

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO**

**Facultad de Ciencias**

**Determinación del tipo de respuesta inmune  
Th1/Th2 en el microambiente tumoral de un modelo  
murino de cáncer de mama tratado con  
micropartículas de almidón**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**Frida Helena González Casanova**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE**

**Dra. Romina Rodríguez Sanoja**

**Dra. Carla García Morales**

**TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO**

## **Resumen**

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor número de nuevos casos y de muertes en mujeres de todas las edades, en México y en el mundo. Esta enfermedad es variable en términos de su progresión, en sus características moleculares y físicas; y también en la forma de tratamiento. Existe una gran gama de tratamientos que son usados de primera mano contra este tipo de cáncer como la quimioterapia, la radioterapia, la terapia hormonal y en muchos casos, la cirugía, sin embargo, todos presentan efectos secundarios que van de leves a graves, por lo que la inmunoterapia ha surgido como una estrategia prometedora para minimizar estos efectos y potenciar la respuesta anti-tumoral.

En estudios de laboratorio recientes, se descubrió que las micropartículas de almidón tienen un efecto adyuvante e inmunoestimulante sobre la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y el cáncer de mama. Este efecto reduce el tamaño de los tumores y disminuye significativamente la metástasis pulmonar. En esta tesis se examina la expresión génica de genes implicados en los tipos de respuesta inmune Th1 y Th2 en tumores de mama de modelos murinos. Los resultados indican sobreexpresión del gen STAT3, lo que sugiere un ambiente pro-inflamatorio posiblemente relacionado con una respuesta Th2.

## **Abstract**

Breast cancer is the type of cancer with the highest number of new cases and deaths in women of all ages in Mexico and the world. This disease is variable in terms of its progression, its molecular and physical characteristics, and also in the treatment. Although there is a wide range of first-hand treatments against this cancer, such as chemotherapy, radiotherapy, hormonal therapy, and surgery, nonetheless there is a high risk of presenting side effects that can be severe, so immunotherapy has emerged as a promising strategy to minimize these adverse effects and enhance the anti-tumor response.

In recent studies, it was discovered that starch microparticles have an adjuvant and immunostimulant effect on *Mycobacterium tuberculosis* infection and breast cancer. This effect reduces the size of tumors and significantly decreases lung metastasis. This thesis examines the gene expression of genes involved in the Th1 and Th2 types of immune response in murine breast tumors. The results indicate an overexpression of the STAT3 gene, which suggests a pro-inflammatory environment potentially linked to a Th2 response.

## Índice

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>5</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>7</b>
<b>Índice de abreviaturas</b> .....	<b>8</b>
<b>I. Introducción</b> .....	<b>10</b>
<b>II. Marco Teórico</b> .....	<b>11</b>
<i>Cáncer</i> .....	11
<i>Cáncer de mama</i> .....	11
<i>Inmunoterapia contra cáncer de mama y su relación con el sistema inmune</i> ....	15
<i>Inmunoadyuvantes como terapia inmune</i> .....	18
<i>Limitaciones de la inmunoterapia</i> .....	20
<i>Inflamación y respuesta inmune como resultado de la inmunoterapia</i> .....	22
<b>III. Antecedentes</b> .....	<b>26</b>
<i>Micropartículas de almidón crudo y sus propiedades inmunoestimulantes</i> .....	26
<b>IV. Justificación</b> .....	<b>28</b>
<b>V. Hipótesis</b> .....	<b>28</b>
<b>VI. Objetivos</b> .....	<b>29</b>
<i>Objetivo general</i> .....	29
<i>Objetivos particulares</i> .....	29
<b>VII. Metodología</b> .....	<b>30</b>
1. <i>Optimización y estandarización</i> .....	30
Elección y diseño de primers .....	30
Obtención de los tumores (tesis de maestría de José Antonio Sandoval) .....	30
Homogenización del tejido y extracción de ARN .....	31
Evaluación del rendimiento y calidad del ARN .....	32
Transcripción reversa .....	33
Expresión de genes de referencia y de interés por PCR punto final.....	33

2. <i>Cuantificación relativa de genes asociados a los tipos de respuesta inmune Th1 y Th2</i> .....	34
Validación del ensayo: Curvas Estándar .....	34
Cuantificación de la expresión de genes Th1 y Th2 .....	34
Análisis estadístico .....	35
<b>VIII. Resultados y discusión</b> .....	<b>36</b>
1. <i>Optimización y estandarización</i> .....	36
Elección de los genes candidatos y diseño de primers .....	36
Selección de método de homogenización y extracción de ARN .....	40
Controles positivos de amplificación: extracción de ARN y síntesis de ADNc .....	43
2. <i>Cuantificación relativa de genes asociados a los tipos de respuesta inmune Th1 y Th2</i> .....	48
Validación del ensayo: Curvas Estándar .....	48
Validación del método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .....	54
PCR en tiempo real: Cuantificación de la expresión de genes Th1 y Th2 .....	56
Variabilidad de resultados.....	63
Expresión génica por el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .....	66
Expresión génica por el método de Pfaffl .....	75
<b>IX. Conclusiones</b> .....	<b>79</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>80</b>
i. <i>Metodología: Protocolos</i> .....	80
ii. <i>Primers</i> .....	82
iii. <i>Resultados de PCR en tiempo real</i> .....	84
iv. <i>Ciclos de cuantificación obtenidos en la amplificación de IFN<math>\gamma</math>, STAT3 y GATA3 por PCR punto final</i> .....	88
<b>X. Referencias</b> .....	<b>89</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Nuevos casos de cáncer de mama en mujeres en el mundo.....	15
<b>Figura 2.</b> Clasificación de cáncer de mama por subtipos moleculares y sus características.....	17
<b>Figura 3.</b> Fases del proceso de “Inmunoedición”.....	19
<b>Figura 4.</b> Factores celulares externos e internos que influyen en la composición del microambiente tumoral.....	27
<b>Figura 5.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído de tumor mamario de modelo murino.....	44
<b>Figura 6.</b> Resultados de electroforesis capilar.....	46
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído de diferentes tejidos de ratones inmunizados con ACR y BEV’s de survivina + anti CTL-4.....	48
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las PCR punto final con ADNc de tumor de mama murino para el gen de referencia y los 12 genes de interés.....	51
<b>Figura 9.</b> Curvas estándar de cada gen y eficiencias de la reacción.....	55
<b>Figura 10.</b> Gráficos de validación para el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .....	59
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído de tumores mamaros de modelo murino tratados con micropartículas de almidón.....	61
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR punto final para $\beta$ -actina...	62
<b>Figura 13.</b> Curva de amplificación y curva de melting de $\beta$ -actina del experimento 1.	63
<b>Figura 14.</b> Curva de amplificación y curva de melting de GATA3 del experimento 1...	64
<b>Figura 15.</b> Curva de amplificación y curva de melting de STAT3 del experimento 1...	65
<b>Figura 16.</b> Curva de amplificación y curva de melting de IFN $\gamma$ del experimento 1.....	65
<b>Figura 17.</b> Expresión génica de IFN $\gamma$ por qPCR en ratones control y ratones tratados con MPAs.....	70
<b>Figura 18.</b> Expresión génica de GATA3 por qPCR en ratones control y ratones tratados con MPAs.....	72
<b>Figura 19.</b> Expresión génica de STAT3 por qPCR en ratones control y ratones tratados con MPAs.....	75
<b>Figura 20.</b> Expresión génica de genes Th1 y Th2 por el método de Pfaffl en ratones control y ratones tratados con MPAs.....	78
<b>Anexos</b>	

<b>Figura 21.</b> Temperatura y tiempo para la reacción de síntesis de ADN complementario.....	79
<b>Figura 22.</b> Protocolo para la reacción de PCR punto final.....	79
<b>Figura 23.</b> Protocolo de PCR en tiempo real.....	80
<b>Figura 24.</b> Curva de amplificación y curva de melting de $\beta$ -actina de los experimentos 1 y 2.....	80
<b>Figura 25.</b> Curva de amplificación y curva de melting de IFN $\gamma$ de los experimentos 1 y 2.....	81
<b>Figura 26.</b> Curva de amplificación y curva de melting de GATA3 de los experimentos 1 y 2.....	81
<b>Figura 27.</b> Curva de amplificación y curva de melting de STAT3 de los experimentos 1 y 2.....	82
<b>Figura 28.</b> Curva de amplificación y curva de melting de IL-10 de los experimentos 1 y 2.....	
<b>Figura 29.</b> Curva de amplificación y curva de melting de STAT4 de los experimentos 1 y 2.....	
<b>Figura 30.</b> Curva de amplificación y curva de melting de TNF $\alpha$ de los experimentos 1 y 2.....	

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentración y pureza de ARN obtenido de la extracción de una muestra de tumor mamario de modelo murino.....	43
<b>Tabla 2.</b> Concentración y pureza de ARN obtenido de la extracción de muestras de bazo de ratones inmunizados con Acr y BEV´s de survivina + anti CTL-4.....	47
<b>Tabla 3.</b> Concentración y pureza de ARN obtenido de la extracción de tumores de mama de ratones tratados con MPAs y ratones control.....	60
<b>Tabla 4.</b> Nivel de expresión de cada gen en el grupo con tratamiento en comparación al grupo control y el tipo de respuesta inmune asociada.....	81
<b>Anexos</b>	
<b>Tabla 5.</b> Protocolo del tratamiento con DNasas .....	83
<b>Tabla 6.</b> Preparación de la reacción de PCR punto final.....	83
<b>Tabla 7.</b> Primers para cada gen elegido para el análisis de expresión génica...	85
<b>Tabla 8.</b> Temperatura de alineamiento para cada par de primers indicada por el fabricante y la reportada en el análisis de PrimerBLAST.....	85
<b>Tabla 9.</b> Cq's obtenidos por qPCR de $\beta$ -actina, IFN $\gamma$ , STAT3 y GATA3.....	91

## Índice de abreviaturas

**Acr:** Alfa Cristalina

**Actb:**  $\beta$ -actina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**ADNg:** Ácido desoxirribonucleico genómico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNr:** ARN ribosomal

**BCG:** Bacilo de Calmette y Guérin

**BEV:** Biblioteca de Epítopes Variables

**CAR-T:** Células T receptoras de antígenos quiméricos

**Cq:** Ciclo de cuantificación

**DFAtag:** Dominio de Unión al Almidón

**dNTPs:** Desoxirribonucleósidos trifosfato

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**ICD:** Muerte celular inmunogénica

**ICI:** Inhibidores de puntos de control inmunes

**IFN $\gamma$ :** Interferón gamma

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL:** Interleucina

**MDSCs:** Células supresoras derivadas de mieloides

**MPAs:** Micropartículas de almidón

**NK:** Natural Killer

**OVA:** Ovoalbúmina

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**qPCR:** PCR en tiempo real

**RIN:** Número de Integridad de ARN

**RT:** Transcripción reversa

**STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción

**Ta:** Temperatura de alineamiento

**TILs:** Linfocitos Infiltrantes de Tumor

**TLR:** Ligandos de receptores tipo Toll

**Tm:** Temperatura de disociación

**TNF $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral alfa

**UFC:** Unidad Formadora de Colonias

## I. Introducción

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad entre mujeres de todas las edades, tanto en México como a nivel mundial. Esta enfermedad presenta una considerable variabilidad en términos de progresión, características moleculares y físicas, así como en las modalidades de tratamiento disponibles. Los tratamientos comunes como la quimioterapia, la radioterapia, la terapia hormonal y la cirugía, aunque efectivos, conllevan una gama de efectos secundarios que pueden ir de leves a graves. Particularmente, para el subtipo de cáncer de mama triple negativo, que es considerado el más agresivo y con peor pronóstico para los pacientes, la quimioterapia es el tratamiento sistémico que se administra, pero pese a su eficacia, conlleva efectos secundarios significativos y quimioresistencia. Esto ha suscitado un creciente interés en el desarrollo de inmunoterapias como complemento a la quimioterapia convencional y que funcionan como una estrategia prometedora para minimizar estos efectos adversos y potenciar la respuesta anti-tumoral.

Recientes estudios de laboratorio han obtenido resultados que indican que las micropartículas de almidón (MPAs) poseen un efecto adyuvante e inmunoestimulante en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, mientras que su administración en un modelo murino de cáncer de mama, ha provocado una reducción del tamaño tumoral y una disminución significativa de la metástasis pulmonar. Así, en esta tesis, con el fin de profundizar en el impacto de estas micropartículas de almidón en el microambiente de un tumor de cáncer de mama, investiga la expresión génica de genes implicados en las respuestas inmunitarias Th1 y Th2 en tumores de mama en modelo murino, mediante la estandarización de ensayos de PCR en tiempo real (qPCR).

## **II. Marco Teórico**

### **Cáncer**

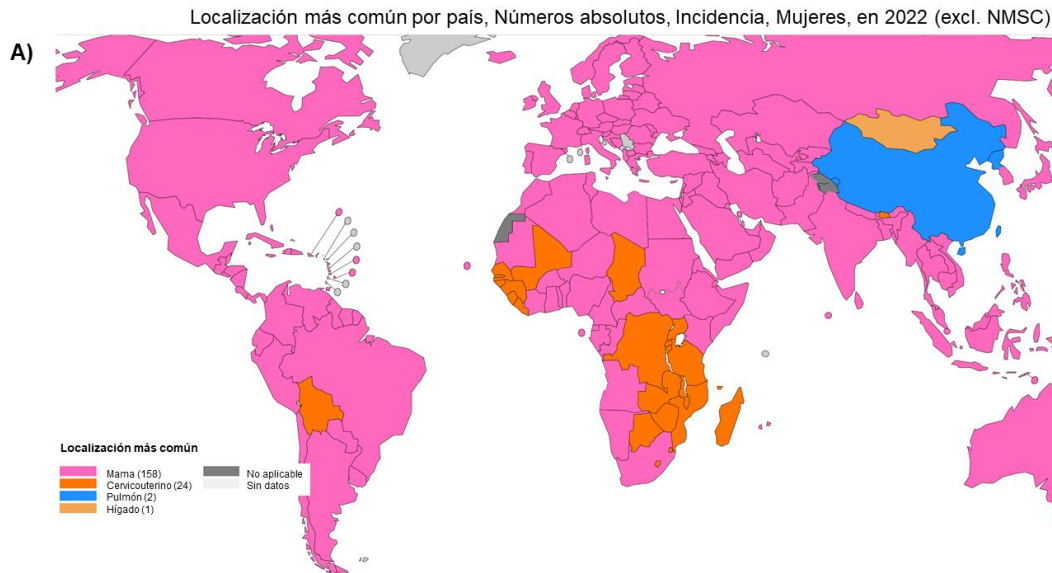
La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al “cáncer” como el “conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos”. Este crecimiento descontrolado de una población celular es lo que se conoce como carcinogénesis, siendo una de sus principales causas, la aparición de mutaciones (Jeggo, 2016). Durante el desarrollo de esta enfermedad, las células anormales se acumulan para formar un tumor y adquieren una serie de propiedades características conocidas en inglés como "hallmarks del cáncer": proliferación autosuficiente, insensibilidad ante señales anti-proliferativas, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, capacidad de vascularización, y capacidad de invasión y generación de metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

De acuerdo con la OMS y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, en 2020 se reportaron 18 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes. Se pronostica que en el 2040 los casos nuevos aumentarán a 29.5 millones y las muertes a 16.4 millones, manteniéndose como una de las más grandes problemáticas que impactan a la salud, a la sociedad e incluso, a la economía, provocando que se destine una cantidad enorme de recursos humanos y económicos a la investigación para su prevención, diagnóstico y tratamiento oportunos.

### **Cáncer de mama**

Los datos emitidos por el Observatorio Global de Cáncer (GLOBOCAN) de la OMS para 2022, señalan que el cáncer de mama es la neoplasia con mayor número de casos nuevos en el mundo (Fig. 1A), un estimado de 2.3 millones, incluyendo a México, en donde también es el tipo de cáncer que mayor número de muertes ha

provocado en mujeres. Se estima que para 2030 el número de casos diagnosticados a nivel mundial anualmente alcanzará 2.7 millones y 0.87 millones de muertes, aproximadamente (Fig. 1B).



Número estimado de nuevos casos de 2020 a 2040, Mujeres, edad [0-85+]. Cáncer de mama.

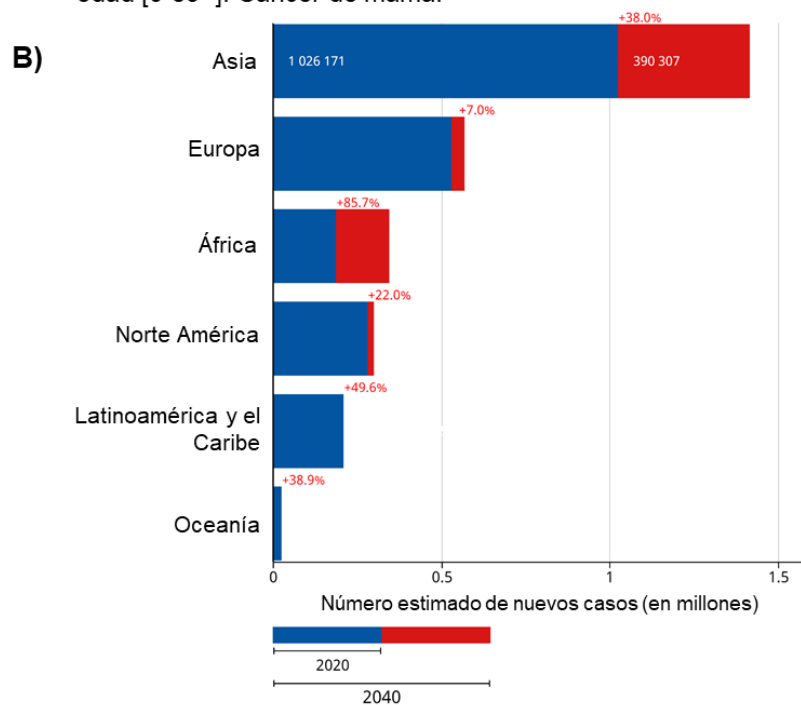


Figura 1. Nuevos casos de cáncer de mama en mujeres en el mundo. A) Países (color rosa) con más casos nuevos de cáncer de mama 2022. B) Número estimado de nuevos casos de cáncer de mama de 2020 a 2040 en cada continente. Imágenes tomadas de GLOBOCAN (OMS).

Los tumores generados por cáncer de mama son considerados heterogéneos en términos de evolución clínica, patología microscópica, características de imagen, y propiedades genéticas y moleculares, por lo que se pueden encontrar varias clasificaciones. Por ejemplo, la descrita por la OMS, en la cual el cáncer de mama se clasifica en no invasivo, invasivo y en la enfermedad de Paget del pezón (Deshpande *et al.*, 2017). Sin embargo, existen otras clasificaciones que se utilizan en distintos ámbitos clínicos y de investigación que proveen más información.

Una de las más empleadas es la clasificación molecular, en la cual se identifican ciertos marcadores moleculares en la superficie de las células cancerosas, estableciendo así, el subtipo de cáncer de mama. La presencia del receptor alfa de estrógeno (ERa) y del receptor de progesterona (PR), que al entrar en contacto con estas hormonas esteroides, inician rutas de crecimiento oncogénicas en las células mamarias, acompañada de expresión de citoqueratinas, identifica al subtipo como Luminal A o B, de acuerdo a si hay una mayor o una menor expresión de estos receptores, respectivamente. La sobreexpresión del receptor transmembranal tirosina-quinasa conocido como factor de crecimiento epidermal 2 (ERBB2, HER2 o HER2/neu), es un marcador molecular que indica que el subtipo de cáncer de mama es HER2+; y cuando en las células tumorales no hay expresión de ninguno de estos marcadores, se define como cáncer de mama triple-negativo (Waks y Winer., 2019 y Eliyatkin *et al.*, 2015).

Identificar el subtipo de cáncer de mama y sus características, les brinda a los profesionales de la salud una gran ventaja, permite obtener información sobre el desarrollo y pronóstico de la enfermedad con el fin de planificar el tratamiento local y sistémico que se administrará al paciente y que mayores beneficios le aportará (Fig. 2) (Waks y Winer., 2019).

En primera instancia, si el cáncer es no invasivo (no metastásico), el objetivo primordial es erradicar el tumor y evitar su recurrencia, por lo que de forma local se puede extirpar la masa tumoral o la mayor parte del tejido, para posteriormente

recibir o no radioterapia. Además, dependiendo del subtipo molecular, como tratamiento sistémico pre- y/o post-operatorio, puede usarse terapia endocrina para todos los tumores positivos en receptores hormonales (HR+) y algunos pacientes requieren también quimioterapia. Para los tumores HER2+, las terapias con mayor éxito han sido las terapias de anticuerpos dirigidos a este receptor y la quimioterapia (con terapia hormonal adicional si además se es HR+), en el caso del cáncer de mama triple negativo, la quimioterapia es el tratamiento de elección (Waks y Winer, 2019). Por otro lado, si es cáncer invasivo (metastásico), el objetivo es aumentar la esperanza de vida y reducir los síntomas, empleando tratamientos locales y sistémicos similares a los utilizados en el cáncer no invasivo, pero generalmente por períodos más prolongados.

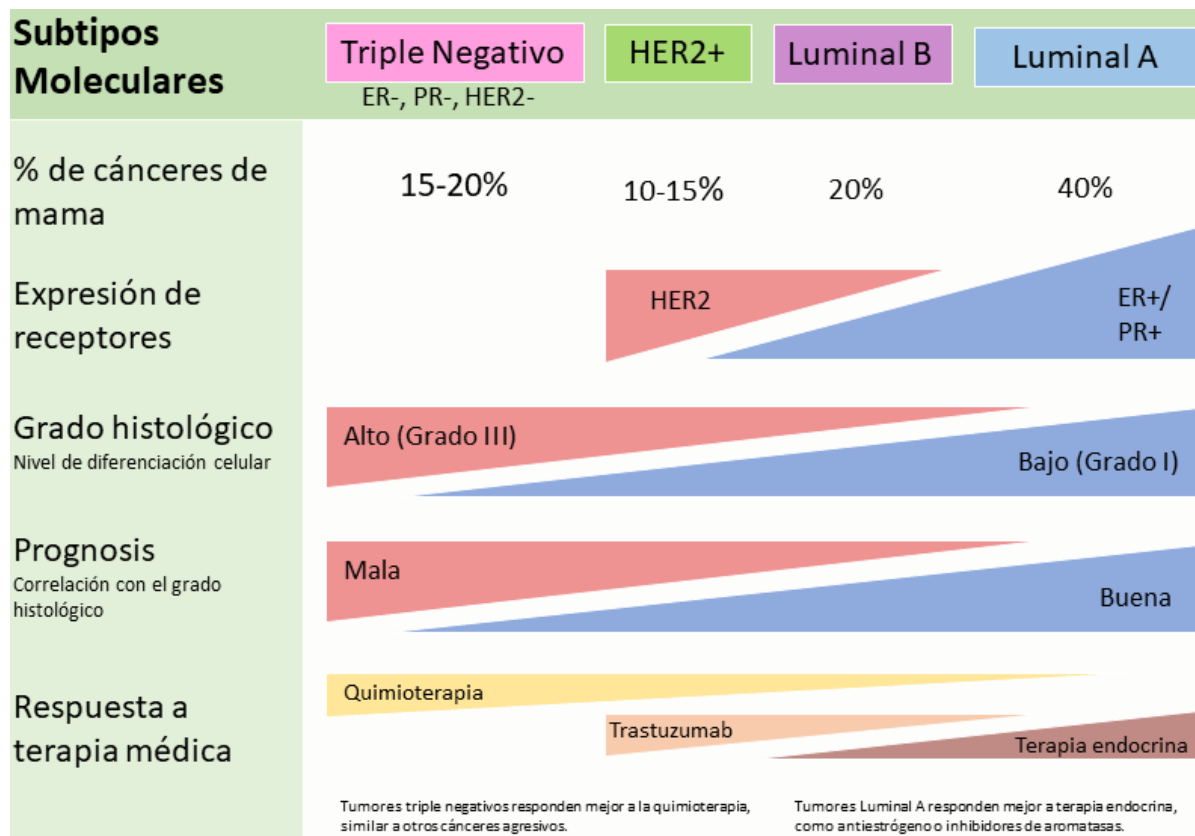


Figura 2. Clasificación del cáncer de mama por subtipos moleculares y sus características. De este subtipo depende en gran parte el tratamiento y el pronóstico. Imagen adaptada al español de McMaster Pathophysiology Review, 2012.

A pesar de que estos tratamientos son usados habitualmente, presentan limitaciones y desventajas, las más preocupantes son la toxicidad y los efectos

secundarios que generan en los pacientes, por ejemplo, entre las afectaciones más comunes y que podrían considerarse leves, están los sofocos y la fatiga, artralgias, mialgias, náuseas, astenia, edemas y mielosupresión, pero también pueden ocurrir efectos adversos más graves como el desarrollo de osteoporosis, enfermedades relacionadas al corazón e incluso ocurrencia de otras lesiones neoplásicas (Waks y Winer, 2019). Por esta razón, los esfuerzos en encontrar nuevos y mejores fármacos son constantes y así, han surgido alternativas prometedoras como la inmunoterapia.

### **Inmunoterapia contra cáncer de mama y su relación con el sistema inmune**

El término “inmunovigilancia” surge en 1909 con Paul Ehrlich, quien proponía la idea de que el sistema inmune tendría la capacidad de reprimir el crecimiento de carcinomas. Más adelante en la década de los 60’s, F. Macfarlane Burnet propuso que los neo-antígenos que surgen de las células cancerosas, podrían iniciar una respuesta inmune efectiva para su eliminación, mientras que Lewis Thomas teorizaba que los organismos debían poseer mecanismos similares a los que ocurren en el rechazo de trasplantes, pero para atacar a las neoplasias (Dunn *et al.*, 2004). Todas estas presunciones originaron la primera teoría de inmunovigilancia, que consistía en que células dependientes del timo (linfocitos T) vigilaban constantemente los tejidos en busca de células transformadas. Ahora sabemos que es una de las estrategias que el sistema inmune implementa para el reconocimiento y erradicación de células malignas, en donde precisamente, durante la transformación a células cancerosas, distintos tipos de neo-antígenos son creados y reconocidos por el sistema inmune para generar células T específicas.

El estudio de este fenómeno ha llevado a proponer un modelo que involucra la acción del sistema inmune tanto en la inhibición del tumor como en la progresión de este, conocido como “inmunoedición”, el cual ocurre en tres fases (Kuby, 2013). La primera es la fase de eliminación, en la que las células transformadas son reconocidas por la presencia de antígenos tumorales y son destruidas por el sistema inmune, le sigue la fase de equilibrio, que comienza cuando algunas de estas células desarrollan mutaciones y evaden al sistema inmune mediante mecanismos

complejos y la interacción con el microambiente, lo que finalmente lleva a la fase de escape y progresión tumoral (Fig 3). Como mecanismos de evasión del sistema inmune, estas células afectan la generación y el tráfico de células T, producen factores que promueven la angiogénesis, así como diferentes moléculas inmunosupresoras e impiden el reconocimiento antigénico, por ejemplo, expresando menos moléculas del complejo de histocompatibilidad clase I o sobreexpresando receptores de membrana que inducen señales apoptóticas en células T (Zugazagoita *et al.*, 2016).

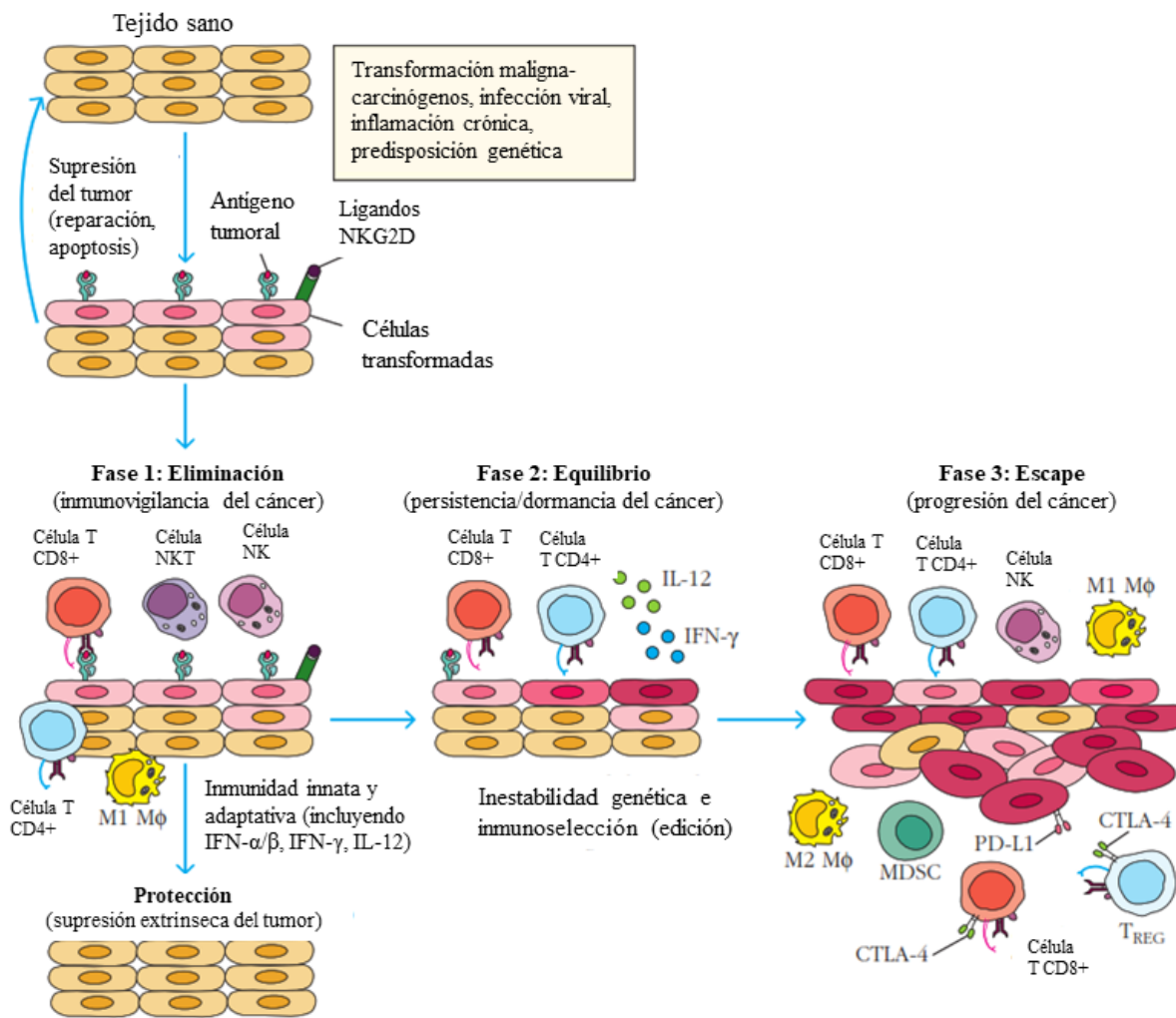


Figura 3. Fases del proceso de "Inmunoedición". Las células del sistema inmune y las células cancerosas interactúan para la erradicación de estas últimas o, por el contrario, su resistencia. Adaptada al español de Kuby Immunology (2013).

