



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

Actividad proapoptótica diferencial EGFR+/EGFR- de una lectina recombinante de frijol Tépari y dependencia de células T en sus efectos antitumorales sobre cáncer de colon singénico

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

M. en C. Francisco Javier Luján Méndez

Dirigido por:

Dra. María Guadalupe García Alcocer

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Presidenta

Codirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús
García Gasca

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Asesora

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Asesor

Dra. Patricia García López
Asesora

Dr. José Santos Cruz
Director de la Facultad de
Química

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo de 2025
México

Dr. Manuel Toledano Ayala
Secretario de Investigación Innovación y
Posgrado

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

A la memoria de mi padre. ↗

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO, EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA BIOMOLECULAR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, A CARGO DE LA DRA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, A CARGO DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA Y EN COLABORACIÓN CON LA DRA. PATRICIA GARCIA LÓPEZ, EN EL LABORATORIO DE FARMACO-ONCOLOGÍA, DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA DE MÉXICO. ASIMISMO, SE CONTÓ CON EL APOYO DE LA SECIHTI (ANTES CONAHCYT).

RESUMEN

Antecedentes: Una fracción concentrada en lectinas de *Phaseolus acutifolius* (TBLF, por sus siglas en inglés) ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo en donde se ha determinado su actividad proapoptótica sobre células de cáncer de colon, así como sus efectos sobre la tumorogénesis colónica *in vivo*. *rTBL-1* es una lectina recombinante basada en la secuencia codificante de una de las lectinas con actividad citotóxica y sus efectos proapoptóticos han sido asociados a un eje mecanístico fosfo-EGFR/fosfo-p38/fosfo-p53. Datos de inmunogenicidad fueron conjuntamente observados en los animales tratados, pero su posible implicación en la respuesta antitumoral permanecía inexplorada. **Objetivo:** investigar si la actividad citotóxica de *rTBL-1* depende de EGFR en el sistema celular y evaluar su capacidad para producir una respuesta antitumoral sobre cáncer de colon singénico en ratones con y sin células T, a fin de explorar su posible implicación en el proceso.

Resultados: ensayos concentración-respuesta demostraron que *rTBL-1* produce efectos citotóxicos dependientes de la concentración, tanto en células de cáncer de colon EGFR⁺ (MC-38) como EGFR⁻ (CT-26), con concentraciones letales 50 de 23.50 y 30.01 µg/mL, respectivamente ($p=0.063$). Mediante citometría de flujo se observó que la apoptosis inducida fue más lenta y sostenida en las células MC-38, que en las CT-26. Incrementos significativos en la activación proteolítica de caspasa-3 y escisión de PARP1 se detectaron mediante western blot en ambos tipos celulares, a pesar de una reostasis de PARP1 en las células CT-26. Finalmente, el tratamiento intralesional con *rTBL-1* inhibió un 27.81% ($p=0.0008$) el crecimiento de tumores singénicos de cáncer de colon implantados en ratones BALB/c inmunocompetentes ($p=0.022$), con beneficio en la supervivencia a 27 días, pero no en ratones desnudos BALB/c (*nu/nu*) inmunodeficientes ($p=0.255$).

Conclusión: la capacidad de *rTBL-1* para inducir apoptosis en células de cáncer de colon no depende estrictamente de la abundancia o disponibilidad de EGFR, dada la existencia de mecanismos inexplorados e independientes del receptor, aunque su expresión podría asociarse a respuestas más pronunciadas. La pobre responsividad en los ratones desnudos podría indicar que el efecto antitumoral de *rTBL-1* constituye el resultado sinérgico de la inducción de apoptosis en la masa tumoral y la citotoxicidad mediada por células T. Estudios futuros se enfocarán en dilucidar los efectos inmunogénicos desencadenados por la actividad antitumoral de *rTBL-1* en cáncer de colon.

Palabras clave: cáncer colorrectal; cáncer de colon; lectina recombinante; *Phaseolus acutifolius*; candidato biofarmacéutico; células T; apoptosis; muerte celular inmunogénica; respuesta inmunitaria antitumoral

SUMMARY

Background: A lectin-concentrated fraction of *Phaseolus acutifolius* (TBLF) has been studied by our working group, where its proapoptotic activity on colon cancer cells has been determined, as well as its effects on colon tumorigenesis *in vivo*. *rTBL-1* is a recombinant lectin based on the coding sequence of one of the lectins with cytotoxic activity and its proapoptotic effects have been associated with a phospho-EGFR/phospho-p38/phospho-p53 mechanistic axis. Immunogenicity data were jointly observed in treated animals, but its possible involvement in the antitumor response remained unexplored. **Objective:** To investigate whether the cytotoxic activity of *rTBL-1* depends on EGFR in the cellular system and to evaluate its ability to produce an antitumor response against syngeneic colon cancer in mice with and without T cells, in order to explore its possible involvement in the process. **Results:** Concentration-response assays demonstrated that *rTBL-1* produces concentration-dependent cytotoxic effects in both EGFR⁺ (MC-38) and EGFR⁻ (CT-26) colon cancer cells, with lethal concentrations of 23.50 and 30.01 µg/mL, respectively ($p=0.063$). Flow cytometry showed that induced apoptosis was slower and more sustained in MC-38 cells than in CT-26 cells. Significant increases in proteolytic activation of caspase-3 and cleavage of PARP1 were detected by western blot in both cell types, despite PARP1 rheostasis in CT-26 cells. Finally, intralesional treatment with *rTBL-1* inhibited the growth of syngeneic colon cancer tumors implanted in immunocompetent BALB/c mice by 27.81% ($p=0.0008$), with a benefit in 27-day survival ($p=0.022$), but not in immunodeficient BALB/c nude (*nu/nu*) mice ($p=0.255$). **Conclusion:** The ability of *rTBL-1* to induce apoptosis in colon cancer cells does not strictly depend on the abundance or availability of EGFR, given the existence of unexplored and receptor-independent mechanisms, although its expression could be related to deeper responses. Unresponsiveness in nude mice could indicate that *rTBL-1* antitumor effect is the synergistic result of apoptosis induction and T cell-mediated cytotoxicity in the tumor. Future studies will focus on elucidating the immunogenic effects triggered by the antitumor activity of *rTBL-1* in colon cancer.

Key words: colorectal cancer; colon cancer; recombinant lectin; *Phaseolus acutifolius*; biopharmaceutical candidate; T cells; apoptosis; immunogenic cell death; antitumor immune response

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), sin cuyo apoyo no habría sido posible el logro de este prolongado afán.

A la Dra. Teresa García Gasca, por su apoyo, comprensión y por cada uno de los aprendizajes compartidos a lo largo de estos años. A la Dra. Guadalupe García Alcocer, por todas las facilidades brindadas, así como por su compromiso personal hacia la excelencia. A la Dra. Laura Cristina Berumen, por brindar siempre calidad con calidez, en cada una de nuestras sesiones académicas; al Dr. Roberto Ferriz Martínez, por su amistad y todos sus consejos; y a la Dra. Patricia García López, por abrirme las puertas de su laboratorio durante los últimos meses, por su generosidad al compartir conocimiento y por su devoción al rigor científico, toda mi admiración y reconocimiento.

A Socorro, mi madre, por ser fuente de fortaleza, resiliencia y amor para todos sus hijos. Gracias Mamá, porque desde el amanecer de mi vida y hasta hoy, siempre supiste entender los motivos de la búsqueda que me trajo aquí. No pasará nunca un solo día, sin que sienta el privilegio de reconocerte en mi corazón.

A la memoria de mi padre, Juan Luján, hombre pleno en orgullo proletario, que supo entender que los privilegios de una subvención completa, en uno de los mejores colegios de Aguascalientes, no sería tanto un estímulo intelectual para *el niño*, como un medio de alienación para la conciencia de clase *del hombre*. Vives en mí, Papá.

A mis estudiantes Anette Ramírez-Carrera y Jaqueline González-Barrón, que, con su entrega, profesionalismo y amor por la ciencia, contribuyeron en forma importante al desarrollo de esta investigación.

A Juan Carlos, mi hermano, que, con su integridad, fortaleza y tesón por el cuidado de la familia, colma de sentido a todos mis porqué.

A mis sobrinitos Sofía, Regina, Renata, Santiago y Carlos, por el privilegio de verlos crecer y redescubrir el mundo a través de sus ojos.

A María M., quien me ofreció su hombro cuando perdí a mi padre y su mano, al iniciar mi doctorado; no soltándome, sino hasta cercana la obtención del grado. Por todo lo vivido, gracias.

A mis amigos dentro y fuera de la academia, por su afecto y acompañamiento, especialmente durante los años más duros de mi doctorado. Gracias por estar siempre ahí.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

FRANCISCO JAVIER LUJÁN MÉNDEZ

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 EL CÁNCER	3
2.1.1 PRINCIPIOS GENÉTICOS DEL CÁNCER	4
2.1.2 BIOLOGÍA EVOLUTIVA DEL CÁNCER	7
2.1.2.1 HETEROGENEIDAD INTRATUMORAL	7
2.1.3 SEÑAS DE IDENTIDAD DEL CÁNCER	9
2.1.3.1 MANTENIMIENTO DE SEÑALIZACIÓN PROLIFERATIVA.....	10
2.1.3.2 EVASIÓN DE SUPRESORES DE CRECIMIENTO	15
2.1.3.3 EVASIÓN DE LA DESTRUCCIÓN INMUNE	17
A. INMUNOVIGILANCIA.....	17
I. PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENO Y ACTIVACIÓN LINFOCITARIA.....	17
II. MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LINFOCITOS EFECTORES	20
B. MECANISMOS DE EVASIÓN A LA INMUNOVIGILANCIA.....	25
I. COOPTADO E INMUNOSUPRESIÓN DE CÉLULAS MIELOIDES.....	26
II. MECANISMOS DE SUBVERSIÓN LINFOIDE.....	31
2.2 EL CÁNCER COLORRECTAL.....	34
2.2.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	36
2.2.2 MANEJO DEL CÁNCER COLORRECTAL	40
2.3 LA INMUNIDAD ANTITUMORAL COMO OBJETIVO TERAPÉUTICO EN EL CÁNCER COLORRECTAL	41
2.4 LECTINAS DE <i>PHASEOLUS ACUTIFOLIUS</i> Y SU POTENCIAL ANTICÁNCER	43
2.4.1 NOCIONES MECANICISTAS DE LA RTBL-1.....	46
2.4.2 EFECTOS DE LAS LECTINAS DE FRIJOL TÉPARI SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	48
3. JUSTIFICACIÓN	51
4. HIPÓTESIS	52
5. OBJETIVOS	52
5.1 OBJETIVO GENERAL	52
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	52

6. MATERIALES Y MÉTODOS	53
6.1 MATERIALES	53
6.1.1 MATERIAL QUÍMICO	53
6.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO	54
6.1.2.1 LECTINA RECOMBINANTE DE <i>PHASEOLUS ACUTIFOLIUS</i>	54
6.1.2.2 CULTIVOS CELULARES.....	55
6.1.2.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	57
6.2 MEDICIONES Y ANÁLISIS	58
6.2.1 ENSAYOS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA CON <i>RTBL-1</i>	58
6.2.2 EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO DE UNIÓN DE ANEXINA V.....	59
6.2.3 WESTERN BLOT PARA CASPASA-3 Y PARP1 ESCINDIDA.....	60
6.2.4 IMPLANTACIÓN SUBDÉRMICA DE ALOINJERTOS TUMORALES DE CÁNCER DE COLON CT-26.....	65
6.2.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE <i>RTBL-1</i> <i>IN VIVO</i>	66
6.2.6 EVALUACIÓN DE LA DEPENDENCIA DE LAS CÉLULAS T EN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE <i>RTBL-1</i>...	67
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
7.1 <i>RTBL-1</i> PRODUCE EFECTOS CITOTÓXICOS EN MANERA DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON MURINAS EGFR⁺ Y EGFR⁻.....	69
7.2 A VALORES DE SU CL₅₀ <i>RTBL-1</i> PRODUCE UN POTENTE EFECTO APOPTÓTICO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON MC-38 EGFR⁺ Y CT-26 EGFR⁻	74
7.3 EL PROCESO INDUCIDO POR <i>RTBL-1</i> EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON ES MÁS LENTO Y DURADERO EN LAS CÉLULAS MC-38 EGFR⁺ QUE EN LAS CÉLULAS CT-26 EGFR⁻	75
7.4 <i>RTBL-1</i> INDUCE LA ACTIVACIÓN PROTEOLÍTICA DE CASPASA-3 EN CORRELACIÓN CON LA ESCISIÓN DE PARP1 EN AMBOS TIPOS TUMORALES, A PESAR DE UNA REOSTASIS DE PARP1 EN EL FENOTIPO EGFR⁻	78
7.5 EL TRATAMIENTO CON <i>RTBL-1</i> INTRALESIONAL INHIBE EL CRECIMIENTO DE TUMORES DE CÁNCER DE COLON IMPLANTADOS EN RATONES BALB/C INMUNOCOMPETENTES CON UN BENEFICIO EN LA SOBREVIVENCIA ...	81
7.6 EL TRATAMIENTO INTRALESIONAL CON <i>RTBL-1</i> NO INHIBIÓ EL CRECIMIENTO DE TUMORES DE LA MISMA ESTIRPE CELULAR IMPLANTADOS EN RATONES BALB/C (<i>NU/NU</i>) INMUNODEFICIENTES	82
8. CONCLUSIONES	86
9. REFERENCIAS.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

1. Genes críticos en la carcinogénesis (Adaptado de Lodish y col., 2016 [32])	6
2. Composición de geles de poliacrilamida al 5*, 8 y 10%	61
3. Condiciones y anticuerpos para western blot de caspasa-3 y PARP1	65
4. Estados mutacionales de los principales marcadores moleculares que norman la elección terapéutica en cáncer colorrectal metastásico en las líneas celulares de cáncer de colon responsivas a rTBL-1	74

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Activación oncogénica de los protooncogenes (Adaptado de Alberts y col., 2016 [33]).....	5
2. Modelo de evolución clonal del cáncer (Loeb, 2011 [31])	8
3. Señas de identidad del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011 [56])	10
4. Estructura de EGFR (London y Gallo, 2020 [59]).....	12
5. Señalización canónica de RAS (Stewart y col., 2020 [63]).....	14
6. Receptores de superficie celular expresados por las NK en <i>Homo sapiens</i> y <i>Mus musculus</i> (Chiossone y col., 2018 [111].....	22
7. Muerte celular inducida por la exocitosis de gránulos citotóxicos por CTL/NK (Voskoboinik y col., 2015 [110])	23

8. Elementos principales de la inflamación asociada al cáncer (Fridman y col., 2017 [82]).....	29
9. Inflamación asociada al cáncer e inmunosupresión mieloide (Nakamura y col., 2020 [128])	31
10. Cebado de células T con antígenos tumorales y mecanismos de subversión (Garner y col., 2020 [30])	33
11. Del pólipos al cáncer colorrectal (Kuipers y col., 2015 [5]).....	35
12. Tasas mundiales estandarizadas por edad (ASR) de la incidencia y mortalidad por cáncer en ambos sexos [180]	37
13. Cambios anuales en las tasas de mortalidad de los principales cánceres por grupo de edad en el IMSS, 1989-2013 (Borja-Aburto y col., [195]).....	38
14. Tendencias de mortalidad por cáncer colorrectal por sexo. México, 1998-2018 (Espinosa-Tamez y col., [204])......	39
15. Incidencia de tumores en colon inducidos químicamente por DMH y tratados con TBLF (50 mg/kg) en días alternos, durante seis semanas (Moreno-Celis y col., 2017 [19])	45
16. Diseño experimental para la prueba de concepto de <i>rTBL-1</i> intralesional en el tratamiento de tumores de CCR y la posible participación del sistema inmune del anfitrión	67
17. Purificación y confirmación de la identidad de <i>rTBL-1</i>	69
18. <i>rTBL-1</i> produce efectos citotóxicos en células de cáncer de colon en manera dependiente de la concentración.....	71
19. Curvas concentración-respuesta de <i>rTBL-1</i>	72
20. El tratamiento con <i>rTBL-1</i> produce una respuesta apoptótica diferencial en células de cáncer de colon EGFR ⁺ MC-38 y EGFR ⁻ CT-26.....	75

21. La apoptosis inducida por <i>rTBL-1</i> es más lenta y duradera en las células MC-38 EGFR ⁺ que en las células CT-26 EGFR ⁻	76
22. La exposición a <i>rTBL-1</i> produce aumentos en la activación proteolítica de caspasa-3 y la escisión de PARP1 en células de cáncer de colon murino EGFR ⁺ y EGFR ⁻	79
23. La administración intralesional de <i>rTBL-1</i> inhibe el crecimiento de tumores de cáncer de colon singénico CT-26 EGFR ⁻ en ratones BALB/c inmunocompetentes (+/+) con beneficio en la supervivencia	82
24. La administración intralesional de <i>rTBL-1</i> no inhibe el crecimiento de tumores de la misma estirpe celular implantados en ratones BALB/c inmunodeficientes (<i>nu/nu</i>).	83

1. INTRODUCCIÓN

Cáncer es la designación de un conjunto de patologías cuya etiología subyace en la perturbación genética de los mecanismos de proliferación y diferenciación de las células que conforman a los organismos metazoos superiores [1]. Estas perturbaciones devienen en el surgimiento de estirpes celulares aberrantes que proliferan sin sujeción a señales externas, conformando tumores con capacidad invasiva, que conducen a disfunción y a la muerte [2]. Debido a factores genéticos y ambientales, el cáncer se posiciona como uno de los problemas de salud pública más apremiantes de la actualidad [3] y, dentro de las malignidades humanas más frecuentes, el cáncer colorrectal (CCR) se ubica en la tercera posición, al tiempo que supone la cuarta causa de muerte asociada a la enfermedad ($\approx 10\%$), tanto en México como en el mundo [4]. Lo anterior incluso a pesar de los avances en la terapia médica y quirúrgica, cuyo impacto en las tasas de curación y sobrevida ha cambiado poco durante las últimas décadas [5].

Se sabe que la proliferación del CCR suele estar impulsada por la sobreexpresión de receptores de tirosina quinasa (TKR) en su forma silvestre o variantes aberrantes con hiperactividad debido a una mutación oncogénica. Tal es el caso del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuya sobreexpresión ha sido reportada en un rango del 25-82% de todos los casos de CCR [6,7], con una frecuencia de mutaciones somáticas, en alrededor del 3% de ellos [8]. Debido a su relativa idoneidad como blanco terapéutico, la inhibición del EGFR es hoy una piedra angular en el tratamiento del CCR metastásico (CCRm) sin mutaciones en RAS y BRAF [9–11] y, junto a la inmunoterapia de inhibición de puntos de control, indicada para el manejo del CCRm con inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H) [12,13], están consolidadas como dos de las principales terapias dirigidas en la actualidad [14]. Sin embargo, la supervivencia a largo plazo en el CCRm sigue siendo baja [15], por lo que persisten los esfuerzos por desarrollar nuevos agentes y combinaciones que permitan respuestas terapéuticas más duraderas y un mejor pronóstico en estos pacientes.

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado la *rTBL-1* (MX/E/2023/021569), una lectina recombinante basada en la secuencia codificante de una lectina bioactiva de frijol Tepari (*Phaseolus acutifolius*), cuyos efectos citotóxicos *in vitro* sobre una diversidad de linajes de células cancerosas han sido intensamente estudiados [16–18], lo mismo que su actividad antitumoral en modelos de tumorogénesis de colon *in vivo* [19]. Recientemente, ha sido validado que *rTBL-1* retiene la actividad proapoptótica de su contraparte nativa en dos líneas celulares de cáncer de colon (SW-480 y HT-29), de una manera vinculada al reconocimiento de glicoconjungados tumorales a través de su dominio de unión a carbohidratos (CBP, por sus siglas en inglés) [20], fosforilación (Tyr1068) y degradación lisosomal del EGFR, así como fosforilación de p38 (Thr180/Tyr182) y p53 (Ser15) [21].

Estudios preclínicos previos indican que la administración intragástrica de una fracción enriquecida de lectinas nativas de frijol Tépari (TBLF), cuyo componente mayoritario constituye *rTBL-1* [22], provocó aumentos transitorios en la relación linfocito/granulocito, aumentos discretos en la pulpa blanca esplénica y a nivel del duodeno, un incremento en los folículos linfáticos de las placas de Peyer, así como en las concentraciones de IL-6 en ratas, datos indicativos de una respuesta inmune secundaria al tratamiento [23,24]. Sin embargo, la capacidad de *rTBL-1* para producir respuestas antitumorales *in vivo* aún no ha sido evaluada, y la posible participación del sistema inmune del anfitrión en dicha respuesta, permanece igualmente inexplorada.

En este trabajo, evaluamos la capacidad de *rTBL-1* para producir apoptosis en dos líneas celulares de cáncer de colon murino, con y sin expresión de EGFR. Asimismo, evaluamos el efecto de la administración intralesional de *rTBL-1* sobre el desarrollo de aloinjertos tumorales ectópicos EGFR[−] establecidos en roedores singénicos inmunocompetentes. Por último, utilizando un modelo de referencia de ratón desnudo (*nu/nu*) atímico, postulamos la dependencia de las células T de la respuesta antitumoral producida por *rTBL-1*.

2. ANTECEDENTES

2.1 El cáncer.

El cáncer representa a un conjunto de patologías originadas de cambios genéticos que afectan los mecanismos de diferenciación y proliferación celular [1,25]. Dichas modificaciones resultan en linajes celulares capaces de proliferar de forma autónoma a las señales externas, en un proceso que da lugar a la formación de estructuras parecidas a órganos ectópicos, crónicamente proliferativos y a menudo diseminantes, capaces de establecer interacciones colaborativas con células aparentemente normales de la vasculatura hematógena y linfática, células de soporte mesenquimatosas específicas de tejido, así como con células del sistema inmune, con las que configuran los microambientes tumorogénicos que caracterizan a la mayoría de los cánceres, ya sea en forma de tumores sólidos o de nichos vasculares que afluyen en procesos malignos hematopoyéticos [26].

