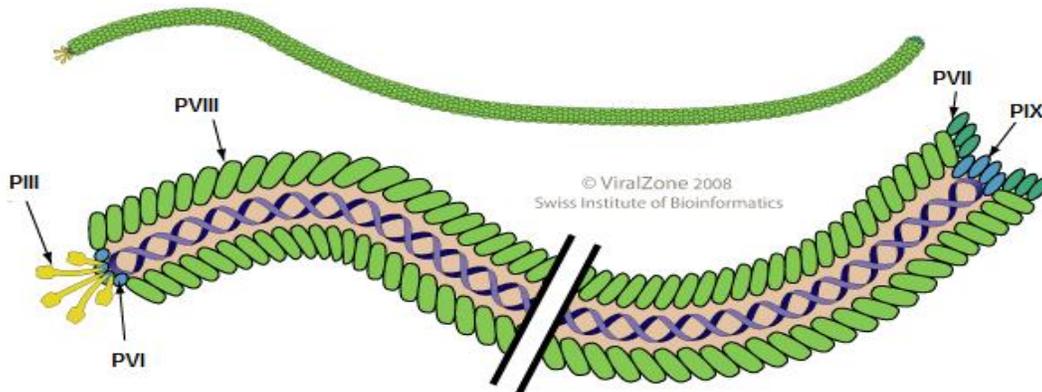


Figura 2: Estructura del fago M13, perteneciente al género Inovirus, es un virus sin envoltura, tipo filamentoso de 7 nm de diámetro y de 700 a 2.000 nm de longitud, se aprecia la distribución de sus proteínas de superficie. Tomado de viral zone 2008. http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/558.html

IV. HIPÓTESIS

Es posible identificar perfiles antigénicos e inmunogénicos en escala de genoma relacionados con el desarrollo de cáncer de mama, mediante un sistema de tamizaje utilizando una biblioteca de cADN de cáncer de mama de ratón desplegada en fago M13 y esplenocitos de un modelo murino de cáncer de mama con trasplante singénico de línea celular 4T1.

V.OBJETIVO GENERAL:

Identificar perfiles antigénicos e inmunogénicos en escala de genoma, relacionados con el desarrollo de cáncer de mama, mediante un sistema de tamizaje utilizando una biblioteca de cADN de cáncer de mama de ratón desplegada en fago M13 y esplenocitos de un modelo murino de cáncer de mama con trasplante singénico de línea celular 4T1.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Construcción de la biblioteca de cADN de cáncer de mama de ratón desplegadas en fago M13;
2. Tamizaje de la biblioteca de cADN de cáncer de glándula mamaria de ratón desplegadas en fago M13, mediante ensayos de proliferación con esplenocitos de modelo murino de cáncer de mama con trasplante singénico de línea celular 4T1.
3. Identificación y selección de clonas de acuerdo a sus propiedades antigénicas durante los ensayos de proliferación (Secuenciación de ADN, búsqueda en bases de datos de las mejores clonas);
4. Evaluación del efecto antitumoral de las clonas identificadas en un modelo murino de cáncer de mama con trasplante singénico de línea celular 4T1.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

La metodología general se puede dividir en tres etapas: obtención de la biblioteca de fagos recombinantes, tamizaje de dicha biblioteca y evaluación del efecto antitumoral de las clonas seleccionadas. La estrategia realizada se resume en la Figura 3.

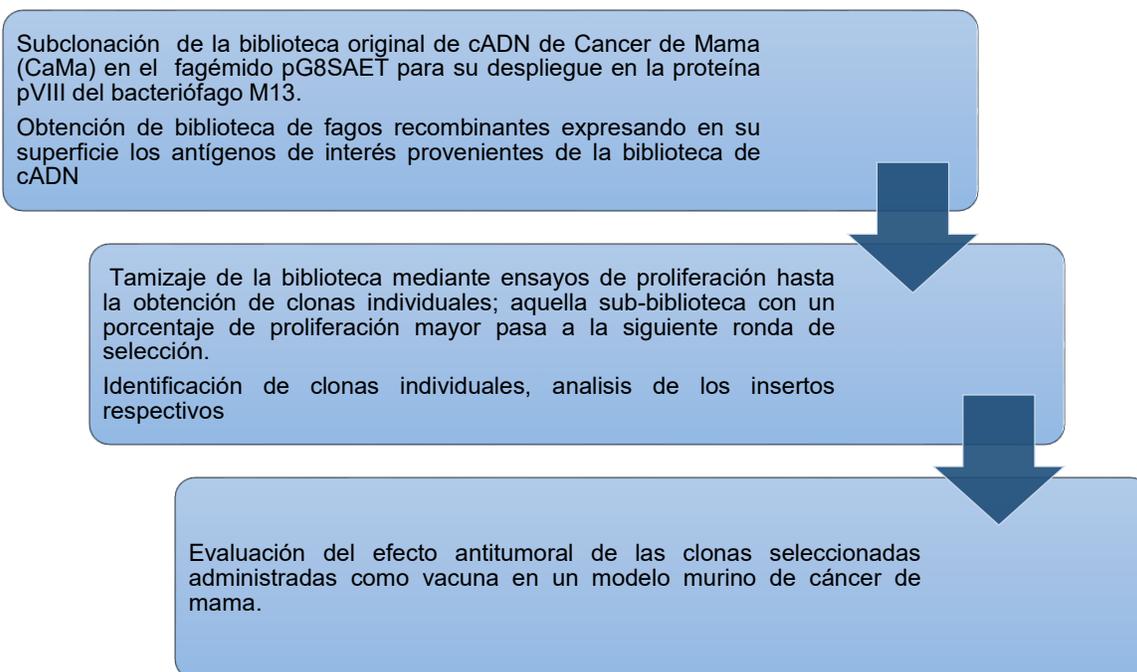


Figura 3. Metodología empleada para identificación de antígenos involucrados en la respuesta inmune contra cáncer.

Todos los procedimientos de biología molecular se llevan a cabo utilizando los protocolos estándar así como las recomendaciones del fabricante. Las enzimas de restricción, kits de aislamiento y purificación de ADN, ADN polimerasa, T4 ADN ligasa y fago ayudador (helper) son obtenidos de Invitrogen, Qiagen o Gibco.

Subclonación de la biblioteca de cADN de CaMa

Se realizó la subclonación de la biblioteca comercial *NCI CGAP Lu29 cADN Library Mammary gland tumor* (Tabla 9) en el fagémido pG8SAET para su expresión en la proteína pVIII de bacteriófago M13.

**Tabla 9: Características de biblioteca NCI CGAP Lu29 cDNA Library
Mammary gland tumor**

Marca	Invitrogen
Catálogo	12023-016
Vector	pCMV•SPORT6
Tamaño de inserto	1.9 kb
Complejidad	1x10 ⁷
Fuente del ARN	Tumor de glándula mamaria de ratón
Sitios de clonación	<i>Not I / Sal I</i>

La amplificación de insertos de cADN de la biblioteca original se realizó por PCR mediante el uso de los oligos 5SPO y 3N6SNB. Se muestran los oligos en la Figura 4.

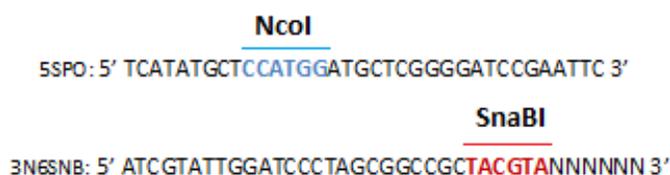


Figura 4: Oligonucleótidos utilizados en la subclonación. 5SPO y 3N6SNB permiten la amplificación de los insertos de cADN de la biblioteca comercial y su posterior subclonación en el vector pG8SAET gracias a que contiene en su secuencia los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *NcoI* y *SnaBI*.

El diseño del oligonucleótido 3N6SNB, permite gracias a su extremo 3' de bases aleatorias, unirse de manera azarosa dentro del inserto, dando como resultado la amplificación de insertos con diversos tamaños y evitando las regiones 3' no codificantes de los cADN's. Los productos de PCR dentro del rango de 300-2500 pb (pares de bases) fueron purificados usando el kit de extracción QIAquick Gel Kit de Qiagen, después fueron digeridos con las enzimas de restricción *NcoI* y *SnaBI*.

Ligación de los insertos con el fagémido.

Se realizó la digestión del ADN del vector pG8SAET con las enzimas de restricción *NcoI* y *SnaBI*, posteriormente los insertos previamente purificados se unen al ADN del fagémido mediante una reacción de ligación usando T4 ADN ligasa. La imagen del vector se muestra en la Figura 5.