Con base en esto último y como parte de los esfuerzos en la lucha contra el cáncer de mama, surge la inmunoterapia, una estrategia de tratamiento cuya intención es estimular y mejorar la respuesta inmune ya existente, la meta de la inmunoterapia es potenciar esta actividad para la erradicación de las células malignas (Zitvogel *et al.*, 2016). La administración de este tipo de inmunoterapias ha demostrado resultados prometedores en cáncer de mama HER2+ y en cáncer de mama triple negativo, posiblemente debido a que ha mostrado que son los subtipos de cáncer de mama más inmunogénicos, por lo que utilizar el sistema inmune del huésped puede lograr mejores resultados en la eliminación de células tumorales (Arab *et al.*, 2020).

Las estrategias de inmunoterapia pueden clasificarse en activas y pasivas, las primeras buscan generar una respuesta inmune específica, mientras que las segundas son aquellas en las que el sistema inmune actúa de forma conjunta con estrategias independientes (Hashemzadeh *et al.*, 2021). Aunque es de suma importancia recalcar que independientemente del tipo de inmunoterapia, estas siempre son administradas en conjunto con algún otro tipo de terapia. Entre los tipos de inmunoterapias que se administran con mayor frecuencia, están los inhibidores de puntos de control inmunes (ICI), estos se basan en la utilización de un anticuerpo monoclonal específico que bloquea la interacción entre proteínas de membrana que al unirse con sus receptores en las células del sistema inmune, las inhiben o activan, por ejemplo la proteína PD-L1 que al unirse a su ligando PD-1 en células inmunes, suprime su proliferación y capacidad de secretar citocinas que activen a más células (He y Xu, 2020). También los anticuerpos anti-HER2 como el trastuzumab son utilizados con frecuencia en este subtipo de cáncer (Wedam *et al.*, 2020). Otros tipos de inmunoterapias que están bajo investigación y han demostrado un gran potencial son las vacunas que utilizan péptidos derivados de antígenos tumorales o asociados al tumor para estimular una respuesta específica y duradera y la llamada terapia de transferencia adoptiva de células, ya sea con linfocitos extraídos del paciente, expandidos *ex vivo* y administrados nuevamente o con células inmunes modificadas genéticamente como las terapias CAR-T por sus siglas en inglés, en

donde las células T tienen un receptor de antígeno quimérico y así reconocen proteínas antigénicas de los tumores (Abbaspour y Akbari, 2022; Chaudhuri *et al.*, 2021).

### **Inmunoadyuvantes como terapia inmune**

Un adyuvante es una molécula o la combinación de diferentes moléculas que mejoran y prolongan la respuesta inmune contra un antígeno. Comúnmente se reconocen dos mecanismos de acción en los adyuvantes: 1) inmunoestimulantes que actúan directamente sobre las células del sistema inmune para aumentar las respuestas a los antígenos (ligandos de receptores tipo Toll (TLR), citocinas, saponinas y exotoxinas bacterianas) y 2) vehículos que en las vacunas presentan los antígenos al sistema inmunológico de manera óptima, incluidos los sistemas de liberación controlada y la administración de depósito para aumentar la respuesta inmune específica al antígeno, por ejemplo, sales minerales, emulsiones, liposomas, virosomas, microesferas de polímeros biodegradables y los llamados complejos inmunoestimulantes (ISCOM™, ISCOMATRIX™), además, los vehículos también pueden servir para administrar los inmunoestimulantes antes mencionados (Bryers y Woodrow, 2011).

Durante el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas contra cáncer, utilizar adyuvantes se ha convertido en una situación recurrente con el fin de impulsar una respuesta inmune duradera y favorecer que se polarice a un tipo de respuesta específica (Vermaelen, 2019). En el uso como inmunoterapia, se han reportado adyuvantes de origen microbiano como BCG y *Mycobacterium vaccae*; citocinas producidas de forma recombinante como IL-2, IL-4, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ; adyuvantes químicos y celulares (células dendríticas); y diversos péptidos, todos ellos con efectos en diferentes tipos de cáncer y principalmente de respuesta Th1 (Dredge *et al.*, 2002). Los efectos moduladores en las respuestas innata y adaptativa del sistema inmune de estas moléculas han llevado a proponer el término de inmunoestimulación (Vermaelen, 2019).

Recientemente, se han descrito diversos tipos en la aplicación de inmunoterapias contra varios tipos de cáncer, incluyendo el de mama, según su mecanismo de acción, por ejemplo, como moléculas antagonistas de TLR, exosomas, moléculas inorgánicas, proteínas endógenas y especialmente, moléculas derivadas de plantas, entre estas, los polisacáridos han mostrado una acción potenciadora del sistema inmune, y además poseen características ventajosas como biocompatibilidad y biodegradabilidad que los convierten en moléculas adyuvantes prometedoras para la administración efectiva (Banstola *et al.*, 2020).

Se ha reportado que diversos productos naturales tienen este efecto en la inmunoterapia contra el cáncer, incluidas vacunas, ICI y la terapia adoptiva de células. El mecanismo de esto se atribuye principalmente a la remodelación del microambiente inmunosupresor del tumor, que es el factor clave para evitar el reconocimiento y el ataque del sistema inmune y, por ende, el éxito de la inmunoterapia contra el cáncer. Por ejemplo, el efecto de muerte celular inmunogénica (ICD) es un tipo de vía apoptótica celular que puede inducir la muerte de las células cancerosas. La capsaicina puede inducir la autofagia apoptótica en varios tumores sólidos y hematológicos (Díaz-Laviada y Rodríguez-Henche, 2014; Alshaer, *et al.*, 2021; Huang, *et al.*, 2021). Una saponina del ginseng induce ICD tanto en el melanoma inmunogénico como en el cáncer de pulmón de Lewis no inmunogénico (Son *et al.*, 2016). Otro efecto reconocido es de la curcumina, que mejora el resultado terapéutico de las vacunas BCG, que es la terapia inmune estándar de oro para el cáncer de vejiga, mediante la inhibición de las vías NF- $\kappa$ B y TRAIL en las células cancerosas (Kamat *et al.*, 2009).

Algunos polisacáridos, como los beta-glucanos, han sido estudiados por su capacidad para modular la respuesta inmunitaria y se han explorado en el contexto del tratamiento del cáncer como posibles inmunoestimulantes. Chang *et al.* (2015) evaluaron dos polisacáridos extraídos de *Astragalus membranaceus* y *Codonopsis pilosella* para determinar el efecto adyuvante de vacunas contra el carcinoma

mamario 4T1 en ratones. Descubrieron que los polisacáridos mejoraban significativamente la cantidad de marcadores CD40, CD80 y CD86 en las DC110. Y sus datos también mostraron que podría regular positivamente la secreción de IL-6, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Los polisacáridos de *Ganoderma*, ricos en manosa y galactosa, pueden estimular la maduración de las células dendríticas de la médula ósea y mejorar la secreción de IFN $\gamma$  para producir células T efectoras. Además, también induce la maduración de las CD. La inmunización con ovoalbúmina (OVA) utilizando como adyuvante a los polisacáridos de *Ganoderma* promueve la producción de anticuerpos específicos y mejora las respuestas de las células T auxiliares tipo 1 (Th1) específicas de OVA y de las células T citotóxicas, que podrían proteger a los ratones de las células tumorales que expresan OVA. Además de que la inmunización de los polisacáridos de *Ganoderma* contribuye principalmente a involucrar a familias de receptores de reconocimiento de patrones como TLR4/1/2 (Dong, *et al.*, 2022).

En definitiva, los polisacáridos pueden tener actividad antitumoral a través de la eliminación de las células transformadas y la activación del sistema inmune tanto innato como adaptativo, o con el reclutamiento de células inmunes y el aumento en la producción de citocinas. La unión de estos carbohidratos a receptores como los TLR o los receptores scavenger, activa células dendríticas o macrófagos, produciendo la liberación de, por ejemplo, TNF $\alpha$  y también ayuda potenciar la actividad citotóxica de las células NK, mencionando solo algunos de estos procesos (Li *et al.*, 2021).

### **Limitaciones de la inmunoterapia**

En el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas se han alcanzado resultados prometedores, sin embargo, también se han evidenciado los retos implicados. Uno de estos reside en la gran variabilidad de la respuesta clínica entre pacientes, la efectividad del tratamiento puede ser diferente, aunque se esté tratando a personas

con el mismo subtipo de cáncer. La baja infiltración de linfocitos (TILs) en el tejido tumoral disminuye la efectividad de tratamientos como los ICI, pues la presencia de células inmunes ya existentes en el microambiente permite el funcionamiento de estos inhibidores (Law *et al.*, 2020). Durante el progreso tumoral, el proceso de angiogénesis y la conversión a un microambiente tumoral inmunosupresivo a través del reclutamiento de células inmunosupresoras que a su vez inhiben aquellas células con actividad antitumoral, son mecanismos de evasión inmune que el tumor desencadena, para evitar una respuesta antitumoral potente (Mougel *et al.*, 2019). Por otro lado, aún no se ha identificado completamente la gama y la severidad de efectos secundarios que podrían ocurrir y causar lo que se ha identificado como “eventos adversos relacionados a la inmunidad”, por ejemplo, la afectación de los mecanismos reguladores de las células T, lo que lleva a una sobreactivación del sistema inmune (Law *et al.*, 2020; Mina *et al.*, 2019).

Una de las más importantes limitaciones de la inmunoterapia es el alto costo que implica su administración, el tratamiento de esta enfermedad tiene un enorme impacto económico tanto en instituciones públicas como en privadas; en México, las mujeres tienen el derecho a un acceso gratuito a la salud, en 2009 se reportó que los costos médicos asociados a la administración de trastuzumab, un anticuerpo dirigido a HER2+, eran de \$163,849 aproximadamente en un periodo de un año de tratamiento por paciente (González-Robledo *et al.*, 2015). También, se ha estimado que el uso de ICI representa costos de 100,000-250,000 dólares por paciente, mientras que las terapias completas con células CAR T se estiman en 350,000 dólares (Galluzzi *et al.*, 2018).

Estas limitaciones promueven la necesidad de continuar con la investigación y desarrollo de inmunomoduladores como el almidón, con el fin de contribuir a la mejora de alternativas inmunoterapéuticas más viables, seguras y económicas.

## **Inflamación y respuesta inmune como resultado de la inmunoterapia**

Las respuestas inmunes contra el tumor generadas con las inmunoterapias, pueden verse afectadas por una serie de factores como la heterogenicidad entre los tumores, un microambiente tumoral inmunosupresor, la inadecuada generación y funcionamiento de las células T, disponibilidad y variabilidad de neoantígenos y modificaciones epigenéticas (Taefehskor *et al.*, 2022).

En este contexto, un factor de suma importancia es la infiltración celular de tipo inmune en el tumor, la localización de estas células, así como su tipo y función, determinan el éxito de las inmunoterapias. Se ha observado que cuando las células infiltradas son en su mayoría células T CD8+, células T helper 1 CD4+, macrófagos de tipo M1 y células dendríticas CD103+, se activan mecanismos antitumorales asociados a una respuesta positiva, es decir, antitumoral por el contrario, si las células infiltradas son en gran medida células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ o macrófagos de tipo M2, se activarán mecanismos de inmunosupresión que impedirán que el tumor sea sensible ante las terapias; además, la localización de estas células también es importante, en general, se habla de tres fenotipos celulares que influyen en el desarrollo de la enfermedad, el fenotipo inmunoexcluido y los llamados fenotipos “cold” y “hot”, que se describen como una gran cantidad de células T en la periferia del tumor incapaces de invadirlo, ausencia en todo el tumor de células inmunes y abundancia de células inmunes antitumorales dentro del tumor y adyacentes a las células tumorales que lo componen, respectivamente, siendo los dos primeros fenotipos aquellos que no son responsivos ante los tratamientos (Galluzzi *et al.*, 2018).

El microambiente tumoral, que consta no solo de células cancerosas sino también de fibroblastos, células vasculares, endoteliales, células del sistema inmune innato y adaptativo, entre otros componentes, determina la progresión y desarrollo tumoral, impidiendo o favoreciendo la respuesta inmune anti-tumoral del paciente (Soysal *et al.*, 2015). El surgimiento de un tumor es consecuencia de múltiples factores,

durante su crecimiento, la presencia de células inmunes, principalmente de linfocitos T, contribuye a determinar lo que se ha llamado “Paradigma Th1/Th2”, pues el microambiente que se establezca en el tumor depende del tipo de células inmunes que predominen en él. Cuando hay una mayoría de células se polarizan hacia un perfil Th1 como macrófagos de tipo M1, linfocitos T CD8+ y CD4+ Th1, es favorecido un ambiente pro-inflamatorio, mientras que las que cambian a un perfil Th2, como células supresoras derivadas de mieloides, macrófagos de tipo M2, linfocitos T reguladores y CD4+ Th2, generan un ambiente inmunosupresor (Fig. 4). Como consecuencia, la presencia o ausencia de alguno de los dos grupos celulares y de las moléculas que producen como IFN $\gamma$  (Th1) o IL-10 (T2) determinará la respuesta inmune, las células con un perfil Th1, favorecen la disminución y erradicación de las células del tumor, mientras que las células Th2 favorecen el crecimiento del tumor y la progresión de la enfermedad (Hinshwa y Shevde, 2019).

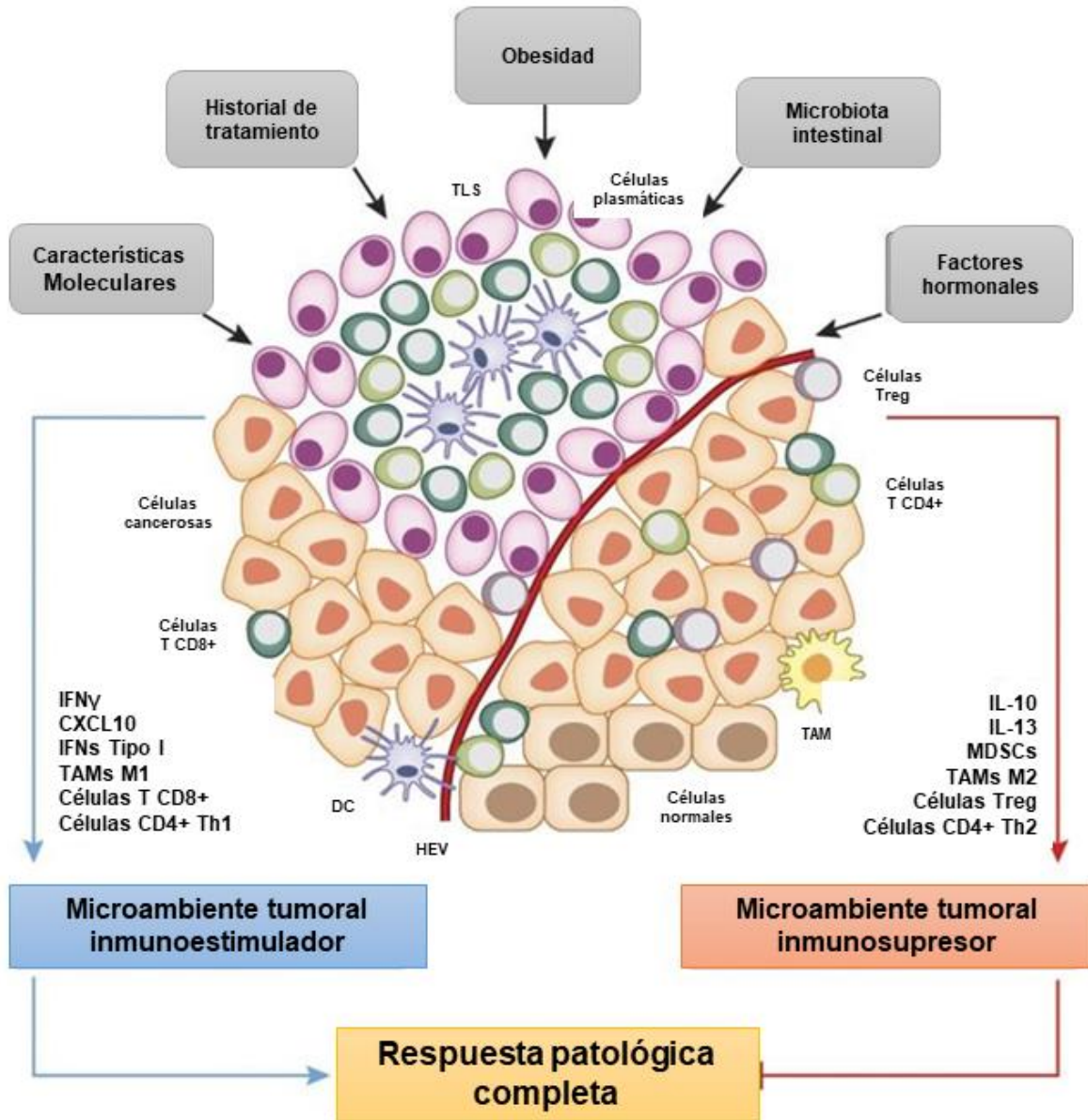


Figura 4. La composición del microambiente tumoral, dado por características moleculares, determinan la abundancia y el estado funcional del infiltrado inmune estromal e intraepitelial que resulta en un microambiente inmunoestimulador o inmunosupresor. Adaptada al español de Kroemer et al., 2015.

Como parte del microambiente tumoral, los procesos de inflamación juegan un rol clave en la eliminación o la resistencia del tumor, incluso en la progresión de angiogénesis y la efectividad de un tratamiento dado; se han descrito diferentes tipos de respuesta inflamatoria que impacta en el desarrollo del tumor: la inflamación crónica que precede al crecimiento tumoral, la inflamación asociada al tumor, y la inflamación inducida por la administración de tratamiento (Jiang y Shapiro, 2014).

La inflamación es un fenómeno que abarca la activación, el reclutamiento y la acción de las células de la inmunidad innata y adaptativa que ocurre de forma normal con el fin de protegerlas de algún daño, estímulo negativo o un patógeno, además de contribuir a mantener la homeostasis, sin embargo, cuando se trata de cáncer, el proceso de inflamación no es resuelto, es decir, se mantiene de forma crónica. Este tipo de respuesta inflamatoria está relacionada con la transformación del tumor a un microambiente inmunosupresivo, lo que promueve su desarrollo (Lan *et al.*, 2021; Greten y Grivennikov, 2019). De ahí la importancia de la búsqueda de tratamientos que produzcan una respuesta inflamatoria aguda en lugar de una respuesta crónica que pudiese favorecer la resistencia tumoral.

### III. Antecedentes

#### **Micropartículas de almidón crudo y sus propiedades inmunoestimulantes**

En la búsqueda de adyuvantes vacunales, se ha investigado el uso de MPAs como vehículo para el transporte de antígenos. Se probó con el fragmento C de la toxina tetánica inmovilizado sobre la micropartícula por medio de un dominio de unión al almidón (DFAtag) administrado por vía oral en un modelo murino, lo que indujo respuesta inmune sistémica específica y retardó la aparición de síntomas en animales retados con la dosis letal media (Guillén *et al.*, 2014). También se probó con la proteína alfa cristalina (Acr) de *Mycobacterium tuberculosis*, donde se indujo la producción de anticuerpos específicos tanto por vía nasal como oral, hubo una respuesta preferente de IgG2a con la proteína y mayor producción de IFN $\gamma$ , lo que sugiere una respuesta de tipo Th1. Estos resultados demostraron la utilidad del sistema para la inducción de respuesta antígeno específica por vía mucosa y sugieren un posible efecto adyuvante de la unión antígeno-MPAs (Moreno-Mendieta *et al.*, 2014).

En trabajos posteriores, se evaluó el potencial inmunoestimulante y adyuvante de las MPAs en modelos murinos. Inicialmente, se investigó su uso como refuerzo de la vacuna BCG en tuberculosis pulmonar crónica. Tras la vacunación con BCG, se administraron antígenos inmovilizados, solubles o solo MPAs por vía nasal, y luego se retó a los animales. La protección se midió mediante la carga bacilar en los pulmones, la supervivencia y las lesiones de neumonía, encontrando que los refuerzos con la proteína inmovilizada o solo con MPAs redujeron significativamente la carga bacilar, sugiriendo propiedades inmunoestimulantes del almidón. En un estudio derivado, se exploró la capacidad adyuvante de las MPAs por si solas coadministradas con la vacuna BCG de forma subcutánea, mostrando una mejora en la protección en términos de carga bacilar, supervivencia y lesiones de neumonía, lo que reafirma el potencial de las MPAs como adyuvante en estrategias de vacunación parenteral (Moreno-Mendieta *et al.*, 2017; Moreno-Mendieta *et al.*, 2019).

Recientemente se estudió el destino que las micropartículas tras su administración nasal u oral. Demostrando que las MPAs pueden cruzar tanto el epitelio mucoso nasal como el digestivo, llegando a tejidos linfoides como el NALT y las placas de Peyer, donde se induce la respuesta inmunitaria, lo que podría establecerse como un mecanismo por el que las MPAs actúan como adyuvantes o inmunomoduladores (Vasquez-Martínez *et al.*, 2023).

De manera paralela se trasladó el uso de las micropartículas a un modelo diferente de enfermedad, el cáncer de mama. Se seleccionó un modelo murino de cáncer de mama triple negativo, el cual se logra a través de la inoculación de la línea celular 4T1, una línea celular de carcinoma mamario que simula el estadio IV de cáncer de mama humano. Esta línea se caracteriza por crecer rápidamente al ser inyectada en el tejido graso y por la capacidad de hacer metástasis en pulmones, hígado, hueso y cerebro (Fantozzi y Christofori, 2006).

Cinco días después de la implantación de las células 4T1, se administraron las MPAs de forma subcutánea como una primera inmunización. Posteriormente, las MPAs se administraron como refuerzos por vía intranasal a los 6, 13 y 20 días. Otros grupos en este estudio fueron inmunizados con una biblioteca de mucina-1 con poly I-C como adyuvante y mucina-1 con MPAs y e igualmente recibieron los refuerzos intranasales con las MPAs solas o en conjunto con la biblioteca de mucina. Notablemente se observó que el tratamiento con MPAs + Refuerzo MPAs, tuvo un efecto antitumoral significativo en ambas variables, incluso en términos generales, fue mejor que los tratamientos con las BEVs (Sandoval JA, no publicado).

#### **IV. Justificación**

La administración en un modelo murino de cáncer de mama de un tratamiento de micropartículas de almidón, ha mostrado efectos anti-tumorales como la reducción del tamaño de los tumores y del número de metástasis en pulmón.

Por lo que, identificar el tipo de respuesta inmune asociada a la administración de este sistema, contribuye a la caracterización de la posible acción anti-tumoral del almidón como inmunomodulador y de ese modo aportar en el desarrollo de nuevas y mejores estrategias inmunoterapéuticas.

#### **V. Hipótesis**

La administración de micropartículas de almidón en un modelo murino de cáncer de mama, producirá que el tipo de respuesta inmune se polarice hacia el tipo Th1.

## **VI. Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la expresión de genes asociados al perfil de Th1/Th2 existente en el microambiente tumoral de un modelo murino de cáncer de mama, mediante ensayos de PCR en tiempo real (qPCR).

### **Objetivos particulares**

- Optimizar y estandarizar las condiciones para la amplificación de los genes asociados al perfil Th1/Th2 en el microambiente de un tumor de cáncer de mama en modelo murino BALB/c mediante PCR punto final y PCR en tiempo real.
- Identificar los niveles de expresión de un grupo de genes asociados al perfil Th1/Th2 en el microambiente de un tumor de cáncer de mama en modelo murino BALB/c.

## VII. Metodología

### 1. Optimización y estandarización

#### Elección y diseño de primers

Los primers para IL-6, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GAPDH y  $\beta$ -actina, fueron tomados de la literatura y para el momento del inicio de este proyecto, ya estaban almacenados en el laboratorio. Para elegirlos, la secuencia codificante de cada uno se buscó en la plataforma Ensembl, posteriormente se identificó manualmente la región a la que se unen los primers para identificar el tamaño del amplicón (ver anexos: Tabla 7), con esta información se realizó un PrimerBlast en NCBI para obtener información como las temperaturas de alineación (ver anexos: Tabla 8), el porcentaje de GC, el tamaño del amplicón y la especificidad.

Por otro lado, los primers de los genes IL-12, TBX21, STAT4, STAT6, STAT3 y GATA3 fueron diseñados con la herramienta PrimeQuest (IDT) a partir de la secuencia codificante de cada uno que también fue obtenida de Ensembl, en este caso (ver anexos: Tabla 7 y Tabla 8), para la elección de los primers se tomaron en cuenta dos aspectos principales: 1) el tamaño del amplicón, ya que para qPCR debe ser menor a 200 pb y específicamente para reacciones con SYBR Green, es ideal una longitud de 80-150 pb y 2) un porcentaje mayor de AT (Cq más bajos) (Bustin y Huggett, 2017). Una vez seleccionados los candidatos, se revisaron los parámetros antes mencionados en análisis PrimerBLAST de NCBI. Los primers seleccionados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM.

#### Obtención de los tumores (tesis de maestría de José Antonio Sandoval)

Ratones hembras BALB/cAnNC se mantuvieron una instalación convencional de mantenimiento de animales bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo de luz/oscuridad con acceso *ad libitum* a comida y agua. A estos animales de 5 a 6 semanas de edad, se les implantó subcutáneamente en la mama inferior

derecha con  $10^4$  células viables de la línea celular de adenocarcinoma murino 4T1 en PBS. 5 días después fueron tratados con 1 mg de MPAs/PBS (patente título 386193) por la vía subcutánea, posteriormente a los días 6, 13 y 20 se administraron por vía intranasal refuerzos de 500  $\mu$ g de MPAs, el control fue tratado únicamente con PBS. En todos los casos, los animales fueron sacrificados al día 30 y los tumores generados experimentalmente en el sitio de inoculación, fueron extraídos y almacenados en solución RNeasy Lysis Buffer (Thermo Scientific™). Se realizaron dos experimentos con este mismo procedimiento, para este trabajo se utilizaron seis ratones de cada experimento, tres del grupo control y tres del grupo con tratamiento; durante el resto del trabajo en los resultados se referirán como experimento 1 y experimento 2. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas (CICUAL) de la UNAM con el número de proyecto 196.

#### Homogenización del tejido y extracción de ARN

Inicialmente, se probaron dos métodos de homogenización: pistilo y TissueLyser en diferentes combinaciones, y también se probaron dos métodos de extracción de ARN: Trizol y por columna, esto con la finalidad de seleccionar el método con el que se obtuviera el mejor rendimiento y calidad del ARN.

Los tumores obtenidos fueron cortados en cajas Petri de vidrio previamente esterilizadas, en fragmentos de aproximadamente 0.5x0.5 cm y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 600  $\mu$ l de buffer de lisis RLT Plus No. Cat. 1053393 (QIAGEN) y 6  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Enseguida, se disgregó el tejido mediante tres métodos, con una micropipeta, con el TissueLyser II (QIAGEN) y con un pistilo de plástico (3.5 pulgadas de longitud) marca BEL-ART esterilizado, hasta lograr la homogeneización del tejido. Cuando la extracción se llevó a cabo el mismo día, el tubo se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, pero si se realizó al siguiente día, se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se realizó una segunda homogeneización con otro pistilo esterilizado hasta observar que ya no hubiera restos sólidos visibles de tumor. En caso de que los hubiese y fuese

imposible homogeneizar más con el pistilo, el tubo se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto y con ayuda de una punta de micropipeta, se retiraron los fragmentos depositados al fondo del tubo con cuidado de no derramar el sobrenadante. Con esta fase ya homogénea, se realizó la extracción del ARN siguiendo dos métodos, la extracción con Trizol, específicamente con TRIzol™ Reagent No. Cat. No. 15596018 (Thermo Scientific™) y con el kit RNeasy Plus Mini Kit 74134, (QIAGEN, Hilden, Germany).

Se seleccionó el método de homogenización con pistilo (dos veces) y la extracción con el kit RNeasy Plus Mini, por lo que este es el método que se usó para todos los experimentos futuros.

#### Evaluación del rendimiento y calidad del ARN

Para medir la concentración y pureza de RNA se realizó la medición espectrofotométrica a 260nm utilizando el NanoDrop One/OneC (Thermo Scientific™). Se evaluaron además las relaciones  $A_{260}/A_{280}$  que indica contaminación con compuestos aromáticos con un valor esperado de entre 1.8-2.0 y  $A_{260}/A_{230}$  que indica contaminación por sales y carbohidratos, cuyos valores óptimos deben encontrarse alrededor de 2.0.