Inicialmente, estos procesos permanecen confinados al órgano de origen [27] más, a medida que transcurre la progresión tumoral, nuevas mutaciones surgen y gradualmente se acumulan, dando paso a poblaciones celulares genéticamente distintas [28], dotadas con propiedades fenotípicas propias y heredables, que eventualmente maximizan su competencia para propagarse a tejidos adyacentes a la lesión primaria. Una vez que células de cáncer competentes, acceden a los sistemas hematopoyético y/o linfático, se valen de su riego para diseminar a tejidos distantes en el organismo y establecerse en colonias metastásicas, que deterioran la arquitectura del tejido invadido y conducen a su disfunción [27].

La enfermedad metastásica es, en última instancia la causa del 90% de las defunciones asociadas al cáncer [29,30].

2.1.1 Principios genéticos del cáncer.

Por su etiología genética, la carcinogénesis es entendida en términos de alteración estructural y/o epigenética de genes que codifican para proteínas que regulan el crecimiento y la proliferación celular [25]. También conocidas como mutaciones conductoras, dichas alteraciones son de todo tipo y su acumulación determina la degeneración de diversas propiedades fundamentales de las células, en el denominado fenotipo del cáncer [31]. Gracias a tecnologías de secuenciación profunda, la ocurrencia de dichas lesiones ha sido dimensionada en el genoma de cánceres específicos. De manera general, las células de cáncer presentan un número aberrante (usualmente mayor) de cromosomas completos y perdidas y/o ganancias de brazos cromosómicos en alrededor del 25% de su genoma; amplificaciones y delecciones locales de magnitud variable se presentan en alrededor del 10%. Especialmente numerosas, las mutaciones puntuales destacan con hasta 100 cambios de base/Mb en cánceres inducidos por agentes mutágenos; aunque son mucho menos frecuentes (0.01 cambios de base/Mb) en cánceres pediátricos [32].

A saber, no todas las lesiones genómicas desempeñan un papel funcional en la proliferación maligna. Las denominadas, mutaciones pasajeras emergen incidentalmente con la inestabilidad genómica [33] a causa de las mutaciones genes mutadores, responsables de la activación oncogénica y la pérdida de la función de los supresores tumorales [1]. A diferencia de las mutaciones conductoras, las mutaciones pasajeras no contribuyen a la oncogénesis y hasta donde se sabe carecen de carácter patogénico [34]. En contraste, las mutaciones acaecidas en ADN polimerasas replicativas y genes reparadores de ADN, resultan especialmente potentes para inducir fenotipos mutadores, debido a una mayor ocurrencia de errores y a la incapacidad para corregirlos [31]. Asimismo, la sobreexpresión de ADN polimerasas de translesión contribuye al desarrollo de fenotipos mutadores, por medio de su intervención en ADN no dañado y la inserción de nucleósidos no complementarios [35].

A pesar de que la activación oncogénica puede responder a diferentes tipos de alteraciones genéticas (Figura 1), estas confluyen en un efecto funcional común: una excesiva promoción del crecimiento y la perturbación de la sociedad multicelular [32,33]. De manera particular, los genes cuya alteración subyace a la activación oncogénica se dividen en 2 grupos generales: oncogenes y genes supresores de tumor (Tabla 1) [32,33].

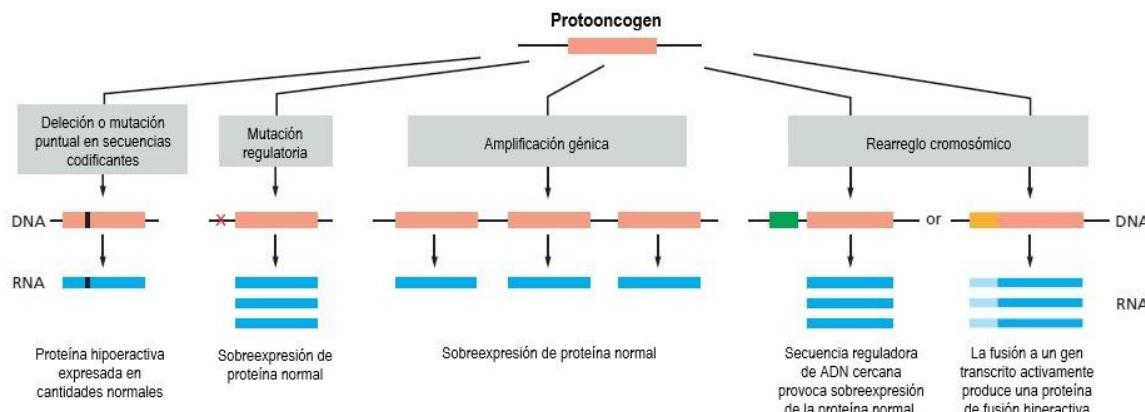


Figura 1. Activación oncogénica de los protooncogenes (Adaptado de Alberts y col., 2016 [33]). De izquierda a derecha. Una mutación/delección puntual puede alterar la estructura de su proteína y degenerarla a una forma constitutivamente activada (oncoproteína) si acontece en la región codificante del gen (1) o bien, conducir a su sobreexpresión, si se produce en la región reguladora del gen (2). Copias adicionales del gen pueden ser producidas por errores en la replicación del ADN, conduciendo a la sobreexpresión de su proteína silvestre (3). Por su parte, los reordenamientos cromosómicos pueden tanto reubicar las regiones de control y determinar la sobreexpresión del gen (4), como alterar la región codificante y producir una oncoproteína químérica (5).

Los oncogenes emergen como resultado de la alteración de los protooncogenes, genes celulares normales cuyos productos silvestres promueven la proliferación y sobrevivencia en respuesta a determinadas señales ambientales. Las mutaciones que determinan su transición a oncogenes, ocurren típicamente en puntos críticos específicos y son, en su mayoría, mutaciones sin sentido presentes en un solo alelo, lo que les confiere heterocigosisidad [36].

Por su parte, los genes supresores de tumor codifican para proteínas que actúan para derogar procesos proliferativos con potencial carcinogénico, al surgimiento y/o durante la progresión tumoral [37], ya sea a manera de *a)* proteínas intracelulares que regulan o inhiben la entrada al ciclo celular (p. Ej. p16 y pRb), *b)* receptores o

transductores de señal para hormonas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación (p. Ej. TGF-β), c) proteínas de punto de control de daños en el ADN (p. Ej. p53), d) proteínas proapoptóticas o bien, e) enzimas de reparación de ADN [32]. Dado el carácter crítico de los supresores tumorales, la eliminación o el surgimiento de mutaciones de pérdida de función en ellos, constituyen eventos esenciales para el desarrollo de múltiples malignidades [1,25,33].

Tabla 1. Genes críticos en la carcinogénesis (Adaptado de Lodish y col., 2016 [32]).

	Función normal	Productos proteicos típicos	Efecto de la mutación	Propiedades genéticas del gen mutante	Lesiones genéticas de origen
Protooncogenes	Promueven proliferación y supervivencia celular	Proteínas antiapoptóticas, componentes y transductores de señalización conducente a proliferación, factores de transcripción.	Mutaciones de ganancia de función permiten la proliferación y supervivencia sin sujeción a los controles tradicionales.	Mutaciones genéticamente dominantes.	Surgen por mutación puntual, translocación cromosómica y amplificación.
Genes supresores de tumor	Inhiben supervivencia y proliferación celular	Proteínas promotoras de apoptosis, inhibidores de la progresión del ciclo celular, proteínas de punto de control de daños en el ADN y/o en los cromosomas, componentes de las vías de señalización que limitan la proliferación.	Mutaciones de pérdida de función permiten la proliferación y supervivencia celular no regulada.	Mutaciones genéticamente recesivas.	Surgen por delección, mutación puntual y metilación.
Genes de mantenimiento del genoma	Reparan o previenen daños en el ADN	Enzimas reparadoras de ADN	Mutaciones de pérdida de función generan instabilidad genómica y fenotipos mutadores.	Mutaciones genéticamente recesivas.	Surgen por delección, mutación puntual y metilación.

Las lesiones genéticas que derogan a los supresores tumorales, acontecen primero en uno de los dos alelos, a manera de percances como mutaciones puntuales o pequeñas delecciones cromosómicas y, eventualmente, por medio de mecanismos

menos específicos (p. ej. errores en la segregación cromosómica o mutaciones por evento de recombinación mitótica) en el segundo alelo [33]. El silenciamiento epigenético constituye otra de las modalidades de inactivación, ya sea empaquetando el gen de determinado supresor tumoral en heterocromatina o metilando a su promotor, estos eventos pueden derrogar en forma irreversible el gen en la célula de origen, así como en toda su progenie [38].

2.1.2 Biología evolutiva del cáncer.

Desde la perspectiva del evolucionismo-biológico, la progresión del cáncer acredita todas las facetas de un proceso evolutivo presentado a escala somática, que tiene a la célula de cáncer por “unidad de selección” y cuyo curso, no está acotado a las pautas para mantener la homeostasis, ya que la célula de cáncer antepone un interés genético independiente al del organismo anfitrión, el cual, desde esta perspectiva queda marginado a ser un entorno protector, susceptible de ser explotado para sus propios fines [39]. De manera similar, Gatenby y Brown [40] postulan a la carcinogénesis, como la transición evolutiva de una determinada célula somática de un metazoo funcional, a un protista de una sola célula.

Desde el momento de su surgimiento, la célula de cáncer se inserta en una particular dinámica Darwiniana, que impulsará su evolución por selección natural a través de una competencia por recursos limitados, así como por su depredación por parte del sistema inmunológico [40,41]. En este ambiente hostil, las células de cáncer experimentan procesos iterativos de expansión, diversificación genética y selección clonal (Figura 2), bajo condiciones propias de los tejidos adyacentes [42,43], sustentando el desarrollo de fenotipos que maximizan sus aptitudes ante tales circunstancias microambientales y explican la elevada heterogeneidad genética, transcriptómica y microambiental del cáncer y la enfermedad metastásica [29].

2.1.2.1 Heterogeneidad intratumoral.

Tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas, la heterogeneidad del cáncer es resultado de la acumulación estocástica de mutaciones conducentes a

una denominada divergencia morfológica, cariotípica, genética y en la expresión transcriptómica, proteómica y metabolómica, que confiere diferentes dotaciones de funcionalidad a lo largo de todo el repertorio de células tumorales lo que en última instancia, también determinará la característica variabilidad de su respuesta terapéutica [44,45]. El microambiente tumoral (TME) desempeña un importante papel en el establecimiento de esta heterogeneidad, al ejercer distintos niveles de presión selectiva a cada locación de la masa [46].

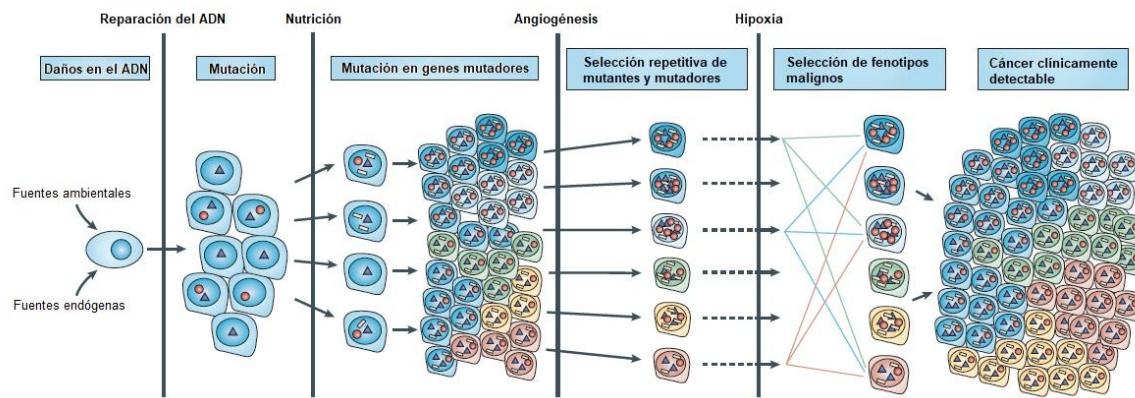


Figura 2. Modelo de evolución clonal del cáncer (Loeb, 2011 [31]). Cascada de mutaciones durante la progresión tumoral: luego del daño genómico inicial, diversas restricciones fisiológicas (encabezados) determinarán el curso evolutivo, a través de varias rondas de selección (recuadros). Los clones más aptos, completarán su tránsito gracias al desarrollo de las competencias fenotípicas del cáncer. Los círculos rojos representan mutaciones en genes mutadores; los triángulos azules denotan mutaciones conductoras, seleccionadas en función de los cambios del TME. Los rectángulos blancos representan mutaciones pasajeras. En este modelo, el proceso conduce al desarrollo de una masa tumoral desprovista de una organización jerárquica particular.

Si bien, la inestabilidad genómica constituye el motor de la heterogeneidad tumoral, la coexistencia de diversos subtipos de cáncer en un órgano común (e inclusive, en un mismo tumor), remite también al surgimiento de más de una célula de origen, cada una de las cuales, es resultado del asentamiento de uno o varios eventos mutacionales de iniciación, generalmente en una célula troncal o progenitora común [47–49], aunque su ocurrencia también es posible en ciertas progenitoras más restringidas [44]. En cualquiera de los tres casos, la capacidad de renovación intrínseca de estos tipos celulares impulsará su expansión clonal y el establecimiento de nuevas estirpes aberrantes, cada una de las cuales, emprenderá un curso evolutivo particular (progresión tumoral), cuyo resultado se verá

influenciado por mutaciones conductoras, cambios epigenéticos y eventualmente, por nuevas lesiones genómicas [50] lo que según otra hipótesis, sustentará el desarrollo de una o varias poblaciones de células troncales de cáncer (CSC, por sus siglas en inglés), entidades sobre las que recaería el máximo potencial replicativo, metastásico y regenerativo secundario a daños, características que por su parte, no serían extensivas a sus respectivas progenies dado su mayor grado de diferenciación [42,51].

Sin embargo, el modelo de las CSC y de manera particular, la noción de una diferenciación unidireccional en el cáncer, parece pobremente soportada frente a evidencias que señalan que células de cáncer no troncales, detentan una notable plasticidad que les permite reactivar comportamientos troncales en respuesta a la terapia por radiación [52]. Al respecto, otros autores [45] sugieren que la evolución clonal y los modelos de CSC pueden de hecho, coexistir y operar en conjunto para establecer ecosistemas complejos, con varias capas de heterogeneidad. Por sus implicaciones biológicas y patológicas, la heterogeneidad del cáncer y la metástasis, constituyen los principales desafíos para su tratamiento como enfermedad potencialmente mortal [45,51–54].

2.1.3 Señas de identidad del cáncer.

A pesar de que la heterogeneidad es un atributo generalizable a todas las formas de cáncer, su progresión como enfermedad no es caótica y conlleva el desarrollo de una serie de competencias biológicas, comunes en la mayoría de las formas de cáncer. La síntesis de estas características, remite a la serie de trabajos de Hanahan y Weinberg [55–57] orientados a postular y discutir las denominadas señas de identidad del cáncer.

Las señas de identidad del cáncer constituyen un conjunto de ocho atributos funcionales (Figura 3) cuyo desarrollo presenta un diferente orden de sucesión entre los cánceres y determina la agresividad de su fenotipo particular, durante los períodos patogénico y clínico de la enfermedad [57]. Por su pertinencia a este

trabajo, se desarrollarán las tres primeras señas de identidad del cáncer, poniendo especial énfasis en la evasión de la destrucción inmune.

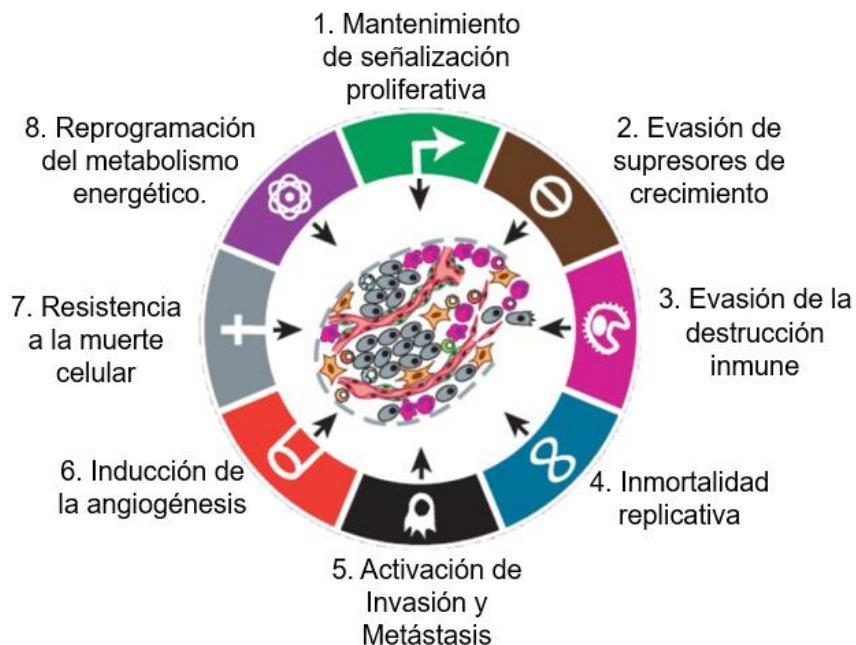


Figura 3. Señas de identidad del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011 [56]). Habilitadas e impulsadas por la inestabilidad genómica y la inflamación inmune, las señas de identidad del cáncer ofrecen una base para comprender la biología del cáncer y sus procesos regulatorios.

2.1.3.1 Mantenimiento de señalización proliferativa.

En condiciones normales, la proliferación de las células eucarióticas ocurre solo cuando las condiciones microambientales son favorables y el genoma celular ha sido replicado con precisión. Las moléculas responsables de dichos controles actúan espacio-temporalmente desde diferentes compartimentos celulares para ejecutar programas específicos de cada linaje celular [32,33]. Fisiológicamente, este proceso inicia con la unión de una proteína factor de crecimiento extracelular con alguno de los TKR de crecimiento afines, a nivel de la superficie celular. Luego de esta primera interacción, uno o varios dominios intracitoplasmáticos del complejo ligando-receptor, quedarán expuestos para catalizar la transferencia del grupo γ -fosphato de un ATP, a grupos hidroxilo de un residuo de tirosina, presente en una proteína transductora de señal [58]. Dada la considerable carga del grupo fosfato,

su adición puede delimitar un sitio de reconocimiento proteína-proteína o conducir a cambios conformacionales que determinen el inicio o el cese de una acción enzimática en determinadas proteínas transductoras de señal [33]. Como consecuencia de lo anterior, sobreviene su interacción con otras proteínas transductoras, ubicadas esquemáticamente a un nivel inferior. Eventualmente y tras una sucesión de interacciones, primero a nivel citoplasmático y después a nivel del núcleo, la señal incidirá sobre uno o más factores de transcripción, que regularán la expresión génica y desencadenarán el efecto mitogénico [32].

El TKR por antonomasia, es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés). Miembro de una familia de 4 receptores conocidos (junto con HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4), el EGFR cuenta con 4 dominios extracelulares (DI, DII, DIII y DIV), seguidos de un dominio transmembranal sencillo, que confluye en un dominio intracitoplasmático de tirosina quinasa (Figura 4), estructura que conserva ErbB4; pero no ErbB2 y ErbB3, los cuales exhiben características únicas. ErbB3 carece de dominio de tirosina quinasa, mientras que el ErbB2 no se une a ligando conocido, sino que opera como correceptor para los otros miembros de la familia [59].

Toda vez que el dominio de unión del EGF (constituido por DI y DIII) perpetra la captura de su ligando extracelular (EGF), sobreviene un cambio conformacional que deja expuesto el dominio de dimerización del receptor, el cual, permite el reclutamiento de otro monómero de EGFR activado, a fin de conformar un dímero de receptores. Enseguida, el dominio quinasa intracitoplasmático en cada receptor, fosforilará a los residuos de tirosina en el bucle de activación de su contraparte en el dímero, en un proceso conocido como autofosforilación intermolecular [58]. Tras el consecuente cambio conformacional, cada receptor admitirá el acceso de ATP y sustrato a su dominio quinasa catalítica, lo que resulta esencial para su posterior interacción con las proteínas transductoras de señal [33,58].

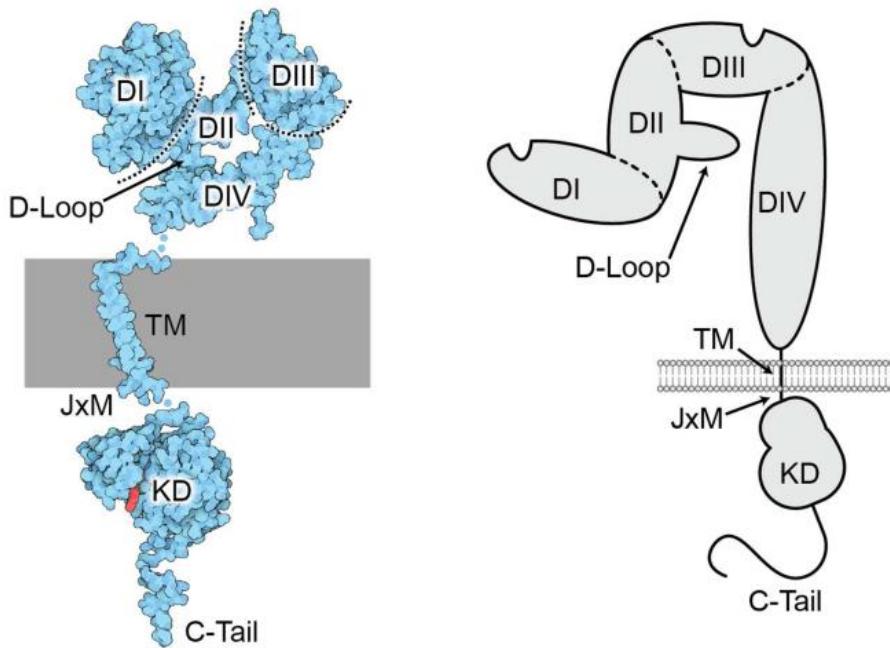


Figura 4. Estructura de EGFR (London y Gallo, 2020 [59]). Representación de la cristalografía del EGFR (izquierda) y una perspectiva esquemática (derecha). Se acotan rótulos a los dominios extracelulares DI, DII, D-III y DIV, así como del bucle de dimerización (D-Loop); los dominios transmembranal (TM) y yuxtapamembrana (JxM), seguidos del dominio de tirosina quinasa (KD) y la cola C-terminal (C-Tail). Las muescas presentadas en DI y DIII de la vista esquemática, representan el bolsillo de unión a ligando.