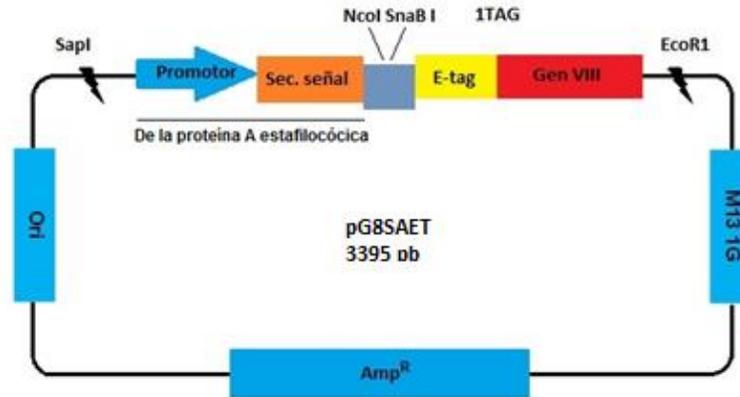


Figura 5. Esquema del fagémido pG8SAET. La subclonación de los fragmentos de cADN de la biblioteca de cáncer de mama de ratón se realizó en los sitios de *NcoI* y *SnaBI* del sitio de clonación del fagémido, además contiene un gen de resistencia a antibiótico y dos orígenes de replicación, uno para el plásmido y otro para el fago filamentos, este último se activa hasta la infección con fago “helper”. Contiene una señal de empaquetamiento que permite la expresión de un péptido foráneo fusionado a la proteína seleccionada.

El ADN obtenido de la ligación fue transformado por electroporación en células *Escherichia coli* TG1 usando Gene Pulser II System de Bio-Rad. Las células TG1 transformadas fueron plaqueadas en agar selectivo con carbenicilina para determinar la complejidad de la biblioteca.

La diversidad de los insertos de la biblioteca se verificó mediante una PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos:

5YSAET 5' GGAAAAACATTTATTCGTAAGTAG 3'
F8OLI 5' GACAATGACAACAACCATCGCCCACGCATA 3'

Los fragmentos obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Finalmente la biblioteca fue conservada a -70°C almacenando las células transformadas de *E. Coli* en medio 2YT con glicerol al 30%.

La biblioteca resultante fue rescatada y amplificada utilizando el fago ayudador M13K07; los fagos recombinantes resultantes fueron purificados en un volumen de 100 mL de medio 2X YT seguido de una doble precipitación con PEG/NaCl (20% w/v polietilenglicol-8000; 2.5M NaCl) y resuspendido en buffer TBS (Tris buffer). Por último la biblioteca es titulada por medio de diluciones seriadas y crecimiento en placas con carbenicilina, esperando un rendimiento de rescate de aproximadamente de 10^{10} a 10^{11} unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro de cultivo (Robles, *et al.*, 2005).

División y tamizaje de la biblioteca de cADN desplegada en fago M13

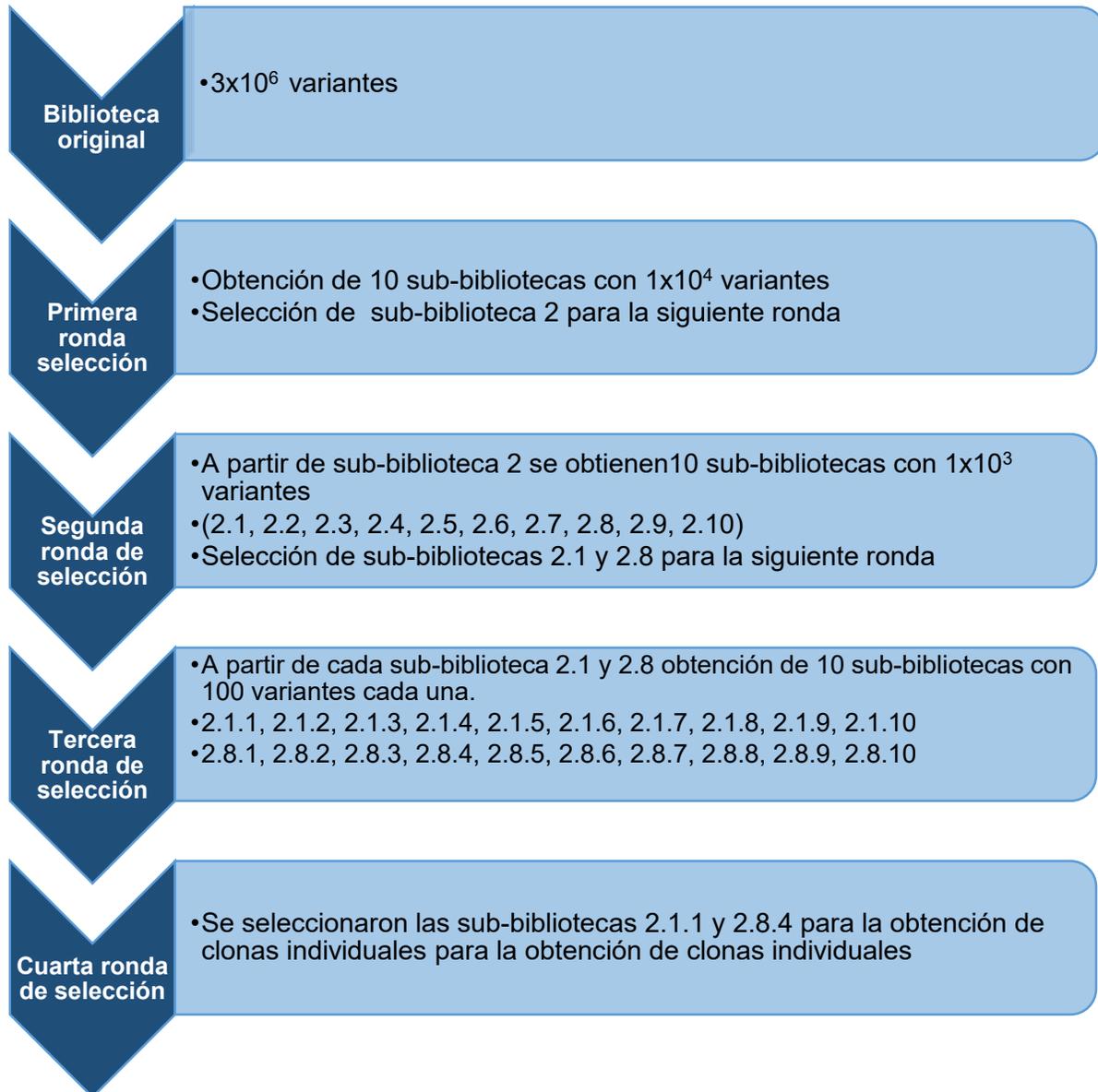
Se sometió la biblioteca a rondas sucesivas de división y selección, la selección se hizo con base en ensayos de proliferación de esplenocitos de ratón Balb/c implantados con células 4T1, línea celular de cáncer de mama.

Para iniciar el tamizaje de la biblioteca de cADN, a partir del título de la biblioteca inicial se tomó el volumen necesario para obtener 10 sub-bibliotecas con 1×10^4 clonas cada una. En este momento se realizó el primer ensayo de proliferación, la biblioteca con el porcentaje de proliferación más alto se selecciona para la siguiente ronda de proliferación. Se eligió la sub-biblioteca 2.

A partir del título de la sub-biblioteca 2 se tomó el volumen necesario para obtener 10 sub-bibliotecas con 1×10^3 variantes (2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10) se realizó el segundo ensayo de proliferación y se eligieron las sub-bibliotecas 2.1 y 2.8, de igual forma se dividieron cada una en 10 sub-bibliotecas de manera que tuviera 100 variantes cada una. Se obtuvieron 20 sub-bibliotecas (2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6, 2.1.7, 2.1.8, 2.1.9, 2.1.10 y 2.8.1, 2.8.2, 2.8.3, 2.8.4, 2.8.5, 2.8.6, 2.8.7, 2.8.8, 2.8.9, 2.8.10). Se realizaron nuevamente ensayos de proliferación con las 20 sub-bibliotecas y se seleccionaron las sub-bibliotecas 2.1.1 y 2.8.4 para la

obtención de clonas individuales. Lo anteriormente descrito se resume en la siguiente Figura 6.

Figura 6: Esquema general que describe las rondas de proliferación y selección sucesivas aplicadas a la biblioteca de cADN, hasta la obtención de clonas individuales



Obtención de clonas individuales

Para la obtención de clonas individuales clonas se utilizó la técnica de purificación de fago en placa, la cual permite realizar hasta 96 purificaciones individuales a la vez, a partir de un volumen menor. La técnica se describe a continuación.

Purificación de fago en placa

Día 1: Repartir 300 μ l de medio 2xYT suplementado con 50 μ g/ml de carbenicilina a tantos pozos de una placa como sean necesarios. Se utilizaron placas Corning Costar estéril con capacidad hasta 700 μ l.

Con las dos sub-bibliotecas 2.1.1 y 2.8.4 de fagos recombinantes, se hace la infección de un cultivo de células TG1 por cada sub-biblioteca, se plaquean en agar selectivo con carbenicilina para obtener colonias aisladas. Posteriormente se toma cada colonia por picadura y es inoculada en el pozo correspondiente. Incubar a 37°C a 250 rpm de agitación por un periodo de 3 a 4 horas, hasta observar aproximadamente 0.7 D.O.

Agregar fago ayudador M13K07 a 10 MOI diluido en 100 μ l de YT2X suplementado a 50 μ l/ml de carbenicilina por pozo.

MOI = Multiplicidad de infección
1 MOI = 1 Fago por cada célula
10 MOI = 10 Fagos por cada célula

Incubación 30 min a 37°C sin agitación para permitir llevar a cabo la infección.

Incubación 30 min a 37°C con agitación a 250 rpm.

Agregar 100 μ l de medio YT2X suplementado a 50 μ l/ml de carbenicilina y con kanamicina de manera que la concentración final en cada pozo sea de 50 μ l/ml.