Para evaluar la integridad del ARN, se preparó un gel de agarosa al 1%, se vertieron 40 ml de TAE 1X en un matraz Erlenmeyer, se pesaron 0.4 g de agarosa y fueron agregados al matraz. Se calentaron en el microondas por intervalos de tiempo, sin llegar al punto de ebullición, mezclando suavemente entre cada calentamiento, este paso se repitió hasta que la agarosa se disolvió completamente y se obtuvo un líquido transparente y homogéneo. Se dejó enfriar y se le añadieron 3 µl de Bromuro de Etidio para posteriormente verterse al molde de la cámara de electroforesis con el peine ya colocado en su lugar. Se dejó solidificar. Una vez completamente solidificado, el peine fue retirado y el gel se colocó en la cámara, llenándola con TAE 1X al volumen necesario. Fueron cargados tanto el marcador de peso molecular como las muestras, ya mezcladas con el buffer de carga. Se dejó correr el gel a 90

V por aproximadamente 1 hora con la finalidad de observar las bandas 28S y 18S, además de alguna posible contaminación de ADN genómico. Se visualizó el gel en un transiluminador UV.

### Transcripción reversa

Para realizar la síntesis de ADN complementario a partir del ARN, primero se trataron de 1-5 µg de ARN y 500 ng para muestras con concentración baja, con el kit DNase I, RNase-free (1 U/µL) No. Cat. EN0521 (Thermo Scientific™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver anexos: Tabla 5). Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc utilizando para los primeros ensayos el AMPIGENE cDNA Synthesis ENZ-KIT106-0050 kit (ENZO, Farmingdale, NY, USA), y posteriormente, el kit RevertAid Reverse Transcriptase de Thermo Scientific™ No. Cat. MAN0012757, la cual contiene el buffer de reacción 5X (50 mM Tris-HCl pH 8.3 at 25 °C, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT) siguiendo el protocolo (ver anexos: Figura 21).

### Expresión de genes de referencia y de interés por PCR punto final

Para identificar la expresión de un gen, incluyendo el gen de referencia que se utiliza en la verificación de la correcta síntesis de ADNc, se realizó una PCR punto final con los primers correspondientes a cada gen, utilizando el kit DreamTaq™ Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Scientific™). La mezcla del kit incluye dNTPs 0.4 mM, MgCl<sub>2</sub> de 4 mM y la DreamTaq™ Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific™). La mezcla de reacción y el protocolo térmico son representados en la tabla 6 y en la figura 22 de la sección de anexos.

La expresión cualitativa de los genes se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, en TAE 1x, como se describió previamente. Como referencia se incluyó el marcador de peso molecular de ADN XVI de 100pb (Roche®) de 100 a 1500 pb y una banda añadida de 2642 pb. El gel se corrió a 90V por 1 hora y se observó en un fotodocumentador para evaluar la especificidad de la reacción al coincidir el peso molecular de la banda con el tamaño del producto.

## **2. Cuantificación relativa de genes asociados a los tipos de respuesta inmune Th1 y Th2.**

### Validación del ensayo: Curvas Estándar

Para la evaluación de la validez del ensayo, el gen de referencia fue  $\beta$ -actina y los genes de interés fueron IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , STAT4, STAT6, STAT3, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-6, GATA3 y TBX21, utilizando muestras de tumores de mama generados en los ratones BALB/cAnNC sin tratamiento.

En cuanto a las curvas de calibración o curvas estándar para la obtención de la eficiencia y posterior validación del ensayo, se realizaron diluciones seriadas 1/3, 1/5 y 1/7 del ADNc de cada gen, incluyendo  $\beta$ -actina con cinco puntos cada una y partiendo de una concentración inicial de 100 y 75 ng/ $\mu$ l para evaluar la eficiencia de amplificación de cada uno y establecer la concentración de ADNc necesaria para obtener Cqs bajos que esta, sea la misma para todos los genes.

### Cuantificación de la expresión de genes Th1 y Th2

Una vez sintetizado el ADNc, se llevaron a cabo las reacciones de amplificación en tiempo real para la cuantificación de la expresión de genes Th1 y Th2 en los tumores de mama. La preparación de las reacciones para PCR en tiempo real se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix No. 1725120 (Bio-rad, USA) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Cada reacción contenía 10  $\mu$ L de SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix 2x, 0.3  $\mu$ L de oligos (150 nM) y 8.7  $\mu$ L de agua. La reacción se realizó utilizando el termociclador Bio-Rad CFX96 con las condiciones ilustradas en la figura 23 de los anexos.

Al finalizar la reacción se da la curva de fusión o curva de melting, esto es incrementar la temperatura 0.5  $^{\circ}$ C cada 2-5 segundos en un intervalo de 65-95  $^{\circ}$ C para saber si el producto de la reacción fue específico al observar un único pico en el gráfico que indica la temperatura en la que el producto de doble cadena es desnaturalizado. La expresión de los genes se normalizó con la expresión del gen

control  $\beta$ -actina y con las muestras control, cada una de las reacciones se realizó por triplicado.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de  $\Delta Cq$  se realizó mediante una prueba Kolmogórov-Smirnov para verificar si los valores siguen o no una distribución normal y posteriormente se realizó la prueba U en el software GraphPad versión 10.1.2 para Windows, San Diego, California, USA. Las comparaciones entre los grupos fueron analizadas con el promedio  $\pm$ SD. Las diferencias significativas fueron consideradas cuando  $P < 0.05$ .

## VIII. Resultados y discusión

### 1. Optimización y estandarización

#### Elección de los genes candidatos y diseño de primers

Para la selección de los genes candidatos se realizó una búsqueda bibliográfica (Monteiro *et al.*, 2013. Kumar *et al.*, 2017. Mohamed *et al.*, 2014. Majidzadeh *et al.*, 2011. McNeill *et al.*, 2007. Gur-Dedeoglu *et al.*, 2009. Nagatomo *et al.*, 2015. Bardel *et al.*, 2016. Ohmichi *et al.*, 2011) de estudios de cáncer de mama en los que se analizara la expresión diferencial de respuestas Th1 o Th2, considerando además su viabilidad para evaluarlos en modelo murino. La expresión de estos genes, que incluyen interleucinas y factores de expresión, brindan información sobre el estado inmune que atraviesa el organismo estudiado bajo ciertas condiciones, en este caso, ratones con cáncer de mama con o sin tratamiento. Los genes GAPDH y  $\beta$ -actina fueron elegidos como genes de referencia pues son los más frecuentemente utilizados para la normalización de la expresión.

Además de la búsqueda bibliográfica, también se consultó una base de datos, curada y que tiene información sobre la expresión de genes en *Mus musculus*, esta plataforma es: TIMER, cuyas siglas significan “Tumor Immune Estimation Resource”, una base de datos formada a partir de 10,000 muestras tumorales de 23 tipos de cáncer provenientes del Atlas de Genomas de Cáncer (TCGA, por sus siglas en inglés), en donde además se analizan según la infiltración de células inmunes y su influencia en las observaciones clínicas (Li *et al.*, 2016). Se tomó en cuenta dónde fue reportada su expresión o su ausencia, especialmente en tejidos de mama, que el modelo fuese ratón, y preferentemente que estos hubieran sido obtenidos mediante PCR, qPCR o RNA.Seq.

#### *Citocinas elegidas*

Las citocinas son un grupo de proteínas, péptidos y glucoproteínas que van desde los 5 hasta los 30 kDa que regulan las respuestas inmunitarias e inflamatorias y

actúan como factores de crecimiento para distintas células (Shellito y Kolls, 2004). Son liberadas bajo diferentes tipos de estrés estimulando respuestas del huésped para controlar y revertir el daño causado. Una deficiencia en esta respuesta puede generar una producción alterada de citocinas que conlleve a que el daño persista, impactando, en el proceso de formación y progresión del cáncer (Dranoff, 2004).

Los linfocitos T cooperadores CD4+ al desarrollarse en células efectoras se clasifican en dos grupos: T cooperador 1 y T cooperador 2 (en inglés Th1 y Th2 o de tipo T1 y T2), las células inmunes y especialmente estos dos tipos, producen citocinas propias y específicas de cada uno, se han identificado más de 150 citocinas, algunas de ellas considerándose de Th1 con efectos de inmunidad celular o de Th2 para la respuesta inmune humoral, un alto o bajo ratio de citocinas Th1:Th2, se considera un indicador de activación o supresión de la inmunidad celular, respectivamente (Mocellin *et al.*, 2001). Además, se ha propuesto que el perfil génico de citocinas es de interés cuando se estudia la respuesta inmune anti-cáncer pues se ha observado que una respuesta efectiva contra agentes infecciosos y posiblemente, células tumorales, generalmente está caracterizada por un cambio hacia un perfil de citocinas de tipo Th1 (Mocellin *et al.*, 2003). Por ejemplo, estudios han demostrado el rol dual de las interleucinas en el desarrollo de un tumor, promoviendo su crecimiento y la metástasis, o teniendo actividad anti-tumoral y participando en la proliferación de linfocitos T (Lv *et al.*, 2022).

IL-6: Producida por células T, monocitos, fibroblastos y células endoteliales, principalmente (Pirog *et al.*, 2010). Es una citocina pro-tumorogénica involucrada en la proliferación, supervivencia, diferenciación e invasión de células tumorales, además de en procesos de angiogénesis e inflamación. Evidencia sugiere que se han observado niveles altos de esta interleucina en múltiples tipos de cáncer incluyendo el cáncer de mama (Gu *et al.*, 2021).

IL-4: Esta interleucina pleiotrópica está relacionada con las respuestas alérgicas y participa en la proliferación, supervivencia y expresión genética de células T y B, es

producida por mastocitos, células T y células estromales de médula ósea (Pirog *et al.*, 2010). En el desarrollo de cáncer de mama tiene un efecto en la resistencia a apoptosis y en procesos de metástasis (Fasoulakis *et al.*, 2018).

IL-10: Esta interleucina, aunque es considerada inmunosupresora, tiene una actividad dependiente del contexto, particularmente en cáncer, su acción inhibe la apoptosis de los linfocitos CD8+ que es inducida por antígenos, potenciando así su actividad efectora citotóxica (Berraondo *et al.*, 2019). Es producida por muchos tipos de células de mamíferos como macrófagos, monocitos, células B y células T (Pirog *et al.*, 2010).

IL-1 $\beta$ : Es una citocina pro-inflamatoria secretada por monocitos, macrófagos tisulares y células dendríticas, entre otras, tiene actividad en la maduración y proliferación de células B e influencia en la inducción de IL-2 (Pirog *et al.*, 2010).

IL-12: Esta citocina es producida por macrófagos y monocito activados, células B y mastocitos de tipo tejido conectivo. Es un potente regulador de respuestas inmunes celulares, promueve la activación de células CD4, CD8, NK y la producción a su vez, de IFN- $\gamma$  (Pirog *et al.*, 2010).

#### *Factores de transcripción elegidos*

El gen TBX21, también llamado “T-bet”, es conocido como “regulador maestro” del perfil Th1 ya que es un factor de transcripción fundamental en la diferenciación de las células a este tipo de respuesta, es inducido por la presencia de IL-12 e IFN $\gamma$  y a su vez, regula la expresión de este último, produciendo así, una retroalimentación positiva en el proceso de diferenciación a Th1 (Zhu *et al.*, 2012).

GATA3 es un factor de transcripción identificado como regulador maestro de la diferenciación a Th2 de células T CD4+ y fundamental en el desarrollo y correcto funcionamiento de células T CD8+ y otros tipos celulares como las células NK, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Su expresión está a cargo de

estímulos endógenos como la expresión de otras citocinas, pero también puede auto activarse. La diferenciación a un perfil Th2 dada por GATA3, ocurre al unirse a los promotores de genes también característicos de Th2 como IL-4, y a su vez inhibiendo la expresión de otras citocinas como IFN $\gamma$  y STAT4 (Wan, 2014).

Existe una familia de factores de transcripción conocidos como STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Por un lado, STAT4 es un regulador transcripcional activado principalmente por IL-12, presente en gran medida en células hematopoyéticas, está involucrado en el crecimiento celular, la diferenciación y la respuesta inmune, siendo parte crucial en la diferenciación a un perfil Th1 debido a su rol en la producción de IFN $\gamma$  (Kaplan, 2005). Mientras que, por otro lado, característicos de la respuesta Th2, están STAT3 que es un factor de transcripción involucrado en procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular; inmunosupresión, angiogénesis y tumorigénesis. Es asociado a la respuesta Th2 y Th17, y promueve el desarrollo de cáncer mediante mecanismos de inflamación al ser activado por IL-6 (Yang y Chen, 2021) y STAT6 que es un factor de transcripción que transmite señales de los receptores hasta el núcleo para la transcripción de genes. Su activación ocurre principalmente en presencia de IL-4 e IL-13 y una vez en el núcleo, regula la transcripción al unirse directamente al ADN mediante un dominio de unión al ADN. La respuesta de células Th2 y las respuestas causadas por IL-4, dependen ampliamente de este factor (Goenka y Kaplan, 2011).

#### *Genes de referencia elegidos*

Fueron elegidos dos genes de referencia, ambos ampliamente utilizados en múltiples y diversos ensayos. En primer lugar, el gen de la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, por sus siglas en inglés, GAPDH, esta enzima posee una gran batería de actividades en toda la célula, está involucrada en la reparación de ADN, en el transporte de ARN, en fusión de membranas, dinámicas del citoesqueleto, muerte celular, entre muchas otras (Tristan *et al.*, 2011). El segundo gen elegido fue el que codifica para  $\beta$ -actina, una proteína altamente

conservada cuyo rol en la estructura del citoesqueleto y evidentemente en la acción de los microtúbulos de actina, es fundamental en los procesos de adhesión y locomoción de las células (Gu *et al.*, 2021). Estos genes, su respectivo par de primers y las temperaturas de alineamiento que están indicadas tanto en el instructivo del fabricante como las reportadas en el análisis de PrimerBlast, se muestran en el anexo i.

### Selección de método de homogenización y extracción de ARN

En los primeros ensayos de extracción de ARN, síntesis de ADNc y amplificación por PCR punto final, cuyo objetivo principal fue el de seleccionar el mejor método y comenzar con la estandarización de los ensayos, se utilizó un tumor de mama murino del grupo control. En la tabla 1, se muestran los resultados de la única extracción de ARN, que corresponden a los obtenidos mediante los métodos de homogenización propuestos: pistilo y TissueLyser; y los métodos extracción de ARN por Trizol y por columna que se probaron en una primera estancia. Se reporta la concentración de ARN y los radios A260/280 y A260/230, que indican la contaminación con compuestos aromáticos y con sales y carbohidratos, respectivamente; para el primer radio, se espera un valor de entre 1.8-2.0 se considera aceptable, el segundo radio debe girar en torno a un valor de 2.0.

*Tabla 1. Concentración y pureza de ARN obtenido de la extracción de una muestra de tumor mamario de modelo murino.*

<b>Tubo</b>	<b>Método de homogenización</b>	<b>Método de extracción</b>	<b>ng/μl</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>
1	Pistilo + Pistilo	RNeasy Plus Mini Kit	104.2	2.09	1.96
2	Pistilo + TissueLyser		93.1	2.08	0.86
3	TissueLyser		113.0	1.99	1.70
4	Pipeta	Trizol	211.9	2.10	0.66

Las concentraciones de ARN de las tres extracciones fueron muy similares, llegando a los 100 ng/ $\mu$ l, en cuanto a ambos ratios, el mejor resultado corresponde al método de pistilo + pistilo, pues ambos son cercanos a 2, por otro lado, el método de pistilo + TissueLyser, mostró un ratio A260/230 muy bajo causado probablemente por los residuos de tiocinato de guanidina proveniente de los componentes de los buffers del kit, este resultado fue similar al de la extracción con Trizol, el ratio A260/230 resultó el más bajo por lo que se descartó. Los resultados de la espectrofotometría demostraron que no hubo diferencia significativa entre el uso de pistilos y de TissueLyser.

Posteriormente se evaluó la calidad del ARN, que es una variable fundamental que debe tomarse en cuenta para poder ser utilizado en los ensayos posteriores. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para observar las bandas 28S y 18S, ya que se considera que, si se observan de forma clara y sin barrido alrededor de ellas, el ARN extraído está íntegro. La electroforesis en gel de agarosa (Fig. 5) muestra que las bandas 28S y 18S del mismo grosor en las tres muestras, particularmente en la muestra número 3 se puede observar una banda de un gran tamaño, lo que indica contaminación con ADNg.

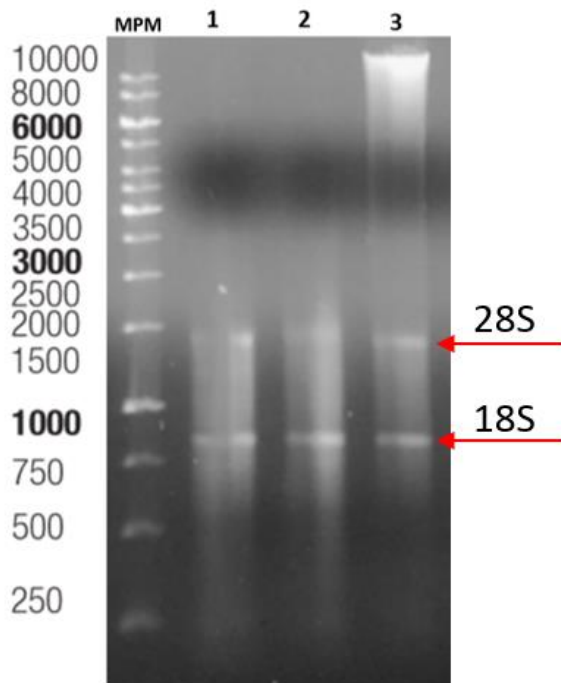
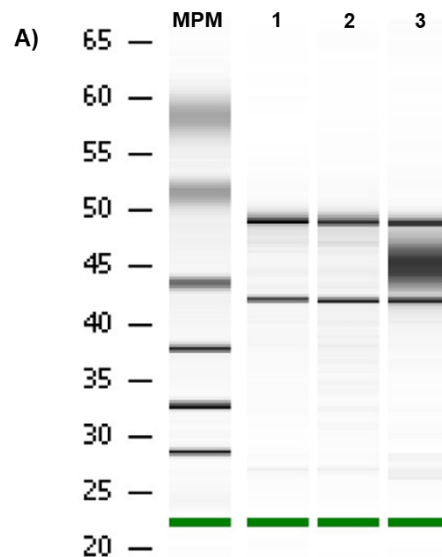
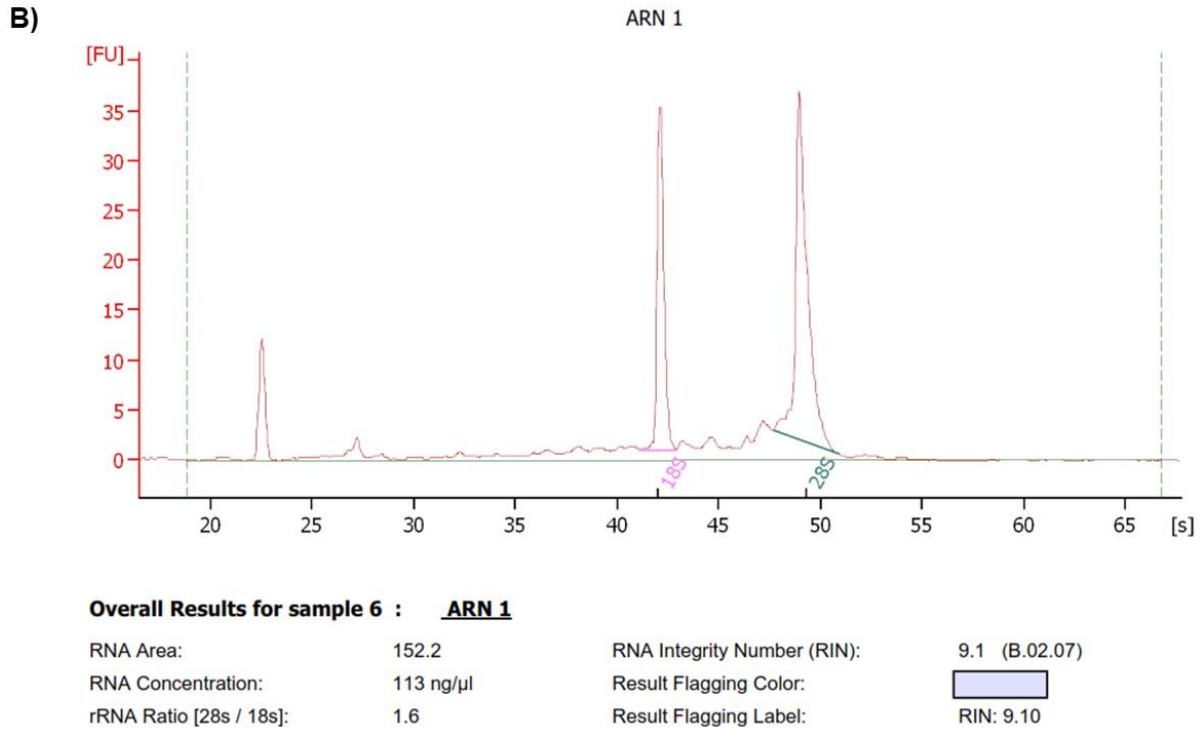


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído de tumor mamario de modelo murino. Muestra de tumor homogenizado dos veces con pistilos (1), con pistilo y TissueLyser (2) y únicamente con TissueLyser (3). En los tres carriles se muestran las regiones 28S y 18S aún visibles (indicados con flecha roja) a pesar del nivel de degradación evidente en el barrido y el carril 3 es el único en presentar una banda de alto peso molecular que indicaría contaminación de ADN genómico.

En esta primera extracción, también se realizó una electroforesis capilar con el Agilent RNA 6000 Nano Kit utilizando el bioanalizador Agilent 2100, este kit se basa en un chip en cuyo interior hay una serie de microcanales que permiten que la o las muestras de ARN total o ARN mensajero sean analizadas según su tamaño en su paso por un gradiente electroforético. Así, se obtiene no solo un gel digital, sino también un valor conocido como RIN (Número de Integridad de ARN), el cual nos permite evaluar la calidad del ARN extraído en un rango de 1 a 10, siendo 1, un valor que indica ARN totalmente degradado y 10, un valor para un ARN intacto y que es generado a partir de un algoritmo que evalúa no solo el gel digital, sino la el comportamiento de un electroferograma que también se puede observar para cada una de las muestras, en él se evalúan varios parámetros (de acuerdo a la guía de Agilent RNA 6000 Nano Kit):

- Proporción de ARN total: proporción del área bajo los picos generados por las regiones 18S y 28S de ARNr con respecto al área total bajo el gráfico.
- Altura del pico 28S: este debe ser el pico más alto pues es la especie más prominente del ARNr y se degrada más rápido que la 18S.
- Región rápida: área entre los picos de 18S y 5S, al aumentar su tamaño, se indica degradación.
- Altura del marcador: un valor alto en la altura indica que una gran cantidad del ARNr se ha degradado en pequeñas piezas.





*Figura 6. Resultados de electroforesis capilar. A) Gel digital que muestra las tres muestras de tumor homogenizadas por pistilo (1), pistilo y TissueLyser (2) y TissueLyser (3). Se muestran las bandas 28S y 18S. El carril 3 es el que presenta una mayor degradación. B) Electroferograma de la muestra homogenizada dos veces con pistilo, los picos correspondientes a la región 28S y 18S se observan claros y definidos, siendo el 28S más alto que le 18S y en la región de 20-25 hay solo un pico de bajo tamaño.*

La figura 9A muestra el gel digital del ARN extraído con el kit RNeasy Plus con los tres métodos de homogenización probados: pistilo, pistilo + TissueLyser y TissueLyser; en la figura 9B se muestra el electroferograma de la muestra homogenizada con pistilo, cuyo valor RIN fue el más alto. Este indicador y las bandas 28S y 18S que se observan definidas y sin barrido en el gel digital favorecieron la elección de pistilo + pistilo como método de homogenización y extracción con el kit RNeasy Plus para todos los experimentos futuros.

#### Controles positivos de amplificación: extracción de ARN y síntesis de ADNc

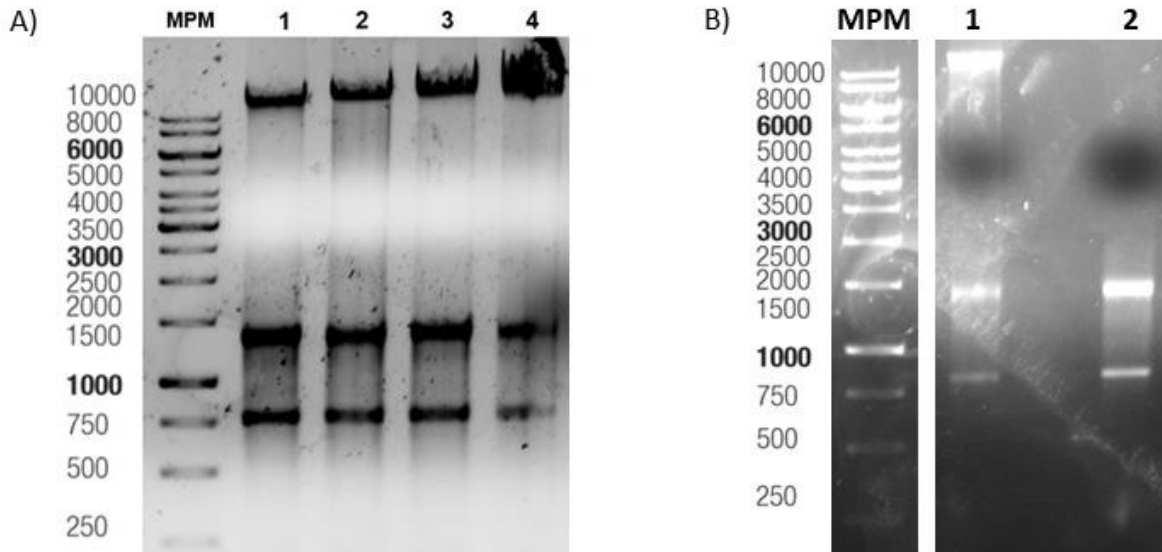
Como parte del proceso de optimización y estandarización, es necesario en primer lugar verificar la correcta funcionalidad de los primers y posteriormente buscar la amplificación de los genes, una banda única del tamaño esperado, así que, con el

fin de servir como un control positivo de la amplificación para cada gen, fue requerido analizar tejidos de otro modelo murino en donde la expresión de estos genes estuviera favorecida.

Para el primer control se utilizaron los bazos de dos ratones inmunizados con antígenos de tuberculosis (Acr) que en experimentos previos del laboratorio mostraron niveles de Ig1 e Ig2; para el segundo control, los tejidos seleccionados fueron un tumor de mama y los nódulos linfáticos centinela de un ratón macho C57BL6 tratado con una vacuna de epítomos variables de survivina y dosis de *in vivo* MAb anti-mouse CTL-4 Núm. Catálogo BE0131 (BioCell) como tratamiento contra tumores generados con la línea celular 4T1, y cuyos resultados demuestran una transición hacia el perfil Th1 (Odales *et al.*, 2022). El ARN de los tres tejidos se extrajo mediante el protocolo previamente descrito en la metodología. La tabla 4 concentra los resultados de las cuatro extracciones de ARN de las muestras de bazo; las concentraciones son altas, sin embargo, el radio A260/A230 de la muestra 3 es muy bajo probablemente por contaminación con carbohidratos, sales o fenoles. Los resultados de la electroforesis de este ARN muestran las bandas 28S y 18S claras y definidas, comprobando la integridad del ARN (Fig. 7).

*Tabla 2. Concentración y pureza de ARN obtenido de la extracción de muestras de bazo de ratones inmunizados con Acr y BEV's de survivina + anti CTL-4.*

<b>Modelo</b>	<b>Muestra</b>	<b>Tubo</b>	<b>ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>A260/ A280</b>	<b>A260/ A230</b>
Ratones inmunizados con Acr y Acr+Prime	Bazo	1	191.7	2.05	2.10
		2	656.5	2.03	2.25
		3	527.0	2.04	1.37
		4	858.4	2.03	2.19
Ratones tratados con BEV's de survivina + anti CTL-4	Tumor	1	749.4	2.09	2.24
	Nódulos Linfáticos centinela	1	205.6	2.09	2.10



*Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído de diferentes tejidos de ratones inmunizados con A) Acr y Acr+Prime en donde los cuatro carriles (1, 2, 3 y 4) son extracciones de bazo y B) BEVs de survivina MAb anti-mouse CTL-4, el carril 1 es ARN de tumor y el carril 2 de nódulos linfáticos centinela. En cada carril se observan las bandas 28S y 18S, con un bajo nivel de degradación, únicamente el ARN extraído de nódulos linfáticos centinela no presentó contaminación de ADNg.*

Por otro lado, los resultados de la espectrofotometría de tumor y nódulos linfáticos indicaron que las concentraciones superaron los 100 ng/μl, llegando incluso a los 700 ng/μl en el caso de la muestra de tumor (Tabla 2); en cuanto a la pureza, los radios A260/280 y A260/230 de ambos tejidos son cercanos a 2. En el gel de electroforesis (no mostrado) las bandas 28S y 18S se observan claras y sin barrido, hay contaminación con ADN genómico.

Para cada extracción de ARN, independientemente del tejido de origen, la transcripción inversa para obtener ADNc se llevó a cabo siempre con 1000-5000 ng de ARN y el material genético que se usó para la fase de optimización provino de un tumor de mamá de un ratón que no recibió ningún tratamiento; la estandarización de las condiciones de PCR punto final se realizó primordialmente con la idea de encontrar una temperatura de alineamiento en común para la mayoría de genes de interés, de ser posible, para todos. Las T<sub>m</sub> reportadas para todos los genes oscilaban entre los 55-65° C, por lo que las primeras reacciones se probaron con 57° y 60° C.