Cabe señalar que luego de cierto período de actividad, la quinasa de EGFR debe ser desactivada para evadir una señalización desenfrenada. Para lograrlo, se dispone de varios mecanismos, que incluyen: a) la desfosforilación de residuos reguladores de tirosina en EGFR, llevada a cabo por proteínas fosfatases de tirosina; b) la unión de reguladores negativos al dominio quinasa del receptor, seguida de su endocitosis y degradación; y c) fosforilación adicional, que luego de ser perpetrada por quinasas como PKC α , desencadenará cambios conformacionales que inhibirán la captura de ligandos extracelulares o bien, derrogarán de forma directa la actividad del dominio quinasa de EGFR [59,60].

Una importante proteína transductora de EGFR es Grb2, cuyo dominio SH2 reconoce a los residuos fosforilados en el bucle de activación de EGFR, lo que determina su asociación. Enseguida, Grb2 establece una nueva interacción a través de sus dos dominios SH3, con los homólogos de la proteína de intercambio de nucleótidos de guanina SOS, la cual es reclutada desde su localización citoplasmática,

hasta el sitio del complejo EGFR-Grb2 a nivel de membrana [59]. Es aquí donde SOS, cataliza la activación de la proteína RAS, al intercambiar el guanosín difosfato (GDP) acoplado al dominio G de esta proteína, por guanosín trifosfato (GTP).

A pesar de que las proteínas RAS poseen una actividad intrínseca de GTPasa que permite cierto nivel de autorregulación, es a este nivel que subyace otro importante mecanismo regulador, a cargo de las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) las cuales, catalizan la hidrólisis de GTP a GDP en RAS, a fin de evitar una señalización desenfrenada [58]. En su estado unido a GTP (RAS-GTP), RAS desencadenará río abajo, la activación secuencial de las MAP quinasas (MAPK), una familia de serina/treonina quinasas que operan como enlace citoplasmático entre RAS-GTP (a nivel de membrana celular) y la expresión génica, toda vez que las MAPK pueden traslocarse a núcleo en donde, regularán por fosforilación la actividad de múltiples factores de transcripción [61].

Inicialmente, RAS-GTP actuará a través de sus regiones interruptoras de conformación dinámica SWI y SWII [62] sobre su principal efectora, la serina/treonina quinasa Raf, la cual, es reclutada hacia la membrana plasmática en donde, luego de su activación, quedará habilitada para fosforilar a la proteína quinasa quinasa activada por mitógeno (Mek) que, por su parte, tendrá a la proteína quinasa regulada por señal extracelular (Erk) como principal diana (Figura 5). Finalmente, Erk fosforilada quedará habilitada para translocarse al núcleo y activar factores de transcripción que operarán en favor de la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis [63].

La evasión de estos procesos regulatorios en células de cáncer, emerge causalmente a partir de diversos mecanismos alternativos, tales como la coexpresión de TKR y sus respectivos ligandos, a manera de estimulación autocrina o yuxtacrina [64–66]; la comunicación bidireccional con células normales en el estroma de soporte del tumor a fin de estimular su expresión de diversos ligandos-factores de crecimiento [67] y la sobreexpresión de TKR silvestres o bien, de isoformas aberrantes constitutivamente activadas de los mismos [56]. En el CCR,

por ejemplo, la sobreexpresión y/o mutación oncogénica del EGFR, está presente en ≈80% de todos los casos [5].

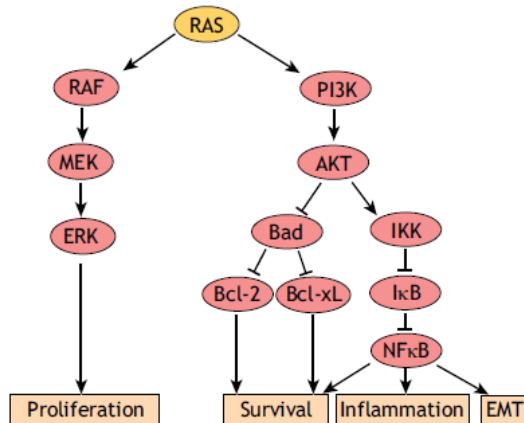


Figura 5. Señalización canónica de RAS (Stewart y Clark, 2020 [63]). GTP-RAS contrata efectores que regulan el crecimiento, la supervivencia y el metabolismo celular. Tras la activación de Raf se desencadena la secuencia de quinasas Raf-Mek-Erk la cual, finaliza con la translocación de Erk fosforilada al núcleo, en donde activará factores de transcripción cuyos productos obrarán en favor de la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis. En paralelo, GTP-RAS activa a PI3K, induciendo la señalización PI3K-Akt con dos afluentes: I) fosforilación inhibitoria sobre la proteína proapoptótica Bad, cuya derogación determina el cese de su dominancia negativa sobre las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL. II) Activación de la quinasa IKK, cuya fosforilación conlleva efectos inhibitorios sobre IκB, comprometiendo su actividad represora sobre el factor de transcripción NFκB, el cual, queda habilitado para translocar al núcleo y activar genes, cuyos productos son clave para la supervivencia, la migración y la transición epitelial-mesenquimal (EMT), un programa embrionario latente cuya activación aberrante en células de cáncer es asociada a una mayor competencia metastásica [68].

En el caso representativo del EGFR, múltiples cánceres epiteliales exhiben entre su repertorio de anomalías, sobreexpresión de su forma silvestre o de variantes mutadas [59]. Asimismo, es usual la pérdida de su regulación negativa a expensas de proteínas como las fosfatasas de tirosina; la proteína de andamiaje Anexina A6, esencial para la fosforilación inhibitoria de PKC α [60]; o la proteína PHD3 que, actuando también como andamio, se asocia con el adaptador endocítico Eps15 y promueve la internalización de EGFR [69].

De manera análoga, dianas intracelulares de los TKR, pueden experimentar un destino similar a expensas de eventos mutacionales [56]. Se estima que hasta un 24% de todos los cánceres humanos expresan isoformas aberrantes de Ras, caracterizadas por presentar una variedad de mutaciones en residuos como Gly12,

Gly13 o Gln61, las cuales, deterioran tanto la hidrólisis intrínseca de GTP, como la inducida por GAP, conduciendo a incrementos sostenidos de Ras-GTP y de sus efectos señalizadores río abajo [62]. Pese a lo anterior, la actividad aberrante de Ras a menudo acontece sin sujeción a mutaciones aberrantes, sino como resultado de la disfunción en sus dominantes negativos. En este sentido, se ha observado que tanto mutaciones de pérdida de función, como el silenciamiento epigenético de GAP o de algunas de sus proteínas andamio, son atributos frecuentes, que tienden a correlacionar con un mal pronóstico en una variedad de malignidades humanas [70,71].

Otro grupo de dominantes negativos de RAS, son las proteínas de la familia de supresores tumorales con dominio asociado a RAS (RASSF) las cuales, conducen a las células con hiperactividad de RAS a la apoptosis o a la senescencia, por medio de mecanismos no del todo comprendidos [63]. No es de extrañarse pues, que la derrogación de RASSF mediada por la metilación de su promotor, deje vía libre al establecimiento de la señalización constitutiva de RAS, debido a su desacoplamiento de esta vía inhibitoria [72].

2.1.3.2 Evasión de supresores de crecimiento.

Está bien establecido que para la efectiva abolición de un supresor tumoral en una célula diploide, es necesaria la inactivación de las dos copias del gen [1]. Según la hipótesis fundacional de Knudson (1971) desarrollada a partir de una serie de 48 casos de retinoblastoma [73], la enfermedad puede ser iniciada a partir de dos dinámicas mutacionales: hereditaria y no hereditaria. En la primera, el primer evento mutacional (o *hit*) es heredado a través de las células germinales, mientras que el segundo acontece a nivel de las células somáticas. Por su parte, la forma no hereditaria, surge a expensas de dos mutaciones acaecidas en células somáticas. El gran mérito de dicha hipótesis, radica en el hecho de que Knudson, dedujo en forma indirecta la existencia de los genes supresores de tumores. Sin embargo, observaciones recientes revelan que, en ciertos casos la pérdida o inactivación de un solo alelo es suficiente para reducir la supresión tumoral, conduciendo al

desarrollo de un fenotipo anormal conocido como haploinsuficiencia, así como a un incremento en la predisposición de ciertos tejidos a desarrollar cáncer [74].

Los supresores tumorales constituyen la contramedida molecular ante el eventual surgimiento de focos proliferativos con potencial carcinogénico. Tal como ha sido señalado, los genes supresores de tumor codifican para proteínas que operan desde variadas locaciones subcelulares y a través numerosos mecanismos para derogar procesos oncogénicos ya sea a su surgimiento, como operadores de detención del ciclo celular o reparadores de ADN; o durante la progresión de tales procesos, obrando en favor del desarrollo de rasgos de diferenciación o incluso, induciendo directamente la apoptosis [25,37].

Dos ejemplos prototípicos de supresión tumoral corren a cargo de p53, un regulador maestro de cientos de genes involucrados en procesos biológicos, tales como reparación de daños en el ADN, arresto al ciclo celular, activación de la apoptosis y senescencia celular [75], cuya ocurrencia mutacional remite a por lo menos el 50% de todos los cánceres humanos [76]; y pRb, la cual limita la transcripción de genes del ciclo celular al estabilizar complejos que reprimen la transcripción del factor E2F [77]. Ambos, constituyen nodos de control central, cuya derrogación mutacional o epigenética, deja inoperantes a dos circuitos reguladores complementarios, esenciales para las decisiones de proliferar o activar el arresto al ciclo celular, la senescencia y/o la muerte celular [56].

La acción de los supresores tumorales también puede darse a nivel de receptores de superficie, tal es el caso de Merlin (codificada por el gen NF2), una proteína asociada a membrana/citoesqueleto que regula la inhibición de la proliferación dependiente del contacto, al actuar en respuesta al ensamblaje de uniones célula-célula y de la activación de CD44 mediada por la matriz extracelular rica en ácido hialurónico. CD44 activa a MYPT1, una fosfatasa que desfosforila a Merlin (Ser 518), en la que supone su conformación activa [78]. Merlin desfosforilada confina a EGFR a un compartimento de membrana, desde el que no puede señalizar ni internalizarse [79]. Mutaciones de pérdida de función en Merlin o en alguna de sus

proteínas andamio, conllevan efectos nefastos sobre la inhibición por contacto y conducen a la característica formación de masas tumorales [80].

2.1.3.3 Evasión de la destrucción inmune.

A. Inmunovigilancia.

Además de proteger contra infecciones virales o bacterianas asociadas al desarrollo de ciertos cánceres o de resolver procesos inflamatorios que podrían promover su desarrollo, el sistema inmunológico puede reconocer y matar células de cáncer a través de un proceso nombrado por Burnet como inmunovigilancia [81]. Este proceso, inicia con el reconocimiento de productos proteicos anormales surgidos de mutaciones somáticas en secuencias génicas codificantes conocidos como antígenos específicos del tumor (o neoantígenos), así como de antígenos asociados al tumor, cuyo origen remite a alteraciones epigenéticas que conducen a la expresión ectópica de antígenos propios del desarrollo embrionario, tejidos de la placenta o de los testículos [82].

El reconocimiento de neoantígenos/antígenos asociados a tumor, es esencial para la activación de la respuesta inmune antitumoral y determina la especificidad de los linajes celulares involucrados [83,84], incluidos los linfocitos T citotóxicos (CTL), diferenciados a partir de células T CD8⁺ sin experiencia antigenica previa (*naive*). Dicha activación, es ejecutada por linfocitos T CD4⁺ en coordinación con células presentadoras de antígeno “profesionales” (APCs) las cuales, capturan antígenos tumorales en el contexto de inflamación inherente a ciertos cánceres o derivada de su tratamiento, a fin de exponerlos a las células T CD4⁺ y CD8⁺, en un proceso conocido como presentación cruzada de antígeno [85,86].

I. Presentación cruzada de antígeno y activación linfocitaria.

Las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) son subconjuntos especializados y terminalmente diferenciados de células mieloides con abundantes procesos membranosos que convergen en forma de dendritas. Están presentes en

la mayoría de los tejidos y reciben diversas denominaciones según su locación, más sus funciones son análogas entre sí [87]. Una vez que las DC han acreditado su activación funcional, mediante señales de infección (patrones moleculares asociados a patógenos; PAMPs, por sus siglas en inglés) o de daño tisular (patrones moleculares asociados al daño; DAMPs, por sus siglas en inglés), son aptas para perpetrar la captura de antígenos tumorales a través de una adaptación de sus vías endocíticas y fagocíticas [88] con la consecuencia funcional de provocar una respuesta inmune [89]. Los antígenos fagocitados, son exportados al citoplasma a fin de procesar sus péptidos bajo una de dos modalidades alternativas, usualmente referidas como vía citosólica y vía vacuolar [86].

En la primera, los productos de la degradación proteosómica son importados al retículo endoplásmico (ER) a fin de ser cargados *in situ* en moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I). Por su parte, la vía vacuolar comienza con la interacción de un receptor de la familia de proteínas de fusión sensibles a la N-etilmaleimida, conocido como SEC22B y la sintaxina-4 del fagosoma, lo que sustenta el reclutamiento (desde el ER) del transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) el cual, una vez asociado a la membrana del fagosoma, mediará la reimportación de los péptidos antigenicos para su carga subsecuente en moléculas de MHC-I [90]. Ya sea por la vía citosólica o por la vacuolar, una vez que las moléculas de MHC-I han sido conjugadas con péptidos antigenicos de tumor, estos son movilizados hacia la superficie de la DC a través del aparto de Golgi, luego de lo cual éste subconjunto de DC podrá actuar *in situ* o bien, migrar a través de los vasos linfáticos con dirección a los ganglios drenantes, locación en que establecerán sucesivas sinapsis inmunológicas con células T CD4⁺ y T CD8⁺ *naive*, a fin de presentar los péptidos antigenicos de tumor a los receptores de células T (TCR) que expresan, en la que constituye una señal para su diferenciación a linfocitos T colaboradores y CTL, respectivamente [91,92].

Las células T colaboradoras CD4⁺ tipo 1 (T_h1), son corresponsables de la maduración de células T CD8⁺, incluidas las de la subpoblación Tc1, cuya capacidad

para producir y secretar Interferón gamma (IFNy) les confiere de una importancia superlativa en el contexto de la inmunidad antitumoral [93]. En este sentido, la actividad de los diversos subtipos de CTL puede darse en configuración curativa, al impedir la progresión de un proceso oncológico residual resistente a la terapia o bien, en configuración profiláctica, al mediar la respuesta contra posteriores desafíos por nuevas células de cáncer [94].

Desde una perspectiva estructural, el TCR consiste en un complejo heterodímero de proteínas, conformado por una subunidad de unión a antígeno (TCR $\alpha\beta$), unida por un disulfuro asociado de forma no covalente a 3 subunidades de señalización CD3: CD3 $\zeta\zeta$, CD3 $\delta\epsilon$ y CD3 $\gamma\epsilon$ [95]. Una vez que el TCR $\alpha\beta$ se ha comprometido con un péptido antigénico, en el contexto de una molécula de MHC-I, sobreviene la fosforilación de la tirosina en el motivo de activación inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) a nivel de las subunidades CD3. En este punto, los correceptores CD4 y CD8 de las células T contribuyen a la señalización del TCR, al estabilizar la débil unión TCR-péptido antigénico, por medio de su interacción concomitante con los MHC-II y I, respectivamente [96].

Tras la asociación de CD4 a MHC-II o de CD8 a MHC-I, la quinasa Lck es reclutada a la cola citoplasmática de los correceptores, desde donde accederá al complejo TCR-péptido antigénico y acometerá la fosforilación de los sitios ITAM en las cadenas CD3 [97], lo que hace posible el acoplamiento y la activación de la proteína tirosina-quinasa ZAP70. Esta por su parte fosforilará a la proteína adaptadora transmembrana para la activación de células T (LAT), produciendo cambios conformacionales que revelarán múltiples sitios de reconocimiento, tanto para otras proteínas adaptadoras como para ciertas efectoras, de cuya agregación emerge el complejo multiproteico conocido como señalosoma LAT [98], nodo de tres vías primordiales de señalización: Ca²⁺-calcineurina, que conduce a la translocación nuclear del regulador transcripcional factor nuclear de células T activadas (NFAT).

La señalización de las MAPK, que deviene en la activación de los factores de transcripción JUN, FOS y de la proteína activadora 1 (AP1), así como en la

polimerización de actina y la señalización del factor nuclear κB (NF-κB), que sustenta la translocación nuclear y la actividad de los reguladores transcripcionales REL y NF-κB. La confluencia de estas tres vías, trae como resultado la proliferación, migración, actividad secretora y demás funciones efectoras de las células T_h CD4⁺ y de los CTL [99]. Si bien, está claro que la cinética de unión TCR-antígeno desencadena la transducción de las señales que sustentan la diferenciación de células T [86,92] y que, en algunos casos, la intensidad de dichas señales define el linaje a que estas se diferencian [83], el posible papel pivotal que los diferentes estados conformacionales del TCR desempeñan en el contexto de su señalización, no ha sido completamente elucidado [100].

Una vez que el binomio T_h1-DC ha llevado a cabo el óptimo cebado de un grupo de células T CD8⁺, sobreviene su expansión clonal y diferenciación terminal a CTLs antígeno-específicos, listos para ejecutar sus funciones efectoras. Posteriormente y como parte del ciclo homeostático, esta subpoblación de CTLs decrecerá hasta en un 90%, dejando atrás una cantidad de células T de memoria, dotadas con la capacidad innata de proliferar y reactivar en forma rápida y robusta respuestas citotóxicas mediadas por su estimulación secundaria con el mismo antígeno [101] en forma independiente de asistencia, cuya magnitud y funcionalidad correlaciona positivamente con la asistencia recibida por los linfocitos T CD4⁺ *naive* durante el cebado, a manera de señales de mantenimiento dependientes de Interleucina (IL)-15 [102]. Por su parte, las células T_{CM} ingresarán a la circulación, a fin de concentrarse en órganos linfoideos, en donde pueden reactivar sus funciones efectoras ante el eventual establecimiento de sitios metastásicos [82]. Sin embargo, el desenlace de los futuros encuentros con el antígeno podría verse influenciado por el TME de cada lesión.

II. Muerte celular inducida por linfocitos efectores.

Las células asesinas naturales (NK) son un linaje del sistema inmunitario innato con funciones efectoras, considerado como la tercera población linfocitaria más abundante [103] y componente esencial en la respuesta inmune antitumoral [104].

Su activación es sinérgica y responde a la convergencia de distintas combinaciones de señales transducidas por una serie de receptores de activación con diferente especificidad de ligando [105], toda vez que expresen amplificación tal en sus señales que superen el umbral de activación [106], así como a la eventual señalización devenida de los receptores de inhibición, expresados de manera conjunta en la célula (Figura 6). Las NK pueden reconocer células tumorales al detectar la ausencia de moléculas de MHC en su membrana plasmática, lo que constituye un atributo común en las células de cáncer [107]. Lo anterior, mediante sus receptores inhibitorios de tipo inmunoglobulina (KIR) y activador de células NK grupo 2 miembro D (NKG2D) los cuales, exhiben gran afinidad por el MHC-I. El versátil NKG2D, también puede dar cuenta de la abundancia anómala de ciertas señales de superficie inducidas por estrés, cuyo origen remite a la respuesta a daños en el ADN, la senescencia celular y el choque térmico, ya sean de causalidad oncogénica o no [106].

Una vez activadas, las NK yuxtaponen su actividad citotóxica a la de los CTL en aras de destruir clones de cáncer. Lo anterior; ocurre a expensas de la movilización de una batería de serina proteasas catiónicas, conocidas como granzimas [108]. Hasta el momento en que las CTL/NK entran en contacto con una célula diana, las moléculas de los dos tipos de granzima (A y B) permanecen confinadas en gránulos citotóxicos al interior de las células efectoras, de manera que no puedan dañarlas. A continuación, los gránulos se desplazan a lo largo de la red de microtúbulos hasta tomar posiciones en la membrana plasmática adyacente a la célula transformada, desde donde son secretadas hacia una nueva sinapsis inmunológica entre estas dos células [109,110].

El tercer constituyente más abundante del coctel citotóxico, la enzima formadora de poros perforina [111], sustenta el paso y la actividad proteolítica de las granzimas a nivel del citosol de la célula diana (Figura 7), locación en que las granzimas obrarán en favor de la muerte celular a través de sus mecanismos particulares [112]. La granzima A actúa sobre las mitocondrias, abatiendo su potencial transmembrana

($\Delta\Psi_m$) y provocando un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este evento, está causalmente asociado con la translocación nuclear del complejo asociado al ER de alto peso molecular (complejo SET) el cual, se ve implicado en la transcripción de genes asociados con la respuesta al estrés oxidativo.