Dejar crecer toda la noche a 30°C a 250 rpm.

Día 2: Centrifugar a 4°C a la máxima velocidad soportada para placas por 30 min.

Recuperar sobrenadante en una nueva placa de 96 pozos estéril.

Adicionar 1/4 de volumen de PEG 8000 al 20% NaCl 2.5 M y mezclar con movimientos arriba – abajo usando la pipeta.

Dejar reposar en refrigeración toda la noche.

Día 3: Centrifugar a 4°C a la máxima velocidad soportada para placas por 30 min.

Desechar sobrenadante y se homogeniza el botón con 100 µl de TBS. Almacenar caja a 4°C.

Por último la biblioteca es titulada por medio de diluciones seriadas y crecimiento en placas con carbenicilina, esperando un rendimiento de rescate de aproximadamente de 10^7 a 10^8 unidades formadoras de colonias (cfu) por mililitro de cultivo.

Modelo murino de cáncer de mama

Para la obtención de esplenocitos de ratón del modelo de cáncer de mama, se realizó trasplante singénico con 1×10^4 células 4T1 viables/50 µl de PBS en la periferia de la glándula mamaria (zona inguinal, flanco derecho) en ratones Balb/c hembras de entre 4 y 6 semanas (NoeDominguez, *et al.*, 2015).

Ensayos de proliferación celular

Para el ensayo de proliferación celular se requiere marcar los esplenocitos de ratón con diacetato de carboxifluoreceína (CFSE, por sus siglas en inglés carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester. Un fluorocromo al cual la membrana celular es permeable. Se acopla de manera irreversible a las proteínas intracelulares y de membrana mediante una reacción con grupos amino y residuos de lisina. De manera que a medida que una célula se divide el fluorocromo se reparte de manera equitativa entre las células hijas, como resultado se obtiene una disminución en la intensidad de fluorescencia comparada con aquellas células que no se dividen.

Las células de bazo fueron obtenidas de ratones 14 y 30 días después del implante. Las células fueron resuspendidas en una solución de PBS/1% BSA precalentada para obtener una concentración final de 1×10^6 células por mL, posteriormente se adiciona 2 μ l de la solución stock de SFCE 5 mM para su marcaje.

La suspensión de células marcadas con CFSE se distribuyen en la placa: 2×10^5 células por pozo cocultivadas por tres días con las sub-bibliotecas o clonas individuales de interés, colocando 3×10^9 fagos por pozo (1.5×10^{10} fagos/mL). Además se incluyó para cada ensayo:

Blanco: células sin teñir y sin estímulo antigénico

Control negativo: células teñidas sin estímulo antigénico

Control positivo: células teñidas con un mitógeno (Concanavalina)

Finalmente los esplenocitos se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de proliferación de esplenocitos totales. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScalibur con un rango de 5000 a 10,000 eventos. Para el análisis posterior se utilizó el programa Cyflogic V 1.2.1. Para dicho análisis se procede a realizar primero una gráfica de tamaño versus granularidad, una vez realizado esto, se delimitó una región R1 correspondiente a los esplenocitos, posteriormente se realizó un histograma a partir de la región de interés. Figura 7.

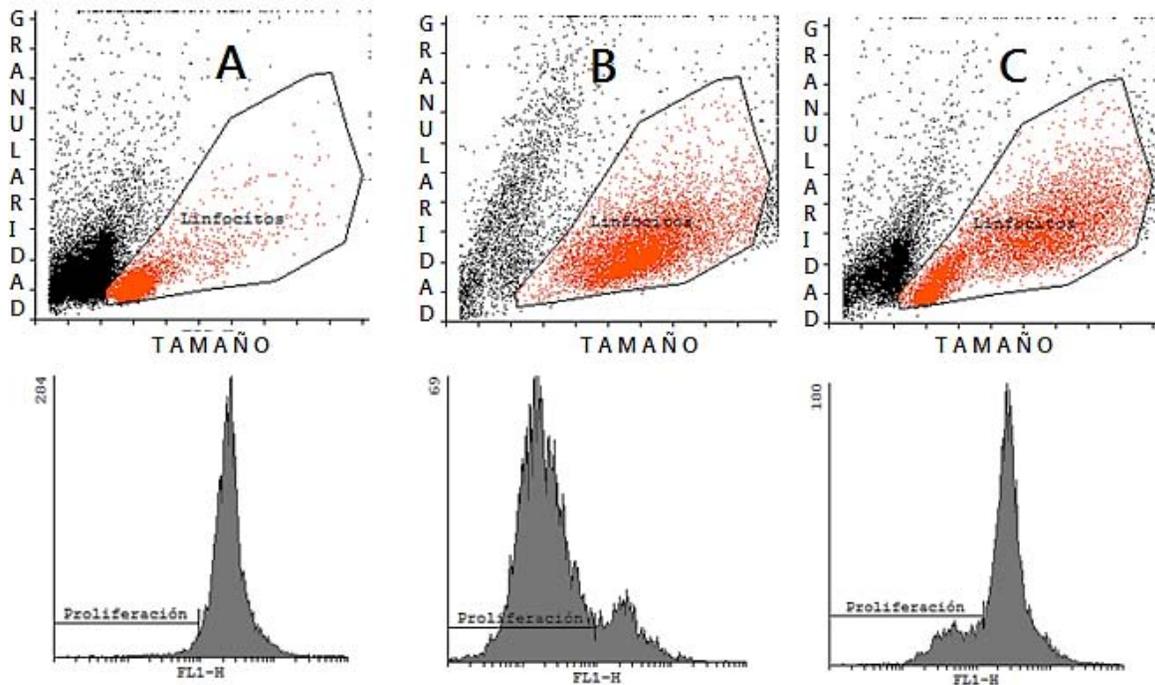


Figura 7: Gráficas obtenidas mediante el programa Cyflogic V 1.2.1. de las muestras analizadas para medir porcentaje de proliferación. En la parte superior de las columnas A, B y C se observa las gráficas de tamaño contra granularidad para control negativo (A), control positivo (B) y (C) muestra representativa analizada. Además se observa la región delimitada de las células de interés en color rojo. En la parte inferior se muestra el histograma correspondiente a cada gráfica. En (A) se muestra el pico de esplenocitos que no proliferaron, esto en ausencia de fago y mitógeno, se utiliza este control para indicar el marcador (barra horizontal que indica proliferación). Control positivo (B), se observa el pico de los esplenocitos que proliferan con Concanavalina A y muestra cultivada con fago recombinante (C).

Purificación de ADN

Una vez identificadas las clonas más inmunoreactivas con base en los ensayos de proliferación, lo que sigue es analizar su secuencia nucleotídica, para lo cual se hace la purificación del ADN codificante para cada clona expresada por el fagémido, mediante el kit comercial Wisard Plus SV Minipreps ADN Purification System.

Evaluación del efecto antitumoral de clonas individuales seleccionadas en Modelo murino de cáncer de mama

Para evaluar el efecto antitumoral de las clonas individuales se realizó un experimento tipo terapéutico en un modelo murino de trasplante singénico con línea celular 4T1 de cáncer de mama, para este fin, se utilizaron grupos de 6 ratones Balb/c hembras de entre 4 y 6 semanas (NoeDominguez, *et al.*, 2014).

Los ratones se inmunizaron al día 6 posterior al implante con las clonas individuales seleccionadas. La vía de administración fue intraperitoneal. Un grupo de ratones intactos es control del experimento.

Los tumores se midieron en 2 dimensiones cada 3 días utilizando un vernier y el área tumoral fue calculada en mm².

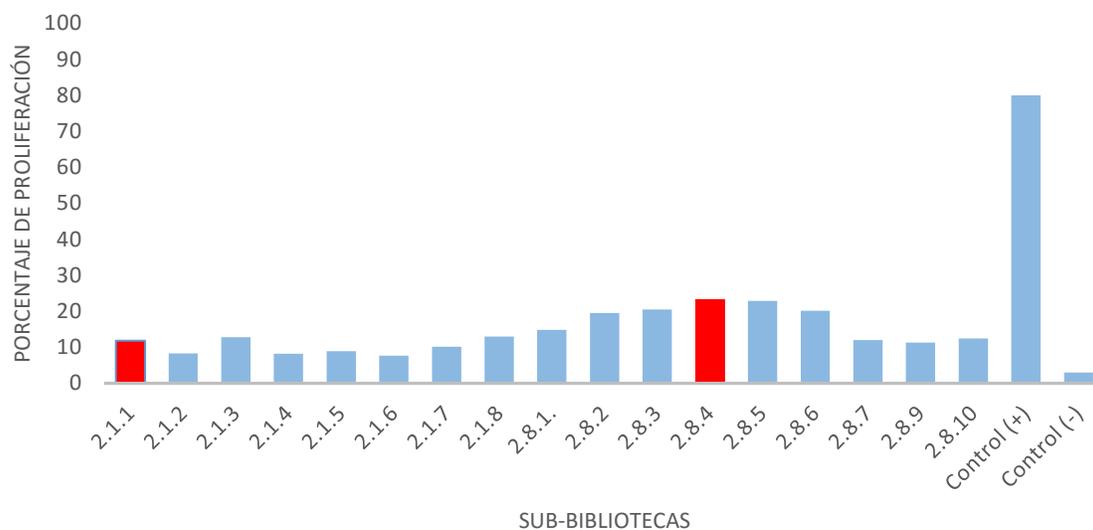
VIII. RESULTADOS

Construcción de biblioteca de cADN desplegada en fago M13

Al verificar la diversidad de la biblioteca de cADN desplegada en fago M13 mediante electroforesis en gel de agarosa y su posterior titulación se obtuvo una complejidad de 3×10^6 clonas.