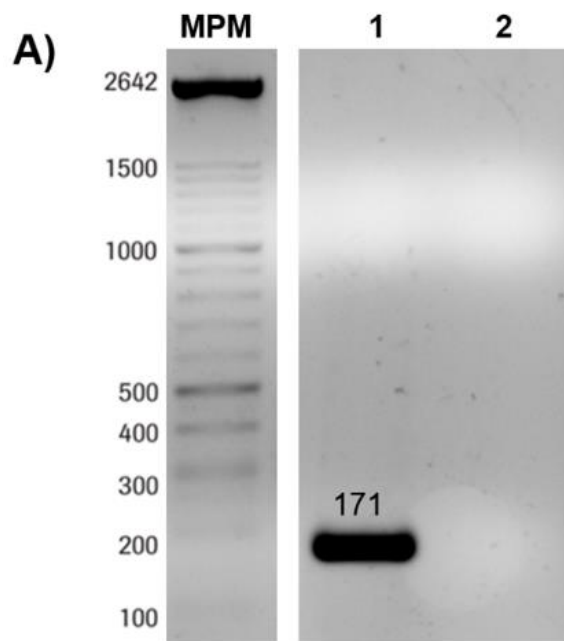
IL-6 e IL-1 $\beta$  amplificaron a 57° C con un tamaño correcto de 186 y 133 pares de bases, e IL-10, IL-12, STAT4, STAT3, STAT6, GATA3 TBX21, GAPDH y  $\beta$ -actina, amplificaron a 60° C y todas las bandas obtenidas fueron correspondientes al peso molecular esperado 237, 324 y 171, respectivamente, los controles negativos no tuvieron amplificación y no se observaron bandas inespecíficas (Fig. 11).

IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-4 no amplificaron a ninguna de las dos temperaturas iniciales, por lo que se decidió hacer una PCR con gradiente de temperatura 60-65° C para IL-4 y 57-61° C para IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  para determinar la temperatura óptima. Esta vez, IFN $\gamma$  amplificó a 57° C. Para TNF $\alpha$  se observó una banda definida del peso molecular correcto en todas las temperaturas así que tomando en cuenta la temperatura para todos los genes y la formación de dímeros de los primers, se eligieron 60° C como temperatura óptima. Finalmente, no se observó amplificación de IL-4 en ninguna de las temperaturas probadas.

Posteriormente, se utilizó ADNc generado a partir de ARN extraído de bazo de dos ratones BALB/c inmunizados con ACR y ACR+Prime, esto con el fin de utilizarlo a modo de control positivo y verificar la expresión genes, especialmente, si había amplificación de IL-4 en este modelo y así, poder comprobar la correcta funcionalidad de los primers. Todos los genes amplificaron con las temperaturas elegidas previamente y con el tamaño correcto, para IL-4 se hizo nuevamente una PCR de gradiente y hubo amplificación, se observó una banda tenue a 60°, 61°, 62° y 63° C en el peso esperado, 183 pb; sin embargo, también aparecieron bandas inespecíficas, la causa más probable de estas bandas que no estaban presentes en las anteriores reacciones, es la contaminación de ADNg durante la extracción de ARN, para eliminar estas bandas inespecíficas y prevenir su aparición en los experimentos futuros, se implementó un tratamiento de DNasas previo a la síntesis de ADNc. Como resultado de este tratamiento, la banda correcta y la inespecífica desaparecieron con ambos tratamientos, por lo que, como resultado preliminar, se decidió establecer 60° C como su Ta.

Las Ta indicadas en las instrucciones del fabricante de IL-12, STAT4, STAT3, STAT6, GATA3, TBX21 estaban entre 60-65° C, al probar la temperatura que se eligió para el resto de los genes anteriores, 60° C, estos seis genes fueron amplificados con una banda del tamaño (pb) esperado: 114, 180, 97, 104, 109 y 103, no se observaron bandas inespecíficas en ningún caso (Fig. 8).

Antes de continuar con las reacciones de PCR en tiempo real, se hizo notar que el tamaño del amplicón de GAPDH era de 324 pb, superando el rango límite que se sugiere utilizar para lograr que la duplicación en cada ciclo para colorantes intercalantes como SYBRGreen que es entre 80 y 150 pb, un tamaño menor o mayor podría generar dificultad para discernir entre el dímero de primer y el amplicón o para completar la extensión (Bustin y Huggett, 2017), por lo que este gen ya no fue utilizado como gen de referencia en los ensayos de qPCR, únicamente para la verificación de la correcta síntesis de ADNc por PCR punto final.



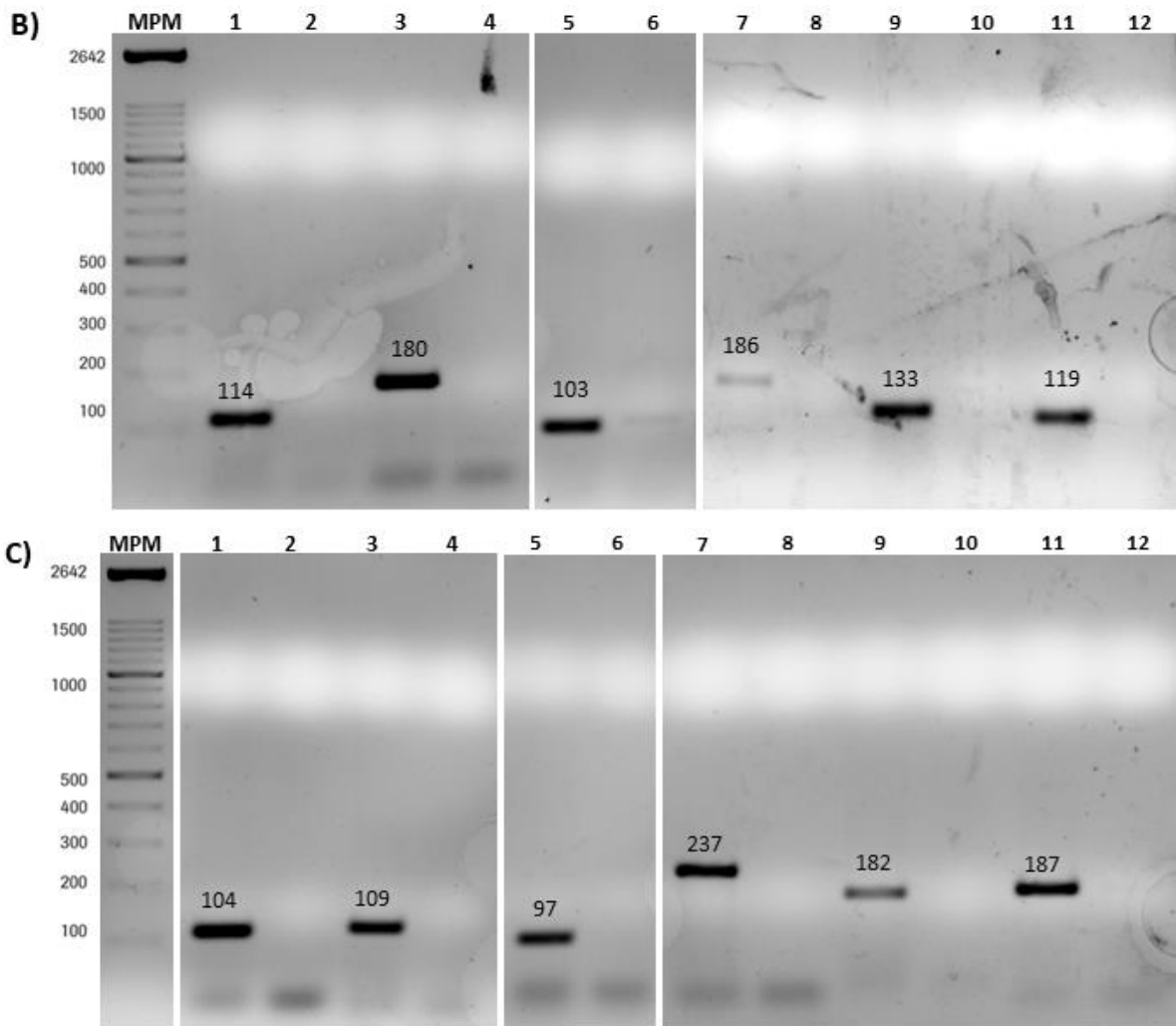


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las PCR punto final con ADNc de tumor de mama murino para el gen de referencia y los 12 genes de interés. A)  $\beta$ -actina (1) y negativo (2). B) IL-12 (1), STAT4 (3), TBX21 (5), IL-6 (7), IL-1 $\beta$  (9), IFN $\gamma$  (11) y sus respectivos negativos (4, 6, 8, 10 y 12). C) STAT6 (1), GATA3 (3), STAT3 (5), IL-10 (7), IL-4 (9), TNF $\alpha$  (11) y sus negativos (4, 6, 8, 10 y 12)

## 2. Cuantificación relativa de genes asociados a los tipos de respuesta inmune Th1 y Th2

### Validación del ensayo: Curvas Estándar

En los ensayos de qPCR, al inicio de la reacción la cantidad de producto y por lo tanto, de fluorescencia, es muy baja para ser detectada de manera confiable y solo se observa señal de fondo o “ruido”, cuando el producto comienza a formarse de forma exponencial y aumenta la fluorescencia, se establece el “umbral” que en la

curva de amplificación de cada reacción se muestra como una línea base, así, el ciclo en el que este umbral se cruza se conoce como “Quantification Cycle (Cq)” y es el valor con el que posteriormente puede calcularse el nivel de expresión (Aguilera *et al.*, 2014). Idealmente, la curva de amplificación presenta un patrón sigmoidal que refleja las fases de la reacción: exponencial, lineal y plateau. Este patrón es crucial para una cuantificación precisa de los productos de PCR y proporciona información sobre la eficiencia y la calidad de la reacción.

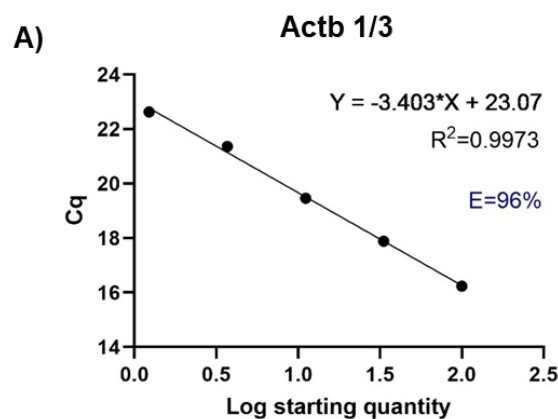
La fluorescencia que es detectada y medida, es emitida por fluoróforos que se unen al ADN, lo que produce un aumento de la señal al aumentar las cadenas, estos fluoróforos son agentes intercalantes que en un principio presentaban problemas al diferenciar entre cadenas simples y cadenas dobles, como es el caso del Bromuro de Etidio, que dejó de utilizarse, además de por su toxicidad; actualmente existen varios tipos de fluoróforos con esta función, siendo el más utilizado el SYBR Green, un fluoróforo que se une al surco menor de la cadena de ADN, el complejo ya formado absorbe a una longitud de onda de 498 nm y emite a 522 nm (Aguilera *et al.*, 2014; AAT Bioquest, Inc., 2024). Es importante considerar que el uso de SYBR Green tiene ventajas de costo y facilidad de empleo, sin embargo, su capacidad de unirse a cualquier ADN de doble cadena puede provocar uniones inespecíficas y se forme más de un amplicón. Por esta razón, en los ensayos de qPCR se emplea una herramienta conocida como “melt curve”. El fundamento de este proceso radica en la fluorescencia y la temperatura, cuando el SYBR Green está unido a una cadena doble de ADNc, fluoresce, pero cuando la cadena está separada en dos hebras de ADNc, la fluorescencia no ocurre, entonces, posterior a los ciclos de amplificación, el termociclador fija una temperatura cercana a la de alineamiento, mide la fluorescencia, y después aumenta la temperatura gradualmente mientras va midiendo la fluorescencia hasta que alcanza un punto en el que la doble cadena se desnaturaliza y la fluorescencia baja, esta es la temperatura de melting y cada amplicón se representa gráficamente como un pico, por lo que la presencia de dos o más picos, hablan de la presencia de otros productos que han sido amplificados de forma inespecífica (Downey, 2014).

El primer paso para comenzar con PCR en tiempo real fue la generación de una curva estándar con cinco diferentes concentraciones para cada uno de los genes. Estas curvas se elaboraron con el objetivo de determinar el rango de concentraciones en la que se amplifica el gen antes del ciclo 30, además, esta curva estándar permitió identificar la eficiencia de la reacción, definida como la fracción de moléculas de interés que son copiadas en cada ciclo (Svec *et al.*, 2015), teóricamente, la eficiencia de una reacción es de 100%, sin embargo, se ha establecido un rango aceptable de 90-110% de eficiencia para considerar que la amplificación de un gen es válida (Taylor *et al.*, 2010). Para calcular la eficiencia de la reacción y expresarla en porcentaje, se utiliza esta ecuación  $E=(10^{-1/\text{pendiente}}) - 1 * 100$ .

Las curvas estándar se realizaron con cada uno de los genes y se probaron diferentes factores de dilución, pues según el nivel de expresión de un gen en particular, ya sea alto o bajo, una dilución u otra funciona mejor para alcanzar la eficiencia, se probaron diluciones 1/3, 1/5, 1/7 y 1/10 para Actb, para lo demás, estas diluciones se probaron en función del rango dinámico entre la concentración más alta y la más baja de templado de ADNc en donde se observa que la reacción es lineal ( $R^2 \geq 0.98$ ), se considera que un Cq de entre 30 a 35 ciclos indica una detección muy baja de ARNm, mientras que un Cq de 10 a 15 ciclos indica un gen con alta expresión, los genes de referencia normalmente tienen Cqs más bajos que los genes de interés, por lo que recomendable utilizar concentraciones que resulten en Cqs de menores de 35 ciclos (Understanding QPCR Results, 2020) Con excepción de la curva de  $\beta$ -actina, ninguna otra pudo ser realizada con una dilución como la de 1/10 ya que los Cqs resultantes de las concentraciones más altas alcanzaron los 30 ciclos, e incluso los superaron, la eficiencia se alcanzó disminuyendo el rango de las diluciones para garantizar que la curva se ajustara a las concentraciones de templado de ADNc para la expresión de cada uno de los genes. Las reacciones de qPCR se realizaron a 57° y 60° C, y se programaron 40 ciclos.

Únicamente IFN $\gamma$ , IL-10 y GATA3 con dilución 1/3, TNF $\alpha$  y STAT4 con dilución 1/5 y STAT3 con dilución 1/7, además de Actb, alcanzaron una eficiencia dentro del rango óptimo (Fig. 9). IL-1 $\beta$  y STAT6 se probaron con varias diluciones y a pesar de tener Cqs bajos de entre 20 y 30, no se alcanzó la eficiencia deseada, por otro lado, TBX21, IL6 e IL-12, no solo no alcanzaron una eficiencia adecuada, sino que también mostraron Cqs mayores a 30.

La eficiencia de una reacción puede verse afectada por varios motivos: la formación de estructuras secundarias e interacciones no deseadas causadas por la composición de los primers y el templado que disminuyen la eficiencia; la presencia de inhibidores en la reacción y las altas concentraciones de cualquiera de los reactivos que generalmente llevan a observar una mayor eficiencia, esto debido a que los efectos de la inhibición se observan de mayor claridad en las concentraciones altas ocasionando que la pendiente disminuya, incluso el uso de diferentes termocicladores, el número de réplicas técnicas y la cantidad de muestra que se transfiere en la preparación de diluciones seriadas, afectan la eficiencia de la reacción. De forma interesante, se ha observado que un volumen de transferencia mayor, aproximadamente de 10  $\mu$ l o que la muestra de ADN sea el 40% del volumen de la reacción reduce el error y mejora la precisión del ensayo (Svec *et al.*, 2015, Taylor *et al.*, 2019), en este trabajo se usaron volúmenes más pequeños, 4  $\mu$ l aproximadamente lo que podría no está reflejando la eficiencia real de la reacción, además de que, durante el ensayo, se utilizaron dos termocicladores de la misma marca y modelo, pero de distintos laboratorios.



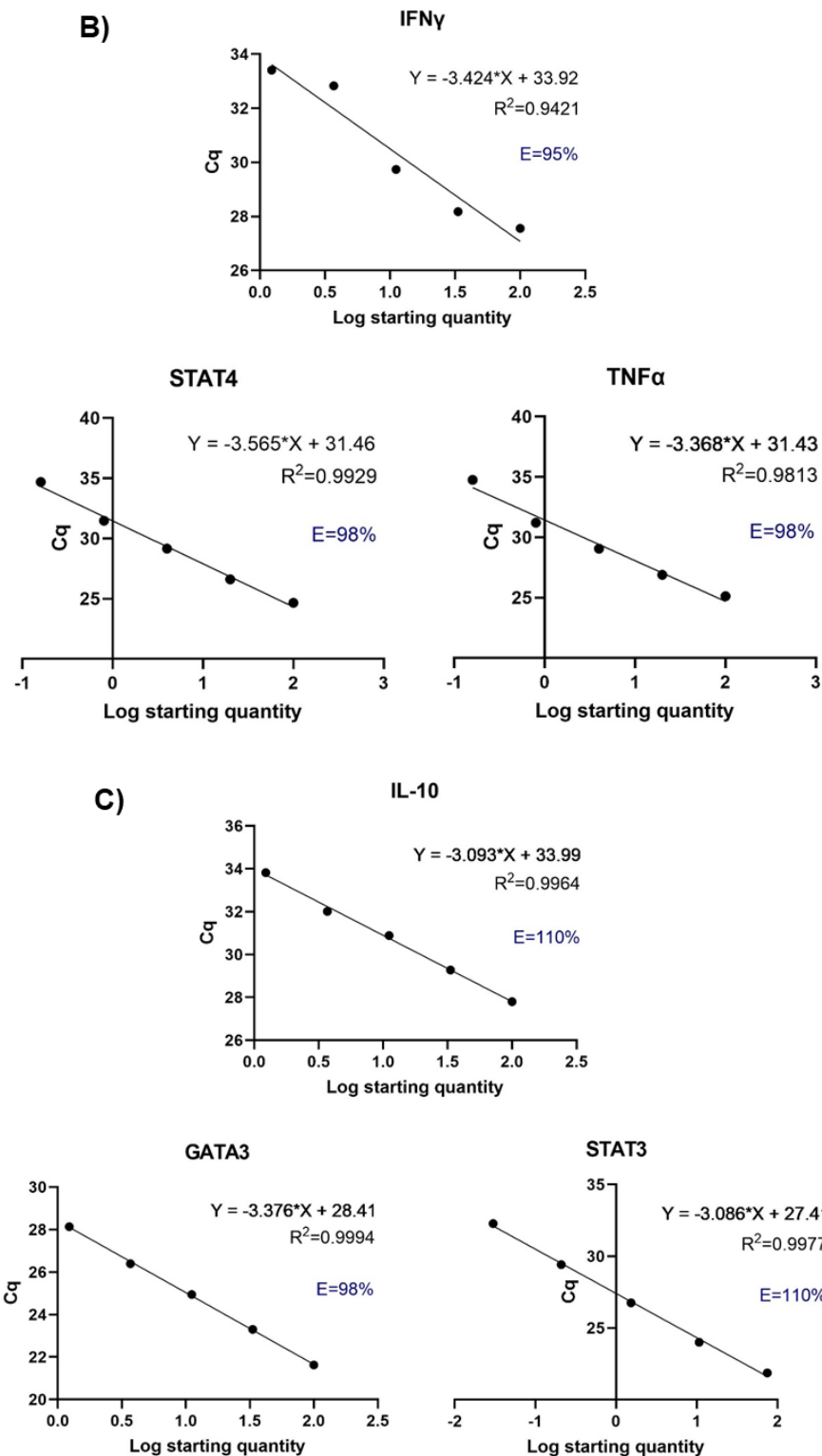


Figura 9. Curvas estándar de cada gen y eficiencias de la reacción. A) B-actina, E=96%. B) Genes Th1: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , E=98% y STAT4, E=98%. E=95%. C) Genes Th2: IL-10, E=110%, GATA3, E=98% y STAT3, E=110%.

En gran parte aquí radica la importancia de optimizar y estandarizar los ensayos de PCR en tiempo real, independientemente del proceso de optimización y estandarización de los ensayos de PCR punto final, las diferencias en cómo es tratada la muestra, en la matriz en que estos dos tipos de reacción se llevan a cabo y el procesamiento en general, pueden afectar los datos que serán obtenidos. En este trabajo se usaron directamente las condiciones utilizadas en la PCR punto final y se trasladaron al kit para qPCR, por lo que los resultados observados en las curvas estándar pudieron haber sido diferentes de haber optimizado el proceso nuevamente. Esto incluye que otra vez se realice la determinación de las cantidades y reactivos, y del rango de temperaturas de alineamiento óptimas para cada par de primers mediante una reacción en donde se evalúe un gradiente de temperatura, esto con el fin de corroborar las  $T_a$  que se seleccionaron en la PCR punto final, o en su defecto hacer modificaciones. Aunado a esto, revisar la especificidad en el producto de qPCR por la curva de  $T_m$ ; este resultado también puede confirmarse con una electroforesis de gel de agarosa o de poliacrilamida, este último tiene una mejor resolución para amplicones de menor tamaño y podría ayudar a identificar bandas de un tamaño muy similar entre ellas, incluso por 1pb cuando es necesario discernir en un mismo tubo de reacción si la amplificación observada corresponde al amplicón del gen de interés o a contaminación (Taylor *et al.*, 2010; Green y Sambrook, 2020).

Los genes de referencia son fundamentales en cualquier ensayo de qPCR, a grandes rasgos se utilizan para normalizar los datos y evitar los errores que pueden ser acarreados por la diferencia en la concentración de ADNc que se usa como templado y los rendimientos de la extracción y la transcripción reversa (Taylor *et al.*, 2010). Entonces, los genes de referencia ideales son aquellos cuya expresión no es afectada por los tratamientos o condiciones que se estén probando y que haya sido usado de forma confiable específicamente en el tipo de tejidos o muestras diversas con las que se esté trabajando. Además de que su nivel de expresión debería ser similar al de los genes de interés, ya sea bajo o alto. Sin embargo, en años recientes se ha discutido si realmente estos genes son estables o, por el

contrario, sufren variaciones ante condiciones diversas, y los resultados apuntan a que la expresión de estos genes es dependiente del ambiente y del tipo de ensayo (Dundas y Ling, 2012). Por lo que su validación es de suma importancia y entre los lineamientos que proponen Bustin *et al* en la guía MIQE (2009), se recomienda usar más de un gen de referencia, una excelente opción sería utilizar entre 3 y 5 genes de referencia para un ensayo robusto y confiable.

Junto a GAPDH,  $\beta$ -actina está entre la lista de genes más utilizados como referencia en PCR, debido a que es una proteína estructural citoplasmática muy importante y se ha observado una expresión más estable en comparación con otros genes internos, sin embargo, también han surgido evidencias de su variación durante procesos de proliferación y crecimiento celular, y condiciones de enfermedad, incluyendo cáncer (Ruan y Lai, 2007). Van De Moosdijk y Van Amerongen en 2016, realizaron una serie de ensayos para identificar nuevos genes de referencia y validar algunos ya reportados, entre ellos  $\beta$ -actina, en tejido mamario de ratón a través de diferentes estadios de crecimiento, este gen resultó poco estable en las diferentes etapas de crecimiento y al ser evaluado utilizando el algoritmo GeNorm, que evalúa la estabilidad en la expresión de un gen con un valor conocido como “M”, resultó entre los 3 menos estables. Este es un ejemplo del trabajo requerido para validar la utilización de un gen de referencia, debe considerarse que estos genes sean estables en diferentes tejidos, que su expresión no se vea afectada por factores ambientales o del propio tratamiento y que su nivel de expresión sea similar al del gen o genes de interés (Wang, *et al.*, 2018); ya que el rango de expresión de  $\beta$ -actina con Cqs que rondan entre los ciclos 9 y 18, es diferente al de los genes de interés que comienza a partir de los 20, lo que lleva a posibles variaciones que deben ser tomadas en cuenta y resaltan la importancia de estos ensayos de validación.

#### Validación del método $2^{-\Delta\Delta Cq}$

Para la cuantificación relativa de la expresión génica y su posterior análisis, es posible utilizar el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , esta ecuación se deriva de aquella que describe la

amplificación exponencial de la PCR:  $X_n = X_0 \times (1 + Ex)^n$ , por lo que esta derivación, el diseño experimental y la validación, se describieron en el boletín No. 2 de usuarios de Applied Biosystems (P/N 4303859). la ecuación es la siguiente:

$$-\Delta\Delta C_q = -(\Delta C_{q_{tratamiento}} - \Delta C_{q_{control}}),$$

donde  $\Delta C_q = C_{q_{gen\ de\ interés}} - C_{q_{gen\ de\ referencia}}$

de los grupos del tratamiento y del control, esto ya aplicado al diseño experimental, finalmente, 2 es elevado a  $-\Delta\Delta C_q$  (Livak y Schmittgen, 2001).

Sin embargo, para que su uso sea válido, el siguiente paso es la validación del método, que consiste en verificar que las eficiencias del gen de interés y del gen de referencia son lo suficientemente similares para poder ser comparables (Livak y Schmittgen, 2001). La forma de determinar esto es utilizando las curvas estándar de cada uno de los genes, a partir de los Cqs se obtiene el valor  $\Delta C_q$  mediante la fórmula  $\Delta C_q = C_{q_{gen\ de\ interés}} - C_{q_{gen\ de\ referencia}}$  (ACTB), para cada punto de la dilución y se grafican con el logaritmo correspondiente a la dilución; la pendiente de la línea de tendencia de esta gráfica debe estar entre -0.1 y 0.1 para que se considere que las eficiencias de ambos genes son iguales y entonces el método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  pueda usarse de forma válida (Livak y Schmittgen, 2001).

Los gráficos de validación se realizaron a partir de los datos de las mismas reacciones qPCR en donde se obtuvieron las eficiencias. Los seis genes que tuvieron una eficiencia de reacción óptima fueron TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y STAT4 para Th1, y STAT3, GATA3 e IL-10 para Th2, no obstante, en las gráficas de TNF $\alpha$ , STAT4 e IL-10 la pendiente resultante está fuera del rango aceptado, por lo que se considera que las eficiencias de estos genes no son iguales a las de  $\beta$ -actina y, por lo tanto, el método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  no puede ser usado de forma válida. Otro método de cuantificación deberá ser usado para estos tres casos. En el caso de GATA3 y STAT3 del perfil Th2 e IFN $\gamma$  del perfil Th1, el valor de la pendiente se encontró cercano a 0, dentro del rango deseado, por lo que es válido utilizar para cuantificar su expresión, el método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (Fig 10).

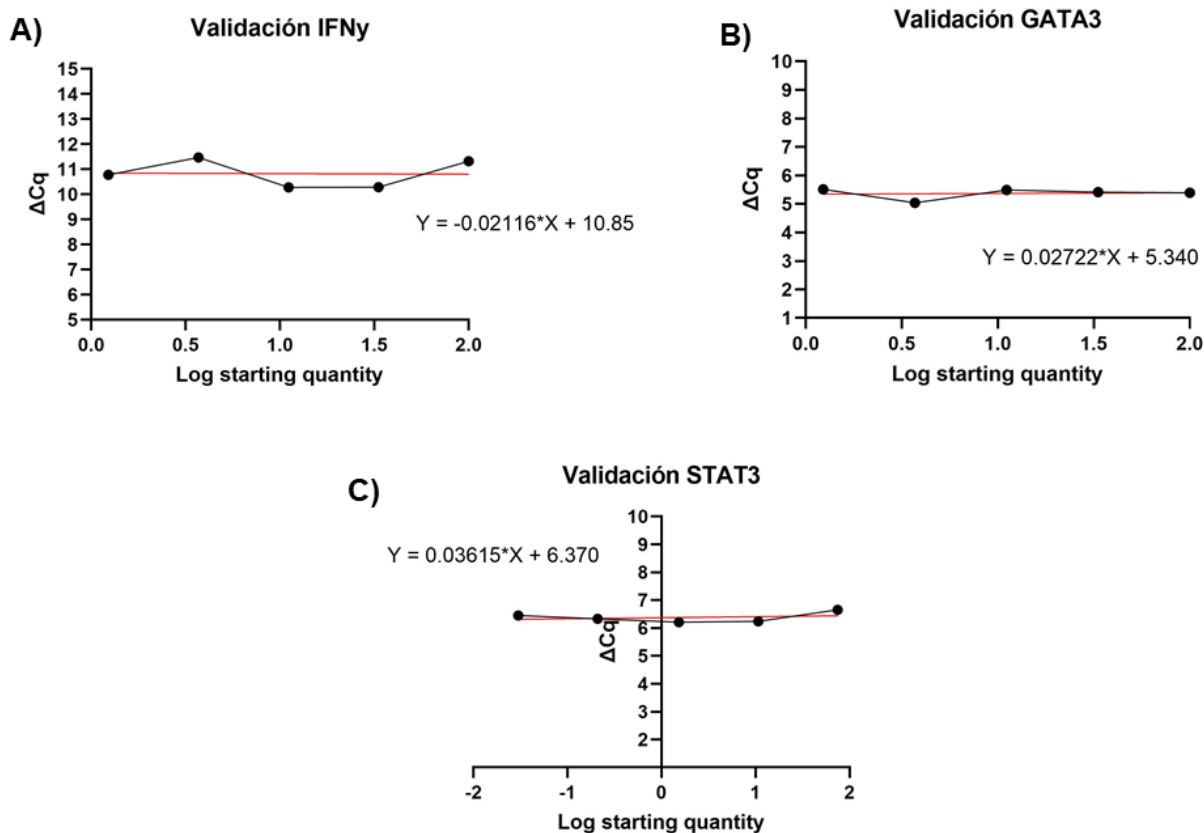


Figura 10. Gráficos de validación para el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  para A) IFN $\gamma$ , B) GATA3 y C) STAT3.