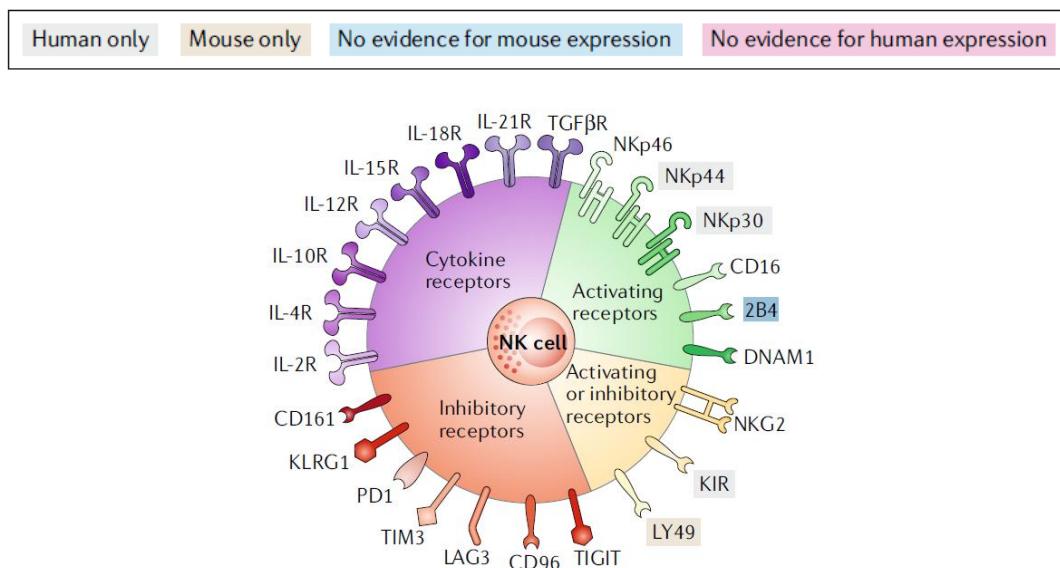


Figura 6. Receptores de superficie celular expresados por las NK en *Homo sapiens* y *Mus musculus* (Chiassone y col., 2018 [113]). Una serie de receptores codificados por la línea germinal, permiten a las NK reconocer determinados ligandos expresados en la superficie de células tumorales o infectadas por virus [105]. Una vez que las interacciones ligando-receptor simultáneamente establecidas, determinan una transducción de señales tal que supera el umbral de activación de las NK, deviene su actividad citotóxica basada en enzimas citolíticas y dirigida en contra de dianas específicas [106].

Asimismo, la granzima A actúa a nivel del núcleo, en donde sustentará la inactivación proteolítica de tres sustratos miembros del complejo SET: la enzima de reparación de endonucleasa apurínica/apirimidínica (APE1; [114]), la proteína del grupo de alta movilidad 2 (HMGB2; [114]) y la proteína de ensamblaje de nucleosomas (SET). Con la derogación del complejo SET, cesa también su influencia inhibitoria sobre la ADNasa NM23-H1 [115], la cual, queda libre para realizar escisiones sobre el ADN de cadena sencilla, lo que constituye una marca característica de la muerte celular inducida por granzima A [109].

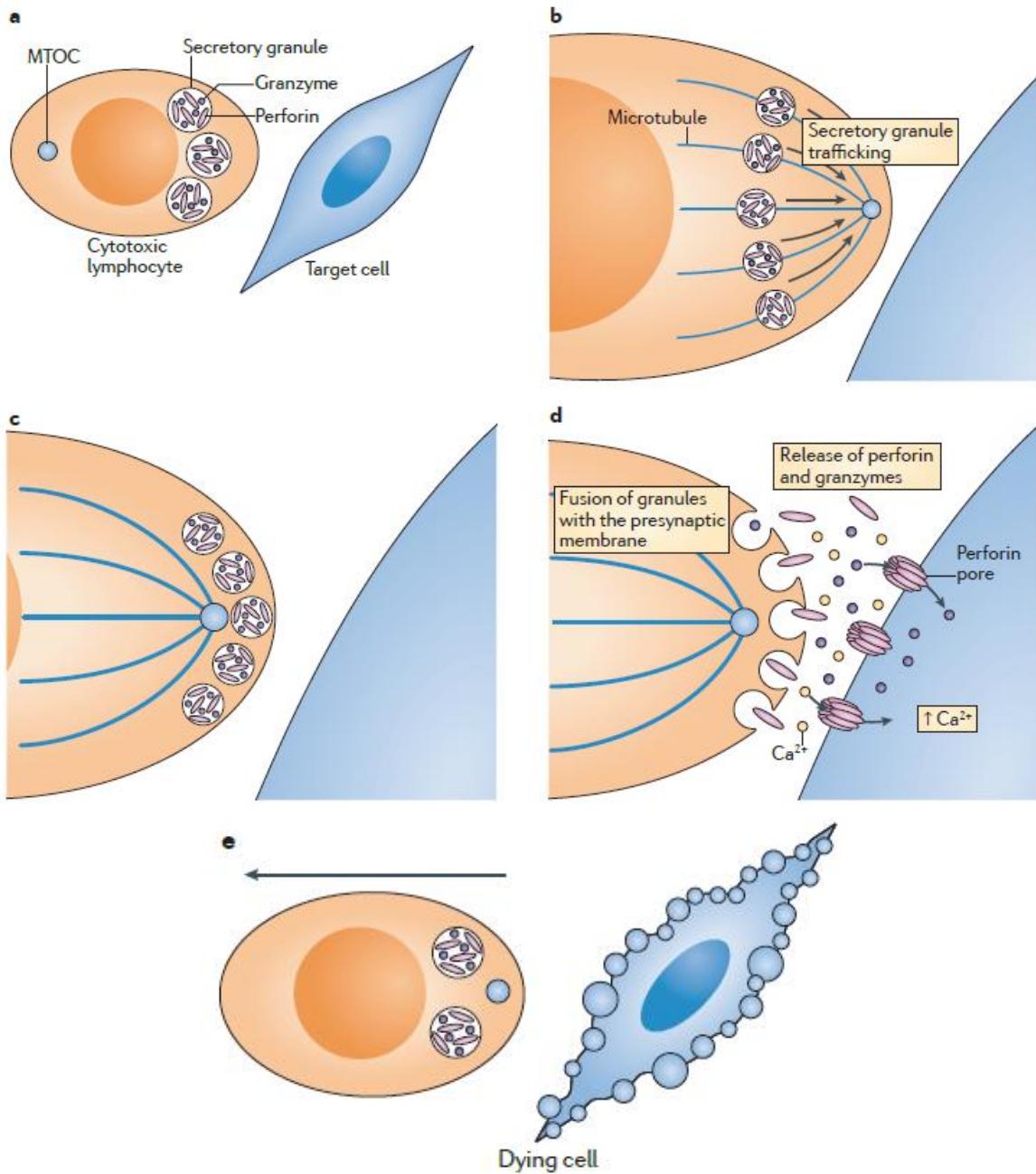


Figura 7. Muerte celular inducida por la exocitosis de gránulos citotóxicos del CTL/NK (Voskoboinik y col., 2015 [110]). Tras el reconocimiento de la firma antigenica de una célula diana, un CTL/NK es reclutado al sitio, por citocinas quimiotácticas secretadas por linfocitos T CD4⁺ (linfocitos T colaboradores; no ilustrados) a fin de establecer una sinapsis inmunológica entre la efectora y su célula diana (a). A continuación, el centro organizador de microtúbulos del efector (MTOC) se polariza y conduce el tráfico de gránulos citotóxicos hacia la membrana presináptica (b y c), en donde acontecerá una fusión de membranas, que resultará en la liberación de perforina y granzimas en la hendidura sináptica (c). A nivel postsináptico, la perforina genera grandes poros transmembrana, que sustentan la difusión de granzimas al citoplasma de la célula diana (d), en donde promoverán la activación proteolítica de caspasas, al tiempo que arremeten contra otros sustratos celulares a fin de asegurar la muerte rápida y eficiente de la célula diana. Posteriormente, el CTL/NK estará listo para una nueva interacción.

En paralelo, la proteólisis del complejo SET puede sustentar la liberación de otro de sus constituyentes, la exonucleasa 3'-5' TREX1, la cual, exacerbará el daño genómico producido por NM23-H1, al impedir la realineación de los extremos de las dos cadenas de ADN mediante la remoción de las bases en el extremo 3' libre, lo que a efectos prácticos imposibilita la eventual reparación del ADN y define el curso apoptótico de la célula diana [116]. Otros sustratos de la granzima A son las láminas A-C, cuya proteólisis conduce a la disruptión nuclear [117].

Por su parte, la granzima B desencadena la ruta canónica de apoptosis mitocondrial, al procesar proteolíticamente a la proteína agonista de muerte de dominio interactivo BH3 (BID), lo que deja expuesto un residuo intracatenario de glicina, cuya posterior N-miristoilación, deviene en su translocación a la membrana mitocondrial externa [118]. Esta locación activará a las proteínas BAX y BAK, al producir cambios conformacionales que determinarán su oligomerización bajo una configuración de poro [119] el cual, derogará la permeabilidad transmembrana y conducirá a la liberación a citoplasma, del factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1) y del citocromo c.

Una vez en citoplasma, estas proteínas oligomerizarán configurando a un complejo proteico adaptador denominado apoptosoma, capaz de reclutar mediante interacciones entre los dominios CARD de Apaf-1 y el extremo N-terminal de procaspasa-9, hasta a 4 unidades de esta última en forma simultánea; cuya agregación, deviene en una holoenzima de elevada actividad catalítica, que perpetrará la activación de caspasa-9 por un mecanismo que hasta el momento no ha sido debidamente caracterizado [120]. Por su parte, la caspasa-9 operará como iniciadora, teniendo por blancos de escisión a las caspasas efectoras 3 y 7, cuya actividad proteolítica incluye a múltiples sustratos nucleares, que una vez escindidos, determinan la característica morfología nuclear de la apoptosis: con condensación de la cromatina y fragmentación del ADN nucleosomal [121,122]. La granzima B, también puede amplificar la señal apoptótica al activar directamente a las caspasas efectoras o actuando nivel de núcleo en dianas como ICAD, cuya

escisión suprime su influencia inhibitoria sobre la ADNasa CAD, dejándola libre para acometer hidrólisis en el ADN internucleosomal [123].

B. Mecanismos de evasión a la inmunovigilancia.

La inmunovigilancia es un proceso falible. Desde el surgimiento de un cáncer, este se encuentra en constante interacción con diversas facetas del sistema inmunológico, lo que si bien puede resultar en una supresión del crecimiento tumoral a expensas de la destrucción de las células de cáncer. Sin embargo, también puede devenir en el eventual fracaso de dichos controles gracias, en parte, a la alta tasa mutacional y la heterogeneidad del cáncer [124], con la peligrosa implicación de generar una potente presión selectiva en favor de las células más aptas para desplegar comportamientos evasivos en un anfitrión inmunocompetente [125,126].

Dicha ambivalencia remite al término de inmunoedición, el cual postula un doble papel a los mecanismos de inmunovigilancia en la compleja interacción entre anfitrión y tumor [127]. Aunado a lo anterior, las células de cáncer detentan propiedades biológicas que les permiten establecer interacciones colaborativas con “células accesorias” aparentemente normales de la vasculatura hematógena y linfática, con células de soporte mesenquimatosas específicas de tejido e incluso, con células del sistema inmune innato y adquirido [30,128]. Esta emergente sociedad multicelular conforma al TME, que mediante diversos mecanismos contribuye al desarrollo de cada una de las señas de identidad del cáncer, incluida la evasión de los controles inmunológicos [26,129]. En este sentido, la respuesta inflamatoria constituye una de las facetas inmunes, que mejor ilustran la ambivalencia de la inmunoedición [82].

Como mecanismo de defensa universal, la inflamación es activada en respuesta a una lesión tisular de cualquier índole, en interés de asegurar la destrucción o el aislamiento expedito de la fuente subyacente a la alteración y así, reestablecer la homeostasis [130]. El proceso inflamatorio también desempeña un papel fundamental en el aclaramiento de células dañadas o muertas [131], así como en la

respuesta montada contra patógenos infecciosos a través de neutrófilos y macrófagos, cuya expresión membranal de receptores de tipo Toll (TLR) les confiere la capacidad de detectar patrones moleculares/señales de peligro que tipifican a virus y bacterias [132] y, en el caso de la inflamación no estéril, perpetrar su fagocitosis y subsecuente aniquilación mediada por la producción de óxido nítrico (NO). Este reacciona ávidamente con metales de transición y tioles (respectivamente presentes en metaloproteínas y enzimas dependientes de tiol de la cadena respiratoria) a manera de un veneno metabólico, eficaz contra microorganismos dependientes de respiración [133]. Adicionalmente y operando como un mediador gaseoso lábil, el NO eleva la vascularización local y estimula la extravasación de células inmunes mieloides y linfoides [82].

Alternativamente, en caso de que el proceso infamatorio fracase en la eliminación del agente lesivo y la homeostasis no pueda ser restaurada, la inflamación se tornará crónica y los elevados niveles de NO sustentarán reacciones con el oxígeno molecular y el anión superóxido (O_2^-), que conducirán a una excesiva producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) [134] y oxígeno [135]. El eventual desequilibrio respecto a los mecanismos de defensa antioxidantante y de reparación del ADN, pueden tanto favorecer la transformación maligna de células locales [136], como promover la progresión de un cáncer preexistente [137], ya sea generando cambios en el TME o actuando a nivel sistémico, al producir condiciones propicias para la habitabilidad de células de cáncer en órganos distantes [138,139]. Dicho en otras palabras, si la inflamación aguda no puede sustentar la eliminación o el equilibrio (latencia) de un cáncer, la inmunoedición resolverá a favor de la supresión de los controles inmunológicos [140,141] por medio de una diversidad de mecanismos que atañen tanto a células de linaje mieloide [128], como de linfoidal [84].

I. Cooptado e inmunosupresión de células mieloides.

Un ejemplo representativo de colaboración entre el cáncer y células mieloides, lo ilustran los macrófagos CD68⁺, que destacan como las células infiltrantes más

abundantes en el TME, llegando incluso a constituir más del 50% de la masa tumoral en ciertos cánceres [142], cuya abundancia de macrófagos, correlaciona con una pobre respuesta clínica y pronósticos más adversos [143–145]. Sin embargo, los macrófagos ejercen influencias pleiotrópicas según las señales microambientales y el estado de activación que estas determinen. Al respecto, se reconocen dos subpoblaciones generales de macrófagos tipificadas como M1 y M2. Los macrófagos M1 son clásicamente activados por compromiso con TLR [146], así como por TNF- α producido por las APCs tras el reconocimiento antigenico; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IFN γ , principalmente producidos por células NK y células Th1 [147], así como por LPS, endotoxina y principal componente de la membrana plasmática de bacterias Gram negativas [148].

En contraste, los macrófagos M2 son alternativamente activados por infecciones fúngicas y helmínticas; TGF- β , así como por las antiinflamatorias IL-4, IL-10 y IL-13, producidas por células Th2 y células B efectoras de tipo 2 (B E 2), incluso bajo ciertas condiciones estériles [142,147,149,150]. Una vez que los agentes de activación prevalentes inciden sobre sus receptores afines, a saber, tirosina quinasas de factores de crecimiento, citocinas, adipocinas o PRRs, estos transducen sus señales inflamatorias/metabólicas con concreción hacia la vía de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt/mTOR [151], cuya activación en macrófagos inhibe las respuestas fenotípicas M1, al regular positivamente la expresión y retroalimentación autocrina de la citocina antiinflamatoria IL-10 [152,153], que también media la inactivación por fosforilación (Ser21 de la subunidad α y Ser9 de la subunidad β) de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), una serina/treonina quinasa de prolífica actividad intracelular que, en asociación con la proteína andamio Axina y la supresora tumoral proteína asociada a poliposis adenomatosa coli (APC), conforma el complejo de destrucción de β -catenina [154]. Dentro de esta GSK3 fosforila a β -catenina (previamente cebada por la caseína quinasa 1 a nivel de Ser45), en los residuos Thr41, Ser37 y Ser33 [155], determinando su reconocimiento por la proteína con repetición de β -transducina (F-box beta-TrCP) que por su parte, media

el reclutamiento de β -catenina por la ligasa de ubiquitina, a fin de proceder a su degradación proteosomal [156]. Dado que la actividad transcripcional de β -catenina es causa subyacente de la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 [153,157–159], la inactivación enzimática de GSK3 podría favorecer la señalización de β -catenina y favorecer la polarización de macrófagos M2 en el TME.

Durante la inflamación aguda subyacente al surgimiento de un tumor, los macrófagos M1 despliegan una amplia actividad secretora que incluye a las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 e IL-12; a la tumoricida TNF- α ; a las quimiocinas CXCL9 y CXCL10, así como a las RNS. Su acción colectiva deviene en la ejecución y amplificación de un abanico de respuestas antimicrobianas y tumoricidas, al mismo tiempo que se potencia la respuesta inmune adaptativa mediada por células Th1 y su fomento a la presentación antigénica [149,160]. En adición, los M1 expresan grandes cantidades de MHC-II y del receptor coestimulador CD86, lo que también les faculta y afina para la presentación antigénica a los CTL [94]. Sin embargo, la liberación sostenida del cóctel inflamatorio de los macrófagos M1, produce daño tisular y una cronicidad inflamatoria que eventualmente, desencadenará procesos en gran medida fisiológicos que contravendrán la actividad citotóxica de las células T y otros efectores (Figura 8), a fin de aminorar el daño tisular en nombre de la homeostasis [125]. La puesta en marcha de esta contramedida, incluye la activación de la vía canónica de Wnt/ β -catenina, lo que se traduce en un potente estímulo para la polarización de macrófagos a un fenotipo M2 [153,155,157,158] los cuales, a diferencia de los M1, son deficientes en la presentación antigénica, pero eficaces supresores de las respuestas de tipo Th1 [150] debido a que su actividad secretora obra en favor de respuestas antiinflamatorias y cicatrizantes propias de la fase de resolución de la inflamación (reparación).

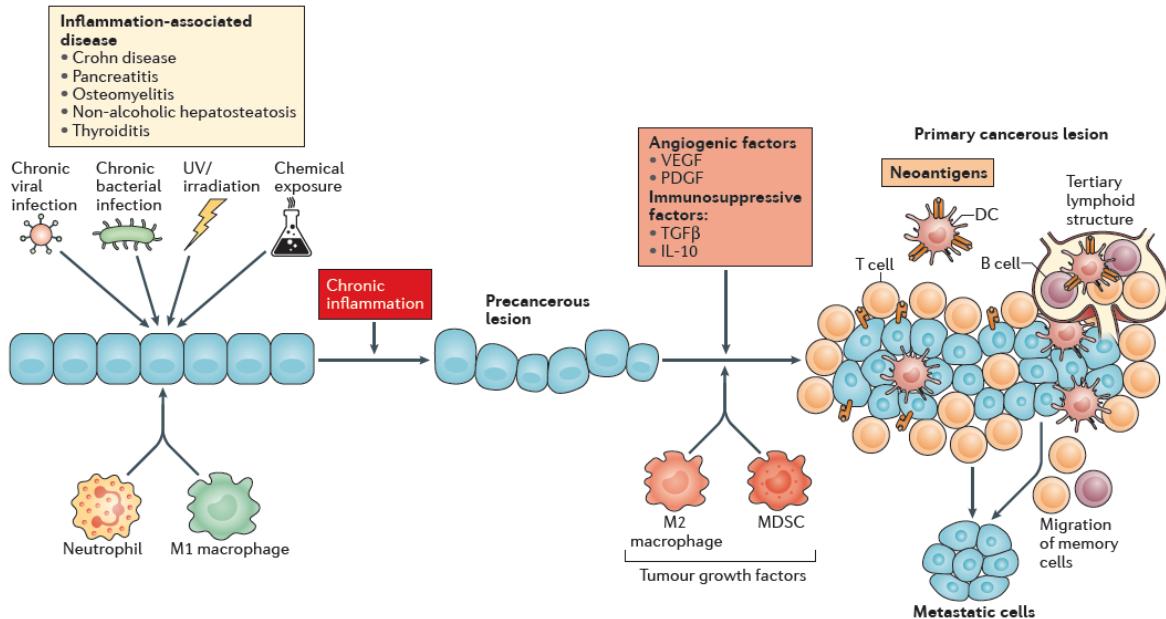


Figura 8. Elementos principales de la inflamación asociada al cáncer (Fridman y col., 2017 [82]). La persistencia de agentes lesivos biológicos, físicos o químicos, desencadena la infiltración de células inmunes innatas, cuya actividad sostenida es causa de inflamación crónica e inestabilidad genómica que puede degenerar en lesiones precancerosas, a menudo contenidas por efectores inmunes locales. Con el eventual surgimiento de macrófagos M2 y células mieloídes inmaduras con actividad inmunosupresora (MDSC), el infiltrado inmune depone progresivamente su papel en la inmunovigilancia, para sustentar la progresión tumoral. Una vez que los controles inmunitarios locales han fracasado y la metástasis es posible, las células de memoria cebadas con neoantígenos a nivel de las TLS emergen como último bastión de control inmune, ya sea actuando localmente en el tumor primario o accediendo a la circulación general, en aras de arremeter contra metástasis individuales.

Entre los productos secretados por los M2 se incluyen el inmunosupresor y profibrótico TGF- β , toda una batería de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), factor de crecimiento placentario (PGF) y el proangiogénico factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); asimismo, los M2 son fuente tanto de las citocinas inflamatorias IL-1 e IL-6, como de la antiinflamatoria IL-10 [161,162].