Tamizaje de la biblioteca de cADN desplegada en fago M13

Se realizó un ensayo de proliferación celular con esplenocitos de ratón Balb/c trasplantados con la línea celular 4T1 al día 14 después del implante. Los esplenocitos fueron marcados con CFSE y después cocultivados por tres días con 17 sub-bibliotecas de fagos con una complejidad de 100 variantes cada una, esto con la finalidad de seleccionar las sub-bibliotecas de las cuales se obtendrán las clonas individuales. Los resultados se muestran en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Ensayo de proliferación celular 1. Se muestra el porcentaje de proliferación de esplenocitos obtenidos de ratón Balb/c al día 14 después de implante con células 4T1, los esplenocitos fueron cocultivados con las 17 sub-bibliotecas con 100 variantes cada una. Se resaltan en color rojo las sub-bibliotecas seleccionadas para la obtención de clonas individuales.

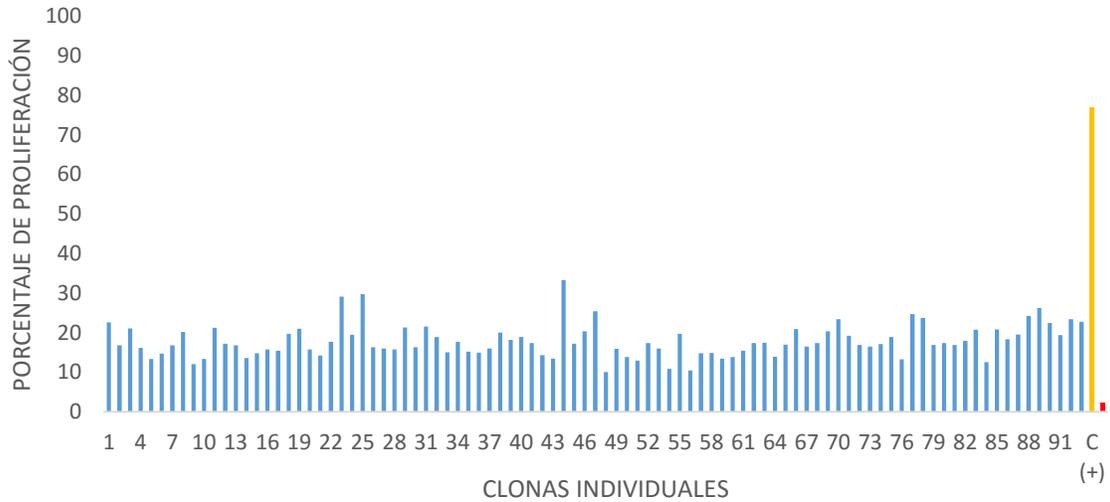
Después de medir la intensidad de fluorescencia como se muestra en la Figura 6, se procede a analizar los datos con el programa Cyflogic y se obtiene el porcentaje de proliferación de cada sub-biblioteca. Se puede apreciar en la Gráfica 1 que el porcentaje de proliferación de las 17 sub-bibliotecas se encuentra entre 7.69% para la sub-biblioteca 2.1.6 y 23.33% para la sub-biblioteca 2.8.4. Los porcentajes de proliferación se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Porcentajes de proliferación de las 17 sub-bibliotecas con 100 variantes			
Sub-biblioteca	Porcentaje de proliferación	Sub-biblioteca	Porcentaje de proliferación
2.1.1	11.88%	2.8.1.	14.86%
2.1.2	8.28%	2.8.2	19.55%
2.1.3	12.81%	2.8.3	20.46%
2.1.4	8.17%	2.8.4	23.33%
2.1.5	8.87%	2.8.5	22.88%
2.1.6	7.68%	2.8.6	20.14%
2.1.7	10.17%	2.8.7	11.99%
2.1.8	12.99%	2.8.9	11.28%
		2.8.10	12.45

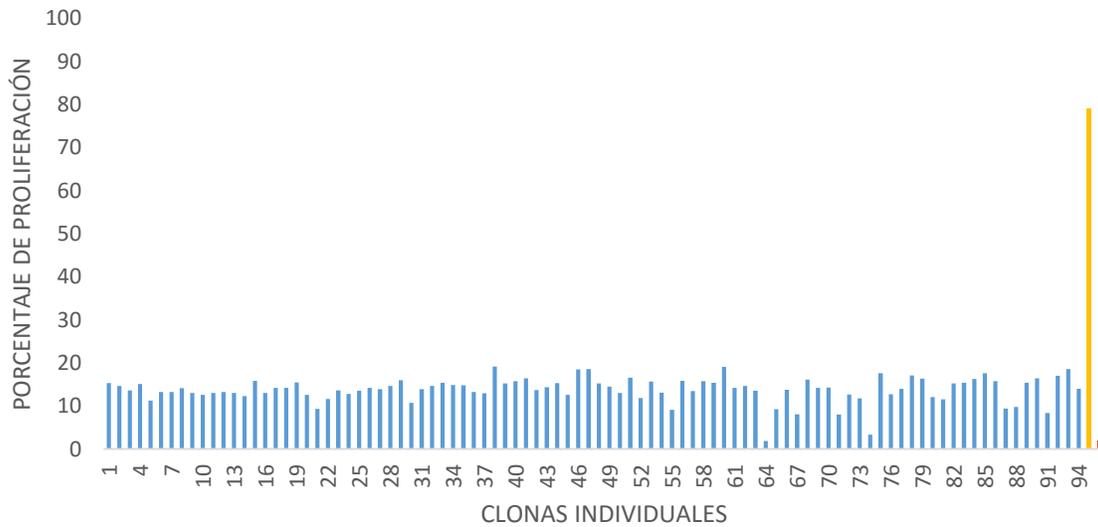
Obtención de clonas individuales

Se obtuvieron 185 clonas individuales provenientes de las sub-bibliotecas 2.8.4 y 2.1.1. La sub-biblioteca 2.8.4 se eligió por presentar el porcentaje de proliferación más alto, por otro lado la sub-biblioteca 2.1.1 muestra un porcentaje de proliferación por encima de la media que es de 11.12% y en ensayos previos donde la biblioteca original fue sido sometida a rondas de selección con ensayos de proliferación, pero usando método de incorporación de Timidina tritiada en lugar de la incorporación de CFSE mostro los porcentajes de proliferación de alrededor del 20%, es por ello que fue seleccionada también para la obtención de clonas individuales.

Posteriormente para determinar cuáles eran las clonas más antigénicas se realizaron ensayos de proliferación con las clonas individuales de ambas sub-bibliotecas y esplenocitos de ratón Balb/c implantado con la línea celular 4T1. Esto se realizó al día 14 y 30 después del implante. Los resultados se muestran en las Gráficas 2, 3, 4 y 5.



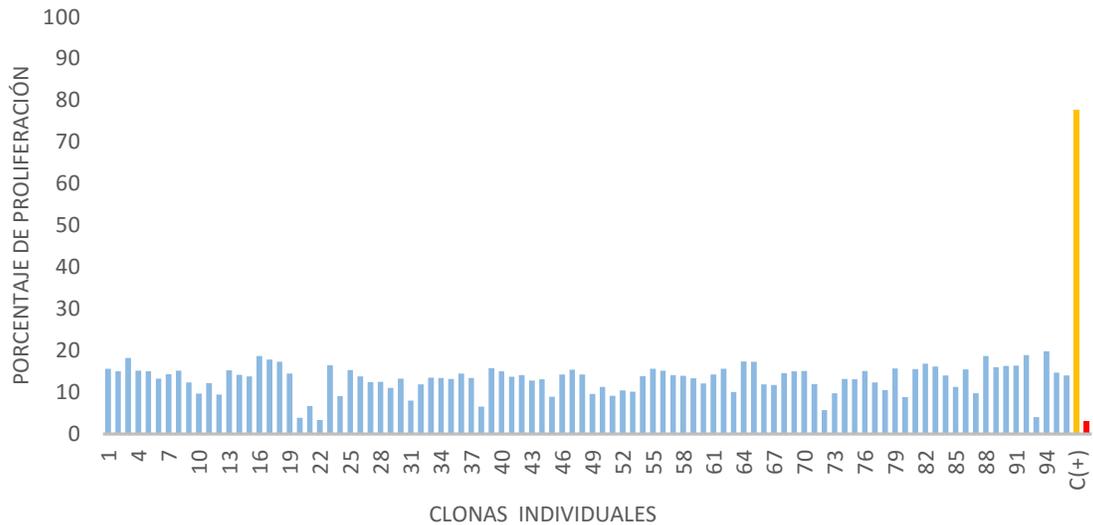
Gráfica 2. Ensayo de proliferación celular 2 Se muestra el porcentaje de proliferación de esplenocitos obtenidos de ratón Balb/c al día 14 después de un implante con células 4T1 cocultivadas con las clones individuales obtenidas de la sub-biblioteca 2.1.1. Se muestran los controles positivo y negativo en color amarillo y rojo respectivamente.