### PCR en tiempo real: Cuantificación de la expresión de genes Th1 y Th2

Se extrajo el ARN de 3 tumores obtenidos de los animales sin tratamiento (control) y de 3 tratados con micropartículas (tratamiento) y cuyos resultados se muestran en la tabla 3. Se realizaron dos extracciones de ARN de las muestras del experimento 2 debido a que las concentraciones fueron bajas y se requirió sintetizar más ADNc. En este primer experimento las muestras cuyos ratios 280/260 y 230/260 fueron cercano o iguales a dos, se consideran adecuados, el ratio A260/230 de algunas muestras fue del experimento 2 fueron  $<1.5$  y en la cuantificación con el nanodrop se indicó la presencia de guanidina. Esto puede explicarse por el método de extracción, este tipo de contaminación es común en los kits que utilizan columnas para la extracción y purificación, además de otros posibles contaminantes como el fenol, que también aparecen durante la extracción de ácidos nucleicos (Matlock,

2015). En el experimento 2, los valores de ambos ratios fueron cercanos a 2, lo que se consideró como una extracción adecuada.

*Tabla 3. Concentración y pureza de ARN obtenido de la extracción de tumores de mama de ratones tratados con micropartículas de almidón y ratones control.*

	Muestra	Extracción 1			Extracción 2		
		ng/μl	A260/280	A260/230	ng/μl	A260/280	A260/230
<b>Experimento 1</b>	Control 1	215	2.07	1.94	699	2.10	2.21
	Control 2	99.4	2.06	1.86	17	1.92	0.77
	Control 3	48.3	1.98	1.59	347.9	2.09	2.0
	Tratamiento 1	45.2	2.0	.18	98.1	2.04	1.59
	Tratamiento 2	181.4	2.0	1.57	544.2	2.09	2.05
	Tratamiento 3	246.1	2.0	1.98	134.6	2.07	.89
<b>Experimento 2</b>	Control 1	628.2	2.06	1.93			
	Control 2	498.5	2.11	1.81			
	Control 3	848.9	2.04	2.21			
	Tratamiento 1	615.6	2.04	2.12			
	Tratamiento 2	499.3	2.09	2.13			
	Tratamiento 3	360.9	1.99	1.67			

La calidad del ARN extraído se observó en los geles de agarosa (Fig. 11). En todas las extracciones encontramos las bandas 28S y 18S en diferentes intensidades y sin barrido, también exhiben en la mayoría de las muestras, contaminación por ADN genómico. En el caso de la extracción correspondiente al experimento 2, las muestras del control 1 y el tratamiento 3, aparecen con una banda 28S casi inapreciable, y una banda 18S de muy baja en intensidad pudiéndose tratar de degradación, sin embargo, al sintetizar el ADNc, la PCR punto final resultó positiva para  $\beta$ -actina (Fig. 12), sugiriendo así, que el ARN se encontraba en un estado adecuado para el proceso de obtención de ADNc.

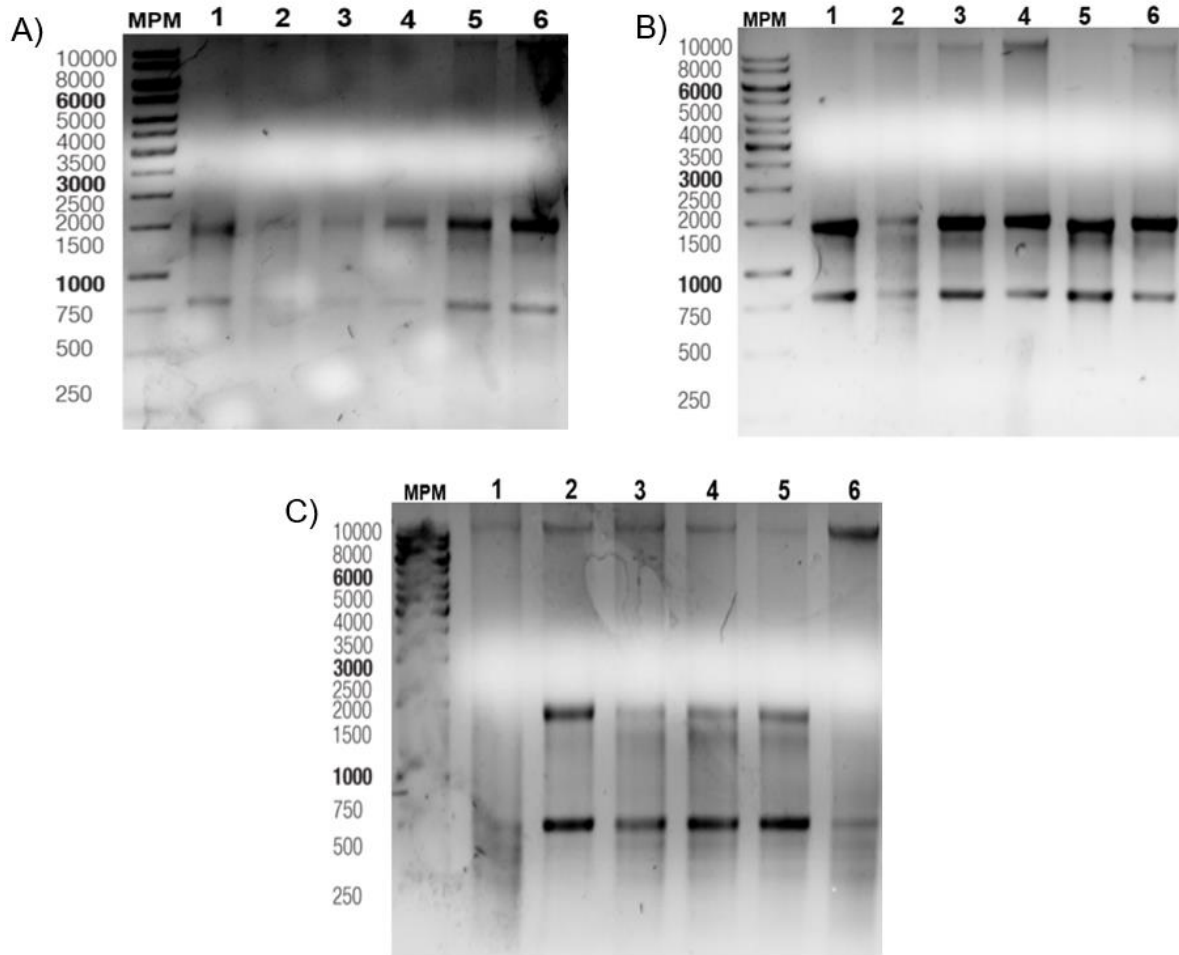


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN extraído de tumores mamarios de modelo murino tratados con micropartículas de almidón. A) Extracciones 1 y 2 de ARN de los 6 ratones del experimento 1. B) Extracción de ARN de los 6 ratones del experimento 2.

El ARN extraído de todas las muestras de cada ratón, se trató con DNAsas con el fin de eliminar el ADN genómico mostrado en los geles de ARN y posteriormente se sintetizó el ADNc siguiendo el protocolo que previamente se describió y se verificó con PCR punto final para  $\beta$ -actina (Fig. 12).

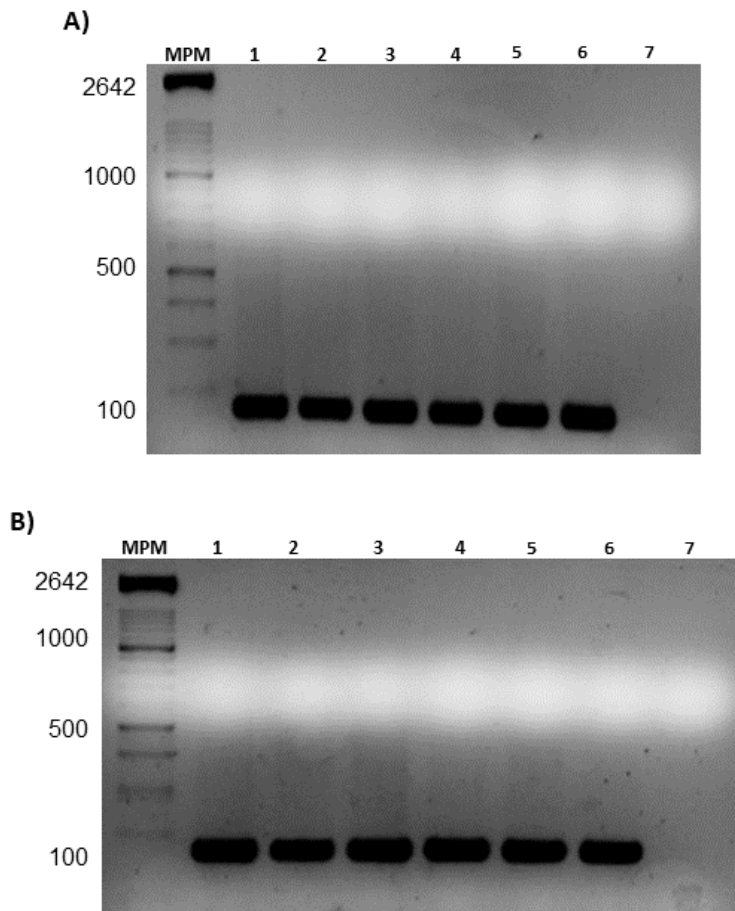


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de PCR punto final para  $\beta$ -actina (171 pb). A) Amplificación de las seis muestras del experimento 1 y el control negativo (7). B) Amplificación de las seis muestras del experimento 2 y el control negativo (7).

En los ensayos de PCR tiempo real, se obtienen las curvas de amplificación y de disociación para cada uno de los genes con eficiencia adecuada del experimento 1, incluyendo al gen de referencia Actb (Figuras 13-16, las gráficas del experimento 2 y los tres genes con eficiencia inadecuada se encuentran en anexos: Figuras 24-30) y cada muestra es colocada por triplicado, por lo que los valores de Cq que de la amplificación de cada gen (ver anexos: Tabla 9), son promediados para ser sustituidos en la fórmula, el valor resultante es lo que se conoce como “fold change” que es el cambio en el nivel de expresión, si es positivo significa sobreexpresión, si es negativo, subexpresión (Livak y Schmittgen, 2001), normalizado con el gen de referencia, que es  $\beta$ -actina y con respecto a un control (ratones sin tratamiento de micropartículas). En teoría, la diferencia de los  $\Delta Cq$  de la muestra control es 0 y al

elevar  $2^0$  el resultado es 1, siendo este el valor de fold change que sirve como referencia para observar sobre o sub expresión, además de ser una forma de comprobación y evitar errores en los cálculos entre triplicados y muestras (Livak y Schmittgen, 2001).

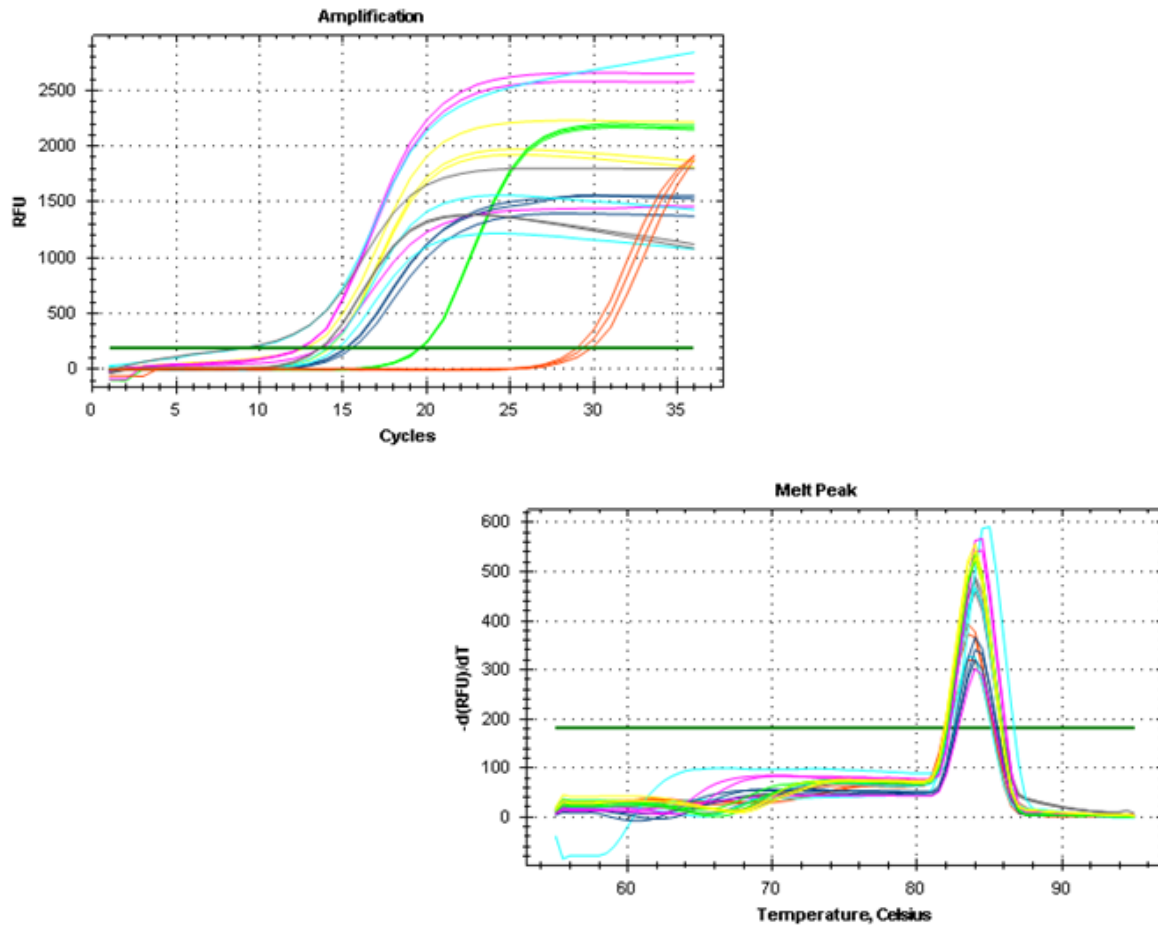


Figura 13. Curva de amplificación (A) y curva de melting (B) de  $\beta$ -actina del experimento 1. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

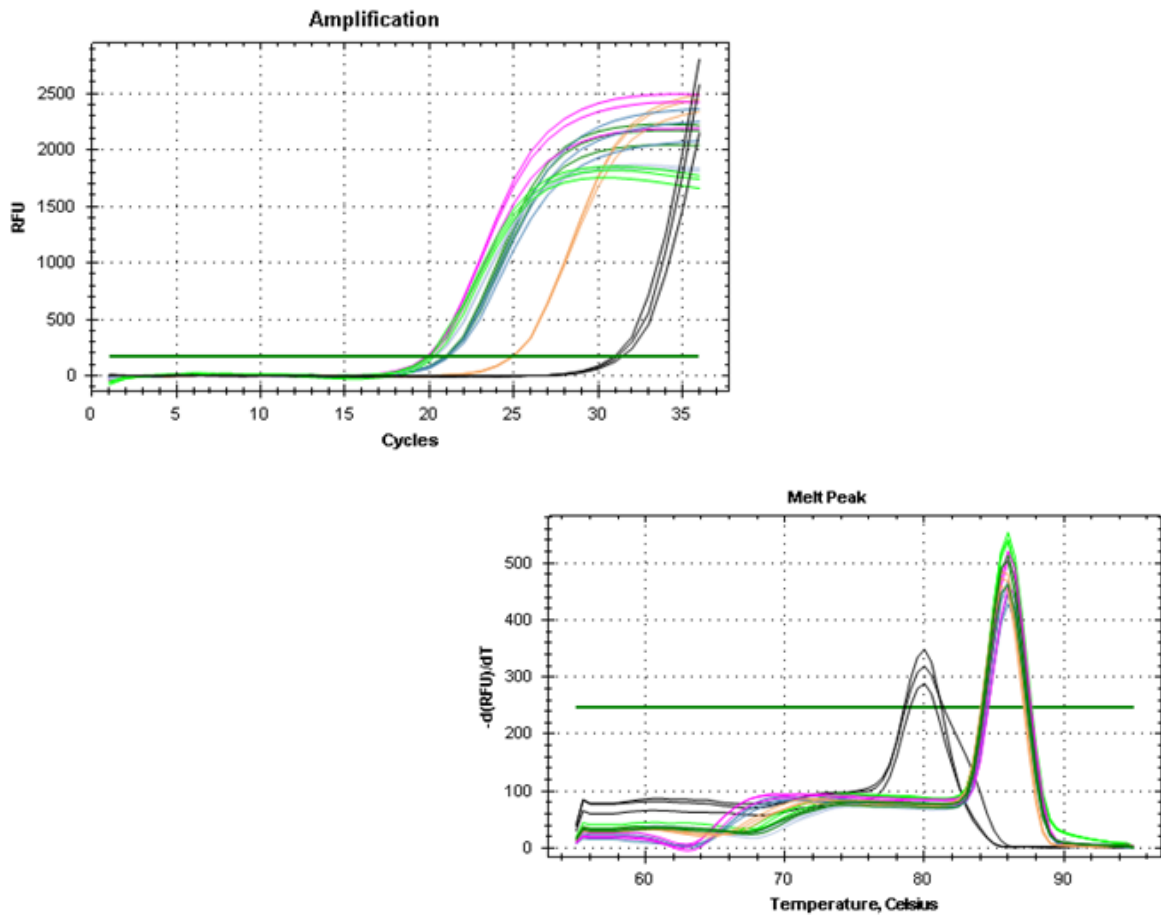
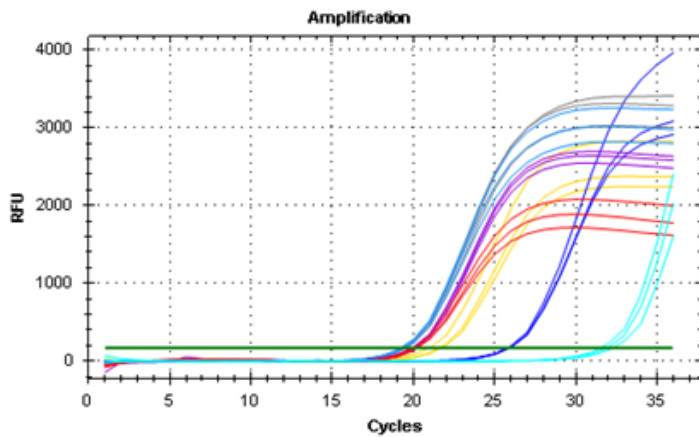


Figura 14. Curva de amplificación (A) y curva de melting (B) de GATA3 del experimento 1. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.



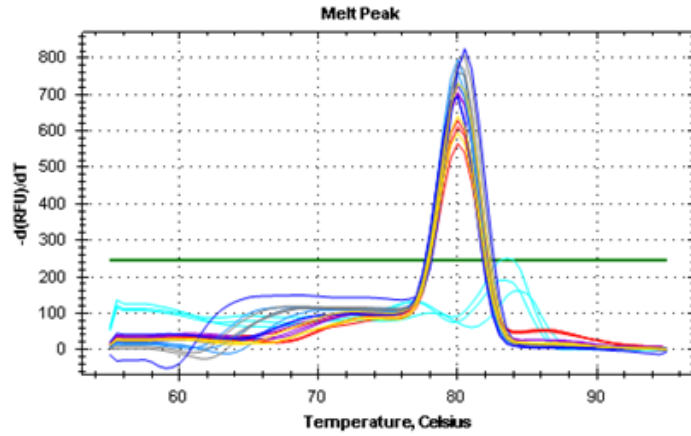


Figura 15. Curva de amplificación (A) y curva de melting (B) de STAT3 del experimento 1. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

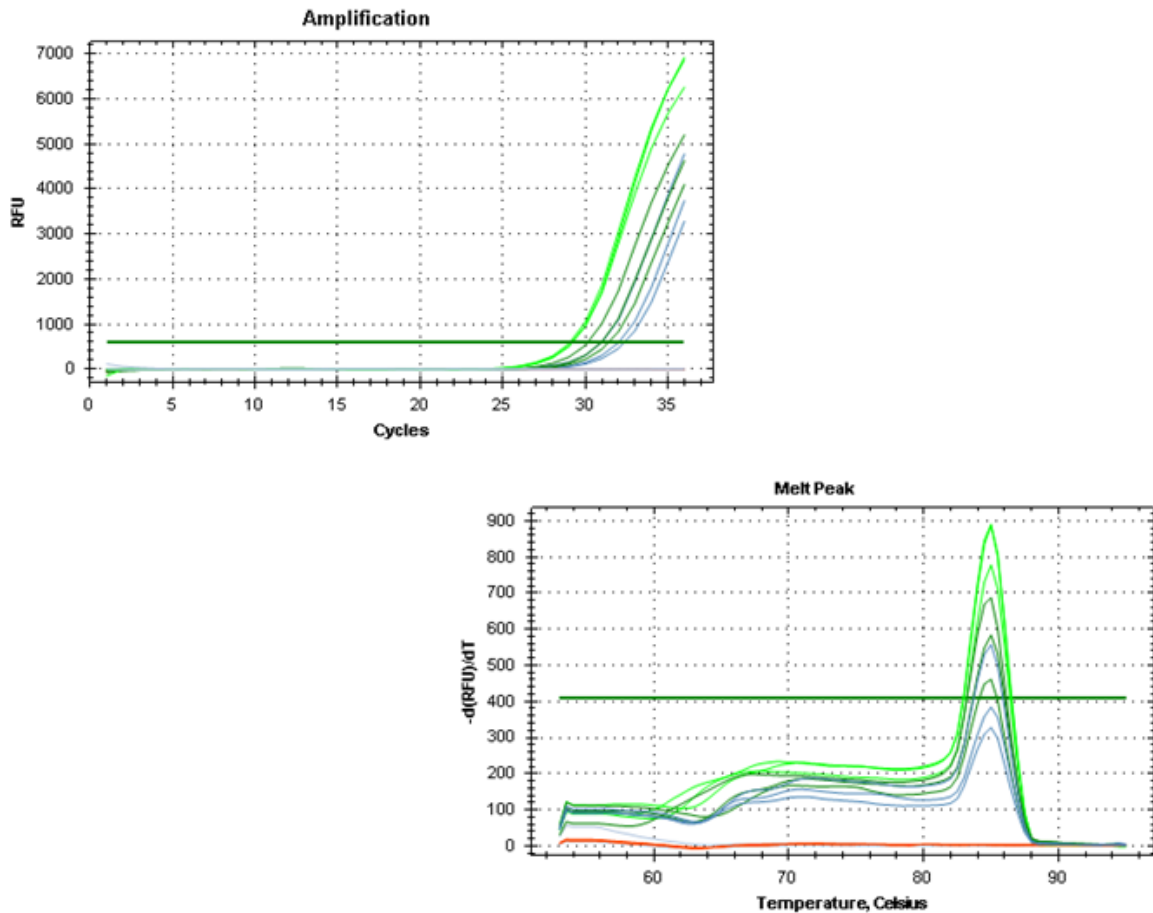


Figura 16. Curva de amplificación (A) y curva de melting (B) de IFN $\gamma$  del experimento 1. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

## Variabilidad de resultados

En los ensayos de qPCR existen fuentes de variación como la variación del sistema, dada por el pipeteo y el instrumento de medición, la variación biológica, que indica la variabilidad real entre muestras del mismo grupo y la variación experimental, que mide la variación de estas muestras. Pese a que esta variabilidad se toma en cuenta con réplica técnicas y múltiples muestras de un grupo, estos y otros factores como la calidad de los ácidos nucleicos extraídos, el diseño de primers y la reacción química propia de los procesos de transcripción reversa y la PCR, pueden afectar la significancia de los resultados, disminuir la variabilidad lleva a resultados más consistentes que reflejen con la mayor precisión posible, la realidad del fenómeno (Precision in qPCR, Thermo Fisher Scientific, 2024; Real-Time PCR Brochure 07, QIAGEN, 2010)

Una de las principales fuentes de error en muchos tipos de ensayos, incluyendo los de qPCR es la variabilidad biológica dada por el número de réplicas individuales de cada grupo estudiado. Los animales de donde provienen las muestras tumorales que se utilizaron en este trabajo fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo de luz/oscuridad con acceso ad libitum a comida y agua. Minimizar la variabilidad no es un trabajo sencillo pues se ha observado que el transcriptoma y el proteoma son sensibles a las diferencias biológicas inherentes entre las muestras, por lo que es altamente recomendable que en el diseño experimental se considere un número de individuos que asegure robustez en el ensayo, precisión y reproducibilidad (Taylor *et al.*, 2019).

En cáncer, el microambiente tumoral juega un rol crítico en la progresión y desarrollo de la enfermedad; en cáncer de mama, este ambiente está conformado además de distintos tipos celulares como fibroblastos, adipocitos, leucocitos, células mioepiteliales y endoteliales, de componentes de la matriz extracelular y factores solubles como las citocinas y factores de crecimiento, que están repartidos en tres niveles; local (intratumoral), regional (en el tejido mamario) y distante (metástasis) (Soysal *et al.*, 2015).

Dentro de este complejo microambiente, también están presentes los linfocitos infiltrantes del tumor, TILs por sus siglas en inglés, que son células inmunes mononucleares cuya abundancia ha sido propuesta como un indicador del pronóstico clínico de los pacientes, en especial en cáncer de mama triple negativo, debido a que es el subtipo más inmunogénico. La mayoría de los tumores son heterogéneos en su morfología y composición, por lo que la distribución de las TILs también es heterogénea dentro de estos y aún no se conoce por completo la implicación de la distribución espacial de estas células, en consecuencia, un grupo de investigadores (TILS Working Group) en 2013 propusieron una serie de recomendaciones para la evaluación de las TILs en ensayos clínicos e investigación que abarcan qué áreas del tumor se deben examinar, cómo evaluarlas y por qué son importantes clínicamente. A grandes rasgos, generalmente para su estudio se toman en cuenta únicamente aquellas que están dentro de la masa tumoral, aunque también hay células infiltradas en los límites y los alrededores del tumor y es recomendado evaluar diferentes regiones, y elegir secciones de tejido completo cuando se realiza una biopsia y no únicamente las zonas pequeñas con alta concentración de TILs, llamadas “puntos calientes” (Salgado *et al.*, 2015). Estas características del microambiente impactan en los intentos de analizar lo que ocurre dentro de él a través de diferentes técnicas, en este trabajo, las muestras son obtenidas de la periferia del área del tumor, el fragmento que se corta y se disgrega es de aproximadamente 5 mm<sup>3</sup>, debido a que se requiere un fragmento cada vez que se realizará extracción de ARN y el tumor está en solución, el sitio de donde proviene la muestra tumoral es diferente, por lo que puede existir un gran nivel de heterogeneidad celular. Se ha estimado que en una biopsia o en una muestra quirúrgica, hay 50% de células tumorales, 30% de células estromales y 20% de linfocitos, incluso en ciertos tumores con alta infiltración, los macrófagos pueden alcanzar hasta el 50% de la masa tumoral (Kochi *et al.*, 2018; Anderson y Simon, 2020). La cantidad y el tipo de células que se encuentran únicamente en el fragmento de tejido ocupado en ese momento, pueden no representar de manera fiel la tendencia general de lo que ocurre en todo el tumor. Esta variabilidad subraya

la importancia de considerar la heterogeneidad tumoral en la interpretación de sus resultados.

Las células inmunes como los macrófagos, las células T, células dendríticas y otro tipo de células como los fibroblastos y las células endoteliales son las que expresan las citocinas que se evaluaron (Liu *et al.*, 2021), por lo que es de importancia tomar en cuenta que a pesar de que teóricamente los tumores de cada ratón deben ser lo más similares posibles, la variabilidad de los resultados y la diferencia en la expresión de estos genes está sujeta a la heterogeneidad de la muestra tumoral y al nivel de la infiltración linfocitaria de cada uno de los fragmentos tumorales que se utilizaron.

Aunada a la variabilidad biológicas, la variabilidad técnica también debe ser tomada en cuenta, esta proviene del pipeteo y del uso de volúmenes de muestra inadecuados, generalmente muy pequeños. Se ha visto que estos factores pueden producir una variabilidad que oscila entre el 5% y el 37% del coeficiente de variación, principalmente en las diluciones seriadas porque los errores de pipeteo entre cada dilución se propagan (Taylor *et al.*, 2019). Sin embargo, en este trabajo se siguieron buenas prácticas de pipeteo y de manejo de muestras, los volúmenes utilizados no fueron pequeños ya que se elaboró un mix en la preparación de las reacciones, además de la inclusión de los controles adecuados como lo es el control sin ácido nucleico (NTC) que brinda información sobre contaminación o formación de dímeros de primers y los controles positivo y negativo que ayudan a prevenir la variación producida por posibles contaminantes como ADNg (Real-Time PCR Brochure 07, QIAGEN, 2010). Esto reafirma la hipótesis de que la fuente de variabilidad principal, proviene de la complejidad y heterogeneidad propias de los sistemas biológicos y las muestras tumorales.

### Expresión génica por el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$

Como se trató en la sección anterior, existe una gran variabilidad en los resultados, aportada por los modelos biológicos y por factores propios de la técnica, aunque esto no quiere decir que los resultados sean inválidos, la realidad es que las tendencias que se observan en los resultados de la cuantificación de expresión génica brindan información preliminar sobre lo que podría estar ocurriendo en el microambiente tumoral y es importante es considerar las causas de estas variaciones.

#### *Expresión de IFN $\gamma$*

La expresión génica de IFN $\gamma$  fue diferente en ambos experimentos, en el experimento 1, el grupo tratado con micropartículas mostró una mayor expresión con respecto al control, mientras que en el experimento 2, los resultados están invertidos, hay sobre expresión en el grupo control. Sin embargo, entre ambos grupos no hubo diferencia significativa en ninguno de los dos experimentos (Fig. 17).