Como resultado de la modulación de tales poblaciones inmunes, las señales difundidas en el TME cambian en forma sustancial [163], favoreciendo progresivamente a las respuestas inmunes de “tipo 2” a cargo de células T_{Reg}/T_{h2} [164] y células B reguladoras (B_{Reg}) o B_{E2} [165]. Estas establecen un prominente estado antiinflamatorio que, al coexistir con los múltiples factores de crecimiento producidos por los macrófagos M2 [153], es causa de una exacerbada mielopoyesis

de emergencia, cuyos productos aberrantes se diseminan por sangre periférica y tejidos linfoides, a manera de una heterogénea población de células de origen granulocítico (polimorfonuclear) o macrofágico (monocitico), caracterizadas por presentar un fenotipo de superficie inmaduro ($CD11b^+GR1^{\text{Alto}}LY6C^{\text{Bajo}}LY6G^+CD49d^-$ y $CD11b^+GR1^{\text{Medio}}LY6C^{\text{Alto}}LY6G^-CD49d^+$, respectivamente), así como una potente actividad inmunosupresora [128,166,167]. Conocidas colectivamente como células mieloides inmaduras con actividad inmunosupresora (MDSC, por sus siglas en inglés) [168], estas células infiltran rápidamente al TME rico en citocinas quimiotácticas e IL-1 β derivada de tumor [169,170] en donde, junto a los macrófagos M2, estimularán la angiogénesis tumoral, la adquisición de fenotipos invasivos entre las células de cáncer [30,153,171], así como la disfunción de linfocitos efectores en el infiltrado inmune (Figura 9).

Adicionalmente, los tejidos tumorales pueden inducir directamente la polarización de macrófagos CD68 $^+$ al fenotipo M2, mediante la expresión de ligandos de Wnt [157,159] cuya señalización conduce al desacoplamiento del complejo de destrucción de β -catenina y al cese de su inhibición mediada por GSK3, lo que mejora sustancialmente la vida media de β -catenina, su importación a núcleo, así como su actividad transcripcional [155].

Pese a lo anterior, es preciso señalar que el término “macrófago” designa a un grupo heterogéneo de células fagocíticas, de variada ontogenia y perfil funcional. En este sentido, los fenotipos M1 y M2 representan tan sólo los extremos de todo un espectro y como tal, su concepción dicotómica podría ser inapropiadamente reduccionista [30], toda vez que los genes que tipifican a cada fenotipo son a menudo coexpresados por células individuales más tendientes al centro del espectro [172].

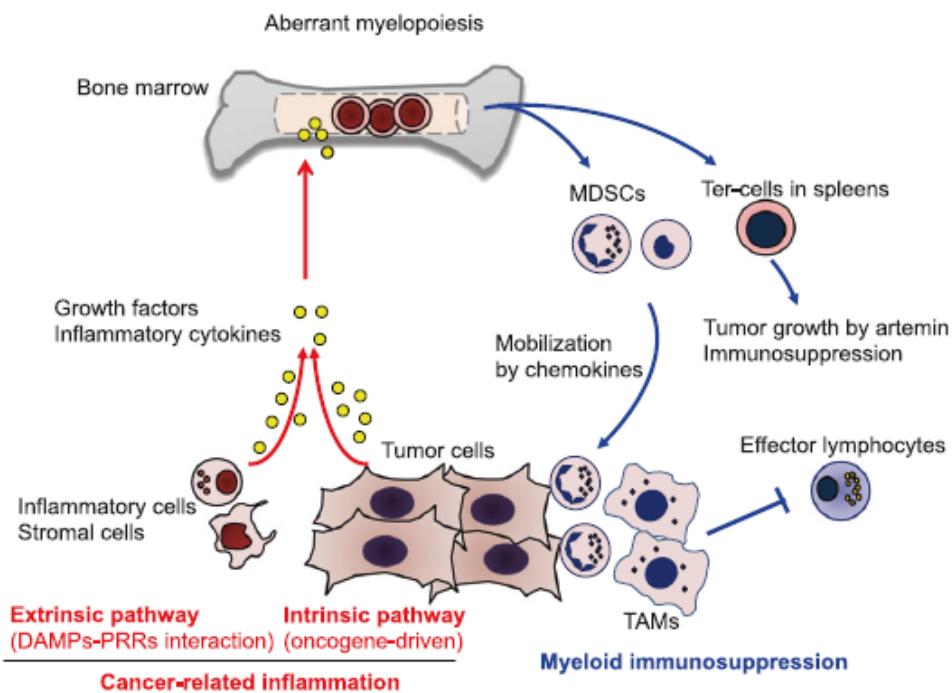


Figura 9. Inflamación asociada al cáncer e inmunosupresión mieloide (Nakamura y col., 2020 [128]). Procesos intrínsecos (de origen oncogénico) y extrínsecos (mediados por la interacción entre ciertos DAMPs y los PRR expresados por células en el estroma tumoral y algunos tipos de células de cáncer) confluyen en la liberación de una variedad de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, capaces de perturbar la mielopoyesis en la médula ósea y conducir a la generación de MDSCs; las cuales, serán reclutadas mediante citocinas quimiotácticas a los tejidos tumorales, en donde se promoverá su diferenciación a macrófagos asociados a tumor (TAM). Colectivamente MDSCs y TAMs, operarán como una barrera contra la inmunidad antitumoral de los linfocitos efectores. De forma concomitante, células progenitoras eritroides protumorales (células Ter) surgen como resultado de una eritropoyesis aberrante en el bazo, con la capacidad de promover el crecimiento tumoral a través de la expresión de artemina, así como la disfunción (mediada por ROS) de las células T.

II. Mecanismos de subversión linfoide.

Por su parte, las funciones antitumorales de los efectores linfoides requieren para una apropiada ejecución, de la superación de una serie de restricciones tanto fisiológicas como de origen tumoral. Su ocurrencia a nivel del TME puede sustentar la inmunoevasión del tumor a distintos niveles (Figura 10). Dentro de los mecanismos mejor caracterizados, destacan la disfuncionalización de las DCs a expensas de hipoxia intratumoral [173] o mediada por sobreacumulación lipídica secundaria a estrés del ER [174].

Dentro del repertorio de DC, las células del subtipo cDC1 destacan por su capacidad para establecer interacciones colaborativas con células T_h1, lo que les confiere un

papel protagónico de cara a la activación de una respuesta efectora antitumoral [175]. Sin embargo, se ha observado que, en caso de que las cDC1 capturen antígenos normales del nicho microambiental, su posterior presentación a células T CD4⁺ en el ganglio linfático drenante determinará la expansión de estas, a manera de células T_{Reg}. Si bien, evolutivamente conservada para conducir a la resolución de la inflamación, la influencia inmunosupresora de las células T_{Reg} se traduce en una importante fuerza de oposición a las funciones antitumorales de los CTLs en el contexto del TME [30]. Siendo así que, la captación y presentación de neoantígenos tumorales, constituye una condición necesaria para el óptimo cebado y la expansión de CTLs y células T_{CM} [176].

Por su parte, además de afrontar la inmunosupresión mieloide en el TME, los CTL deberán hacer frente a los mecanismos de inmunosupresión intrínsecos de las células de cáncer [177], tales como el cese en la expresión del MHC-I y la imposibilidad de su reconocimiento por parte de los CTLs [178], así como el incremento en la expresión de moléculas inhibidoras de punto de control inmunológico, tales como el CTLA-4, el PD-1 o su ligando PD-L1, cuya interacción con los CTLs suprime sus funciones efectoras [179].

Al respecto, las terapias de bloqueo de puntos de control inmunitario contra dichos blancos moleculares, permiten la reactivación de algunas facetas de la inmunovigilancia, al explotar la relativa abundancia de antígenos tumorales de cánceres con alta carga mutacional tumoral (TMB, por sus siglas en inglés) [180,181]. El éxito de estos agentes en la clínica ha sido tal que, a día de hoy, la presencia de los ICI es ubicua en la primera línea de tratamiento contra numerosas neoplasias malignas, ya sea como monoterapia o en combinación con otro agente del mismo tipo [182,183] o diferente; ya sea un quimioterapéutico [184], un inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) [185] y/o un agente antiangiogénico [186].

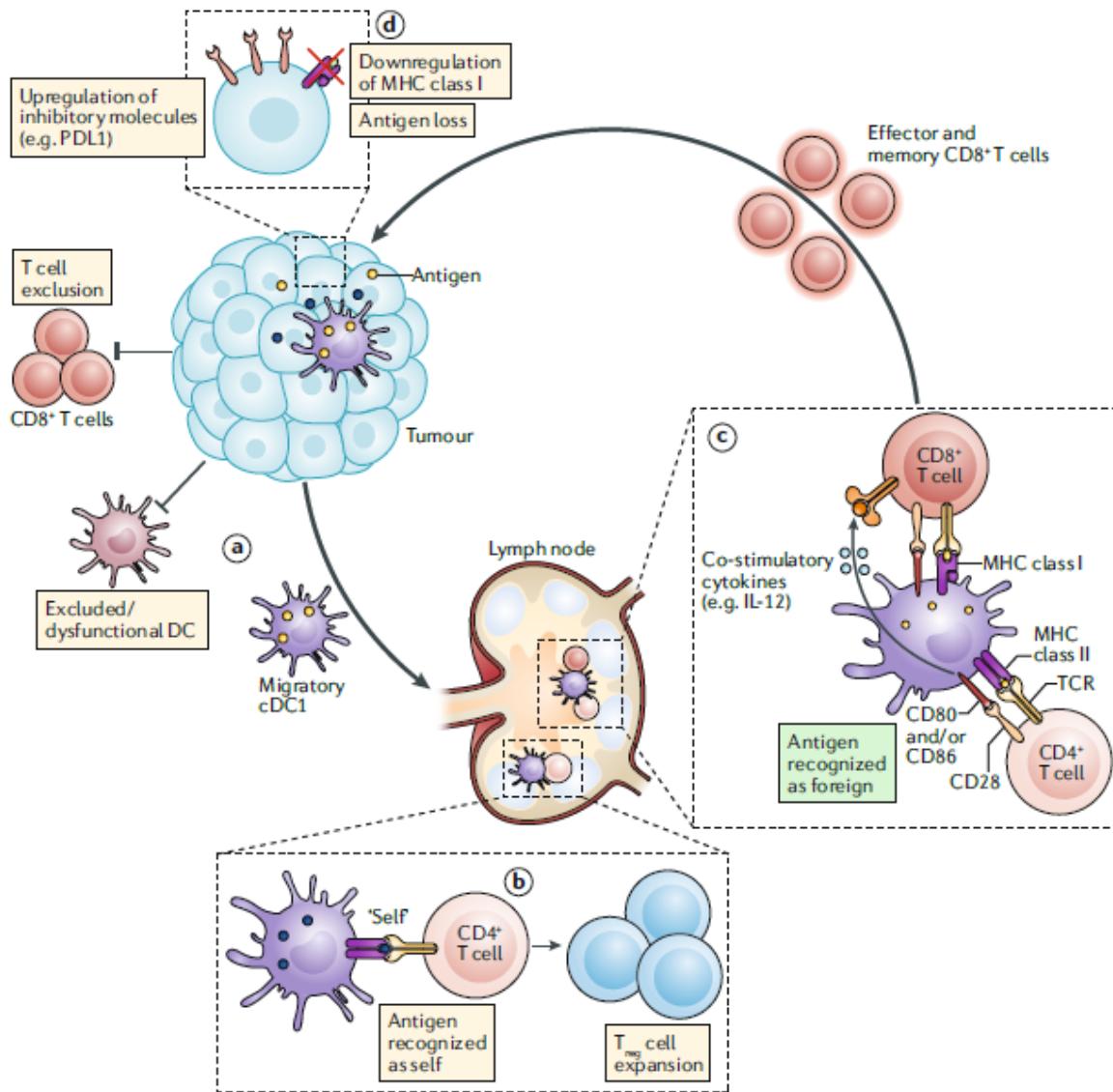


Figura 10. Cebado de células T con antígenos tumorales y mecanismos de subversión (Garner y col., 2020 [30]). (a) Tras la captura de un antígeno tumoral *in situ*, las DC migran a los ganglios linfáticos drenantes, a fin de perpetrar la presentación del antígeno, no obstante, el proceso puede ser obstaculizado por la inactivación postraduccional de quimiocinas como CCL2 y la consecuente derogación del reclutamiento de las DC, confinándolas al exterior del TME o bien, induciendo su disfunción mediante hipoxia intratumoral y/o sobreacumulación lipídica. Una vez que la cDC1 accede al ganglio linfático drenante, (b) un eventual reconocimiento del antígeno como “propio” (círculos azules) por parte de las células T CD4⁺ *naive*, determina su expansión clonal como células T_{Reg}. Alternativamente, (c) si el neoantígeno conjugado a MHC-II es reconocido como “exógeno” (círculos amarillos) por las T CD4⁺ a través de su TCR, interacciones concomitantes establecidas entre los coreceptores CD80/CD86 de las cDC1 y ligandos coestimuladores CD28 de las T CD4⁺, se traducirán en un potente estímulo para la liberación de IL-12, cuya actividad adyuvante promoverá el cebado óptimo de un linfocito T CD8⁺, dotado con una citotóxicidad superior en magnitud y calidad. Tras haberse consumado el cebado de CTLs y T_{CM}, estos migran hacia el tumor para ejercer sus funciones efectoras. Sin embargo, desafíos como el cese en la expresión del MHC-I y la expresión de moléculas inhibidoras como el PD-L1 pueden limitar la efectividad de la respuesta inmune antitumoral.

2.2 El cáncer colorrectal.

El CCR constituye uno de los cánceres más predominantes a nivel mundial [187]. Factores como el envejecimiento poblacional, la generalización de malos hábitos alimenticios, el tabaquismo, el consumo de alcohol, el sedentarismo y la obesidad, proyectan la morbimortalidad del CCR a los primeros lugares, especialmente en las poblaciones humanas de los países occidentales [188,189].

Como toda enfermedad oncológica, el CCR deviene de la progresiva acumulación de mutaciones genéticas y perturbaciones epigenéticas que sustentan, tanto la activación oncogénica, como la derogación de los supresores tumorales; atributos presentes en toda una diversidad de lesiones neoplásicas tempranas del colon que incluye a los adenomas, pólipos serrados y focos de criptas aberrantes [190]. La inestabilidad genómica y la desregulación epigenética, impulsan la diversidad fenotípica de las células transformadas del colon, a través de rondas de expansión y selección clonal que, en última instancia, favorecen la supervivencia de las células de cáncer con los fenotipos más agresivos [31], cuya progresión se verá influenciada por las señales presentes en el microambiente. Este principio, ha dado lugar al postulado de que el infiltrado inmune en el CCR, podría suponer utilidad pronóstica junto a la estadificación por el sistema TNM [191].

Por su parte, la transición evolutiva de una célula epitelial del colon a un adenocarcinoma, está sujeta a un proceso relativamente bien conservado, de cambios genéticos y epigenéticos con concreción histológica. Según el “modelo clásico” el proceso inicia con la formación de un pólipos, devenido de una cripta aberrante; que evoluciona a un pequeño adenoma temprano (<1 cm), de histología tubular o túbulovellosa. Posteriormente, sobreviene su progresión a adenoma avanzado con un tamaño >1 cm y/o histología vellosa que finalmente, evolucionará a CCR en un tiempo típico de entre 10 y 15 años en total; aunque bajo condiciones como el síndrome de Lynch, la progresión a CCR puede transcurrir más rápidamente [192].

Además de los pólipos adenomatosos tubulares y túbulovellosos, otro subconjunto de lesiones conocidas como pólipos serrados sésiles (que comprenden entre el 5 y el 10% de todos los pólipos) emergen como resultado de diferentes eventos moleculares de iniciación respecto al modelo clásico, pero también pueden progresar a CCR (Figura 11).

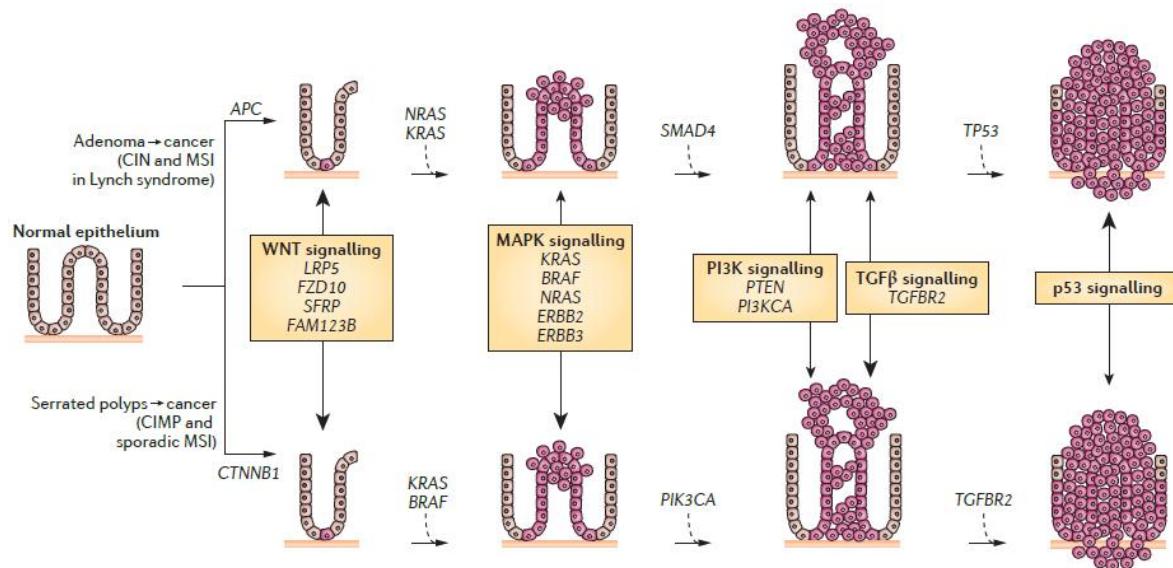


Figura 11. Del pólipos al cáncer colorrectal (Kuipers y col., 2015 [5]). Representación de dos sucesiones de eventos moleculares subyacentes a la transformación maligna de células epiteliales del colon, su progresión a focos de criptas aberrantes, pólipos en estadios temprano y avanzado, su subsecuente progresión a cáncer temprano y finalmente, avanzado. La vía clásica (superior) consiste en el desarrollo de adenomas tubulares y su eventual progresión a adenocarcinoma. Por su parte, la más recientemente caracterizada vía alternativa (inferior), señala la progresión de pólipos serrados a CCR serrado. Los genes mutados o epigenéticamente desregulados en cada sucesión son señalados. Nótese que algunos genes toman parte en ambas secuencias, mientras que otros, tales como las mutaciones de BRAF y el fenotipo CIMP, son exclusivos de la vía alternativa. Asimismo, se presentan las vías de señalización desacopladas en cada vía (el grosor de la punta en cada flecha indica su relevancia en cada vía de progresión). CIN: inestabilidad cromosómica; CTNNB1: catenina- β 1; FAM123B: familia con similitud de secuencia 123B; FZD10: receptor de clase frizzled 10; LRP5: proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad; PI3KCA: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinas catalítica subunidad- α ; PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina; SFRP: proteína secretada relacionada con frizz; SMAD4, miembro 4 de la familia SMAD; TGFBR2: receptor de TGF β -2.

Por lo general, los pólipos serrados acontecen en el colon derecho (en el ciego y las porciones ascendente y transversa) y suelen presentar inestabilidad de microsatélites (MSI), así como datos de inestabilidad epigenética, caracterizada por una excesiva y aberrante metilación del ADN en las islas CpG (fenotipo CIMP). Alternativamente, los pólipos surgidos en las porciones izquierdas del colon

(descendente, sigmoide y recto), se presentan estables en microsatélites y con una mayor ocurrencia de mutaciones en KRAS [193,194].

La heterogeneidad mutacional en el CCR es elevada y está sujeta a epistasis. Uno de los puntos de mayor concreción de dichas alteraciones, es la vía Wnt/β-catenina/EGF/MAPK/PI3K. Si bien, las alteraciones en Wnt y APC destacan entre los eventos de iniciación más comunes, las subpoblaciones resultantes suelen progresar a partir del desacoplamiento de otras vías, habitualmente Ras/Raf/MAPK; PI3K/Akt/mTOR y la vía del TGF-β [195,196]. Al margen del papel etiológico que desempeñan dichas alteraciones genéticas, la mayor parte de los CCR son esporádicos y, ante todo, remiten a la persistencia de los factores de riesgo ambientales que caracterizan a las sociedades occidentales [189].

2.2.1 Epidemiología.

El CCR constituye una neoplasia de alto impacto en términos de morbimortalidad. Se estima que, en 2015, se suscitaron 1,360,000 nuevos casos a nivel mundial y 694,000 personas fallecieron a causa de esta malignidad. En 2018, la cifra de muertes ascendió a 880,792, lo que hace del CCR el 4º cáncer más frecuente y el tercero más letal para ambos sexos (Figura 12) [187], en un marco de incidencia que se prevé siga aumentando a nivel mundial [197], más notoriamente en los países de ingresos bajos y medianos, cuya creciente occidentalización, conlleva una mayor presencia de los factores de riesgo ambientales [189].

En la población hispana residente en los EE. UU., se estima que anualmente 14,400 hombres y mujeres son diagnosticados con CCR y alrededor de 4,200 de ellos, mueren a causa de la enfermedad [198,199]. Aunado a lo anterior, durante los últimos 10 años se ha observado un incremento en la incidencia de esta neoplasia en menores de 40 años [198]. México no es la excepción, pues el CCR se ubica en la tercera posición, al tiempo que supone la cuarta causa de muerte asociada a la enfermedad, con una contribución de alrededor del 10% de las muertes totales por cáncer en el país [200].