Gráfica 3. Ensayo de proliferación celular 2. Se muestra el porcentaje de proliferación de esplenocitos obtenidos de ratón Balb/c al día 30 después de un implante con células 4T1 cocultivadas con las clones individuales obtenidas de la sub-biblioteca 2.1.1. Se muestran los controles positivo y negativo en color amarillo y rojo respectivamente.



Gráfica 4. Ensayo de proliferación celular 4. Se muestra el porcentaje de proliferación de esplenocitos obtenidos de ratón Balb/c al día 14 después de un implante con células 4T1 cocultivados con las clones individuales obtenidas de la sub-biblioteca 2.8.4. Se muestran los controles positivo y negativo en color amarillo y rojo respectivamente.



Gráfica 5. Ensayo de proliferación celular 5. Se muestra el porcentaje de proliferación de esplenocitos obtenidos de ratón Balb/c al día 30 después de un implante con células 4T1 cocultivados con las clones individuales obtenidas de la sub-biblioteca 2.8.4. Se muestran los controles positivo y negativo en color amarillo y rojo respectivamente.

Como se puede observar en las Gráficas 2, 3, 4 y 5, se obtuvo un porcentaje de proliferación mayor en el ensayo de 14 días con respecto a los ensayos de proliferación de 30 días, estos resultados son los esperados, es un fenómeno que se ha visto reiteradamente en los ensayos de proliferación realizados por el equipo de trabajo bajo las mismas condiciones, probablemente debido a que las células del cáncer con alta de variabilidad antigénica tienden a no ser reconocidas en etapas subsecuentes a los primeros contactos con el sistema inmune del individuo.

En el ensayo de proliferación de 14 días después del implante tenemos un porcentaje de alrededor del 20% de un posible máximo de 79% de proliferación celular de acuerdo con el control positivo del experimento, mientras que en el ensayo de proliferación de 30 días los porcentajes son de alrededor del 15 % de un máximo de 77%, de igual forma comparado con el control positivo del experimento.

Con base en estos resultados se seleccionaron las clonas con los porcentajes de proliferación más alto en los ensayos de 14 días y también algunas clonas con un porcentaje de proliferación un poco menor de manera aleatoria. En la Tabla 11, se enlistan las clonas seleccionadas con su respectivo porcentaje de proliferación.

Tabla 11. Porcentajes de proliferación de las clonas seleccionadas con la sub-biblioteca 2.1.1 y 2.8.4.

Número de clona	Porcentajes de proliferación de clonas individuales de la sub-biblioteca 2.1.1	Número de clona	Porcentajes de proliferación de clonas individuales de la sub-biblioteca 2.8.4
19	20.97%	6	19.01%
23	29.12%	15	21.01%
25	29.76%	20	19.41%
34	17.69%	33	13.53%
44	33.31%	36	19.11%
46	20.4%	37	22.72%
47	25.42%	63	12.52%
69	20.4%	73	22.51%
77	24.68%	84	14.2%
89	26.22%	94	19.74%

Caracterización de clonas individuales seleccionadas

Una vez seleccionadas las clonas, se realizó un ensayo de PCR a las clonas seleccionadas para comprobar la presencia del inserto de ADN y determinar un tamaño aproximado del mismo. Los resultados se observan en la Figura 8.

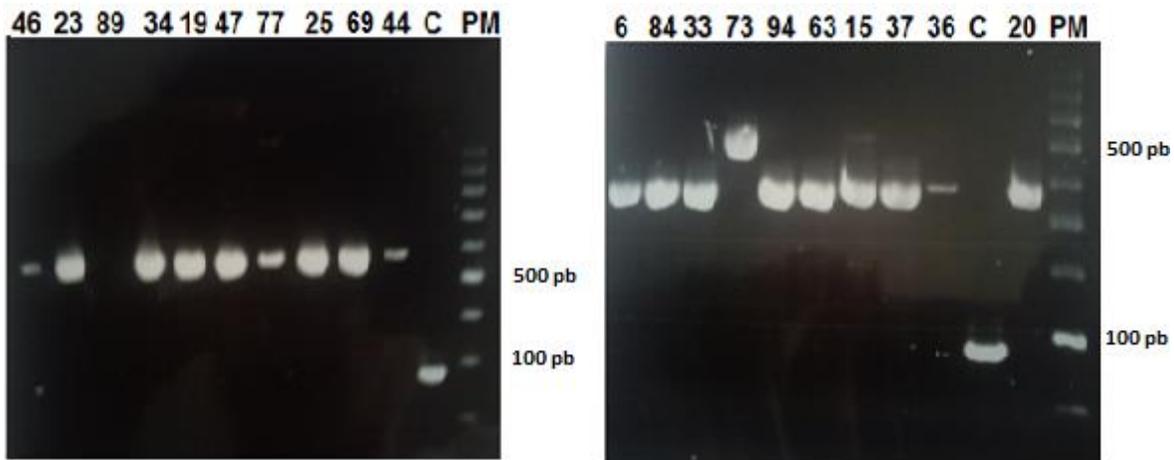


Figura 8. Corrimiento electroforético de los productos de amplificación de las clonas seleccionadas de acuerdo a su porcentaje de proliferación. Se observa el resultado de la PCR en un gel de agarosa. Clonas obtenidas de la sub-biblioteca 2.1.1 panel izquierdo, en él se observa que nueve de las diez clonas presentan inserto. Clonas obtenidas de la sub-biblioteca 2.8.4 panel derecho, en él se observa que las diez clonas seleccionadas presentan inserto. Como control (C) se utilizó el fagémido pG8SAET sin inserto. (PM) marcador de Peso Molecular.

Se observó que el tamaño del inserto es muy similar en todas las clonas. Se decidió secuenciar las clonas que aparentemente tienen el ADN con el mismo peso molecular, las clonas número 25, 37, 15, 84, 63, 77 y 20 además la clona con mayor peso molecular, clona número 73.

Secuenciación de ADN de clonas

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron analizadas en el servidor ExpASy Molecular Biology y el servidor BLAST, para obtener la secuencia de aminoácidos. Se buscó alineamientos en la base de datos del NCBI. Se analizó si el inserto presenta identidad con proteínas y si es el caso, si son proteínas relacionadas con algún tipo de cáncer.

Secuenciación de ADN de clonas 15, 25, 37, 63, 77 y 84

Alineación de nucleótidos (Blastn): secuencia de 289 nucleótidos. Identidad del 99% con un fragmento de una región exónica de mRNA Dominio 1 de monofosfatasa (Impad 1), sin embargo la alineación del inserto es plus/minus.

Secuenciación de ADN de clona 73

Alineación de nucleótidos (Blastn): secuencia de 397 nucleótidos plus/plus. Identidad del 98% con un fragmento de una región exónica del mARN Dominio 1 de Inositol Monofosfatasa (Impad1). Aunque pertenece a la misma región exónica, que las clonas anteriores, esta clona se encuentra varias decenas de nucleótidos rio arriba.

```

Query 1      GGAAACTTGGTATTAATTTAATAGGAGTTGTTAGTTTTTTAAAACAGTTTCAGACAACACTAG  60
            |
Sbjct 2859   GGAAACTTGGTATTAATTTAATAGGAGTTGTTAGTTTTTTAAAACAGTTTCAGACAACACTAG  2918

Query 61     TCTAATCACCAGATAATATGACAGGAGAAAGGAAATCCTGCTTCTCTGGCGAGATGCCA  120
            |
Sbjct 2919   TCTAATCACCAGATAATATGACAGGAGAAAGGAAATCCTGCTTCTCTGGCGAGATGCCA  2978

Query 121    GAGCAGGTCGTCTCACCAGAATCCTGTATTAGGAACCTCTGTGTCACTGTAACATGTCAA  180
            |
Sbjct 2979   GAGCAGATCGTCTCACCAGAATCCTGTATTAGGAACCTCTGTGTCACTGTAACATGTCAA  3038

Query 181    CGCAGAAAATAGAACTTAATTGGGTATTTTTTTAATGTGCAGAACTTTATCATTTATTA  240
            |
Sbjct 3039   CGCAGAAAATAGAACTTAATTGGGTAAATTTTTTAATGTGCAGAACTTTATCATTTATTA  3098

Query 241    CGAGTAAAAC TAGTTCATATTTTGT AAGCACAATTGCTTTTCTTCTAGTTTCATTAACA  300
            |
Sbjct 3099   CAAGTAAAAC TAGTTCATATTTTGT AAGCACAATTGCTTTTGT TTTTAGTTTCATTAACA  3158

Query 301    GTTATCACTAAGAATAGGAACATTGTGTGTTGGGCTCAGAAGCAAAGATGCTGGCTGAGA  360
            |
Sbjct 3159   GTTATCACTAAGAATAGGAACATTGTGTGTTGGGCTCAGAAGCAAAGATGCTGGCTGAGA  3218

Query 361    GGTGAAAGTAGTTTTTATAATTTGTTTCGTGTTATCTA  397
            |
Sbjct 3219   GGTGAAAGTAGTTTTTATAATTTGTTTCGTGTTATCTA  3255
    
```

Query: se refiere a la secuencia nucleotídica perteneciente a la clona seleccionada.