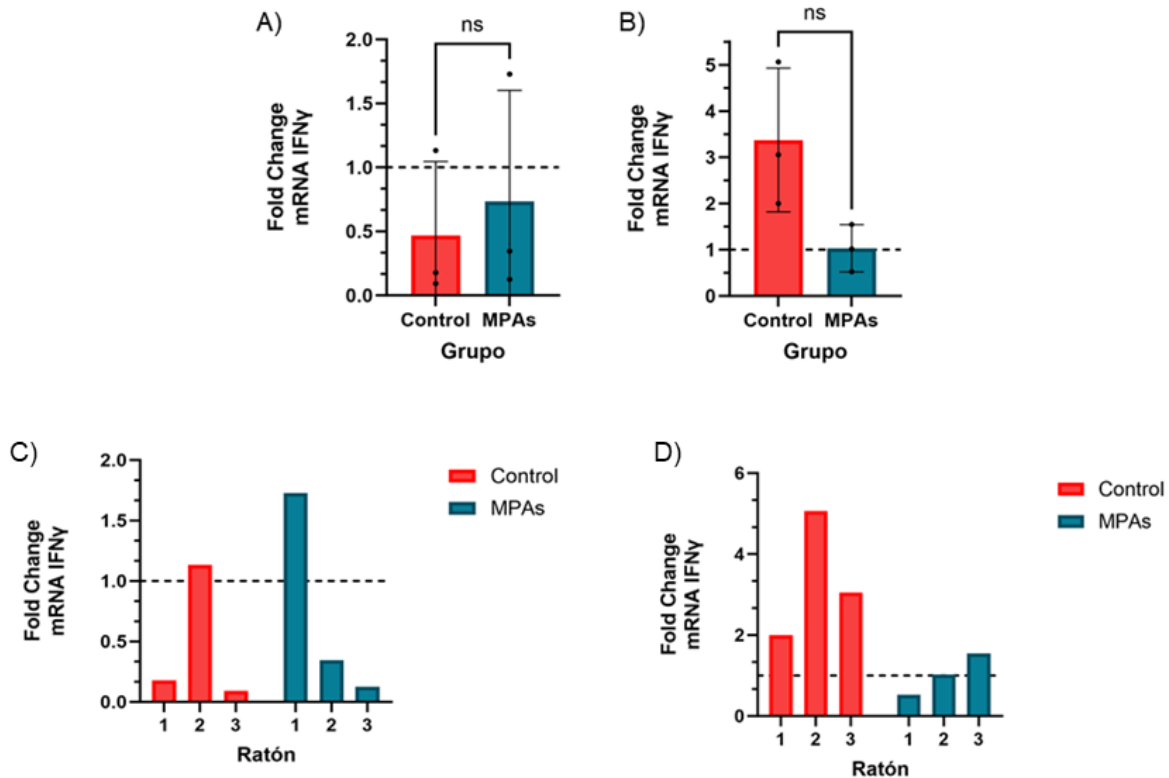


Figura 17. Expresión génica de IFN $\gamma$  por qPCR en ratones control y ratones tratados con MPAs de forma grupal A) Experimento 1 y B) Experimento 2; y de forma individual C) Experimento 1 y D) Experimento 2. Los resultados se muestran normalizados con el gen de referencia B-actina. Los valores >1 representan sobreexpresión y los valores <1 representan subexpresión. No hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Ahora, IFN $\gamma$  es una citocina proinflamatoria de tipo Th1, representando un rol clave en la diferenciación de Th0 a Th1, su expresión permite comunicar la presencia de un daño o infección, desencadenando así, una respuesta inflamatoria aguda como medida de protección (Liu *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2023). Se ha reportado que todos los tipos de interferón, incluyendo a IFN $\gamma$  que es de tipo II, participan en la inducción de apoptosis mediante la cascada de señalización de caspasas, liberación de citocromo C y fragmentación del ADN (Chawla-Sarkar, 2003). Este fenómeno podría tener impacto en la reducción del tamaño de los tumores observada, independientemente de la expresión génica observada en este experimento.

IFN $\gamma$  ha sido evaluado como posible marcador en la eficacia de diversas estrategias; en un estudio de 2014, Zhu y colaboradores evaluaron mediante citometría de flujo los niveles de varias citocinas en suero, incluyendo IFN $\gamma$  en pacientes de cáncer de

mama con o sin tratamiento (cirugía, radio o quimioterapia) y un grupo de individuos sanos como control. Se observaron niveles significativamente más altos en el grupo con tratamiento que en el grupo sin tratamiento, además, al analizar el ratio IFN $\gamma$ /IL-4 que representa la relación Th1/Th2, igualmente este fue más alto en el grupo tratado, sugiriendo entonces que la respuesta está polarizada hacia el perfil Th1. En cuanto a la eficacia de inmunoterapias no solo en cáncer de mama, altos niveles de esta citocina han sido relacionados con una buena respuesta ante las terapias de inhibidores de checkpoints inmunes, por ejemplo, un estudio con inhibidores anti PD-1 en pacientes con NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas), demostró por citometría de flujo niveles altos de IFN $\gamma$  en aquellos individuos que tuvieron mejor respuesta y mayor supervivencia (Boutsikou *et al.*, 2018); para este mismo tipo de cáncer, la disminución en los niveles de IFN $\gamma$  medidos por ELISA después de la administración de un inhibidor de checkpoints inmunes (ICI-Tx) se relacionó con la progresión de la enfermedad y el surgimiento de neumonitis (Hirashima *et al.*, 2019). El tratamiento con nivolumab en la fase II de un ensayo clínico para pacientes con melanoma maligno, también mostró altos niveles de IFN $\gamma$  en aquellos quienes respondieron mejor al tratamiento utilizando un ensayo de anticuerpos contra citocinas humanas (Yamazaki *et al.*, 2017).

Estos resultados sugieren el potencial de IFN $\gamma$  como un marcador de la respuesta positiva a un tratamiento, incluyendo la inmunoterapia, para el cáncer de mama y otros tipos de cáncer, sin embargo, es importante considerar que estos resultados en la mayoría de los casos, son provenientes de muestras de sangre y al ser detectadas en suero, los niveles de citocinas o de cualquier gen, son en forma de proteína. Se ha reportado que alrededor de un 40% de las variaciones en el ARNm puede explicar las variaciones de proteína en todos los organismos, sin embargo, la correlación entre los niveles de ARNm y los niveles de proteína es un amplio tema de discusión pues se han encontrado diferencias significativas entre estos niveles entre tejidos y tipos celulares distintos, por lo que se debe considerar la complejidad biológica en este proceso, especialmente cuando se habla de una muestra tumoral y del microambiente que lo compone (Buccitelli y Selbach, 2020). En este contexto,

existen artículos en donde se evalúa la posibilidad de utilizar PCR en tiempo real para analizar el perfil de expresión génica de citocinas, en un ensayo *in vitro* se evaluó la expresión de varias citocinas, incluyendo IFN $\gamma$ , antes y después de la administración de TNF $\alpha$ , mediante la validación de qPCR a partir de tumores, en donde los niveles de ARNm de IFN $\gamma$  fueron mayores después del tratamiento (Mocellin *et al.*, 2003).

### Expresión de GATA3

En cuanto a la expresión de GATA3, en los dos experimentos el grupo que recibió el tratamiento con micropartículas tuvo una menor expresión con respecto al control sin tratamiento, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Fig. 18).

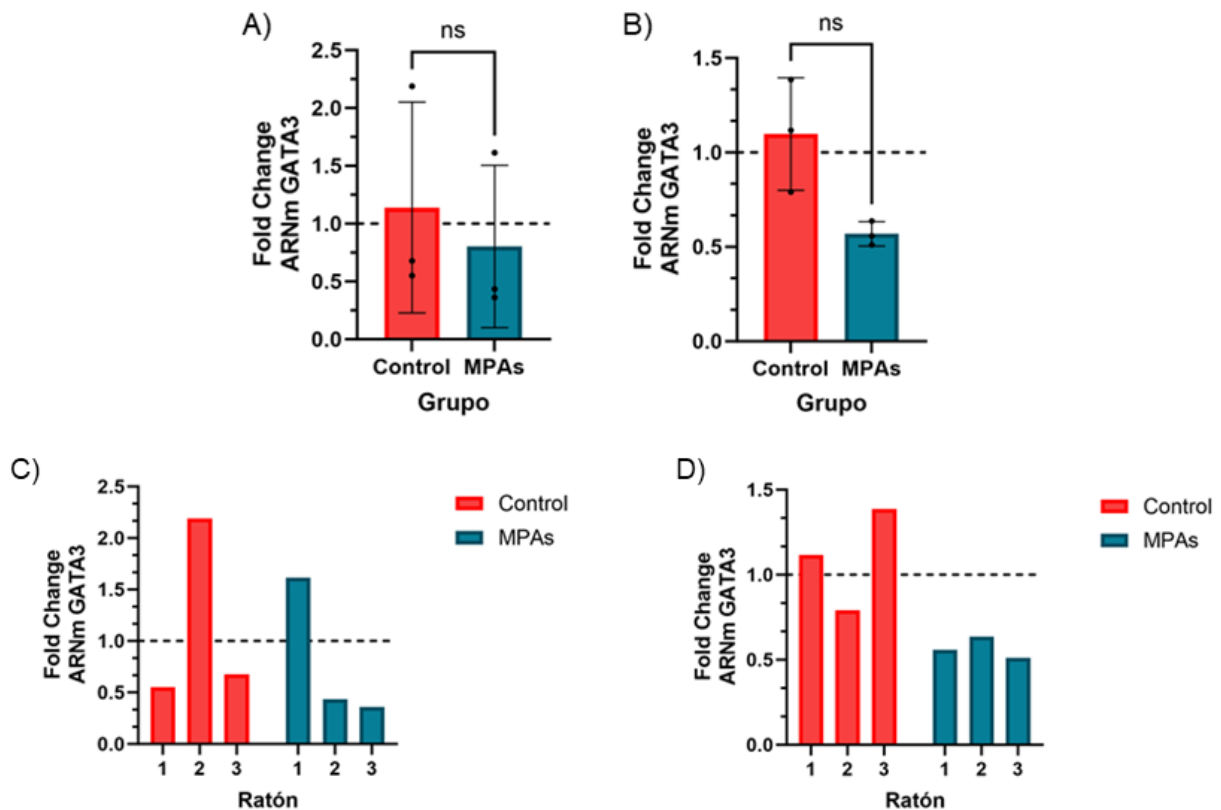


Figura 18. Expresión génica de GATA3 por qPCR en ratones control y ratones tratados con MPAs de forma grupal A) Experimento 1 y B) Experimento 2; y de forma individual C) Experimento 1 y Experimento 2. Los resultados se muestran normalizados con el gen de referencia B-actina. Los valores >1 representan sobreexpresión y los valores <1 representan subexpresión. No hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

GATA3 es un gen que es parte de la familia GATA de factores de transcripción con unión a dedos de zinc que regula la diferenciación de varios tipos de tejidos, incluyendo el de las células epiteliales luminales en el tejido mamario y que ha sido calificado como el regulador maestro del tipo de respuesta Th2, las células pertenecientes a este tipo de respuesta se encargan de controlar las infecciones por helmintos y las reacciones alérgicas (Wan, 2014; Tindemans *et al.*, 2014). La activación de GATA3, puede ocurrir de forma autónoma pero generalmente responde a las señales de IL-4 y STAT6 (Ouyang *et al.*, 2000), otros dos genes de tipo Th2, que, a su vez, permiten que GATA3 retroalimente la señal para la expresión de estos dos genes y otros característicos de este tipo de respuesta como IL-5 e IL-13 al unirse a sus promotores, además de inhibir a genes Th1 como STAT4 e IFN $\gamma$ , perpetuando así, la respuesta Th2 (Usui *et al.*, 2003).

La expresión de GATA3 ha sido reportada con mayor frecuencia en tumores ER+, aproximadamente 96% de los casos con este subtipo de cáncer mama, expresan GATA3, de hecho, se ha reportado que una mayor expresión de este gen indica una mayor expresión de receptor de estrógeno, lo cual explica la importancia de GATA3 en los subtipos de cáncer de mama luminales, por otro lado, solo el 22% de los tumores que no expresan el receptor de estrógeno, incluyendo cáncer de mama triple negativo, expresan GATA3 (Parikh *et al.*, 2005). En este trabajo, se utilizó un modelo de enfermedad que simula las características de un cáncer de mama triple negativo, aun así, los resultados mostraron expresión de GATA3 en ambos grupos y de manera diferencial, lo que podría indicar que este gen está desempeñando su papel en el tipo de respuesta inmune Th2.

En estudios en tumores con un fenotipo triple negativo, un estudio con 231 líneas celulares demostró que la expresión de GATA3 está relacionada con una reducción significativa de la expresión de una enzima llamada lisil oxidasa (LOX) que está involucrada en la promoción de la metástasis (Chu *et al.*, 2011). Los resultados observados en el conteo de metástasis en el experimento de Sandoval JA (no publicado) indicarían que existe un proceso anti-metastásico, pues el número de

macrometástasis en pulmón se vio disminuido en el grupo tratado con micropartículas de almidón, sin embargo, la expresión de GATA3 en estos tumores fue más baja en estos grupos, lo que supondría que no está directamente involucrada esta vía. Sin embargo, esta información es interesante, pues implicaría que, aunque GATA3 es un gen Th2, su sobreexpresión, beneficiaría la reducción de los procesos metastásicos y tendría una actividad anti-tumoral (Du *et al.*, 2015). Un resultado similar se observó al medir la expresión de GATA3 en la línea celular de adenocarcinoma perteneciente al grupo de cáncer de mama triple negativo altamente agresivo, la LM2-4175 (LM2), en donde se observó una sobreexpresión de este gen, el retraso significativo del primer tumor palpable y la inhibición del desarrollo y metástasis tumoral a pulmón (Dydensborg *et al.*, 2009). Siguiendo esta idea, un estudio en ratones portadores de virus del tumor mamario de ratón (MMTV)-MT, demostró que al perder un alelo de GATA3, la progresión tumoral aumentaba, mientras que la sobreexpresión del mismo, inhibe la cancerogénesis y angiogénesis, proponiéndolo como un posible supresor tumoral (Asselin-Labat *et al.*, 2011). Sin embargo, el efecto de GATA3 podría estar relacionado con el subtipo de cáncer de mama ya que en otro estudio con la línea celular MCF-7 que también es una línea celular de cáncer de mama, pero positiva a receptores de estrógeno, la inhibición de GATA3 se vio relacionada con una disminución en la proliferación de las colonias de las células MCF-7, actuando entonces como un promotor del desarrollo tumoral (Shan *et al.*, 2014). Esta información resulta contradictoria pues en el modelo de triple negativo de este trabajo, GATA3 se encontró subexpresado en el grupo tratado con micropartículas, siendo probable que su baja expresión tenga relación con la disminución del peso y el volumen de la masa tumoral. Estos hallazgos sugieren que el rol de GATA3 en el desarrollo tumoral puede variar significativamente dependiendo del contexto y subtipo de cáncer de mama, destacando la complejidad de su función y la necesidad de estudios adicionales para comprender mejor su mecanismo de acción en el microambiente tumoral.

## Expresión de STAT3

Los dos experimentos nuevamente coinciden en la expresión de STAT3, pero de forma contraria a GATA3 que también es un gen perteneciente a la respuesta Th2, en el grupo que recibió el tratamiento con micropartículas se observó la sobreexpresión de STAT3 en comparación con el grupo control sin tratamiento, aunque en ambos experimentos no hubo diferencia significativa (Fig 19).

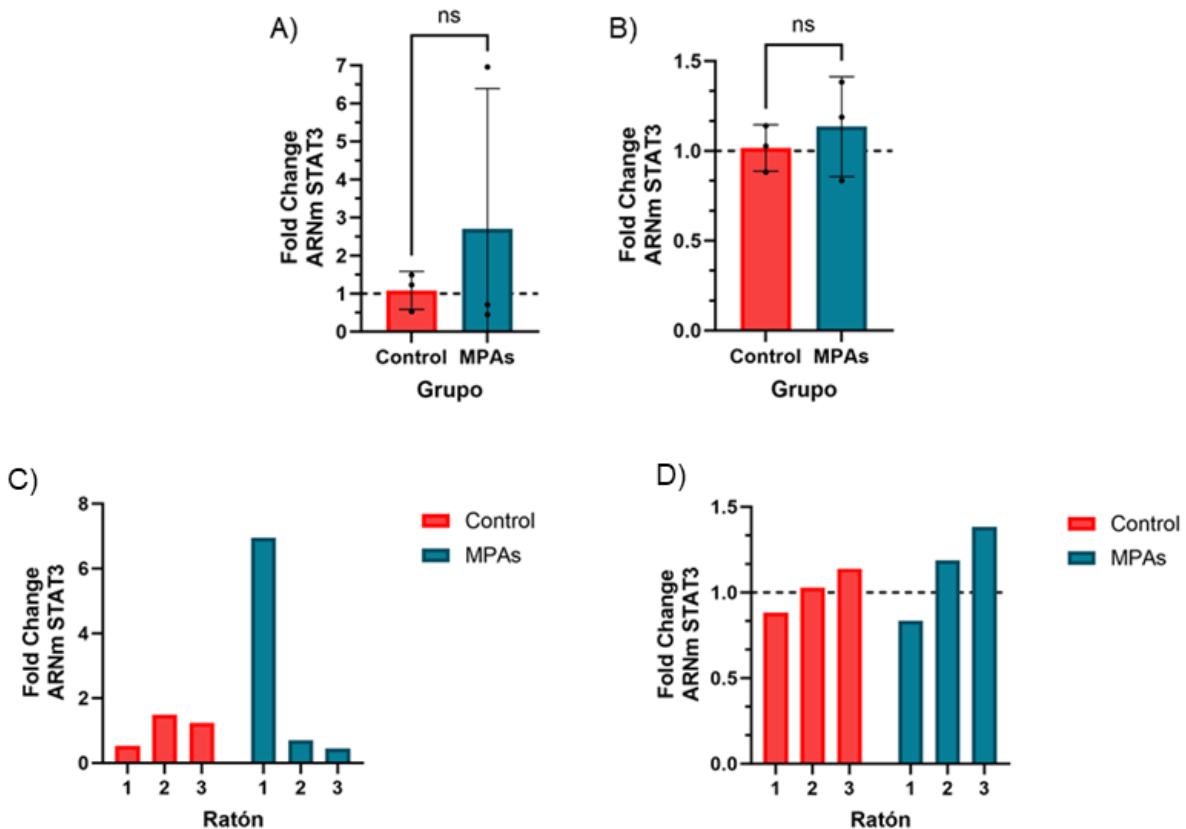


Figura 19. Expresión génica de STAT3 por qPCR en ratones control y ratones tratados con MPAs de forma grupal A) Experimento 1 y B) Experimento 2; y de forma individual C) Experimento 1 y Experimento 2. Los resultados se muestran normalizados con el gen de referencia B-actina. Los valores >1 representan sobreexpresión y los valores <1 representan subexpresión. No hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

STAT3 es una proteína que pertenece a la familia de transductores de señal y activadores de la transcripción que desempeñan funciones en el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, la diferenciación celular y la organogénesis y su activación causada entre otros factores, por un ambiente tumoral inflamatorio mediado por factores de crecimiento y citocinas como por ejemplo, IL-6, se ha visto

en muchas líneas y tejidos de cáncer, incluyendo el de mama, en donde se ha propuesto como una proteína inmunosupresora (Kamran *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014).

Particularmente en cáncer de mama, su activación de forma anormal está relacionada con el comienzo de la inflamación pro-tumoral, la supresión de la inmunidad antitumoral, la promoción de la angiogénesis, cambios en el metabolismo celular y la remodelación de la matriz extracelular (Yu *et al.*, 2009); la evidencia indica que esta activación de este gen promueve la supervivencia de las células cancerosas e inhibe la apoptosis, regulando negativamente a p53 (Bhattacharya *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2005); en las masa tumorales puede generarse un ambiente de hipoxia debido a que las células cancerosas destinan el oxígeno a funciones específicas como crecimiento y proliferación, en la línea celular de cáncer triple negativo MDA-MB231 se ha demostrado que STAT3 es sobreexpresado en condiciones hipóxicas y este fenómeno está relacionado a los procesos de quimioresistencia, por ejemplo, al fármaco cisplatino que se usa contra este subtipo de cáncer (Soleymani Abyaneh *et al.*, 2017). STAT3 fosforilado, es decir, en su forma activa, promueve la expresión de PD-L1, que al unirse a su receptor PD-1, inhibe la proliferación, supervivencia y funciones efectoras de los linfocitos T, además promueve la diferenciación de células T CD4+ en células T reguladoras Foxp3+, así como la resistencia de las células tumorales al ataque de CTL. (Zitvogel y Kroemer, 2020). En relación a esto, se ha reportado que el silenciamiento de STAT3 en línea celular 4T1, también disminuye la expresión de PD-L1, disminuyendo así el crecimiento tumoral y la metástasis, estos efectos tiene relación con presencia de TAMs con un perfil antitumoral más parecido a un fenotipo M1, una acumulación de células NK, aumento de linfocitos T CD4+ y reducción de linfocitos TCD8+ citotóxicos, aunque sorpresivamente, también se observó la presencia de linfocitos T reguladores. (Zerdes *et al.*, 2019).

Reportes indican el hallazgo de niveles altos de expresión de STAT3 en tumores generados por la línea celular 4T1 (Thakur *et al.*, 2015; Hughes *et al.*, 2016), en

dicho modelo también se ha reportado la relación entre STAT3 e IL-6 pues en esta línea celular en comparación con otras líneas de carcinoma mamario como EMF6, hay una mayor expresión de IL-6 que está relacionada con el reclutamiento de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que generan en el tumor un microambiente inmunosupresor y promueven la metástasis (Oh *et al.*, 2013), y ya que IL-6 es un activador de STAT3, y a su vez, este puede promover la transcripción de esta interleucina, podría suponerse que la expresión de STAT3 está relacionada con la inhibición de la respuesta inmune anti-tumoral. También se ha reportado que para su crecimiento in vivo de las células 4T1 se requiere de la expresión intrínseca de STAT3 (Ling y Arlinghaus, 2005).

Los resultados en los grupos tratados con micropartículas de almidón son difícilmente explicables pues muestran una sobreexpresión de STAT3, lo que coincidiría con la evidencia de este gen se expresa en tumores generados con la línea celular 4T1 pero que en términos generales todos los reportes lo asocian con una respuesta pro-tumoral y, sin embargo, en este caso se observó una disminución en el tamaño y en el peso de los tumores de estos ratones después del tratamiento, por lo que quizá la sobreexpresión de ARNm de STAT3 no necesariamente implica que esté fosforilado y activado, además, como se ha comentado, el microambiente tumoral es altamente complejo y las dinámicas entre células y otros componentes pueden suplir los efectos de otros genes, recalcando nuevamente la necesidad de análisis exhaustivos y multifacético para comprender los diferentes mecanismos de respuesta anti o pro tumoral (Baghban, *et al.*, 2020). Por otro lado, al igual que GATA3, se ha propuesto que este gen también tiene funciones diferentes y contrarias, ya sea pro- o anti-tumorales según las características del tumor y las mutaciones, por lo que su papel en la tumorigénesis de mama, dista de estar totalmente descrita (Segatto *et al.*, 2018).

## Expresión génica por el método de Pfaffl

Previamente se han descrito otros métodos para cuantificar de forma relativa la expresión génica en casos en donde la eficiencia de los genes de interés no es igual que la eficiencia del gen de referencia, uno de ellos es el llamado “método de Pfaffl”, cuya ecuación para la obtención de resultados, es la siguiente:

$$\text{Radio o Relación} = \frac{(E_{\text{gen de interés}})^{\Delta Cq_{\text{gen de interés}}(\text{control-tratamiento})}}{(E_{\text{gen de referencia}})^{\Delta Cq_{\text{gen de referencia}}(\text{control-tratamiento})}}$$

“E” representa la eficiencia de cada uno de los genes y es calculada utilizando  $E=(10^{-1/\text{pendiente}})$  y el radio o la relación resultante, será el fold change (Pfaffl, 2001).

En este trabajo, tres genes no fueron validados para cuantificar su expresión mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  ya que su eficiencia no fue igual a la eficiencia de B-actina: IL-10, STAT4 y TNF $\alpha$ , por lo que se procedió a utilizar este método para así tener una aproximación del nivel de expresión de estos genes, además, para complementar la información y brindar un panorama más amplio, también se incluyeron los tres genes que se utilizaron en el análisis del método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ : IFN $\gamma$ , GATA3 y STAT3 para ambos experimentos, los resultados se muestran en la figura 20.

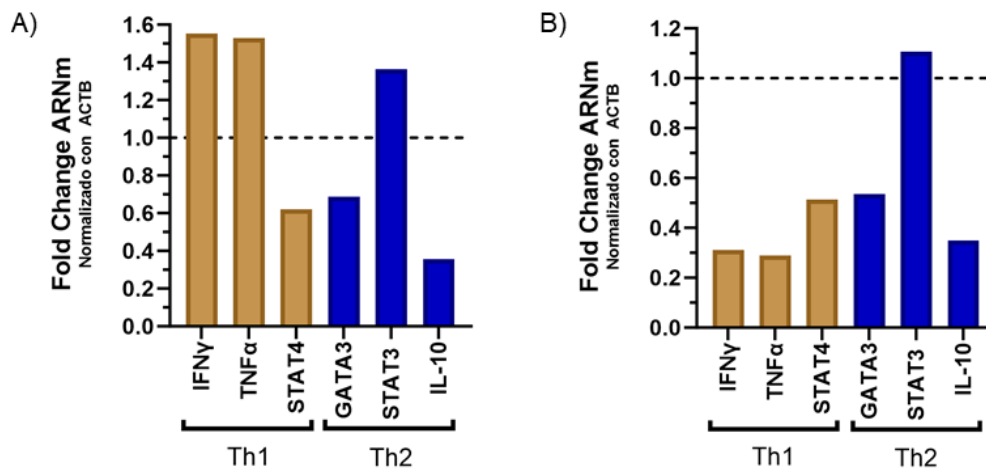


Figura 20. Expresión génica de genes Th1 y Th2 por el método de Pfaffl en ratones control y ratones tratados con MPAs del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. Los resultados se muestran normalizados con el gen de referencia B-actina. Los valores >1 representan sobreexpresión y los valores <1 representan subexpresión.

La expresión de IFN $\gamma$ , STAT3 y GATA3, coincide con los resultados reportados con el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , de la misma manera, ninguna diferencia en la expresión de estos genes fue significativa, sin embargo, también se pueden observar tendencias como la subexpresión de GATA3 en el grupo con tratamiento, la sobreexpresión de STAT3 en este mismo grupo, y en el caso de IFN $\gamma$ , sobreexpresión y sub expresión en el experimento 1 y en el 2, respectivamente. Obtener los mismos resultados por ambos métodos aporta un grado de certeza con respecto a la correcta aplicación de los métodos para la cuantificación de la expresión génica que se usaron en este trabajo.

Con respecto a los genes que no han sido cuantificados con el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , los resultados del análisis de expresión para STAT4 y para IL-10, indican que ambos están menos expresados en el grupo tratado con micropartículas en comparación al control, sin embargo, TNF $\alpha$  presenta resultados opuestos, una mayor expresión en el experimento 1 y una menor expresión en el experimento 2, esto comparado con el grupo control.

Todos estos genes han sido analizados en diversos estudios relacionados con el tratamiento contra cáncer de mama; Zhang y colaboradores en el 2018 estudiaron los efectos del xanthumol, un prenilflavonoide proveniente de plantas de lúpulo, administrado a ratones hembra BLAB/c con tumores de mama generados por la línea 4T1, los resultados indicaron la disminución en el tamaño y en el peso de los tumores, mediante una ELISA con muestra de suero de estos ratones, se identificó una mayor expresión de IFN $\gamma$  y una menor expresión de IL-10 e IL-4 en los grupos de ratones tratados con xanthumol en comparación con los grupos control (sanos y no tratados), además de que mediante western blot y análisis cuantitativos de RT-qPCR en tejido tumoral, la expresión de STAT4 en su forma activada y TBX21 se vio aumentada, mientras que la de GATA3, también de forma activa, se vio disminuida. Estos resultados entonces, llevaron a la conclusión de que el xanthumol contribuye al cambio de respuesta hacia un tipo Th1. La saikosaponina A es un glucósido triterpenoide encontrado en la raíz de Bupleurum, una planta medicinal, que ha demostrado propiedades anticancerosas en líneas celulares de

adenocarcinoma de mama como MDA-MB-231 que genera cáncer de mama triple negativo y MCF-7, que expresa altos niveles de receptor de estrógeno y se utiliza como modelo para cáncer de mama RE+, en un estudio para profundizar en estas propiedades y el efecto en el cambio de respuesta Th1/Th2, se administró saikosaponina A en ratones con tumores generados por DMBA y se observó la reducción del volumen tumoral y de la proliferación celular, en muestras de suero se observó un aumento en la producción de IFN $\gamma$  y una disminución de IL-10 y mediante RT-qPCR y western blot en tumor e observó un aumento de STAT4 y su forma fosforilada (Zhao *et al.*, 2019). En otro estudio se administró curcumina en ratones BALB/c con tumores generados por la línea celular 4T1 para observar sus efectos en contra del desarrollo de cáncer, los resultados demostraron una disminución en STAT3 e IL-10 y un aumento de STAT4, en bazo y en tumor, además de una disminución significativa en el volumen de los tumores (Shiri *et al.*, 2015).

Estos estudios coinciden en que los diferentes compuestos tienen un efecto anti-tumoral reflejado principalmente en el peso y tamaño de los tumores, y, además, en todos ellos se observa una mayor expresión en los grupos tratados de genes Th1 como IFN $\gamma$  y STAT4 y una menor expresión de genes Th2 como STAT3, GATA3 e IL-10, lo que es asociado a un cambio a una respuesta inmune tipo Th1. En el modelo estudiado en este trabajo, también se observa una disminución en el volumen y peso de los tumores de mama en grupos de ratones tratados con MPAs, sin embargo, las diferencias entre los resultados de la cuantificación génica muestran la sobreexpresión y subexpresión de ambos tipos de genes (tabla 6), estos hallazgos sugieren que el efecto del tratamiento con las micropartículas en la expresión génica es complejo y subraya la importancia de continuar investigando cuál es el impacto en el contexto de cáncer de mama y así respaldar el potencial de las MPAs en el desarrollo de inmunoterapias.

Tabla 4. Nivel de expresión de cada gen en el grupo con tratamiento en comparación al grupo control y el tipo de respuesta inmune asociada.