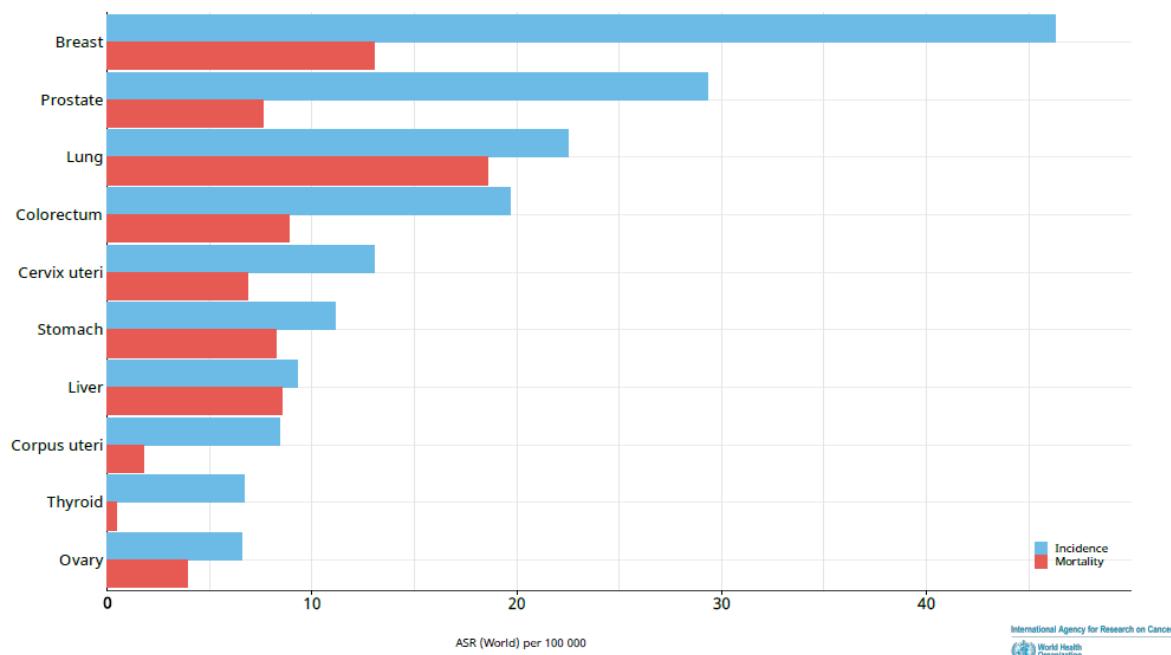


Figura 12. Tasas mundiales estandarizadas por edad (ASR) de la incidencia y mortalidad por cáncer en ambos sexos [187]. El cáncer colorrectal se posiciona como la cuarta malignidad más frecuente a nivel mundial, al tiempo que constituye la tercera más letal. ASR: medida resumida de la tasa que tendría la población, si tuviera una estructura de edad estándar.

En el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan), el 18% de los pacientes con CCR son menores de 40 años y su pronóstico suele ser adverso, pues es un tumor biológicamente más agresivo y con menor porcentaje de respuesta, en contraposición a la población de mayor edad [201]. Lo anterior, incluso a pesar de los avances en la terapia médica y quirúrgica, cuyo impacto en las tasas de curación y sobrevida ha cambiado poco durante las últimas décadas [5].

Un estudio transversal (1989-2013) realizado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reveló que mientras el riesgo de muerte se redujo discretamente en la generalidad de los cánceres después de 2004, el cáncer de colon se erigió como excepción (Figura 13), al registrar incrementos en las tasas de mortalidad para todos los sectores poblacionales [202]. Consistentemente, Sánchez-Barriga [203] encontró que durante el periodo 2000-2012, se registraron 45,487 defunciones por cáncer colorrectal en México, en tanto que las tasas de mortalidad ajustadas por edad por cada 100,000 habitantes, se incrementaron de 3.9 a 4.8, tomando como base la distribución etaria a nivel global.

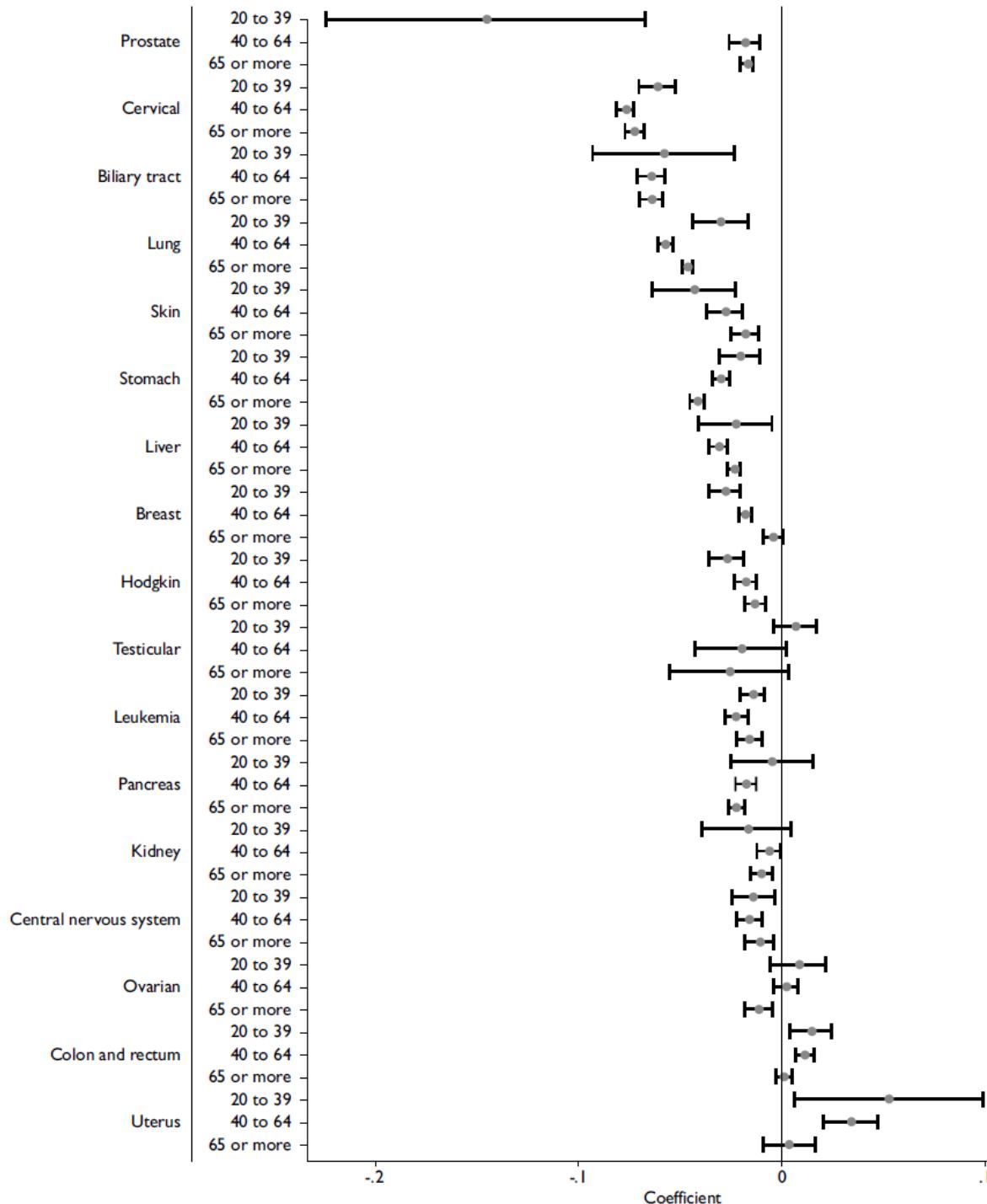


Figura 13. Cambios anuales en las tasas de mortalidad de los principales cánceres por grupo de edad en el IMSS, 1989-2013 (Borja-Aburto y col., [202]). En individuos con edades ≥ 20 años los cánceres que mostraron la mayor disminución fueron los de próstata, cuello uterino, vías biliares, pulmón, piel y estómago. En el sector de ≤ 64 años, los cánceres colorrectal y cervical mostraron tendencias al alza.

Más recientemente, en trabajo publicado por el Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP), Espinosa-Tamez y col., [204] revelaron que durante el periodo 1998-2018, la tasa de mortalidad por CRC persistió al alza, al registrarse incrementos anuales de 1.3% en mujeres y de 2.7% en hombres (Figura 14); siendo mayor en los estados más urbanizados al norte del país, probablemente debido a un mayor arraigo de factores de riesgo, principalmente dietarios. Pese a haberse detectado una menor mortalidad en individuos sin afiliación a servicios de salud, factores como la falta de accesibilidad a servicios diagnósticos y la afiliación post-diagnóstico podrían ser causa de infrarrepresentación de la mortalidad en este sector.

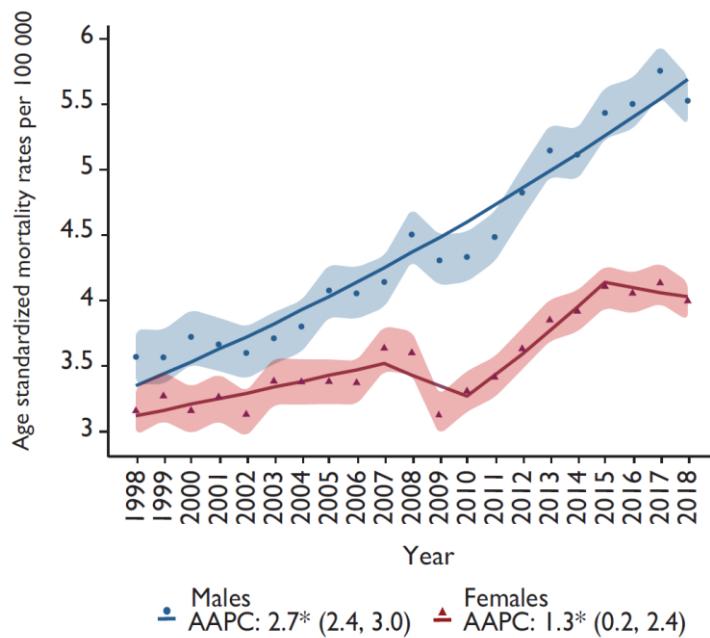


Figura 14. Tendencias de mortalidad por cáncer colorrectal por sexo. México, 1998-2018 (Espinosa-Tamez y col., [204]). Puntos y triángulos representan tasas de mortalidad estandarizadas por edad por 100 000 habitantes (Población estándar mundial de Segi). Las líneas continuas representan las tendencias modeladas de mejor ajuste (intervalos de confianza en área sombreada). El Cambio Porcentual Anual Promedio (AAPC, por sus siglas en inglés; IC = 95%) resume las tendencias para el período completo de 1998 a 2018. * $\alpha < 0.05$.

Colectivamente, 30 años de datos epidemiológicos disponibles, avalan una mortalidad creciente por CRC en México, revelando también la necesidad de implementar programas de cribado con pruebas como la de sangre oculta en heces

(FOBT, por sus siglas en inglés) bajo un enfoque estructurado, así como de incrementar los esfuerzos para el diagnóstico y derivación tempranos [202–204].

2.2.2 Manejo del cáncer colorrectal.

Para efectos de su tratamiento, el cáncer primario de colon y recto son dos entidades patológicas distintas que precisan de enfoques particulares, pues la ubicación del tumor conlleva implicaciones en las alternativas para su manejo [205]. En estadios no metastásicos de ambos casos, la cirugía constituye el principal tratamiento curativo y su resultado se define en función de la calidad I) de la cirugía, II) de la estadificación preoperatoria y III) de una adecuada selección del tratamiento [206]. Es convencionalmente aceptado que la ablación quirúrgica del CCR no metastásico debe realizarse en concordancia con los planos anatómicos embriológicos, de manera que tanto el tumor, como su afluente linfático directo sean eliminados [207].

En el caso del cáncer rectal, la radioterapia neoadjuvante (es decir, preoperatoria) y la quimioradioterapia, pueden reducir la carga tumoral y ocasionalmente, el estadio tumoral, por lo que su administración es ampliamente aceptada como parte del tratamiento del cáncer rectal [208]. Por el contrario, la terapia neoadjuvante no ha demostrado mejorar significativamente la respuesta de pacientes con cáncer de colon y, por lo tanto, no está indicada en su manejo [5].

Por otro lado, la quimioterapia adyuvante (también llamada complementaria) es parte de las pautas de manejo, especialmente en casos de cáncer de colon/recto de alto riesgo, tales como: tumores pobemente diferenciados, perforados o en tumores propagados a todas las capas del colon; casos de invasión linfática, perineural o a nichos vasculares; o cuando se extirpan con éxito menos de 12 ganglios linfáticos. Los principales esquemas farmacológicos consisten en 5-fluorouracilo y oxaliplatino por vía oral; y en leucovorina, 5-fluorouracilo y oxaliplatino por vía intravenosa [209].

Finalmente, las terapias de anticuerpos monoclonales dirigidos contra dianas específicas (EGFR; VEGF-A y otros factores de crecimiento angiogénicos), se indican en esquemas conjuntos al oxaliplatino e irinotecán, principalmente en pacientes con CCR metastático, cuya tasa de sobrevida ha mejorado durante los últimos 25 años, alcanzando una mediana de supervivencia general de hasta 30 meses en los ensayos clínicos [5]. Sin embargo, la tasa de supervivencia del CCR metastásico a 5 años cae hasta ≈12%, mientras que para el CCR general es ≈64% [198].

Ante esta realidad, persisten los esfuerzos por desarrollar nuevos agentes antineoplásicos, así como por mejorar la eficacia de los esquemas de intervención médica en el CCR [210]. De manera general, la evaluación de la eficacia de los nuevos desarrollos antineoplásicos se basa en las respuestas tumorales masivas. Este enfoque, sigue aplicándose a pesar de la incuestionable heterogeneidad del cáncer humano [52], lo que conlleva la peligrosa implicación de que la ablación tumoral completa, sucederá únicamente cuando la respuesta masiva del tumor, sea la de la subpoblación más resistente en todo el repertorio de células tumorales. De otro modo, la intervención terapéutica destruirá clones de cáncer y erosionará sus hábitats, pero también impondrá una potente presión selectiva, que favorecerá la expansión de los clones más resistentes y agresivos [42].

2.3 La inmunidad antitumoral como objetivo terapéutico en el cáncer colorrectal.

Existe la generalizada convención de que la inmunocompetencia del anfitrión, constituye un aspecto crítico para la completa erradicación de las lesiones neoplásicas [211–213]. Sin embargo, incluso a pesar de que al momento de su detección clínica, la mayoría de los cánceres han evadido ya la inmunovigilancia, la presencia de datos de actividad inmune residual en los especímenes patológicos (tales como subconjuntos de linfocitos T y otras subpoblaciones celulares en el infiltrado inmune, así como los patrones de su distribución en el tejido), suelen correlacionar con pronósticos más favorables en dichos pacientes [82].

Desafortunadamente, múltiples agentes quimioterapéuticos, tales como la mitomicina [214], mitoxantrona [215], ciclofosfamida [216], temozolomida [217], ifosfamida [218], doxorubicina [219], 5-fluorouracilo [220] y cisplatino [221] producen, a la par de su acción antitumoral y debido a su limitada especificidad, indeseables efectos inmunosupresores (principalmente mielosupresión) que pueden conducir a respuestas iniciales alentadoras, pero de corta duración [222].

En este sentido, el surgimiento de las terapias dirigidas ha contribuido a prolongar notablemente la vida de los pacientes oncológicos, especialmente de cáncer de pulmón [223] y melanoma [224]. Sin embargo, el CCR es una de las malignidades en que la inmunoterapia ha mostrado menor efectividad, a excepción de los fenotipos deficientes en reparación de desajuste y con alta inestabilidad microsatelital [225]. Al respecto, el CCR podría desplegar mecanismos novedosos de inmunosupresión que podrían limitar la eficacia de este tipo de abordaje. Recientemente, se observó que una mutación oncogénica común: KRAS^{G12D}, reprime la expresión del factor 2 regulador del interferón (IRF2), derogando su regulación negativa sobre la expresión de la quimiocina CXCL3, cuya abundancia, precipita al encuentro del receptor β de interleucina 8 (CXCR2) de las MDSC, estimulando su migración al microambiente tumoral, así como su acción inmunosupresora *in situ* [226]. Al margen de la baja responsividad del CCR a las inmunoterapias de bloqueo contra los puntos de control PD-L1/PD1 y CTLA-4 [225], la respuesta clínica del CCR con anti-EGFR (sin mutaciones posteriores al objetivo) y anti-VEGF-A es considerable [210,227].

Alternativamente, algunos agentes quimioterapéuticos, compuestos naturales y ciertas toxinas, han ganado atención debido a su capacidad para inducir un fenotipo no clásico de apoptosis [228,229] conocido como muerte celular inmunogénica (ICD, por sus siglas en inglés) [230,231], la cual permite reducir la celularidad de una masa tumoral al tiempo que se externaliza y/o libera al entorno extracelular, a un grupo heterogéneo de moléculas de residencia nuclear o citosólica, cuya capacidad para desencadenar respuestas inmunológicas les ha valido la

designación de DAMPs [213]. Entre los DAMPs mejor estudiados en la investigación preclínica del cáncer, se encuentran la proteína no histona de unión a ADN HMGB1, la calreticulina y la chaperona HSP-70; a cuya liberación operan como adyuvantes o señales de peligro para células del sistema inmune innato y adquirido [230] al ser capturados por los PRRs de las DC, su fagocitosis y posterior procesamiento, a fin de cometer su presentación cruzada a las células T CD4⁺ y CD8⁺, desencadenando su activación en favor de una respuesta inmune antitumoral específica [232,233]. Esta contravendrá los mecanismos de subversión inmune del cáncer y acometerá la destrucción de sus clones con mayor plasticidad respecto a los enfoques quimioterapéuticos tradicionales, al “convertir al cáncer en su propia vacuna” [229]. Actualmente, la capacidad de preservar y estimular la actividad inmune antitumoral, es considerada un atributo fundamental de todo antineoplásico candidato [231].

2.4 Lectinas de *Phaseolus acutifolius* y su potencial anticáncer.

Las lectinas son diversas clases de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, que detentan la capacidad de reconocer y unirse en forma altamente específica y reversible a moléculas de mono u oligosacáridos, ya sean libres o parte de la ultraestructura de glicoconjungados de todo tipo (a saber: glicoproteínas, glicolípidos o polisacáridos) a través de un dominio no catalítico, mejor conocido como sitio de unión a carbohidrato (SUC), el cual no produce alteración alguna en su ligando glicosilo [234,235]. Si bien, la presencia de las lectinas es ubicua en todas las formas de vida conocidas, son especialmente abundantes en las plantas, cuya diversidad de lectinas se ve implicada en una amplia variedad de procesos biológicos, algunos de los cuales suceden a nivel de señalización en las células vegetales [236].

Dentro de la pléthora de lectinas vegetales, posiblemente las mejor estudiadas son las de la familia *Leguminosae* [237], devenida en una fuente natural de múltiples lectinas de interés bioquímico, biotecnológico, agronómico, diagnóstico e inclusive, terapéutico [234–236]. Dichas aplicaciones, derivan de la especificidad con que las lectinas reconocen e interactúan con determinados glicoconjungados pues, incluso a

pesar de que todas las lectinas vegetales comparten una alta homología de secuencia, así como propiedades estructurales y fisicoquímicas similares [238], la exquisita especificidad con que las lectinas se unen a glicanos complejos, fue uno de los factores que detonaron el campo de la glicobiología moderna [239]. En este sentido, ciertas lectinas de leguminosas exhiben propiedades de unión potencialmente explotables en el diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de cáncer [234,236,240], debido a la expresión de O-glicanos aberrantes a nivel de la superficie celular y la posibilidad de transgredir aspectos de su fisiología, mediante la unión de ciertas lectinas [241,242].

En nuestro grupo de trabajo, una lectina eritroaglutinante extraída y purificada a partir de semillas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) ha sido intensivamente estudiada durante los últimos 13 años, debido a sus efectos citotóxicos sobre una diversidad de linajes celulares de cáncer [16–18]; sin que dicha propiedad, haya sido observada en tipos celulares no transformados [17,21]. Por ejemplo, los fibroblastos murinos embrionarios de la línea NIH/3T3, presentaron una tolerancia 10 veces mayor a una fracción cromatográfica rica en lectinas de frijol Tépari (TBLF), respecto a su contraparte con activación oncogénica de v-mos [17]. En este estudio, se observó que las células de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2) presentaron la mayor sensibilidad a la TBLF, al presentar la IC_{50} más baja (85 μ g de proteína/mL) en todo el espectro de células estudiado. Por lo que se optó por evaluar la toxicidad de la TBLF, antes de probar sus efectos contra el CCR en sistemas *in vivo*.

La evaluación de la toxicidad subcrónica de la TBLF fue conducida en ratas Sprague-Dawley de 15 semanas de edad, siguiendo un esquema definido a partir de los datos de resistencia a la digestión de la TBLF, administrando mediante cánula intragástrica 50 mg/kg de peso corporal, cada 72 h, durante 6 semanas. Los hallazgos incluyeron, reducciones transitorias en el consumo de alimento y en la ganancia de peso corporal; así como un discreto incremento en la población de granulocitos, que desapareció en la 4^a semana de tratamiento. Al no haberse

presentado datos de toxicidad en el panel de marcadores sanguíneos o en el análisis histológico de los órganos diana, este estudio concluyó que, a la dosis ensayada, la TBLF presentó baja toxicidad y buena tolerabilidad [23]. Posteriormente, Moreno-Celis y col. [19] evaluaron el efecto de la administración de TBLF bajo el esquema señalado, en animales con CCR inducido químicamente con dos agentes: 1,2-dimetilhidrazina (DMH) o azoximetano + dextrano sulfato de sodio (AOM/DSS). A la inspección histopatológica, el tratamiento con TBLF produjo una reducción significativa (~70%) en la frecuencia de lesiones premalignas en el experimento con DMH (Figura 15). Resultados similares se observaron en el experimento con AOM/DSS, al encontrar 50% menos focos de criptas aberrantes en el grupo tratado con TBLF. En correlación, incrementos en la expresión de caspasa-9 y en la abundancia de caspasa-3 fueron detectados por qPCR e inmunohistoquímica, respectivamente. Finalmente, se detectó una disminución en la señalización de Akt en el grupo tratado con TBLF, pese a que la forma fosforilada (Ser473) de la proteína persistió significativamente elevada respecto al grupo de control, lo que, en opinión de los autores, podría implicar a dicha vía en el proceso apoptótico.