Sbjct: se refiere a la secuencia nucleotídica encontrada en la base de datos electrónica (NCBI 2015).

Alineación de aminoácidos (Blastx): No tiene identidad relevante con proteínas reportadas.

Secuenciación de ADN de clona 20

Alineación de nucleótidos (Blastn): secuencia de 391 nucleótidos con identidad del 98% con una región exónica del mRNA de Lectina de Unión a Manosa 2 (Lman2), el alineamiento es plus/plus.

```

Query 1   CACAGGGAAGAAGAACCTCCACGGAGATGGCAAAGCCTTGTGGTACACCCGAGACCGCCT 60
          |||
Sbjct 566 CACAGGGAAGAAGAACCTCCACGGAGATGGCATTGCCTTGTGGTACACCCGAGACCGCCT 625

Query 61  CGTACCAGGGCCTGTGTTTGAAGCAAAGACAACCTCCATGG 102
          |||
Sbjct 626 CGTACCAGGGCCTGTGTTTGAAGCAAAGACAACCTCCATGG 667
    
```

Query: se refiere a la secuencia nucleotídica perteneciente a la clona seleccionada

Sbjct: se refiere a la secuencia nucleotídica encontrada en la base de datos electrónica (NCBI 2015)

Alineación de aminoácidos (Blastx): Se encuentra un alineamiento de 32 aminoácidos con un 97% de identidad con un fragmento de la proteína VIP36 de ratón y homología con la misma región de la proteína equivalente en humanos.

```

Query 2   TGKKNLHGDGKALWYTRDRLVPGPVFGSKDNFHG 103
          TGKKNLHGDG ALWYTRDRLVPGPVFGSKDNFHG
Sbjct 125 TGKKNLHGDGIALWYTRDRLVPGPVFGSKDNFHG 158
    
```

Query: se refiere a la secuencia de aminoácidos pertenecientes a la clona seleccionada.

Sbjct: se refiere a la secuencia de aminoácidos encontrada en la base de datos electrónica correspondiente a la proteína VIP36 de ratón (NCBI 2015).

```

Query 2   TGKKNLHGDGKALWYTRDRLVPGPVFGSKDNFHG 103
          TGKKNLHGDG ALWYTRDRLVPGPVFGSKDNFHG
Sbjct 123 TGKKNLHGDGIALWYTRDRLVPGPVFGSKDNFHG 156
    
```

Query: se refiere a la secuencia de aminoácidos pertenecientes a la clona seleccionada.

Sbjct: se refiere a la secuencia de aminoácidos encontrada en la base de datos electrónica correspondiente a la proteína VIP36 de humano (NCBI 2015).

En la Figura 8 se aprecia la región de la proteína VIP36 a cual es homóloga la clona 20.

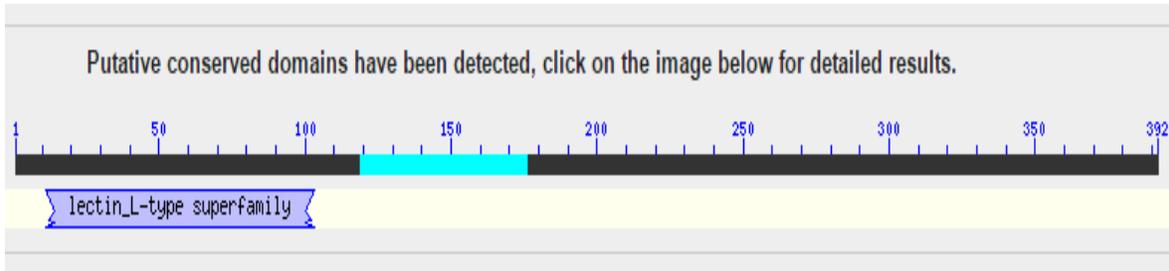


Figura 9. Se aprecia la región de la proteína VIP36 a cual es homóloga la clona 20. Es una proteína integral de membrana de la vía secretora de mamíferos perteneciente a la súper familia de las lectinas. Están implicadas en el transporte selectivo de glicoproteínas recién sintetizadas en el Retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi. Los números indican el total de nucleótidos y la sección resaltada indica el lugar específico de la concordancia entre ambas secuencias. (Tomado de NCBI, abril 2016).

Podemos apreciar en los resultados que al final del tamizaje obtuvimos reiteradamente la misma clona, tal fue el caso de las clonas 15, 25, 37, 63, 77 y 84. Debido a los resultados obtenidos se sugiere que la amplificación y rescate de la biblioteca puede producir un sesgo por fago, es decir que se esté favoreciendo solo ciertas variantes de fagos con la amplificación y rescate iterativos que se realizaron a la biblioteca original, esto ya se ha comprobado en un proyecto que se realizó paralelamente a este en el laboratorio.

Se decidió realizar un experimento de tratamiento terapéutico con dos de las clonas obtenidas para probar su posible efecto antitumoral, de esta manera se aborda el objetivo particular número 3.

Experimento 1: Tratamiento terapéutico

Se realizó un experimento de tratamiento terapéutico en modelo murino de cáncer de mama usando dos de las clonas seleccionadas:

Clona 73: secuencia de 447 nucleótidos en orientación plus/plus. Identidad del 98% con un fragmento de una región exónica del mARN Dominio 1 de Inositol Monofosfatasa (Impad1).

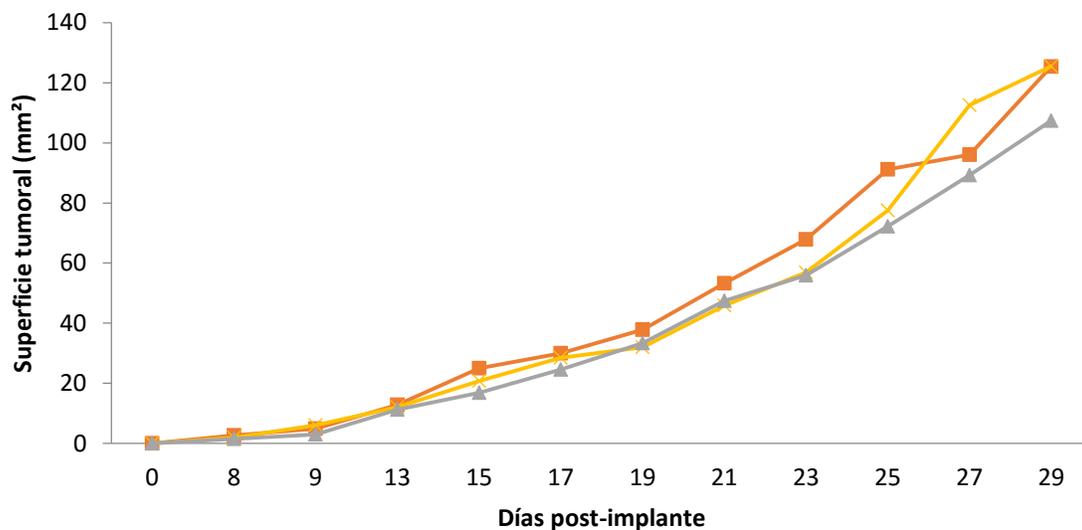
Clona 20: secuencia de 391 nucleótidos con identidad del 98% con una región exónica del mARN de Lectina de Unión a Manosa 2 (Lman2), el alineamiento es plus/plus.

El modelo murino de cáncer de mama se realizó con ratones Balb/c y fue implantado con la línea celular 4T1 como se indica en la sección de materiales y métodos. Para realizar el experimento se organizaron tres grupos con 6 ratones cada uno. Tabla 12.

Tabla 12. Distribución de ratones en tres grupos para el experimento terapéutico	
Grupo 1: Inmunizados con la clona 73	Ratones con tumor que recibieron tratamiento con protocolo de inmunización al día 6 posterior al implante con la clona seleccionada.
Grupo 2: Inmunizados con la clona 20	Ratones con tumor que recibieron tratamiento con protocolo de inmunización al día 6 posterior al implante con la clona seleccionada.
Grupo 3: Grupo control	Ratones con tumor sin tratamiento.

Dicho protocolo de inmunización ha demostrado mejores resultados a lo largo de varios estudios realizados por el equipo de trabajo, es por ello que se ha estandarizado en los ensayos de tipo terapéutico.

A continuación se muestran los resultados del experimento terapéutico utilizando las clonas 73 y 20 en modelo murino de cáncer de mama. Gráfica 6.



Grafica 6. Experimento de tratamiento terapéutico utilizando las clonas 73 y 20 respectivamente en un modelo murino de cáncer de mama. Se aprecia la dinámica de crecimiento tumoral durante los días que duró el experimento. En cuadros se aprecia el comportamiento del grupo control, en cruces se aprecia el comportamiento del grupo inmunizado con la clona 20 y en triángulos se observa la dinámica de crecimiento tumoral del grupo inmunizado con la clona 73.

Se observa en la Gráfica 6 que las dinámicas de crecimiento de los tres grupos se comportan de manera muy similar, no existen diferencias con significancia estadística en la dinámica de crecimiento tumoral.

IX. DISCUSIÓN

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, cada año mueren miles de personas a causa de las complicaciones de la enfermedad.