	Gen	Tipo de respuesta asociada		Expresión génica	
		Pro-inflamatoria	Anti-inflamatoria	Experimento 1	Experimento 2
Th1	IFN $\gamma$	X		↑	↓
	TNF $\alpha$	X		↑	↓
	STAT4	X		↓	↓
Th2	GATA3	X		↓	↓
	STAT3	X		↑	↑
	IL-10		X	↓	↓

## **IX. Conclusiones**

Se optimizaron y estandarizaron las condiciones para la amplificación de genes asociados a los perfiles Th1/Th2 mediante PCR punto final y qPCR, permitiendo así precisión y reproducibilidad en los resultados. Además, la validación de esta técnica permite una evaluación confiable de la expresión génica, proporcionando una base sólida para futuros trabajo sobre la capacidad de inmunomodulación del almidón en el microambiente tumoral. Resaltando la importancia de la optimización y validación técnica para una evaluación e interpretación correcta de la expresión génica

En cuanto a la cuanto a la cuantificación de la expresión génica, se observó una expresión diferencial de genes asociados a los perfiles Th1 y Th2 en tumores de cáncer de mama murino tratados con MPAs y sin tratamiento, a pesar de que estas diferencias no fueron significativas, se puede inferir una tendencia a la sobre o sub expresión de ciertos genes, particularmente la sobreexpresión de STAT3 podría sugerir una posible inclinación hacia un perfil pro-inflamatorio Th2.

Los resultados de este estudio proporcionan una comprensión más profunda de cómo las MPAs pueden influir en el microambiente tumoral, sugieren que estas micropartículas pueden modular la respuesta inmune anti o pro tumoral mediante cambios en los perfiles Th1/Th2, reafirmando su potencial como inmunoadyuvante y teniendo implicaciones significativas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que aprovechen esta modulación para mejorar la eficacia del tratamiento de inmunoterapia para cáncer de mama.

Finalmente, dentro de las perspectivas, este trabajo brinda interesantes propuestas, entre ellas la posibilidad de continuar con la caracterización del microambiente tumoral, particularmente en la identificación de las poblaciones celulares que están presentes en él y como se ven modificadas por el tratamiento con MPAs, ya sea por vía nasal e incluso explorando la vía oral.

## ANEXOS

### i. Metodología: Protocolos

Tabla 5. Protocolo del tratamiento con DNasas

<b>ARN</b>	1-5 µg
<b>Buffer</b>	1.0 µl
<b>DNasa</b>	1.0 µl
<b>H2O</b>	Llevar a 10 µl
37° C x 30 min	
<b>EDTA</b>	1.0 µl
65° C x 10 minutos	

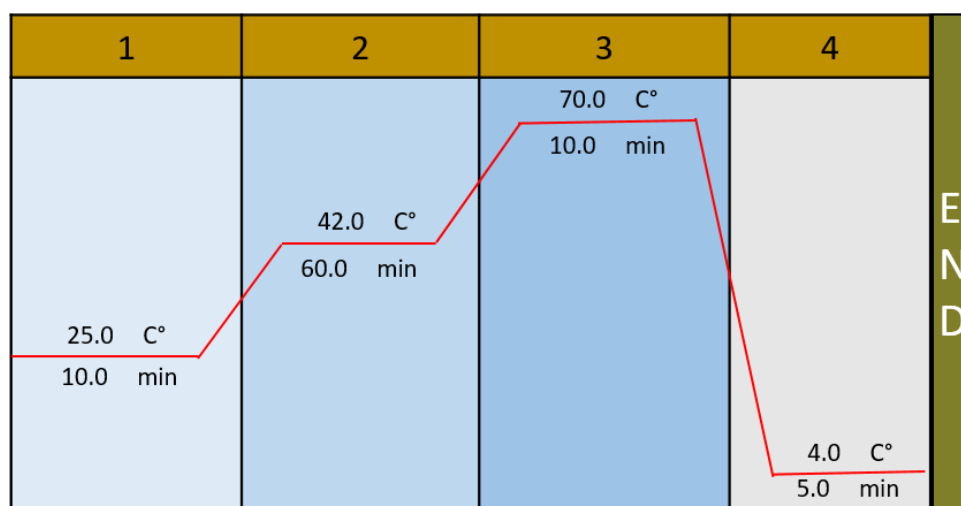


Figura 21. Temperatura y tiempo para la reacción de síntesis de ADN complementario.

Tabla 6. Preparación de la reacción de PCR punto final

Reactivo	Volumen para una reacción de 15 µl (µl)	Concentración final
DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix	7.5	2X
Primers Fw y Rv	1.0	0.4 µM
H2O	Variable	-
ADNc	2.0 - 4.0	100 ng

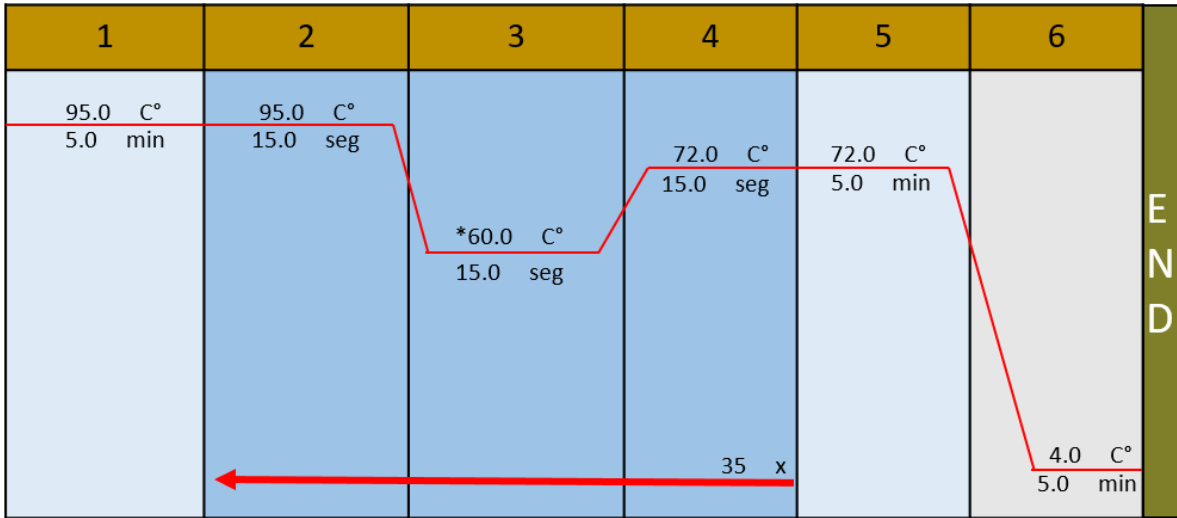


Figura 22. Protocolo para la reacción de PCR punto final.

\*Temperatura de alineamiento, es diferente para cada gen

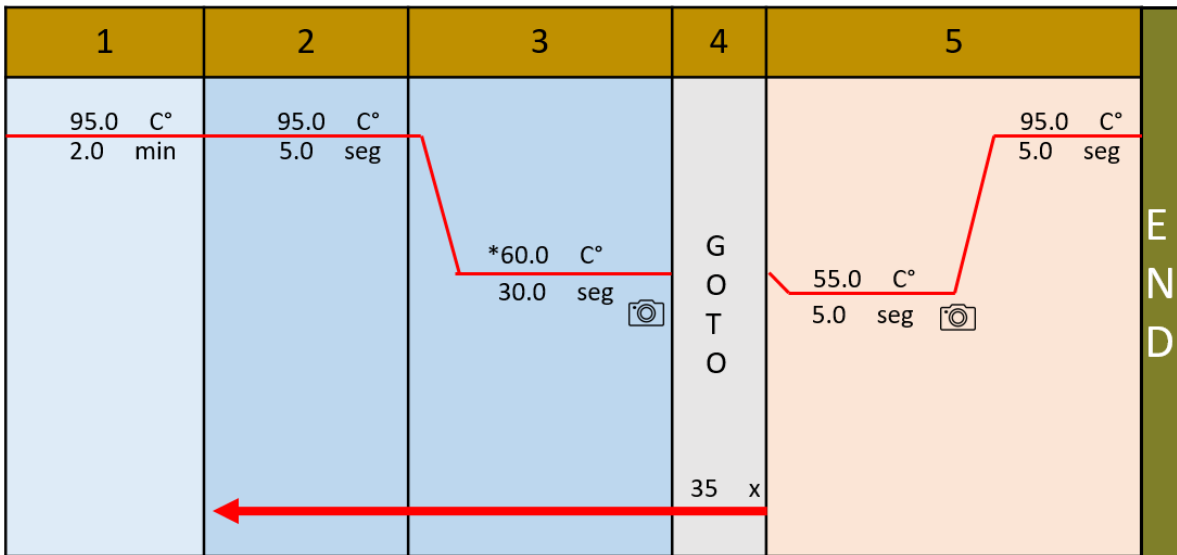


Figura 23. Protocolo de PCR en tiempo real. Las columnas 1-4 corresponden a los ciclos de amplificación (la temperatura de alineamiento varía según el gen a amplificar); la columna 5 corresponde al análisis de la temperatura de melting.

## ii. Primers

Tabla 7. Primers para cada gen elegido para el análisis de expresión génica.

Gen	Transcript ID	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia bibliográfica
IL-6	ENSMUST00000026 845.12	AGTTGCCTTCTTGGGAC TGA	TTGCCATTGCACAACCTCT TT	186	Nagatomo, et al. (2015)
IL-4	ENSMUST00000000 889.7	TCTCGAATGTACCAGGA GCCATATC	AGCACCTTGAAGCCCTA CAGA	183	Ohmichi, et al. (2011)
IL-10	ENSMUST00000016 673.6	ACCTGGTAGAAGTGATG CCCCAGGCA	CTATGCAGTTGATGAAGA TGTCAAA	237	Ohmichi, et al. (2011)
IFN $\gamma$	ENSMUST00000068 592.5	GGATGCATTCATGAGTA TTGC	GCTTCCTGAGGCTGGATT C	119	-
TNF $\alpha$	ENSMUST00000025 263.15	CGTCGTAGCAAACCAC CAAG	GTGGGTGAGGAGCACGT AGT	187	Nagatomo, et al. (2015)
IL-1 $\beta$	ENSMUST00000028 881.14	CCCAAGCAATACCCAAA GAA	GCTTGTGCTCTGCTTGTG AG	133	Bardel, et al. (2016)
GAP DH	ENSMUST00000118 875.8	ACCATCTTCCAGGAGC GAG	AGTGATGGCATGGACTGT GG	324	Nagatomo, et al. (2015)
$\beta$ - actin a	ENSMUST00000100 497.11	CATCCGTAAGACCTCT ATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCAC A	171	Ohmichi, et al. (2011)

Tabla 7. Continuación

Gen	Transcript ID	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)
TBX21	ENSMUST00000001 484.3	CCAGGGAACCGCTTATATGT	CCTTGTTGTTGGTGAGCTTTA G	103
IL-12	ENSMUST00000029345 .12	GTCAATCACGCTACCTCCTCT	GGTTTCGGGACTGGCTAAGA	114
STAT6	ENSMUST00000092074 .12	CACCTTGAGAGCATCTATCA G	GGTGCGGAACTCTTCTATAA C	104
STAT3	ENSMUST00000127638 .8	GCCACGTTGGTGTTCATAAT C	TTCGAAGGTTGTGCTGATAGA G	97

<b>STAT4</b>	ENSMUST00000027277 .7	CGCAGATAGTGAACGAGACA G	CCAGTTGCTGTCTGAGTTGG	180
<b>GATA3</b>	ENSMUST00000102976 .4	AGCTGCCAGATAGCATGAAG	TAGGGCGGATAGGTGGTAAT	109

*Tabla 8. Temperatura de alineamiento para cada par de primers indicada por el fabricante y la reportada en el análisis de PrimerBLAST.*

Gen	Temperatura de alineamiento (°C)			
	T°a fabricante		T°a PrimerBLAST	
	Fw	Rv	Fw	Rv
<b>IL-6</b>	63.8	63.2	58.86	56.72
<b>IL-4</b>	67.9	68.1	61.79	63.37
<b>IL-10</b>	76.2	64.0	69.29	57.92
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	61.9	63.9	55.42	57.91
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	65.5	64.2	59.49	61.53
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	63.6	64.0	55.89	59.76
<b>TBX21</b>	64.8/60.0	65.0/64.0	57.07	57.77
<b>IL-12</b>	66.5/64.0	66.5/62.0	59.25	59.39
<b>STAT6</b>	66.5/66.0	66.5/66.0	58.01	58.54
<b>STAT3</b>	65.0/64.0	65.0/64.0	58.50	58.15
<b>STAT4</b>	66.5/64.0	66.5/62.0	58.55	58.77
<b>GATA3</b>	64.8/60.0	64.8/60.0	57.74	57.29
<b>GAPD</b>	64.4	66.2	58.79	60.03
<b>H</b>				
<b><math>\beta</math>-actina</b>	67.3	69.1	61.48	61.0

### iii. Resultados de PCR en tiempo real

#### $\beta$ -actina

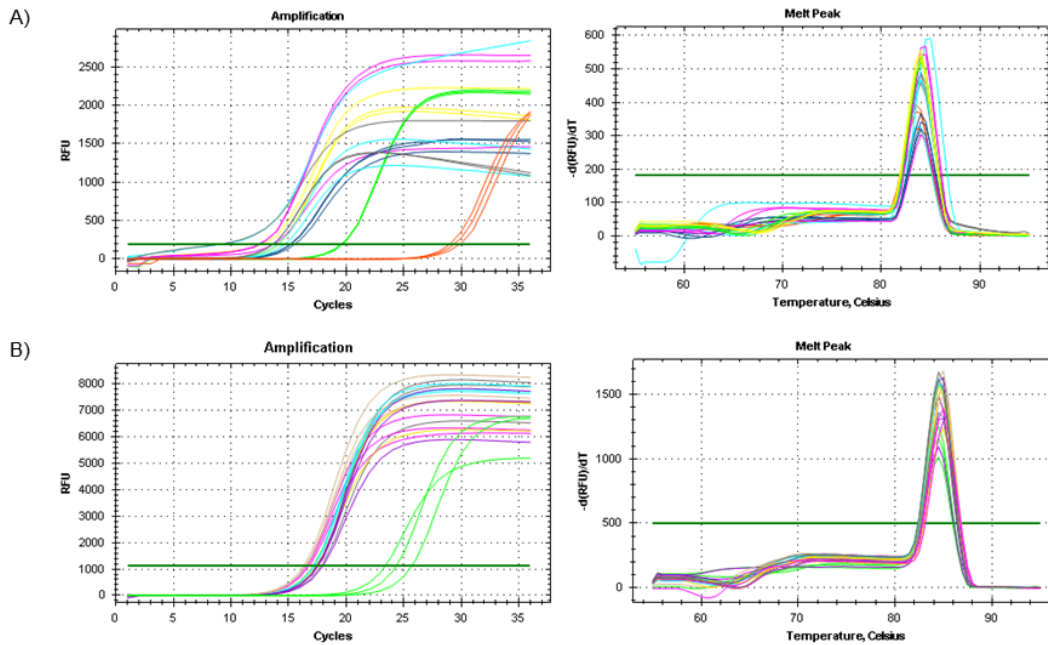


Figura 24. Curva de amplificación y curva de melting de  $B$ -actina del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

#### GATA3

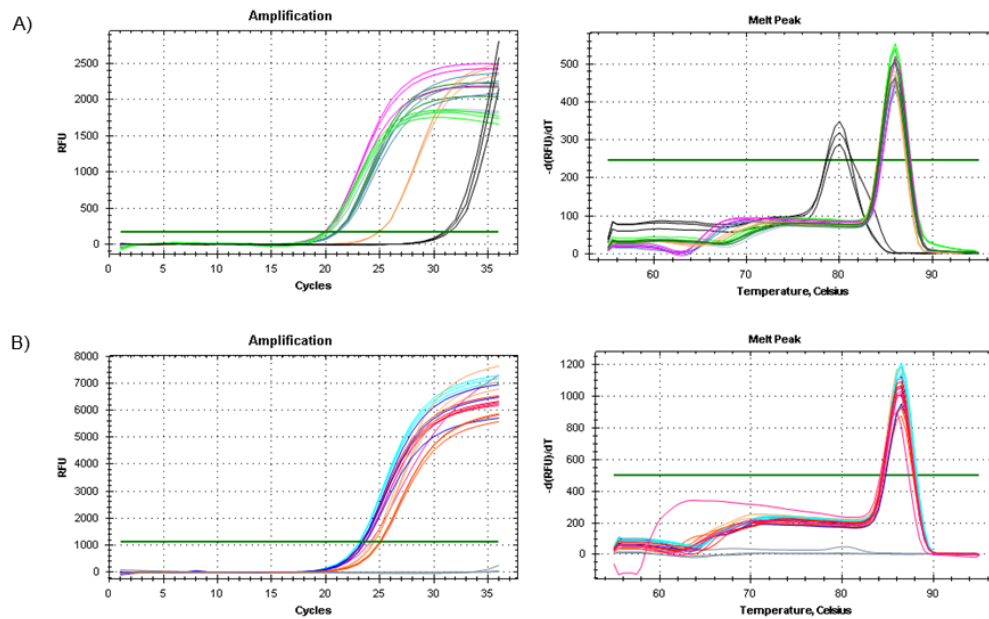


Figura 25. Curva de amplificación y curva de melting de GATA3 del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

# STAT3

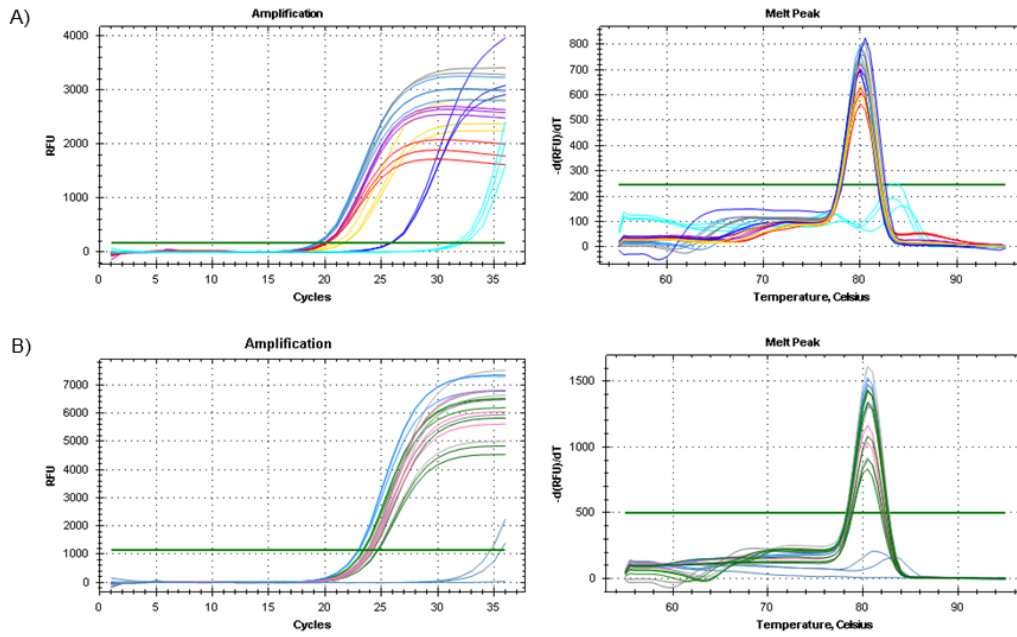


Figura 26. Curva de amplificación y curva de melting de STAT3 del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

# IFN $\gamma$

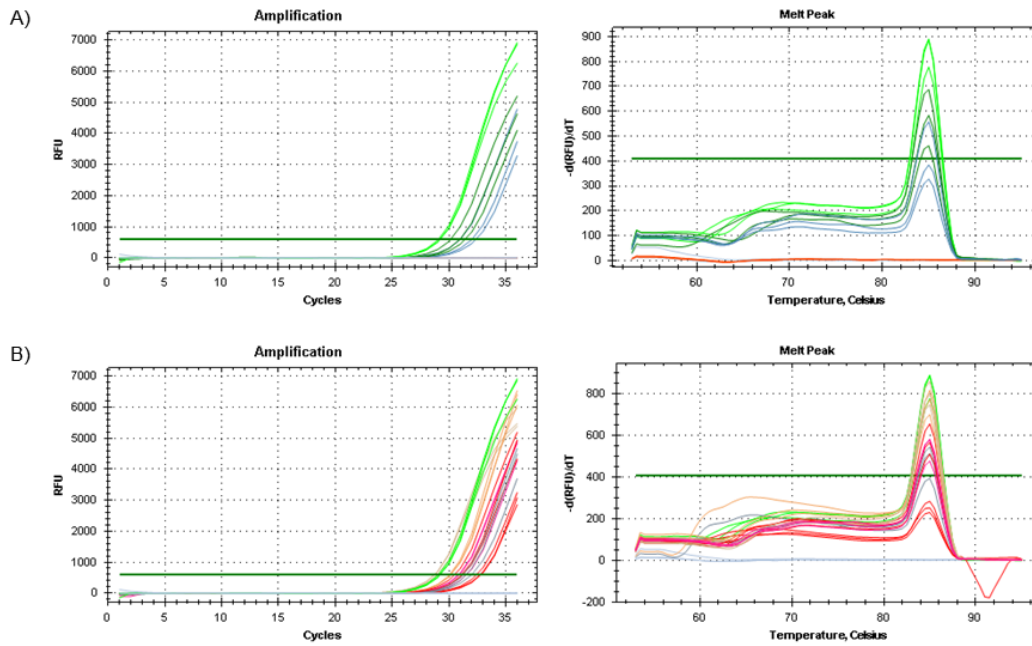


Figura 27. Curva de amplificación y curva de melting de IFN $\gamma$  del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 57°C y 35 ciclos.

## IL-10

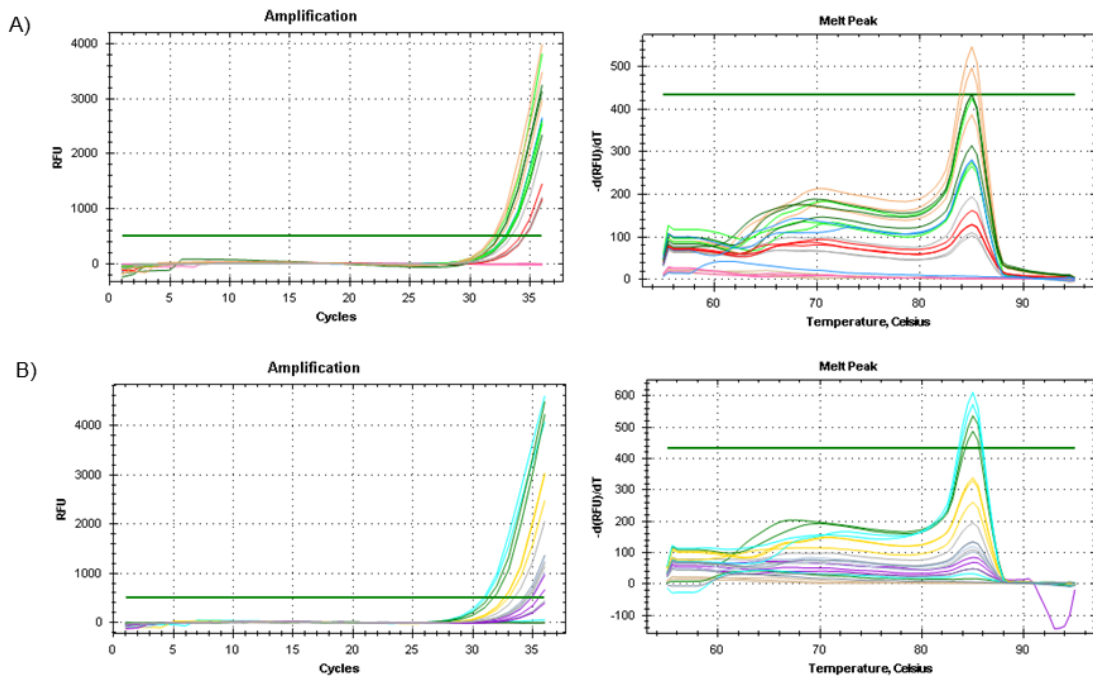


Figura 28. Curva de amplificación y curva de melting de IL-10 del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

## STAT4

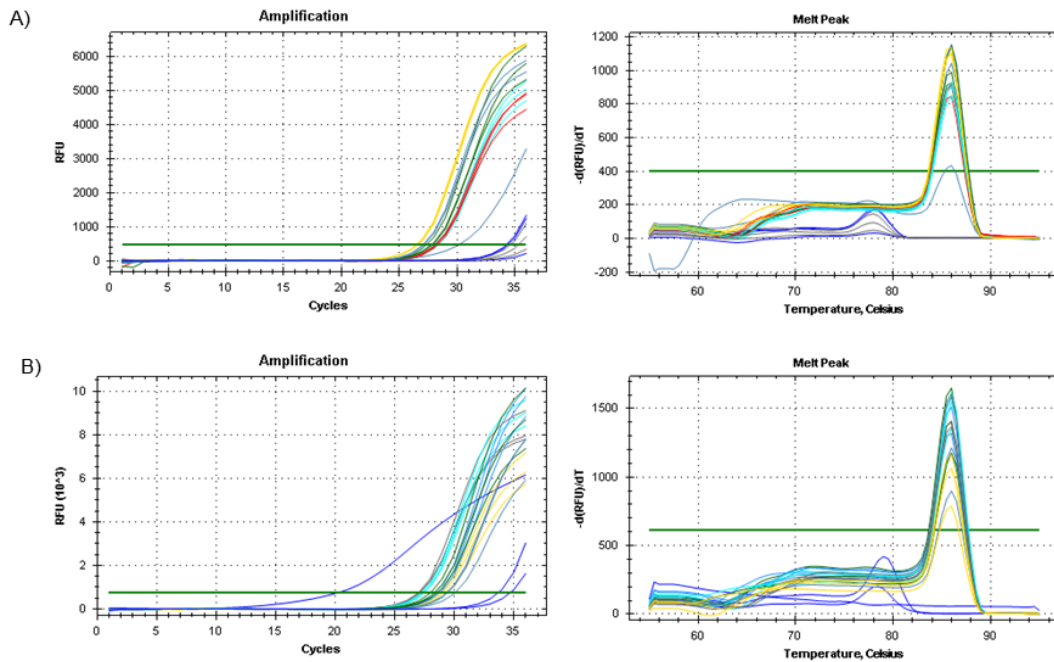


Figura 29. Curva de amplificación y curva de melting de STAT4 del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

## TNF $\alpha$

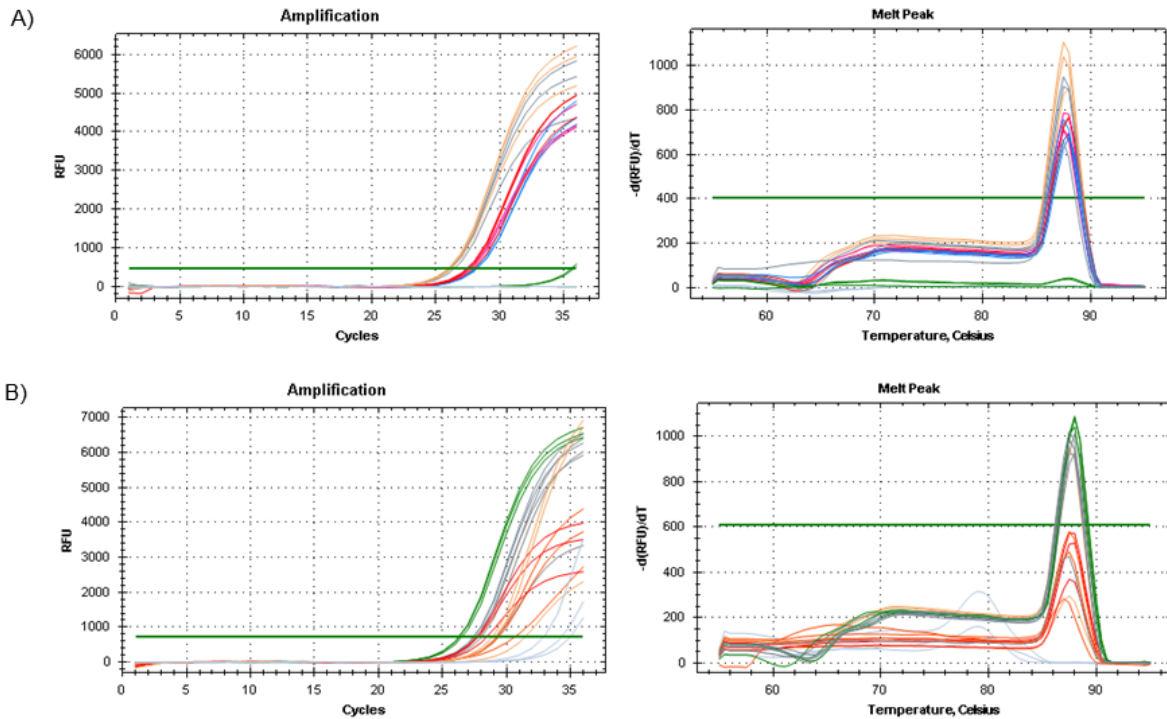


Figura 30. Curva de amplificación y curva de melting de IL-10 del A) Experimento 1 y el B) Experimento 2. La amplificación se llevó a cabo con una temperatura de alineamiento de 60°C y 35 ciclos.

Los picos diferentes que aparecen además del amplicón esperado en los resultados de STAT3, STAT4, TNF $\alpha$  y GATA3, son indicadores de que se ha sido amplificado un producto inespecífico, por ejemplo, dímeros de primers, la formación de estos es caracterizada por la observación de manchas de menor tamaño en los geles de electroforesis y en las curvas de melting, al ser de menor tamaño se observan como picos más amplios con una temperatura de melting más baja, por lo que generalmente se observan a la izquierda del pico correspondiente al producto de interés (Roche Applied Science, 2002).