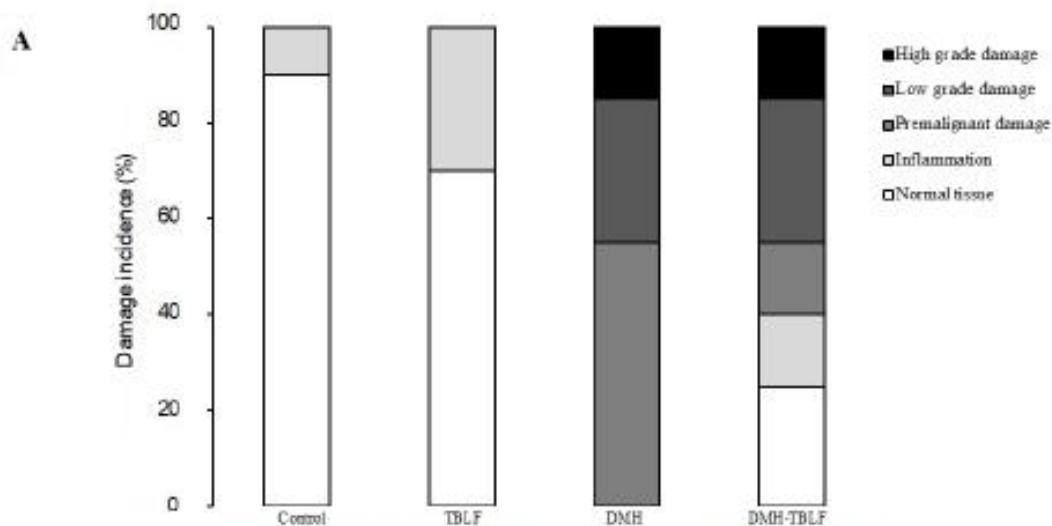


Figura 15. Incidencia de tumores en colon inducidos químicamente por DMH y tratados con TBLF (50 mg/kg) en días alternos, durante seis semanas (Moreno-Celis y col., 2017 [19]).

Un trabajo posterior, profundizó sobre los posibles efectos adversos de la TBLF, bajo el esquema de administración descrito, seguido de dos semanas de recuperación en ratas Sprague-Dawley de 5 semanas de edad. Los resultados incluyeron atrofia en las vellosidades del intestino delgado y a nivel de las criptas del colon [243], los cuales, permanecieron detectables incluso tras el periodo de recuperación. Adicionalmente, se observó hipertrofia transitoria en el páncreas exocrino, lo que fue asociado por los autores a un mecanismo de compensación digestiva, secundario al daño intestinal [24].

Sin embargo, el alto costo del proceso de obtención de la TBLF, así como los bajos rendimientos logrados tras su purificación, constituyan limitantes para la prosecución de la evaluación preclínica de la TBLF. Ante tal situación, se optó por generar un sistema de producción heteróloga independiente del frijol, a fin de contar con una plataforma de obtención continua. En 2020, Martínez-Alarcón [22] produjo la *rTBL-1*, proteína recombinante basada en la secuencia codificante de una de las lectinas responsables de la bioactividad de la TBLF, la cual, fue acoplada a una cola de hexahistidinas y fusionada en fase con el factor- α de *Saccharomyces cerevisiae*, bajo la regulación del promotor constitutivo PGAP. La construcción genética fue posteriormente insertada en la levadura *Pichia pastoris* y transferida a cultivo líquido en condiciones controladas, pertinentes para la producción de la proteína. Al finalizar el proceso, se obtuvo un rendimiento de 316 mg de lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius*, la cual, conservó la resistencia parcial a las condiciones digestivas de su contraparte nativa, pero no su actividad eritroaglutinante [244].

2.4.1 Nociones mechanistas de la *rTBL-1*.

Recientemente, Dena-Beltrán y col. [21], aportaron datos sobre la actividad citotóxica de la *rTBL-1* con respecto a la de la TBLF, así como de sus mecanismos de acción en dos líneas celulares de cáncer de colon humano. Tras 8 h de exposición a las respectivas concentraciones letales 50 (CL₅₀) de TBLF (55 µg/mL) y *rTBL-1* (56 µg/mL), células de adenocarcinoma colorrectal de la línea HT-29,

experimentaron incrementos estadísticamente significativos en la apoptosis celular, tanto bajo parámetros del ensayo de externalización de fosfatidilserina ($p \leq 0.001$), como en la activación proteolítica de caspasa-3, escisión de PARP-1 (cPARP-1) y liberación citosólica de citocromo-c por western blot. Ambos tratamientos, produjeron también arrestos al ciclo celular en G0/G1, en menoscabo de la población celular en fase S ($p \leq 0.05$); en magnitudes que no difirieron en forma estadísticamente significativa. Análisis adicionales en una segunda línea celular (SW-480, derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano) con elevada expresión de EGFR, demostraron que concentraciones de *rTBL-1* a partir de 61 µg de proteína/mL resultaron efectivas para sustentar la activación proteolítica de caspasa-3, incrementos en la escisión de PARP-1 (cPARP1), así como en la fosforilación (Ser139) de la histona HA2X, confirmando el curso apoptótico de las células tratadas. Estos efectos no fueron observados en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) sujetas al mismo tratamiento, inclusive a concentraciones de *rTBL-1* tan elevadas como 122 µg de proteína/mL. La refractariedad de las células CHO-K1 fue asociada por los autores a su fenotipo EGFR⁻, sin embargo, dadas las previsibles diferencias fenotípicas que supone un tipo celular no tumoral, la validez de las células CHO-K1 como modelo EGFR⁻ de referencia podría ser discutible.

Adicionalmente, incrementos en la fosforilación (Tyr1068) de EGFR fueron detectados tras 24 h de exposición, en manera dependiente de la concentración de *rTBL-1* ensayada. En este sentido, una cinética a 24 h de exposición a 61 µg de *rTBL-1*/mL reveló caídas en la abundancia de EGFR en los lisados celulares a partir de las 18 h de exposición, en correlación inversa con los niveles de fosforilación de STAT1 (Tyr701), así como de su regulador transcripcional, la proteína p38 (Thr180/Tyr182); las cuales registraron incrementos estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) a partir de las 18 h de exposición. Al respecto, ha sido observado que, bajo determinadas condiciones, la fosforilación de p38 puede sustentar la activación transcripcional de p53, así como de la ejecución de apoptosis mitocondrial. En este sentido, la apoptosis inducida por *rTBL-1* en células SW-480, fue concomitante con

incrementos en la fosforilación (Ser15) de p53. De manera consistente, Moreno-Celis y col. [18] previamente reportaron la fosforilación de p53 (Ser46) en la apoptosis inducida por TBLF, en células de CCR de la línea HT-29.

Finalmente, mediante un enfoque de pérdida de función, fue observado que el pretratamiento a 6 h con cloroquina-250 μ M (inhibidor de la vía lisosomal) sustentó una mayor preservación de EGFR en células SW-480 tras su tratamiento con *r*TBL-1 (61 μ g/mL durante 18 h); no así con el inhibidor de la vía proteasomal MG132-10 nM, demostrando que el tratamiento con *r*TBL-1 conduce a la degradación lisosomal de EGFR en células de cáncer de colon SW-480 [21].

Si bien, la posible interdependencia entre la fosforilación de EGFR y el nivel de apoptosis inducido por *r*TBL-1 no fue comprobada experimentalmente en este trabajo, la clara correlación observada entre los niveles de fosforilación de EGFR, Akt y p-38 respecto a la concentración de *r*TBL-1 empleada, aunada a la nula responsividad de las células CHO-K1 (EGFR⁻), dotaron de base racional a los autores para postular un eje fosfo-EGFR/fosfo-p38/fosfo-p53, como señalización sesgada y componente mecanístico de la apoptosis inducida por *r*TBL-1 [21].

Al respecto, dada la trascendencia que la postulación del EGFR como blanco molecular de la *r*TBL-1 podría adquirir, de cara al establecimiento de su indicación terapéutica y la salud de sujetos humanos en un entorno clínico, la comprobación experimental de la dependencia de EGFR en la apoptosis inducida por *r*TBL-1 sobre células de CCR permanece como un apremiante asunto por abordar, junto a la evaluación de su capacidad para producir respuestas antitumorales *in vivo*.

2.4.2 Efectos de las lectinas de frijol Tépari sobre el sistema inmunológico.

En ratas Sprague-Dawley sanas de 5 semanas de edad, el tratamiento con TBLF provocó un incremento transitorio en la proporción linfocitos-granulocitos ($p \leq 0.05$), así como un aumento discreto en la concentración sérica de la proinflamatoria IL-6 ($p \leq 0.05$), concomitante con un ligero aumento en la pulpa blanca esplénica

(aunque sin significancia estadística). A nivel del duodeno, el tratamiento provocó una elevación de IL-6 ($p \leq 0.05$) correlativa con un aparente incremento en las placas de Peyer. Colectivamente, estos datos indican una denotada inmunogenicidad secundaria al tratamiento con TBLF [24].

Si bien, los datos disponibles sobre el efecto de la TBLF en órganos y células inmunes podrían ser indicativos de las propiedades inmunogénicas de la molécula, antes que de la inducción de una respuesta inmune con pertinencia terapéutica, en el contexto del CCR tanto el incremento en la población de granulocitos, como la estabilidad en los valores de la serie mieloide observados durante y después del tratamiento con TBLF, podrían ser apreciables frente a la previsible mielosupresión producida por la quimioterapia con antimetabolitos como el 5-fluorouracilo [220] o agentes alquilantes como el cisplatino [221].

Al margen de lo anterior, un estudio llevado a cabo por Castillo-Villanueva y col. [245] encontró que una lectina de *Phaseolus acutifolius* variedad escumite, purificada a través de cromatografía de afinidad (empleando membranas glutaraldehizadas de eritrocitos del grupo sanguíneo O⁺), mostró una denotada bioactividad mitogénica sobre linfocitos humanos CD8⁺ y CD4⁺, tras ser expuestos a una concentración de 15 µg/mL, durante 72 h. Dicho efecto, fue tres veces mayor en las células CD8⁺, respecto a las CD4⁺. Este hallazgo, podría resultar especialmente atractivo en el contexto de la evaluación de la *rTBL-1* como agente antitumoral. Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo no encontraron evidencia de estímulo a la actividad mitótica de células inmunitarias circulantes, ni en el peso de órganos linfoideos (bazo y timo) de ratas tratadas con 50 mg de TBLF/Kg de peso corporal cada 72 h, durante 6 semanas [246,247]. Lo anterior, a pesar de haber encontrado un incremento transitorio ($p < 0.05$) en el número de centros germinales del bazo durante la cuarta semana del tratamiento [246].

Por otro lado, si bien los mecanismos de acción de la *rTBL-1* permanecen poco explorados, en un reciente análisis estructural *in silico*, Martínez-Alarcón y col., [20]

estimaron una probable asociación entre el SUC de la *rTBL-1* y el monosacárido ácido siálico. Después, mediante mutagénesis de sitio dirigido, fue confirmado que la sustitución por Gln, de dos de los residuos de Arg (103 y 130) candidatos para dicha asociación, afectó notablemente su bioactividad proapoptótica en células de cáncer de colon (HT-29) *in vitro*, lo que sugiere que los efectos proapoptóticos de la *rTBL-1* podrían depender de su asociación con glicoconjungados sialilados a nivel de la superficie de las células de cáncer [20]. Al respecto, ha sido observado que el nivel de sialilación correlaciona con una mayor competencia angiogénica [248], con la progresión tumoral por la vía de TGF- β 1 [249,250], así como con el establecimiento de microambientes tolerogénicos, mediados por la interacción entre glicoconjungados sialilados y macrófagos CD169 $^{+}$ [251]. En este sentido, la formación de un complejo “*rTBL-1-glicano sialilado*” en la superficie de los remanentes celulares, podría promover su captación por tal subpoblación de macrófagos, mejorando las posibilidades para su interacción con los PRRs de las DC, la presentación antigenica y el consecuente cebado de los CTL con neoantígenos tumorales.

Finalmente, células de cáncer de mama tratadas con *rTBL-1* experimentaron un incremento concomitante en la concentración citosólica de Ca $^{2+}$ [252], lo que constituye una condición de posibilidad para la ejecución de la ICD [231,253]. Sin embargo, los posibles efectos inmunogénicos desencadenados por la actividad antitumoral de la *rTBL-1* permanecen inexplorados.

3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, el CCR se ha convertido en uno de los cánceres más comunes, y se espera que su incidencia continúe aumentando en los próximos años. A pesar del refinamiento y diversificación de las estrategias terapéuticas, la mortalidad por CCR sigue siendo alta y el 40-50% de los pacientes finalmente muere a causa de la enfermedad. Actualmente, persisten los esfuerzos por desarrollar nuevos agentes y combinaciones que permitan respuestas terapéuticas más duraderas y un mejor pronóstico en estos pacientes.

Basados en la secuencia codificante de la proteína principal de una fracción de lectinas vegetales con propiedades antitumorales, TBLF, nuestro grupo ha desarrollado la lectina recombinante *rTBL-1*. Si bien, sus efectos proapoptóticos sobre células de cáncer de colon han sido asociados a un eje fosfo-EGFR/fosfo-p38/fosfo-p53, como señalización sesgada y componente mecanístico, la posible interdependencia entre la fosforilación del EGFR y la apoptosis inducida por *rTBL-1* no ha sido comprobada experimentalmente. Dada la trascendencia que la eventual postulación del EGFR como blanco molecular de la *rTBL-1* podría adquirir de cara al establecimiento de su indicación terapéutica y la salud de sujetos humanos en un entorno clínico, el estudio de la posible dependencia de EGFR en la apoptosis inducida por *rTBL-1* sobre células de CCR permanece como una apremiante cuestión por abordar, junto con la comprobación de su capacidad para producir respuestas antitumorales *in vivo*.

Por otro lado, si bien los datos disponibles sobre el efecto de la TBLF en órganos y células inmunitarias podría ser indicativa de las propiedades inmunogénicas de la molécula, antes que de la inducción de una respuesta inmune con pertinencia terapéutica, la posible participación del sistema inmunitario del anfitrión en los efectos antitumorales de la *rTBL-1* permanece igualmente inexplorada.

4. HIPÓTESIS

La actividad proapoptótica de *rTBL-1* afecta diferencialmente a células de cáncer de colon EGFR⁺ y EGFR⁻, y su concreción *in vivo*, sustenta respuestas antitumorales asistidas por células T en aloinjertos de cáncer de colon singénico establecidos en ratones BALB/c.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Investigar si la actividad proapoptótica de *rTBL-1* depende de la presencia de EGFR en el sistema celular y evaluar su capacidad para producir respuestas antitumorales en cáncer de colon singénico establecido en ratones con y sin células T, a fin de explorar su posible implicación en el proceso.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la CL₅₀ de *rTBL-1* sobre células de cáncer de colon EGFR⁺ (MC-38) y EGFR⁻ (CT-26).
- Determinar los efectos de *rTBL-1* sobre la apoptosis de células de cáncer de colon EGFR⁺ y EGFR⁻.
- Determinar los efectos del tratamiento con *rTBL-1* sobre la activación proteolítica de caspasa-3 y la escisión de PARP1 en células de cáncer de colon EGFR⁺ y EGFR⁻.
- Evaluar el efecto de *rTBL-1* sobre el crecimiento de tumores de cáncer de colon singénico (CT-26) implantados en ratones BALB/c (+/+) inmunocompetentes, en un escenario de entrega dirigida.
- Evaluar el efecto del tratamiento con *rTBL-1* sobre el crecimiento de tumores CT-26, implantados en ratones BALB/c (*nu/nu*) atípicos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales y seres vivos.

6.1.1 Material químico.

Los reactivos utilizados fueron Ni Sefarosa 6 Flujo Rápido (GE HEALTHCARE No. Cat. 17531802, Darmstadt, Alemania), Azul de Coomassie (Thermo Fisher Scientific™ No. Cat. 20278, Rockford, IL, EE. UU.), Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 modificado de ATCC (Gibco™ No. Cat. A1049101, Miami, FL, EE. UU.), Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco™ No. Cat. 11995065, Miami, FL, EE. UU.), Suero fetal bovino (SFB; Gibco™ No. Cat. 26140079, Miami, FL, EE. UU.), Antibiótico-antimicótico (Gibco™ No. Cat. 15240-062, Miami, FL, EE. UU.), Solución de aminoácidos no esenciales (Corning® No. Cat. 25-025-CI, Durham, NC, EE. UU.), Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-(1)] etanosulfónico (HEPES; Corning® No. Cat. 25-060-CI, 11995065, Durham, NC, EE. UU.), Tripsina + EDTA (0.05%) con rojo fenol (Gibco™ Núm. Cat. 25300062, Miami, FL, EE. UU.), solución de azul tripán 0.4% (Gibco™ No. Cat. 15-250-061, Miami, FL, EE. UU.), albúmina sérica bovina (ASB; Gibco® Sigma-Aldrich® No. Cat. 9048-46-8, Miami, FL, EE. UU.), kit de detección de apoptosis Annexin V & Dead Cell Kit Muse™ (Millex Millipore® No. Cat. MCH100105, Fremont, CA, EE. UU.), buffer de lisis celular NP40 (Invitrogen™ No. Cat. FNN0021, Carlsbad, CA, EE. UU.), coctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa (Abcam® No. Cat. ab201119, Cambridge, RU), Solución SDS 10% (Invitrogen™ No. Cat. 24730020, Carlsbad, CA, EE. UU.), estándar de proteínas pre teñidas PageRuler (10-180 kDa, Thermo Scientific™ No. Cat. 26616, Vilnius, Lithuania), buffer para carga de muestra de Laemmli 2X (Sigma-Aldrich® No. Cat. S3401-10VL, Massachusetts, EE. UU.), tampón de corrida (Invitrogen™, Novex™ Tris-Glycine SDS Running Buffer 10x No. Cat. LC2675, CA, EE. UU.), tampón de transferencia de tris-glicina 25X (Invitrogen™, Novex™ No. Cat. LC3675, Carlsbad, CA, EE. UU.), Leche descremada en polvo grado bloqueo (Bio-Rad Laboratories® No. Cat. 1706404EDU, Hercules, CA, EE. UU.), sustrato quimioluminiscente SuperSignal

West Dura Extended Life (Thermo Scientific™ Cat. Num. 34075, Rockford, IL, EE. UU.), films fotográficos para inmunodetección (Thermo Scientific™ CL-XPosure Film Cat. Num. 34090, Rockford, IL, EE. UU.).

Los anticuerpos necesarios para el desarrollo del trabajo fueron Anti-caspasa-3, clon 3J16, ZooMAb® (Sigma-Aldrich® No. Cat. ZRB1221, Darmstadt, Alemania), anti-PARP1 (Abcam® No. Cat. ab191217, Hangzhou, China), Anti-GAPDH (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. No. Cat. sc-32233, Heidelberg, Alemania); Anti IgG [H+L] de conejo conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch Lab. Inc. No. Cat. 111-035-003, West Grove, PA, EE. UU.), Anti IgG [H+L] de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch Lab. Inc. No. Cat. 715-035-150, West Grove, PA, EE. UU.).

6.1.2 Material biológico.

6.1.2.1 Lectina recombinante de *Phaseolus acutifolius*.

Este material fue obtenido a partir del cultivo líquido y bajo condiciones controladas, de una cepa de *Pichia pastoris* transformada *ex professo* para la expresión heteróloga de la *rTBL-1* [22], siguiendo una adaptación de la metodología de Palmerín-Carreño y col., 2021 [254]. Brevemente, en un primer paso, la *rTBL-1* fue recuperada del medio de cultivo previamente concentrado por medio de flujo tangencial (SartoJet Pump, Sartorius Stedim Biotech GmbH No. Cat. 17521-110, Goettingen, Alemania) y posteriormente, por medio de cromatografía en columna basada en bioafinidad a níquel (11197. Ni Sefarosa 6 Flujo Rápido 45-165UM, GE HEALTHCARE No. Cat. 17531802, Darmstadt, Alemania), dializada hasta a su completa purificación y finalmente, liofilizada (0.125 Scientz-10N, Ningbo Scientz Biotechnology Co., LTD., Ningbo, China) y almacenada a temperaturas de 0 a 4°C, en tubos cónicos de 50 mL sellados con Parafilm® (Científica Senna No. Cat. 7-10992, Chicago, IL, EE. UU.). Previo su uso, la identidad de la molécula en cada lote fue confirmada por medio de su análisis electroforético en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% [255] y tinción con azul de

Coomassie (Thermo Fisher Scientific™ No. Cat. 20278, Rockford, IL, EE. UU.) el cual, mostró una única proteína con peso molecular de 30.8 kDa, cada vez.