Los tratamientos que actualmente se ofrecen a los pacientes, quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia y cirugía además de no ser del todo efectivos, afectan de manera significativa la calidad de vida del paciente. Otro factor determinante en el éxito del tratamiento es la detección temprana de la enfermedad, sin embargo en la mayoría de los casos, el paciente se presenta en un estado avanzado.

Existe una alternativa a los tratamientos antes mencionados, los denominados tratamientos biológicos o inmunoterapia, donde es el sistema inmune del paciente responsable de erradicar a las células tumorales. En los últimos años los grupos de investigación trabajan para entender mejor como interfiere la respuesta inmune en el desarrollo de un tumor, con el principio de que, al entender estas relaciones podremos manipular los complejos mecanismos a nuestro favor.

La inmunoterapia es una alternativa muy prometedora, sin embargo sigue siendo relegada debido al limitado repertorio de tratamientos existentes.

La necesidad de ampliar el repertorio de blancos inmunológicos para el tratamiento con inmunoterapia, así como blancos moleculares que se puedan utilizar como componentes de vacunas o inmunodiagnóstico es la razón de ser del presente proyecto.

La tecnología de despliegue en fagos permite la expresión de polipéptidos exógenos en la superficie de partículas de fago. Una biblioteca de partículas de fago que expresan una amplia diversidad de péptidos se utiliza para seleccionar aquellos que se unen a un blanco específico (Pande J. 2010). El fago M13 filamentoso es el vector más comúnmente utilizado para crear bibliotecas de péptidos. El presente proyecto propone la tecnología de despliegue en fago M13 en la búsqueda de nuevos antígenos relacionados con cáncer de mama, una técnica que acompañada de la

purificación masiva en placa nos permite probar cientos de posibles epítomos/antígenos de una vez.

Los ensayos de proliferación se realizaron a los 14 y 30 días después del implante como se menciona en la metodología, sabemos que las células T son capaces de reconocer antígenos tumorales que son presentados por células presentadoras de antígenos y también pueden reconocer antígenos tumorales de manera directa sobre las células tumorales si ya son células activadas. El planteamiento del presente proyecto se basa en la capacidad de las células T de reconocer dichos antígenos y proliferar ante el estímulo antigénico positivo, cada ensayo siempre comparado con el control negativo. Como podemos observar en las gráficas derivadas de los ensayos de proliferación del día 14 (Gráficas 2 y 4), comparadas con las gráficas de 30 días (gráficas 1 y 3) se aprecia una disminución general en el porcentaje de proliferación al día 30, este resultado es el esperado, es un fenómeno que se ha observado en cada ensayo de proliferación realizado por el equipo de trabajo bajo las mismas condiciones, probablemente debido a que las células del cáncer en una etapa temprana de este proceso microevolutivo pueden ser reconocidas por las células T, sin embargo a medida que la enfermedad avanza y la variabilidad antigénica aumenta, las células T pierden la capacidad de reconocer a dichas células que ahora expresan un fenotipo diferente que les permite escapar a la respuesta inmune, etapa conocida como escape tumoral. Además también es importante mencionar que este fenómeno está reflejando el proceso de inmunosupresión.

Como ya se ha descrito en los resultados, la estrategia de obtención de los fagos recombinantes mediante rondas sucesivas de selección que consistían en la infección de *E. coli* con fagos recombinantes para su posterior infección con fago Helper, demostró que promueve una reducción de la variabilidad de clonas, un fenómeno de sesgo por fago; este resultado surgió después de comprobar la diversidad de la biblioteca mediante el corrimiento electroforético de las clonas individuales de la última ronda de selección, como se observó en los resultados en

la figura 8 y su posterior secuenciación, se comprobó que las clonas 15, 25, 37, 63, 77 y 84 tienen el mismo inserto de ADN.

Tal resultado invito a buscar información con respecto a este fenómeno de sesgo. Se encontró que *Derda, et al.*, en 2011 refiere que la amplificación iterativa de las bibliotecas, parte de la tecnología de despliegue en fago y paso indispensable para la selección de ligandos específicos de la biblioteca, decrece la diversidad de biblioteca y limita la diversidad además de la cantidad de clonas potenciales. Esta evidencia nos ayuda a comprender los resultados obtenidos después de las rondas iterativas de selección.

El objetivo del presente proyecto fue encontrar antígenos específicos que favorecieran la proliferación celular de esplenocitos de ratón relacionados al cáncer de mama, de manera que en este sentido, se demostró que es posible identificar perfiles antigénicos de cáncer de mama mediante tamizaje usando bibliotecas de cADN y esplenocitos de ratón, a pesar del sesgo.

A partir de los ensayos de proliferación se detectaron clonas antigénicas que fueron reconocidas de manera específica y favorecieron los mayores porcentajes de proliferación de los esplenocitos de ratón.

Cuando se analizaron las correspondientes secuencias de las clonas seleccionadas se encontró que presentan coincidencias en forma de secuencia nucleotídica o en forma de péptido en alineamiento plus/plus en algunas de ellas. Destaca la clona 20 con identidad del 98% con una región exónica del mRNA de Lectina de Unión a Manosa 2 (Lman2), en alineamiento plus/plus. Se puede apreciar que el 2% que no coincide con la proteína reportada, corresponde a mutaciones, lo que genera un cambio en la secuencia de aminoácidos en el péptido identificado, esto refleja la variabilidad antigénica propia del cáncer y podría tratarse de un antígeno específico de tumor.

Se realizó una búsqueda de reportes que pudieran relacionar a la proteína de la cual provienen dichos péptidos y se encontró lo siguiente:

La región exónica de este gen codifica para una Lectina transmembranal tipo I que participa en la comunicación entre el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y la membrana plasmática, está relacionada con la vía secretora facilitando el transporte de ciertas glicoproteínas desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi (Fullekrug, *et al.*, 1999) (Dahm, *et al.*, 2001).

Con respecto a su relación con el cáncer de mama, Marumuthu, *et al.*, en 2013 realizó un estudio mediante proteómica cuantitativa utilizando la técnica de SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell cultura), para analizar las proteínas secretadas por células neoplásicas del epitelio gástrico comparadas con células del epitelio gástrico normales y propone cuatro proteínas que según datos que arroja su estudio están sobreexpresadas en cáncer gástrico. Una de las proteínas candidatas en su estudio es Lectina de Unión a Manosa 2 (Lman2).

No se encontraron más referencias que relacionen dicha proteína con el cáncer, sin embargo el aumento en la expresión de un antígeno lo hace un blanco potencial para tratamiento o como candidato de inmunodiagnóstico. Así mismo esta sobreexpresión podría explicar el reconocimiento por parte de los linfocitos T. Es importante mencionar que moléculas inmunoreactivas no necesariamente tienen que ser relacionadas con desarrollo de cáncer.

Las clonas 15, 25, 37, 63, 77 y 84 presentan el mismo inserto perteneciente a una región exónica del mARN Dominio 1 de monofosfatasa, sin embargo el inserto no está orientado correctamente por lo que la expresión de la proteína teóricamente no sería posible, por otro lado la clona 73 que presenta un inserto diferente pero perteneciente a la misma región exónica del mismo mARN, se encuentra en orientación plus/plus, a pesar de ello no se encuentra relevancia con proteínas reportadas. Se propone que por medio de splicing alternativo esta región exónica no esté presente en el mARN maduro y por ende en la proteína funcional. Se tiene conocimiento de que el splicing alternativo es un mecanismo que juega un papel crítico en el desarrollo de procesos fisiológicos y su desregulación está altamente asociado con enfermedades como el cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Le, *et al.*, 2015).

Como primer acercamiento para evaluar las propiedades inmunogénicas y protectoras de las clonas individuales obtenidas, se realizó un experimento de tratamiento terapéutico en ratones. Las clonas seleccionadas fueron la clona 73 y la clona 20.

Podemos observar los resultados obtenidos en la Gráfica 6. Se aprecia que no existen diferencias en las dinámicas de crecimiento de los grupos inmunizados con las clonas seleccionadas y el control del implante sin tratamiento. Las dinámicas de crecimiento tumoral se acercan al mismo punto en la gráfica, dicho comportamiento nos refleja que no hay efecto antitumoral de las clonas en cuestión.

A pesar de haber demostrado ser clonas antigénicas que propiciaron la proliferación *in vitro* de los linfocitos, no obtuvimos resultados favorables en cuanto a reducir el tamaño del tumor, esto puede deberse a varios factores; el sesgo en la biblioteca disminuyó la posibilidad de encontrar clonas potenciales que estuvieran relacionadas con el cáncer de mamá, como se menciona anteriormente Derda y colaboradores demostraron que la selección y amplificación iterativa disminuye de manera abrupta la variabilidad llegando hasta 70% de clonas eliminadas en cada ronda. Gracias a un trabajo realizado a la par del presente proyecto, Muciño en 2013 demostró que el problema en la técnica es el paso de infección masiva por fagos recombinantes y al eliminar dicho paso se conserva la variabilidad de la biblioteca.

Otro punto importante es que quizás el criterio de selección para las rondas sucesivas de proliferación no ha fue el más adecuado, en el presente proyecto se consideró la proliferación de esplenocitos totales, sin embargo en retrospectiva, quizá pudo ser mejor medir la proliferación celular de las poblaciones CD4 o CD8.