**iv. Ciclos de cuantificación obtenidos en la amplificación de IFN $\gamma$ , STAT3 y GATA3 por PCR punto final**

*Tabla 9. Cq obtenidos por qPCR de IFN $\gamma$ , STAT3 y GATA3, de forma individual, por triplicado y con el promedio final.*

	EXPERIMENTO 1						EXPERIMENTO 2					
	Muestra	Cq					Muestra	Cq				
		1	2	3	Promedio			1	2	3	Promedio	
IFN $\gamma$	C1	29.48	32.29	30.25	30.68	31.82	C1	30.81	31.51	30.91	31.08	29.99
	C2	33.38	34.52	-	33.95		C2	28.70	29.00	28.69	28.80	
	C3	31.40	30.14	30.97	30.83		C3	30.06	30.16	30.11	30.11	
	T1	29.33	28.71	29.04	29.03	29.14	T1	32.40	32.71	32.81	32.64	31.71
	T2	28.52	28.86	28.79	28.72		T2	31.21	30.46	31.11	30.92	
	T3	30.22	30.88	27.96	29.69		T3	31.48	31.21	32.00	31.57	
STAT3	C1	21.52	21.66	20.93	21.37	22.18	C1	24.61	24.25	24.69	24.52	23.89
	C2	25.87	25.86	25.71	25.81		C2	23.32	23.43	23.34	23.36	
	C3	19.32	19.27	19.48	19.36		C3	23.79	23.66	23.91	23.79	
	T1	19.37	19.30	19.17	19.28	19.78	T1	24.13	23.99	24.53	24.22	23.72
	T2	19.93	20.08	19.85	19.95		T2	23.03	22.93	22.91	22.96	
	T3	20.17	20.18	19.98	20.11		T3	23.78	24.04	24.15	23.99	
GATA3	C1	20.84	21.03	20.91	20.93	21.88	C1	24.14	23.63	23.61	23.80	23.43
	C2	24.84	24.90	24.90	24.88		C2	23.38	23.38	23.32	23.36	
	C3	19.74	19.79	20.00	19.84		C3	23.10	23.16	23.14	23.13	
	T1	20.98	21.12	20.94	21.01	20.44	T1	24.51	24.31	24.46	24.42	24.31
	T2	20.24	20.28	20.28	20.27		T2	23.44	23.33	23.69	23.48	
	T3	20.21	20.03	19.89	20.04		T3	25.01	25.02	25.12	25.05	
ACTB	C1	12.78	14.12	14.18	13.69	15.40	C1	17.44	17.48	17.83	17.58	17.14
	C2	19.66	19.56	19.66	19.63		C2	16.62	16.51	16.79	16.64	
	C3	12.45	12.53	13.73	12.9		C3	17.38	17.13	17.14	17.22	
	T1	15.55	15.22	15.18	15.32	13.4	T1	17.17	17.22	17.21	17.2	17.11
	T2	14.68	9.27	14.10	12.69		T2	16.30	16.47	16.56	16.45	
	T3	13.65	9.26	13.65	12.19		T3	17.51	18.01	17.57	17.7	

## X. Referencias

Abbaspour, M., y Akbari, V. (2022). Cancer vaccines as a targeted immunotherapy approach for breast cancer: an update of clinical evidence. *Expert Review Of Vaccines*, 21(3), 337-353. <https://doi.org/10.1080/14760584.2022.2021884>

Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., y Chánez Cárdenas, M. E. (2014). *PCR en Tiempo Real*. En: Cornejo Romero, A.; Serrato Díaz, A.; Rendón Aguilar, B. y Roche Munive, M.G. (Comp.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp: 175-201). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT); Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC); Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). ISBN: 978-607-8246-72-4.

Alshaer, W., S., E. A., Azzam, H., y Aburjai, T. (2021). Preparation, Characterization, and Anticancer Effects of Capsaicin-Loaded Nanoliposomes. *Nutrients*, 13(11), 3995. <https://doi.org/10.3390/nu13113995>

Anderson, N. M., y Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>

Arab, A., Yazdian-Robati, R., y Behravan, J. (2020). HER2-Positive Breast Cancer Immunotherapy: A Focus on Vaccine Development. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 68(1). <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00566-1>

Asselin-Labat, M. L., Sutherland, K. D., Vaillant, F., Gyorki, D. E., Wu, D., Holroyd, S., Breslin, K., Ward, T., Shi, W., Bath, M. L., Deb, S., Fox, S. B., Smyth, G. K., Lindeman, G. J., y Visvader, J. E. (2011). Gata-3 negatively regulates the tumor-initiating capacity of mammary luminal progenitor cells and targets the putative tumor suppressor caspase-14. *Molecular and cellular biology*, 31(22), 4609–4622. <https://doi.org/10.1128/MCB.05766-11>

AAT Bioquest, Inc. (2024, July 6). Quest Graph™ Spectrum [SYBR Green]. AAT Bioquest. [https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/sybr\\_green](https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer/sybr_green).

Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., y Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>

Banstola, A., Jeong, J. H., y Yook, S. (2020). Immunoadjuvants for cancer immunotherapy: A review of recent developments. *Acta Biomaterialia*, 114, 16-30. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.063>

Bardel, E., Doucet-Ladevèze, R., Mathieu, C., Harandi, A. M., Dubois, B., y Kaiserlian, D. (2016). Intradermal immunisation using the TLR3-ligand Poly (I:C) as adjuvant induces mucosal antibody responses and protects against genital HSV-2 infection. *Npj Vaccines*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/npjvaccines.2016.10>

Berraondo, P., Sanmamed, M. F., Ochoa, M. C., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Pérez-Gracia, J. L., Rodríguez-Ruiz, M. E., Ponz-Sarvisé, M., Castañón, E., y Melero, I. (2019). Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 120(1), 6-15. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0328-y>

Bhattacharya, S., Ray, R. M., y Johnson, L. R. (2005). STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *The Biochemical journal*, 392(Pt 2), 335–344. <https://doi.org/10.1042/BJ20050465>

Boutsikou, E., Domvri, K., Hardavella, G., Tsiouda, D., Zarogoulidis, K., y Kontakiotis, T. (2018). Tumour necrosis factor, interferon-gamma and interleukins as predictive markers of antiprogrammed cell-death protein-1 treatment in advanced non-small cell lung cancer: a pragmatic approach in clinical practice. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 175883591876823. doi:10.1177/1758835918768238

Bryers, J., y Woodrow, K. (2011). Engineering Interfaces for Infection Immunity. *Comprehensive Biomaterials*, 295-314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00264-6>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Bustin, S., y Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. In *Biomolecular Detection and Quantification* (Vol. 14, pp. 19–28). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>

Buccitelli, C., y Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 630–644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>

Chang, W. T., Lai, T. H., Chyan, Y. J., Yin, S. Y., Chen, Y., Wei, W., y Yang, N. (2015). Specific Medicinal Plant Polysaccharides Effectively Enhance the Potency of a DC-Based Vaccine against Mouse Mammary Tumor Metastasis. *PLOS ONE*, 10(3), e0122374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122374>

Chaudhuri, S., Thomas, S., y Münster, P. N. (2021). Immunotherapy in breast cancer: A clinician's perspective. *Journal of the National Cancer Center*, 1(2), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2021.01.001>

Chawla-Sarkar, M. (2003). *Apoptosis*, 8(3), 237–249. doi:10.1023/a:1023668705040

Chu, I. M., Michalowski, A. M., Hoenerhoff, M., Szauter, K. M., Luger, D., Sato, M., Flanders, K., Oshima, K., Csiszar, M., y Green, J. E. (2011). GATA3 inhibits lysyl oxidase-mediated metastases of human basal triple-negative breast cancer cells. *Oncogene*, 31(16), 2017–2027. doi:10.1038/onc.2011.382

Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Real-Time PCR Brochure 07. (2010). In QIAGEN. <https://www.gene-quantification.de/qiagen-qpcr-sample-assay-tech-guide-2010.pdf>

Deshpande, T., Pandey, A., y Shyama, S. (2017). Review: Breast cancer and etiology. *Trends in Medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.15761/tim.1000110>

Díaz-Laviada, I., y Rodríguez-Henche, N. (2014). The potential antitumor effects of capsaicin. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 68, 181–208. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0828-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0828-6_8)

Dong, S., Guo, X., Han, F., He, Z., y Wang, Y. (2022). Emerging role of natural products in cancer immunotherapy. *Acta pharmaceutica Sinica*. B, 12(3), 1163–1185. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.08.020>

Downey, N. (2014, 20 de enero). *Explaining multiple peaks in qPCR melt curve analysis*. Integrated DNA Technologies; Integrated DNA Technologies.

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>

Dredge, K., Marriott, B. J., Todryk, S. M., y Dalgleish, A. G. (2002). Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 51(10), 521–531. <https://doi.org/10.1007/s00262-002-0309-z>

Du, F., Yuan, P., Wang, T., Zhao, J., Zhao, Z., Luo, Y., y Xu, B. (2015). The Significance and Therapeutic Potential of GATA3 Expression and Mutation in Breast Cancer: A Systematic Review. *Medicinal research reviews*, 35(6), 1300–1315. <https://doi.org/10.1002/med.21362>

Dundas, J., y Ling, M. (2012). Reference genes for measuring mRNA expression. *Theory in Biosciences*, 131(4), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s12064-012-0152-5>

Dunn, G. P., Old, L. J., y Schreiber, R. D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>

Dydensborg, A. B., Rose, A. A., Wilson, B. J., Grote, D., Paquet, M., Giguère, V., Siegel, P. M., y Bouchard, M. (2009). GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis. *Oncogene*, 28(29), 2634–2642. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.126>

Eliyatkin, N., Yalcin, E., Zengel, B., Aktaş, S., y Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*, 11(2), 59–66. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>

Fantozzi, A., y Christofori, G. (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research*, 8(4). <https://doi.org/10.1186/bcr1530>

Fasoulakis, Z., Kolios, G., Papamanolis, V., y Kontomanolis, E. N. (2018). Interleukins Associated with Breast Cancer. *Cureus*, 10(11), e3549. <https://doi.org/10.7759/cureus.3549>

Galluzzi, L., Chan, T. A., Kroemer, G., Wolchok, J. D., y López-Soto, A. (2018). The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Science translational medicine*, 10(459), eaat7807. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat7807>

GLOBOCAN (2020) Organización Mundial de la Salud.

Goenka, S., y Kaplan, M. H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunologic research*, 50(1), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8205-2>

González-Robledo, M. C., Wong, R., Ornelas, H. A., y Knaul, F. M. (2015). Costs of breast cancer care in Mexico: Analysis of two insurance coverage scenarios. *Ecancermedicalscience*, 9. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.587>

Green, M. R., y Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor protocols*, 2020(12), 10.1101/pdb.prot100412. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412>

Greten, F. R., y Grivnenkov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, 51(1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>

Gu, Y., Tang, S., Wang, Z., Cai, L., Lian, H., Shen, Y., y Zhou, Y. (2021). A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of  $\beta$ -actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered*, 12(1), 6166–6185. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1973220>

Guillén, D., Moreno-Mendieta, S., Pérez, R., Espitia, C., Sánchez, S. y Rodríguez-Sanoja, R. (2014). Starch Granules as a Vehicle for the Oral Administration of Immobilized Antigens. *Carbohydrate Polymers* 112:210-215. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.05.089.

Gur-Dedeoglu, B., Konu, O., Bozkurt, B., Ergul, G., Seckin, S., y Yulug, I. G. (2009). Identification of Endogenous Reference Genes for qRT-PCR Analysis in Normal Matched Breast Tumor Tissues. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 17(8), 353–365. doi:10.3727/096504009788428460

Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

Hashemzadeh, N., Dolatkah, M., Adibkia, K., Aghanejad, A., Barzegar-Jalali, M., Omid, Y., y Barar, J. (2021). Recent advances in breast cancer immunotherapy: The promising impact of nanomedicines. *Life Sciences*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119110>

He, X., y Xu, C. (2020). Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, 30(8), 660-669. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0343-4>

Hinshaw, D. C., y Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79(18), 4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-3962>

Hirashima, T., Kanai, T., Suzuki, H., Yoshida, H., Matsushita, A., Hiromi Kawasumi, Yumiko Samejima, Noda, Y., Shingo Nasu, Tanaka, A., Morishita, N., Hirano, S., Kawahara, K., Tamura, Y., Okamoto, N., y Tanaka, T. (2019). The Levels of Interferon-gamma Release as a Biomarker for Non-small-cell Lung Cancer Patients Receiving Immune Checkpoint Inhibitors. *Anticancer Research*, 39(11), 6231–6240. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13832>

Huang, Y., Yuan, T., Liu, B., Liu, K., Wung, C., y Chuang, S. (2021). Capsaicin Potentiates Anticancer Drug Efficacy Through Autophagy-Mediated Ribophorin II Downregulation and Necroptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.676813>

- Hughes, K., Blanck, M., Pensa, S., y Watson, C. J. (2016). Stat3 modulates chloride channel accessory protein expression in normal and neoplastic mammary tissue. *Cell death & disease*, 7(10), e2398. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.302>
- Jeggo, P. A., Pearl, L. H., y Carr, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 35–42. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4>
- Jiang, X., y Shapiro, D. J. (2014). The immune system and inflammation in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.003>
- Kamat, A. M., Tharakan, S. T., Sung, B., y Aggarwal, B. B. (2009). Curcumin potentiates the antitumor effects of Bacillus Calmette-Guerin against bladder cancer through the downregulation of NF-kappaB and upregulation of TRAIL receptors. *Cancer research*, 69(23), 8958–8966. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2045>
- Kamran, M. Z., Patil, P., y Gude, R. P. (2013). Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/421821>
- Kaplan M. H. (2005). STAT4: a critical regulator of inflammation in vivo. *Immunologic research*, 31(3), 231–242. <https://doi.org/10.1385/IR:31:3:231>
- Kochi, M., Iwamoto, T., Niikura, N., Bianchini, G., Masuda, S., Mizoo, T., Nogami, T., Shien, T., Motoki, T., Taira, N., Tokuda, Y., Doihara, H., Matsuoka, J., y Fujiwara, T. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes (TILs)-related genomic signature predicts chemotherapy response in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 167(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4502-3>
- Kroemer, G., Senovilla, L., Galluzzi, L., Fabrice André, y Zitvogel, L. (2015). Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nature Medicine*, 21(10), 1128–1138. <https://doi.org/10.1038/nm.3944>
- Kumar, S., Davra, V., E. Obr, A., Geng, K., L. Wood, T., De Lorenzo, M. S., y Birge, R. B. (2017). Crk adaptor protein promotes PD-L1 expression, EMT and immune evasion in a murine model of triple-negative breast cancer. *Oncot Immunology*, 7(1), e1376155. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1376155>
- Lan, T., Chen, L., y Wei, X. (2021). Inflammatory cytokines in cancer: Comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. *Cells*, 10(1), 1-16. <https://doi.org/10.3390/cells10010100>
- Law, A. M. K., Valdes-Mora, F., y Gallego-Ortega, D. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells*, 9(3), 561. [doi:10.3390/cells9030561](https://doi.org/10.3390/cells9030561)
- Li, B., Severson, E. A., Jean Christophe Pignon, Zhao, H., Li, T., Novak, J., Jiang, P., Shen, H., Aster, J. C., Rodig, S. J., Signoretti, S., Liu, J. S., y X. Shirley Liu. (2016). Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1028-7>

Li, Y., Wang, X., Ma, X., Liu, C., Wu, J., y Sun, C. (2021). Natural Polysaccharides and Their Derivates: A Promising Natural Adjuvant for Tumor Immunotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 621813. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.621813>

Ling, X., y Arlinghaus, R. B. (2005). Knockdown of STAT3 Expression by RNA Interference Inhibits the Induction of Breast Tumors in Immunocompetent Mice. *Cancer Research*, 65(7), 2532-2536. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-2425>

Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., y Liu, G. (2021). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science*, 8(15). <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>

Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lv, Y., Bai, Z., Wang, X., Liu, J., Li, Y., Zhang, X., y Shan, Y. (2022). Comprehensive evaluation of breast cancer immunotherapy and tumor microenvironment characterization based on interleukin genes-related risk model. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25059-8>

Majidzadeh-A, K., Esmaeili, R., y Abdoli, N. (2011). TFRC and ACTB as the best reference genes to quantify Urokinase Plasminogen Activator in breast cancer. *BMC Research Notes*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-215>

Matlock, B. (2015). *Assessment of Nucleic Acid Purity*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

McNeill, R. E., Miller, N., y Kerin, M. J. (2007). Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-107>

Mina, L. A., Lim, S., Bahadur, S. W., y Firoz, A. T. (2019). Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer: Emerging New Data. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 11, 321–328. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S184710>

Mocellin, S., Provenzano, M., Rossi, C. R., Pilati, P., Nitti, D., y Lise, M. (2003). Use of quantitative real-time PCR to determine immune cell density and cytokine gene profile in the tumor microenvironment. *Journal of immunological methods*, 280(1-2), 1–11. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(03\)00274-6](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(03)00274-6)

Mocellin, S., Wang, E., y Marincola, F. M. (2001). Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 24(5), 392–407.

Mohamed, M. M., El-Ghonaimy, E. A., Nouh, M. A., Schneider, R. J., Sloane, B. F., y El-Shinawi, M. (2014). Cytokines secreted by macrophages isolated from tumor microenvironment of inflammatory breast cancer patients possess chemotactic properties. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 46, 138–147. doi:10.1016/j.biocel.2013.11.015

Monteiro, A. C., Leal, A. C., Gonçalves-Silva, T., Mercadante, A. C. T., Kestelman, F., Chaves, S. B., Azevedo, R. B., Monteiro, J. P., y Bonomo, A. (2013). T Cells Induce Pre-Metastatic Osteolytic Disease and Help Bone Metastases Establishment in a Mouse Model of Metastatic Breast Cancer. *PLOS ONE*, 8(7), e68171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068171>

Moreno-Mendieta, S. A., Guillén, D., Espitia, C., Hernández-Pando, R., Sanchez, S., y Rodríguez-Sanoja, R. (2014). A novel antigen-carrier system: The Mycobacterium tuberculosis Acr protein carried by raw starch microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1–2), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.041>

Moreno-Mendieta, S., Barrera-Rosales, A., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., Sánchez, S., Hernández-Pando, R., y Rodríguez-Sanoja, R. (2019). Raw starch microparticles as BCG adjuvant: Their efficacy depends on the virulence of the infection strains. *Vaccine*, 37(38), 5731–5737. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.027>

Moreno-Mendieta, S., Barrios-Payán, J., Mata-Espinosa, D., Sánchez, S., Hernández-Pando, R., y Rodríguez-Sanoja, R. (2017). Raw starch microparticles have immunostimulant activity in mice vaccinated with BCG and challenged with Mycobacterium tuberculosis. *Vaccine*, 35(38), 5123–5130. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.012>

Mougel, A., Terme, M., y Tanchot, C. (2019). Therapeutic Cancer Vaccine and Combinations with Antiangiogenic Therapies and Immune Checkpoint Blockade. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00467>

Nagatomo, D., Taniyai, M., Ariyasu, H., Taniguchi, M., Aga, M., Ariyasu, T., Ohta, T., y Fukuda, S. (2015). Cholesteryl Pullulan Encapsulated TNF- $\alpha$  Nanoparticles Are an Effective Mucosal Vaccine Adjuvant against Influenza Virus. *BioMed Research International*, 2015, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2015/471468>

Niu, G., Wright, K. L., Ma, Y., Wright, G., Huang, M., Irby, R., Briggs, J., Karras, J. G., W. Douglas Cress, Pardoll, D. M., Jove, R., Chen, J., y Yu, H. (2005). Role of Stat3 in Regulating p53 Expression and Function. *Molecular and Cellular Biology*, 25(17), 7432–7440. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.17.7432-7440.2005>

Odales, J., Servín-Blanco, R., Martínez-Cortés, F., Guzman Valle, J., Domínguez-Romero, A. N., Gevorkian, G., y Manoutcharian, K. (2022). Antitumor efficacy of MUC1-derived variable epitope library treatments in a mouse model of breast cancer. *Vaccine*, 40(33), 4796-4805. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.062>

Oh, K., Lee, O. Y., Shon, S. Y., Nam, O., Ryu, P. M., Seo, M. W., y Lee, D. S. (2013). A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast cancer research: BCR*, 15(5), R79. <https://doi.org/10.1186/bcr3473>

Ohmichi, Y., Hirakawa, J., Imai, Y., Fukuda, M., y Kawashima, H. (2011). Essential role of peripheral node address in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *Journal Of Experimental Medicine*, 208(5), 1015-1025. <https://doi.org/10.1084/jem.20101786>

Ouyang, W., Löhning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., y Murphy, K. M. (2000). Stat6-Independent GATA-3 Autoactivation Directs IL-4-Independent Th2 Development and Commitment. *Immunity*, 12(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80156-9](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80156-9)

Owen, J. A., Punt, J., Kuby, J., y Stranford, S. A. (Eds). (2013). *Kuby Immunology*. 7th Edition. W. H. Freeman. p. 640.

Parikh, P., Palazzo, J., Rose, L. J., Daskalakis, C., y Weigel, R. J. (2005). GATA-3 Expression as a Predictor of Hormone Response in Breast Cancer. *Journal of the American College of Surgeons*, 200(5), 705–710. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2004.12.025>

Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., y Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Pirog K.A., Stabinsky, Y. y Goldman R. (2010). Cytokine INDEX. PrepoTech Inc.

Ruan, W., y Lai, M. (2007). Actin, a reliable marker of internal control? *Clinica Chimica Acta*, 385(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.07.003>

Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., ... Loi, S. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Annals of Oncology*, 26(2), 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>

Sandoval Hernández José Antonio. Evaluación del efecto antitumoral de las MPAs y una BEVs de MUC-1 en un modelo murino de cáncer de mama. Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM. En desarrollo.

Segatto, I., Baldassarre, G., y Belletti, B. (2018). STAT3 in Breast Cancer Onset and Progression: A Matter of Time and Context. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2818. <https://doi.org/10.3390/ijms19092818>

Shan, L., Li, X., Liu, L., Ding, X., Wang, Q., Zheng, Y., Duan, Y., Xuan, C., Wang, Y., Yang, F., Shang, Y., y Shi, L. (2014). GATA3 cooperates with PARP1 to regulate CCND1 transcription through modulating histone H1 incorporation. *Oncogene*, 33(24), 3205–3216. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.270>

Shellito, J. E., y Kolls, J. K. (2004). Cytokines. In *Pneumocystis Pneumonia: Third Edition, Revised and Expanded* (pp. 251–268). CRC Press. <https://doi.org/10.1177/1091581815584918>

Shiri, S., Alizadeh, A. M., Baradaran, B., Farhanghi, B., Shanehbandi, D., Khodayari, S., Khodayari, H., y Tavassoli, A. (2015). Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by

changing M1/M2 macrophage balance in the tumor microenvironment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(9), 3917-3922. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.9.3917>

Soleymani Abyaneh, H., Gupta, N., Radziwon-Balicka, A., Jurasz, P., Seubert, J., Lai, R., y Lavasanifar, A. (2017). STAT3 but Not HIF-1 $\alpha$  Is Important in Mediating Hypoxia-Induced Chemoresistance in MDA-MB-231, a Triple Negative Breast Cancer Cell Line. *Cancers*, 9(10), 137. <https://doi.org/10.3390/cancers9100137>

Son, K. J., Choi, K., Lee, S. J., & Lee, H. (2016). Immunogenic Cell Death Induced by Ginsenoside Rg3: Significance in Dendritic Cell-based Anti-tumor Immunotherapy. *Immune Network*, 16(1), 75. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.1.75>

Soysal, S. D., Tzankov, A., y Muenst, S. E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*, 82(3–4), 142–152. <https://doi.org/10.1159/000430499>

Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., y Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>

Taefehshokr, S., Parhizkar, A., Hayati, S., Mousapour, M., Mahmoudpour, A., Eleid, L., Rahmanpour, D., Fattahi, S., Shabani, H., y Taefehshokr, N. (2022). Cancer immunotherapy: Challenges and limitations. *Pathology, research and practice*, 229, 153723. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153723>

Taniguchi, K., y Karin, M. (2014). IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in immunology*, 26(1), 54–74. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.001>

Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., y Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>

Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., y Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* (San Diego, Calif.), 50(4), S1–S5. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>

Thakur, R., Trivedi, R., Rastogi, N., Singh, M., y Durga Prasad Mishra. (2015). Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep10194>

Thermo Fisher Scientific - MX. (2024). Precision in qPCR. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/gene-expression-analysis-real-time-pcr-information/precision-qpcr.html>

Tindemans, I., Serafini, N., Di, J. P., y Hendriks, R. W. (2014). GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. *Immunity*, 41(2), 191–206. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.006>

Tristan, C. A., Shahani, N., Sedlak, T. W., y Sawa, A. (2011). The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. *Cellular Signalling*, 23(2), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.003>

Understanding qPCR results. (2020). In Genomic Platform. Institute of research in immunology and cancer. University of Montreal. Retrieved July 24, 6 C.E., from <https://genomique.irc.ca>

Usui, T., Ryuta Nishikomori, Atsushi Kitani, y Strober, W. (2003). GATA-3 Suppresses Th1 Development by Downregulation of Stat4 and Not through Effects on IL-12R $\beta$ 2 Chain or T-bet. *Immunity*, 18(3), 415–428. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00057-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00057-8)

Van De Moosdijk, A. A. A., y Van Amerongen, R. (2016). Identification of reliable reference genes for qRT-PCR studies of the developing mouse mammary gland. *Scientific Reports*, 6(1), 35595. <https://doi.org/10.1038/srep35595>

Vasquez-Martínez, N., Guillén, D., Moreno-Mendieta, S. A., Medina-Granados, P., Casañas-Pimentel, R. G., San Martín-Martínez, E., Morales, M. Á., Sanchez, S., y Rodríguez-Sanoja, R. (2023). In vivo tracing of immunostimulatory raw starch microparticles after mucosal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 187, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.04.013>

Vermaelen, K. (2019). Vaccine Strategies to Improve Anti-cancer Cellular Immune Responses. *Frontiers in immunology*, 10, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00008>

Waks, A. G., y Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

Wan, Y. Y. (2014). GATA3: A master of many trades in immune regulation. *Trends in Immunology*, 35(6), 233-242. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.002>

Wang, J.-J., Han, S., Yin, W., Xia, X., y Liu, C. (2018). Comparison of Reliable Reference Genes Following Different Hormone Treatments by Various Algorithms for qRT-PCR Analysis of Metasequoia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 34. <https://doi.org/10.3390/ijms20010034>

Wedam, S., Fashoyin-Aje, L., Gao, X., Bloomquist, E., Tang, S., Sridhara, R., Goldberg, K. B., King-Kallimanis, B. L., Theoret, M. R., Ibrahim, A., Amiri-Kordestani, L., Pazdur, R., y Beaver, J. A. (2020). FDA Approval Summary: Ado-Trastuzumab Emtansine for the Adjuvant Treatment of HER2-positive Early Breast Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(16), 4180–4185. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3980>

Xiao, Y., Huang, Y., Jiang, J., Chen, Y., y Wei, C. (2023). Identification of the prognostic value of Th1/Th2 ratio and a novel prognostic signature in basal-like breast cancer. *Hereditas*, 160(1). <https://doi.org/10.1186/s41065-023-00265-0>

Yamazaki, N., Kiyohara, Y., Hisashi Uhara, Iizuka, H., Uehara, J., Otsuka, F., Fujisawa, Y., Tatsuya Takenouchi, Taiki Isei, Keiji Iwatsuki, Hiroshi Uchi, Hironobu Ihn, Minami, H., y Tahara, H. (2017). Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Science*, 108(5), 1022–1031. <https://doi.org/10.1111/cas.13226>

Yang, Z., y Chen, J. J. (2021). STAT3 plays an important role in DNA replication by turning on WDHD1. *Cell & Bioscience*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00524-x>

- Yin, M., Zhang, Y., y Li, H. (2019). Advances in Research on Immunoregulation of Macrophages by Plant Polysaccharides. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00145>
- Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., y Jove, R. (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 736–746. <https://doi.org/10.1038/nrc3818>
- Yu, H., Pardoll, D. M., y Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 798–809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>
- Zerdes, I., Wallerius, M., Sifakis, E. G., Wallmann, T., Betts, S., Bartish, M., Tsesmetzis, N., Tobin, N. P., Coucoravas, C., Bergh, J., Rassidakis, G. Z., Rolny, C., y Foukakis, T. (2019). STAT3 Activity Promotes Programmed-Death Ligand 1 Expression and Suppresses Immune Responses in Breast Cancer. *Cancers*, 11(10), 1479. <https://doi.org/10.3390/cancers11101479>
- Zhang, W., Pan, Y., Gou, P., Zhou, C., Qing Ma, L., Liu, Q., Du, Y., Yang, J., y Wang, Q. (2018). Effect of xanthohumol on Th1/Th2 balance in a breast cancer mouse model. *Oncology Reports*, 39(1), 280-288. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6094>
- Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., y Li, Y. (2021). Inflammation and tumor progression: Signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>
- Zhao, X., Liu, J., Ge, S., Chen, C., Li, S., Wu, X., Feng, X., Wang, Y., y Cai, D. (2019). Saikosaponin A inhibits breast cancer by regulating Th1/Th2 balance. *Frontiers in Pharmacology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00624>
- Zhu, J., Jankovic, D., Oler, A. J., Wei, G., Sharma, S., Hu, G., Guo, L., Yagi, R., Yamane, H., Punkosdy, G., Feigenbaum, L., Zhao, K., y Paul, W. E. (2012). The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. *Immunity*, 37(4), 660-673. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.007>
- Zhu, X., Du, L., Feng, J., Ling, Y., y Xu, S. (2014). Clinicopathological and prognostic significance of serum cytokine levels in breast cancer. *Clinical Laboratory*, 60(7), 1145-1151. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2013.130738>
- Zitvogel, L., y Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 1(8), 1223–1225. <https://doi.org/10.4161/onci.21335>
- Zitvogel, L., Pitt, J. M., Daillère, R., Smyth, M. J., y Kroemer, G. (2016). Mouse models in oncoimmunology. *Nature Reviews Cancer*, 16(12), 759–773. doi:10.1038/nrc.2016.91.
- Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., y Paz-Ares, L. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical therapeutics*, 38(7), 1551–1566. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>