Por otro lado, las condiciones del reconocimiento y proliferación *in vitro* por parte de los esplenocitos totales hacia los antígenos presentados difieren del microambiente tumoral *in vivo*, esta probablemente es otra razón por la que no hemos visto una disminución del tamaño tumoral. Falta mucho por descubrir sobre las interacciones entre las células tumorales y el microambiente tumoral, el presente trabajo es

apenas un esfuerzo más para tratar de comprenderlo mejor y poder brindar tratamientos más eficaces a los pacientes.

X. CONCLUSIONES

La búsqueda de nuevos antígenos que puedan ser componentes de vacunas y marcadores para inmunodiagnóstico del cáncer es un tema complejo que se abre camino a través de nuevas propuestas. La aplicación de la tecnología de despliegue en fago M13 nos brinda la oportunidad de censar de manera simultánea miles de clonas individuales. Además de ser una técnica relativamente sencilla y de bajo costo.

La técnica realizada presentó un fenómeno de sesgo por fago, el cuál disminuye el número de clonas potenciales con cada ronda de selección, sin embargo, se ha identificado el punto crítico en la técnica para realizar la modificación de la técnica.

A pesar de la incidencia de dicho fenómeno, fue posible identificar clonas que promovieron la proliferación de la población de linfocitos T, es decir que fungieron como estímulo positivo, demostrando así su capacidad antigénica.

Como resultado del presente trabajo se identificaron polipéptidos antigénicos/inmunogénicos de los cuales no se encuentran reportes que los relacionen con el desarrollo de cáncer de mama, como es el caso de las clonas pertenecientes a las regiones exónicas de la proteína Inositol monofosfatasa. Por otro lado destaca la clona que contiene un fragmento de la proteína VIP36, de la cual existe solo un reporte de sobreexpresión en cáncer gástrico y no existen reportes con cáncer de mama, por lo que se puede tratar de nuevos antígenos relacionados con cáncer de mama y posibles blancos de inmunoterapia.

XI. PERSPECTIVAS

Las técnicas que se describen en el presente trabajo demostraron su potencial como herramientas en la búsqueda de nuevos antígenos relacionados con cáncer de mama. Se propone la modificación de la técnica para evitar el fenómeno de sesgo por fago y de esta manera mantener el repertorio de clonas. La modificación consiste en partir de células *E. coli* TG1 transformadas que son sometidas a un único paso de infección con fago ayudador para el rescate de la biblioteca en forma de fagos recombinantes, evitando las rondas sucesivas de amplificación.

A partir de los resultados obtenidos surge la necesidad de evaluar diversos aspectos con más detalle. Debemos evaluar la reproducibilidad de la respuesta ante el estímulo antigénico. Evaluar la proliferación de las poblaciones CD4 y CD8 en las rondas de selección.

Realizar más experimentos *in vivo* para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Considerando que los antígenos identificados en ratón son homólogos con genes humanos sería importante usarlos en ensayos de proliferación con células derivadas de pacientes con cáncer de mama.

De esta manera avanzamos hacia el entendimiento de las interacciones existentes entre el sistema inmune y el tumor, enfocándonos al cáncer de mama y sumando esfuerzos para ampliar las posibilidades de tratamiento en esta enfermedad compleja que cobra miles de vidas cada año.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2008). *Inmunología celular y molecular*. España: Elsevier; p 3-17, 189-209.

Alberts, B., Johnson, A. (2004). *Biología Molecular de la célula*. Barcelona: Omega; p 1313-1362.

Almendro, V., Fuster, G. (2011). Heterogeneity of breast cancer: etiology and clinical relevance. *Clin Transl Oncol*; 13(11):767-73.

Bertos, N.R., Park, M. (2011). Breast cancer - one term, many entities?. *J Clin Invest*. Oct; 121(10):3789-96.

Cadoo, K.A., Fournier, M.N., Morris, P.G. (2013). Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q J Nucl Med Mol Imaging*; 57(4):312-21.

Chávarri, G.Y., Villarreal, G.C., Liedke, P.E., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D.M., Goss P.E. (2012). Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*; 13(8): 335-43.

Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., Van der Bruggen, P., Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*; 14(2):135-46.

Dahm, T., White, J., Grill, S., Füllekrug, J., Stelzer, E.H. (2001). Quantitative ER <-> Golgi transport kinetics and protein separation upon Golgi exit revealed by vesicular integral membrane protein 36 dynamics in live cells. *Mol Biol Cell*;12(5):1481-98.

Derda, R., Tang, S.K., Li, S.C., Ng.S., Matochko, W., Jafari, M.R. (2011). Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. *Molecules*. 21;16(2):1776-803.

Dunn, G.P., Koebel, C.M., Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*; 6(11):836-48.

Füllekrug, J., Scheiffele, P., Simons, K. VIP36 localisation to the early secretory pathway. (1999). *J Cell Sci*; 112 2813-21.

Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*; 14(10), 1014–1022.

González, E., Robles, Y., Govezensky, T., Bobes, R.J., Gevorkian, G., Manoutcharian, K. (2010). Isolation of neurocysticercosis-related antigens from a genomic phage display library of *Taenia solium*. *J Biomol Screen*; 15(10):1268-73.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*; 144(5):646-74.

Igney, F.H., Krammer, P.H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*; 71(6):907-20.

Jacobsson, K., Rosander, A., Bjerketorp, J., Frykberg, L. (2003). Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins; *Biol Proced Online*; 5:123-135.

Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine*; 363(5):411–422.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby*. México: Mc. Graw Hill; p 254-261.

Le, K., Prabhakar, B. S., Hong, W., & Li, L. (2015). Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(10), 1212–1218.

Manoutcharian, K. (2005). Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Expert Rev Vaccines*; 4(1):5-7.

Marimuthu, A., Subbannayya, Y., Sahasrabuddhe, N. A., Balakrishnan, L., Syed, N., Sekhar, N. R., Pandey, A. (2013). SILAC-based quantitative proteomic analysis of gastric cancer secretome. *Proteomics. Clinical Applications*, 7(0), 355–366.

Mapara, M.Y., Sykes, M. (2004). Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol*; 22(6):1136-51.

Mehlen, P., Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*; 6: 449-458.

Muciño H., Gabriel, sustentante (2013). Estudio de perfiles antigénicos e inmunogénicos relacionados con cáncer de mama mediante despliegue en fago.

NoeDominguez R.A., Zamora, R., Serví, R., Pérez, E.G., Castrillon, L.E., Munguia M.E., Acero, G., Govezensky, T., Gevorkian, G., Manoutcharian, K. (2014). Variable epitope library carrying heavily mutated survivin-derived CTL epitope variants as a

new class of efficient vaccine immunogen tested in a mouse model of breast cancer. *Hum Vaccin Immunother*; 10(11):3201-13.

Onitilo, A., Engel, J.M., Greenlee, R.T., & Mukesh, B. N. (2009). Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clinical Medicine & Research*, 7(1-2), 4–13.

Pande, J., Szewczyk, M.M., Grover, A.K. (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol*; 28(6):849-58.

Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*; 117(11):3155-63.

Pedroza, C., Charles, C., Saavedra, R., Govezensky, T., Vaca, L., Avannis, E., Gevorkian, G., Manoutcharian, K. (2009). Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets. *Mol Immunol*; 47(2-3):270-82.

Robles, Y., González, E., Govezensky, T., Mungia, M.E., Acero, G., Bobes, R.J., Gevorkian, G., Manoutcharian, K. (2005). Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cADN library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. *Clin Immunol*; 116 (3):265-70.

Stillo, M., Carrillo Santistevé, P., & Lopalco, P.L. (2015). Safety of human papillomavirus vaccines: a review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 14(5), 697–712.

Strehl, J.D., Wachter, D.L., Fasching, P.A., Beckmann, M.W., Hartmann, A. (2011). Invasive Breast Cancer: Recognition of Molecular Subtypes. *Breast Care*; 6(4):258-264.

Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450–461.

Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichter, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H.M., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A.G., Amin, A., Helferich, W.G., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A. S., Keith, W.N., Bilsland, A., Bhakta, D., Halicka, D., Fujii H., Aquilano, K., Ashraf, S.S., Nowsheen, S., Yang, X., Choi, B.K., & Kwon, B.S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol*; 35: S185-98.

Vyas, J.M., Van der Veen A.G., Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*; 8(8):607-18.

Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G. (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*; 6(10):715-27.

Referencias electrónicas:

- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. “Estadísticas a propósito del... día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)” datos nacionales.
<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>
(Consultada en febrero 2016).
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo125&s=est&c=23589>
(Consultada en abril 2014).
- INCAN, Instituto Nacional de Cancerología.
http://incan-mexico.org/incan/incan.jsp?iu_p=/direccion/incanNumeros.xml
(Consultada en febrero 2014).
- Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU.
<http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>
(Consultada en abril 2014).
- GLOBOCAN
<http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>
(Consultada en Abril 2014).
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.
<http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/dmdocuments/diarioOficial/DOF.09-06-2011.pdf>
(Consultada en junio 2013).
- NCBI. The National Center for Biotechnology Information
http://blast.stva.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
(Consultada de junio 2013 a marzo 2016).

- UICC, Union for International Cancer Control.
<http://www.uicc.org/>
(Consultada en febrero 2014).
- Viral zone/ expasy bioinformatics resources portal
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/558.html
(Consultada en enero 2014).
- WHO. Cáncer
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
(Consultada en abril de 2014).