6.1.2.2 Cultivos celulares.

Células de cáncer de colon de la línea CT-26 (No. Cat. CRL- 2638™, Manassas, VA, EE. UU.) derivadas de carcinoma indiferenciado de colon murino [cepa BALB/c] inducido por N-nitroso-N-metiluretano, que constituyen un modelo no inestable a microsatélites [256] y negativas a la expresión de EGFR [257,258], así como de la línea MC-38 (No. Cat. ENH204-FP, Boston, MA, EE. UU.) derivada de adenocarcinoma de colon murino [cepa C57BL6] inducido por metilcolantreno que, además de ser positivas para la expresión de EGFR [258,259], han sido validadas como un cáncer de colon con deficiencia en la reparación de desajustes (dMMR) e inestabilidad microsatelital (MSI-H) [256]; fueron adquiridas en la American Type Culture Collection (ATCC®) y en Kerafast, Inc., respectivamente.

Los crioviales fueron almacenados en la fase de vapor (-190 °C) de un tanque de nitrógeno líquido hasta su cultivo y propagación según el protocolo de cada proveedor, en el laboratorio de Investigación Genética y Experimentación Biológica de la Facultad de Química, en la Universidad Autónoma de Querétaro. Para la descongelación, cada criovial fue cuidadosamente sumergido (sin llegar al nivel del empaque del mismo) en un baño de agua (Stovall Life Science Inc. Modelo CMBAA115S, NC, EE. UU.) a 37 °C y agitado con suavidad, por alrededor de 3-4 min. Una vez descongelada la suspensión celular, el criovial fue rociado con solución de etanol al 70% y trasladado a la campana de flujo laminar (Labconco No. Cat. 3620800, Kansas, MO, EE. UU.), en dónde el resto del procedimiento fue desarrollado bajo condición de esterilidad.

Inicialmente, las células de cada línea fueron transferidas a tubos de fondo cónico estériles de 15 mL (Corning® No. Cat. 430790, Durham, NC, EE. UU.) y resuspendidas en 10 mL de medio de cultivo previamente atemperado a 37 °C, RPMI-1640 modificado de ATCC (Gibco™ No. Cat. A1049101, Miami, FL, EE. UU.)

para las células CT-26 y DMEM con alto contenido en glucosa y piruvato (Gibco®. No. Cat. 11995065, Miami, FL, EE. UU.) para las células MC-38; procurando en ambos casos, la incorporación del medio por goteo con incremento gradual, a fin de evitar el choque osmótico en las células. Posteriormente, cada suspensión celular, fue sometida a centrifugación de 125 g (Beckman Coulter, Inc. No. Cat. 367586, Brea, CA, EE. UU.) durante 5 min a 25 °C, a fin de descartar el sobrenadante y resuspender cuidadosamente los pellets en 4 mL del medio de crecimiento fresco correspondiente: RPMI-1640 modificado de ATCC (Gibco™ No. Cat. A1049101, Miami, FL, EE. UU.) suplementado al 10% con SFB (Gibco™ No. Cat. 26140079, Miami, FL, EE. UU.) y 1% de Antibiótico-antimicótico (Gibco™ No. Cat. 15240-062, Miami, FL, EE. UU.) para las células CT-26 y DMEM con alto contenido en glucosa y piruvato (Gibco™ Num. Cat. 11995065, Miami, FL, EE. UU.) suplementado al 10% con SFB, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Corning® No. Cat. 25-025-CI, Durham, NC, EE. UU.), 10 mM de tampón de HEPES (Corning® No. Cat. 25-060-CI, Durham, NC, EE. UU.) y 1% de Antibiótico-antimicótico, para las células MC-38. Posteriormente, las células de ambas líneas fueron sembradas por separado en cajas para cultivo de tejidos de 60x15 mm de diámetro (Corning® No. Cat. CLS430166, NC, EE. UU.) y puestas en incubación (Thermo Scientific™ Modelo 3110, Boston, MA, EE. UU.) a 37 °C, en atmósfera humidificada de CO₂ al 5% y cambios de medio cada 48 a 72 h.

Toda vez que los cultivos de células CT-26 alcanzaron una alta confluencia en caja (\approx 80%), fueron sometidos a enjuague con solución de Tripsina + EDTA (0.05 %) con rojo fenol (Gibco™ Núm. Cat. 25300062, Miami, FL, EE. UU.); en tanto que las células MC-38, pasaron a enjuague simple con solución salina tamponada de fosfatos (PBS) 1x en interés de eliminar rastros de SFB que pudieran contener inhibidor de tripsina. Enseguida, se procedió a la cosecha de las capas celulares mediante la adición de 2 mL de solución de tripsina + EDTA, seguido por una incubación (37 °C) de 5 a 15 min, para las células CT-26 y de 2-3 min, para las células MC-38; evitando en todo momento, agitar o golpear las cajas de cultivo durante el proceso. Una vez confirmada la pérdida de la adhesión celular (mediante

observación al microscopio), la enzima fue inactivada incorporando el doble del volumen empleado de la solución de tripsina + EDTA, del medio de crecimiento correspondiente. A continuación, las suspensiones celulares fueron transferidas cada una, a tubos de fondo cónico estériles de 15 mL (Corning® No. Cat. 430790, NC, EE. UU.) y sometidas a centrifugación de 125 g durante 5 min a 25 °C. Una vez descartados los sobrenadantes, los pellets celulares fueron cuidadosamente resuspendidos en 12 mL del medio de crecimiento fresco correspondiente; procurando la completa disagregación de las células en el mismo, a fin de propagar los cultivos a proporciones de 1:3, en conformidad con los protocolos de cada proveedor.

6.1.2.3 Animales de experimentación.

El Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro aprobó todos los procedimientos experimentales llevados a cabo (CBQ21/065). Un total de 14 ratones hembra BALB/c de tipo silvestre (+/+) y 14 ratones hembra BALB/c desnudos (*nu/nu*) homocigotos para el haplotipo H2^d del MHC (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, Massachusetts, EE. UU.), todos de 4 a 6 semanas de edad, fueron adquiridos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Zacatenco (Alcaldía Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México). A su recepción, los ratones inmunocompetentes fueron alojados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y cuidados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM) 062-ZOO-1999 bajo los siguientes parámetros: ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h, temperatura ambiente de 18 a 26 °C, humedad relativa de 40-70% y cambios de ropa de cama sanitaria toda vez que fue pertinente. Los ratones inmunodeficientes se alojaron en un ambiente libre de patógenos específicos (SPF) en la torre de investigación del INCan, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h en jaulas autoclavadas y provistas de cama sanitaria esterilizada, bajo condiciones

controladas de temperatura (23 °C) y humedad (40-70%), así como >15 cambios de aire por h. Todos los animales cursaron por un período de aclimatación de dos semanas previas al inicio de los experimentos y fueron alimentados *ad libitum* con agua purificada y alimento esterilizado de alto contenido proteico (5001 Laboratory Rodent Diet, LabDiet® LD5001, Richmond, IN, EE. UU.). Mediciones y análisis.

6.2 Mediciones y análisis.

6.2.1 Ensayos concentración-respuesta con *rTBL-1*.

A partir de cultivos confluentes, se sembraron suspensiones de 5×10^3 células por 500 µL de medio de crecimiento en 16 pocillos de una placa de 24 pocillos (Nunclon Δ Thermo Fisher Scientific™, Sigma-Aldrich® Cat. Num. D7039-1CS, Waltham, MA, EE. UU.) y se incubaron bajo las condiciones antes descritas. Después de 72 h, se realizó la sincronización de los cultivos, reemplazando el medio de crecimiento por RPMI-1640 suplementado con 2% SFB + 1% Antibiótico-antimicótico para las células CT-26 y DMEM suplementado con 2% SFB + 1% solución de aminoácidos no esenciales + 10 mM Hepes y 1% Antibiótico-antimicótico para las células MC-38. Aunque la restricción con SFB es una causa reconocida de afectación en la viabilidad celular [260], su implicación fue asumida durante ensayos concentración-respuesta para asegurar la sincronización del ciclo celular previo al manejo experimental [261].

Luego de 24 h de incubación en medio de sincronización, se realizaron conteos de control iniciales, incorporando 500 µL de solución de tripsina + EDTA a dos de los pocillos e incubando por 15 min (células CT-26) o 5 min (células MC-38) a 37 °C. Una vez inactivada la enzima con 500 µL del medio de crecimiento apropiado, las suspensiones celulares se transfirieron a tubos cónicos de 1,5 mL y se cargaron 10 µL en cada una de las dos cámaras de un contador de células Neubauer (BLAUBRAND® Sigma-Aldrich® Cat. Num. BR717805-1EA Essex, CT, USA) para proceder al recuento directo por duplicado. En este punto, se realizó un segundo cambio de condiciones al resto de los cultivos en la placa, reemplazando el medio

de sincronización de cada par de pocillos por uno de los medios de ensayo consistente en RPMI-1640 o DMEM (con solución de aminoácidos no esenciales al 1% + Hepes 10 mM), suplementado con Antibiótico-antimicótico al 1% + albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5% (*p/v*) y 1 de 6 concentraciones de *rTBL-1* (10, 20, 30, 40, 50 y 100 µg/mL) o vehículo (PBS a igual porcentaje que el de la [*rTBL-1*] más alta ensayada).

Después de 8 h de exposición, los cultivos tratados fueron enjuagados con PBS y tripsinizados para proceder al recuento celular. El porcentaje de sobrevivencia se calculó respecto a la media de los recuentos de control iniciales. Regresiones no lineales fueron realizadas para cada tipo celular, a partir de las medias de 3 experimentos independientes por duplicado [262], desarrollados con células de la 4^a, 5^a y 6^a transferencia, para determinar la CL₅₀ de cada tipo tumoral.

6.2.2 Evaluación de la apoptosis celular mediante el ensayo de unión de anexina V.

Para evaluar el efecto de *rTBL-1* sobre la apoptosis de células CT-26 y MC-38, se utilizó el kit de detección de apoptosis Annexin V & Dead Cell Kit Muse™ siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el *rTBL-1-CL₅₀* correspondiente. Brevemente, después de su tratamiento, los cultivos se enjuagaron con PBS y luego de su tripsinización, las suspensiones fueron transferidas a tubos de fondo cónico estériles de 15 mL (Corning® Cat. Num. 430790, NC, EE. UU.) y se centrifugaron a 125 × *g*. Cada pellet celular se resuspendió en 2 mL del medio de ensayo correspondiente, asegurando su completa disagregación. A continuación, 100 µL de cada suspensión celular fueron transferidos a un tubo Eppendorf® de 1,5 mL y 100 µL del reactivo Annexin-V fueron añadidos. La mezcla se agitó a velocidad media en un vórtex (Scientific Industries, INC. G-560, Bohemia, NY, EE. UU.) durante 3 segundos y, finalmente, se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min.

Los parámetros de muerte celular y sobrevivencia se cuantificaron en el analizador celular Muse (Millex Millipore® Cat. Num. 0500-3115, Cork, Irlanda). Siguiendo las instrucciones del fabricante, las células con señal positiva para anexina V y negativa para 7-aminoactinomicina D (7-AAD) experimentan apoptosis temprana; las células positivas para anexina V y 7-AAD experimentan apoptosis tardía; una tinción positiva para 7-AAD y negativa para Annexin V fue indicativa de necrosis celular. Por su parte, las células que no presentan señal de Anexina V o 7-AAD, están vivas y no experimentan apoptosis cuantificable.

6.2.3 Western blot para caspasa-3 y PARP1 escindida.

Para confirmar los efectos de la *rTBL-1* sobre la apoptosis celular, cultivos confluentes de CT-26 y MC-38 fueron tratados como ha sido descrito a fin de obtener los extractos proteicos y realizar series de Western blot para las proteínas caspasa-3 y PARP1. Una vez descartado el medio de tratamiento, dos enjuagues con PBS helado fueron realizados. A continuación, las monocapas celulares fueron raspadas (Bio-Rad Laboratories® Liberador de gel No. Cat. 1653320, Hércules, CA, EE. UU.; previamente enfriado) y cuidadosamente transferidas a tubos de fondo cónico estériles de 15 mL (Corning® No. Cat. 430790, NC, EE. UU.) en baño de hielo, con el fin de someterlas a centrifugación (200 g por 5 min, a 4 °C). Una vez descartados los sobrenadantes, cada pellet fue resuspendido en 200 µL (1 mL por cada $\approx 1 \times 10^8$ células) de buffer de lisis celular NP40 previamente helado y suplementado (1:9) con coctel de inhibidores de proteasas y fosfatases.

Posteriormente, cada vial fue llevado a incubación en hielo durante 30 min, procurando la aplicación de un pulso de agitación a alta velocidad en vortex (Modelo GENIE 2, Scientific Industries Inc, Cat. DG-3030A2, Bohemia, NY, EE. UU.), cada 10 min. Luego de un nuevo ciclo de centrifugación (200 g por 5 min, a 4 °C), los tubos fueron cuidadosamente retirados de la centrífuga y colocados en hielo, a fin de transferir cada sobrenadante a un tubo cónico de 1.5 mL nuevo, previamente enfriado y mantenido en hielo durante todo el procedimiento. Una vez colectado el sobrenadante, los pellets fueron descartados.

A continuación, la concentración de proteína en cada extracto fue determinada en un espectrofotómetro de microvolúmenes UV-Vis NanoDrop™ One/One^C (Thermo Scientific™ clave de producto ND-ONE-W, Wilmington, DE, USA). Posteriormente, 70 µg de proteína de cada muestra, fueron resueltos por carril, mediante SDS-PAGE reductora al 10% (Tabla 2), para su posterior transferencia western.

Tabla 2. Composición de geles de poliacrilamida al 5*, 8 y 10%.

Gel (%)	Agua (mL)	Solución "A" 30% Acrilamida (mL)	Solución "B" 1.5 M Tris-HCL, pH 8.8 (mL)	10% SDS (µL)	10% APS (µL)	TEMED (µL)
8	4.6	2.6	2.6	100	100	10
10	3.8	3.4	2.6	100	100	10
5	5.86	1.34	2.6	100	100	10

* Gel concentrador.

Brevemente, tras limpiar las placas de vidrio y los separadores con solución de etanol al 70%, se procedió a su ensamble. Los geles de separación fueron preparados empleando los reactivos señalados por cada 10 mL. Todos los componentes fueron mezclados, a excepción del persulfato de amonio (APS) y el TEMED, los cuales, fueron añadidos y mezclados (mediante pipeteo suave) a la solución de monómeros, justo antes de ser vertida a las placas ensambladas al marco de fundición, fuera de la unidad electroforética.

Inmediatamente después, la solución del gel fue vertida hasta alcanzar la marca afín en la placa y una capa de Isopropanol fue sobrepuerta en la parte superior del gel, a fin de asegurar una superficie horizontal y uniforme en el gel. Finalmente, el gel separador fue dejado polimerizar durante al menos 15 min a temperatura ambiente. Entre tanto, la solución del gel concentrador (5%) fue preparada siguiendo el mismo procedimiento.

Una vez polimerizado el gel separador, la capa de Isopropanol fue retirada por decantado y al tiempo, el APS y el TEMED fueron añadidos a la solución del gel

concentrador. Luego de mezclar suavemente, la solución del gel concentrador fue vertida al ensamble de placas (hasta el reborde) y de inmediato, se colocó el peine de la unidad electroforética, procurando no formar burbujas de aire en el gel o cerca de los pozos. Finalmente, el gel concentrador fue dejado polimerizar durante al menos 15 min a temperatura ambiente. Por su carácter neurotóxico, la solución de gel concentrador desplazada por el peine, fue limpiada una vez concluida su polimerización.

A continuación, se procedió a la desnaturalización de las proteínas en cada muestra, por medio de la disolución del volumen correspondiente a 70 µg de proteína de cada extracto, en igual cantidad (1:1) de buffer de carga con SDS como detergente aniónico. Enseguida, cada mezcla fue trasladada a 5 min de incubación en agitación (600 rpm) a 65 °C (Eppendorf AG 22331, Thermomixer No. Cat. 5350, Hamburgo, Alemania). Al tiempo, el ensamble de placas con los geles polimerizados, fue acoplado a la unidad electroforética (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell No. Cat. 12-0625-0312, Hércules, CA, EE. UU.), orientando los cristales cortos hacia el interior y cerciorándose, de que las superficies mantengan un sellado eficiente, a fin de evitar fugas de buffer de la cámara superior a la inferior. Posteriormente, la cámara superior fue llenada con Buffer de corrida 1x hasta alcanzar un nivel ≈3 mm debajo del reborde del vidrio sin muesca, cubriendo completamente la parte superior del gel. Una vez corroborada la ausencia de fugas de buffer entre cámaras, el peine de cada gel fue cuidadosamente removido, dejando que el buffer perfundiera completamente en cada pozo, a fin de asegurar el cierre del circuito eléctrico durante la corrida.

Previo a la carga de las muestras, la punta de la micropipeta fue enjuagada con buffer, para luego colectar el volumen apropiado de cada muestra experimental (*r*TBL-1-CL₅₀ a 8h) o de control negativo (PBS 2-5%). Series experimentales idénticas fueron corridas con células CT-26 y MC-38, utilizando el estándar de proteínas preteñidas PageRuler (10-180 kDa) el cual, fue corrido en los carriles en los extremos izquierdo y derecho de cada gel.

Una vez colocada la tapa de seguridad, los cables de alimentación fueron conectados y se procedió a correr la electroforesis a una tensión inicial de 70 V, durante 15 min (para el tránsito de las proteínas por el gel concentrador) y continuando a 120 V, hasta el punto en que el frente de corrida alcanzó el fondo del gel separador. Finalmente, la fuente de poder fue apagada. De manera previa a la transferencia de tipo western, un volumen de 1,000 mL de buffer Tris-glicina de transferencia 1X fue preparado (200 mL de metanol + 760 mL de agua desionizada) y almacenado a 2 °C.

A continuación, las almohadillas de esponja del kit de transferencia western (Mini Trans-Blot Accesories, Bio-Rad, No. Cat. 1703820, Hércules, CA, EE. UU.) fueron sumergidas en platos poco profundos con buffer Tris-glicina de transferencia 1X helado y enseguida, fueron aplanadas con el rodillo del kit hasta eliminar todas las burbujas y asegurar su completa saturación con buffer. En paralelo, el ensamble de placas de la unidad electroforética fue desmontado y cada gel, fue cuidadosamente removido de los cristales utilizando un liberador de gel (Bio-Rad Laboratories® No. Cat. 1653320, Hércules, CA, EE. UU.) con el cual, el gel concentrador fue recortado para su descarte. Enseguida, se procedió con la transferencia de las proteínas a membranas de soporte sólido de nitrocelulosa.

Inicialmente, cada gel fue colocado con un poco de buffer Tris-glicina de transferencia, en un plato poco profundo. De igual forma, los filtros de papel y la membrana de nitrocelulosa (previamente recortados al mismo tamaño del gel), fueron sumergidos en buffer Tris-glicina. A continuación, se procedió a la conformación del sándwich (Bio-Rad, No. Cat. 1703820, Hércules, CA, EE. UU.), sumergiendo el extremo color negro del broche y colocando una de las almohadillas sumergidas con buffer, seguida de uno de los papeles filtro (también inmersos en buffer). Posteriormente, un pase del rodillo del kit, fue aplicado para eliminar las burbujas entre las capas e inmediatamente después, se colocó el gel. Un nuevo pase del rodillo depuró las burbujas en el empalme y utilizando pinzas inertes, la membrana de nitrocelulosa, con poro de 0.45 µm (Thermo Scientific™,

Nitrocellulose/Filter Paper Sandwich 0.45 µm, previamente sumergida en buffer de transferencia, fue colocada, seguida del segundo papel filtro y dos almohadillas del kit, procurando que todos los componentes se mantuvieran bajo inmersión. Finalmente, el sándwich fue conformado al aplicar un nuevo pase del rodillo, al cierre del broche y la colocación del seguro.

A continuación, el sándwich fue insertado en el módulo de transferencia, al interior del tanque de la cámara, procurando en todo momento, la inmersión del primero en buffer Tris-glicina de transferencia. Enseguida, la tapa de la unidad fue colocada en el tanque y los cables de alimentación fueron conectados a la fuente apagada. Tras encenderla, se procedió con la transferencia a un valor constante de 400 mAh, durante 60 min. Una vez concluida la transferencia, la fuente de poder fue apagada y el módulo del sándwich fue extraído del tanque, a fin de proceder con su desensamblado y la recuperación de la membrana, a través de una cuidadosa sujeción con pinzas inertes.

Finalmente, la membrana fue colocada en un plato poco profundo con buffer y se procedió a probarla por análisis western, bajo las condiciones mostradas en la Tabla 3. Las proteínas objetivo fueron detectadas mediante el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura Extended Life y revelado fotográfico, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla 3. Condiciones y anticuerpos para western blot de caspasa-3 y PARP1.

Proteína objetivo	Peso molecular	Membrana de transferencia	Anticuerpo primario (1:1,000 × 12 h)*	Anticuerpo secundario (1:10,000 × 3 h)*
Caspasa-3	31 kDa (Bandas observadas de 17 a 32 kDa)		Anti-caspasa-3, clon 3J16, ZooMAb® (Sigma-Aldrich® No. Cat. ZRB1221)	Anti IgG (H+L) de conejo (Jackson Immunoresearch Lab. Inc. No. Cat. 111-035-003)
PARP1	113 kDa (Bandas observadas en 113.89 y ≈ 91 kDa [cPARP1])	Poro de 0.45 µM (Thermo Scientific™, No. Cat. LC2001)	Anticuerpo recombinante antiPARP1 (Abcam® No. Cat. ab191217)	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) -Control de carga-	40.2 kDa (Banda observada en ≈ 37 kDa)		Anticuerpo recombinante anti-GAPDH (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. No. Cat. sc-32233)	Anti IgG (H+L) de ratón en burro (Jackson Immunoresearch Lab. Inc. No. Cat. 715-035-150)

* Los anticuerpos fueron diluidos en solución de bloqueo: Leche descremada en polvo grado bloqueo (Bio-Rad Laboratories® No. Cat. 1706404EDU, Hercules, CA, EE. UU.) al 3% en TTBS.

6.2.4 Implantación subdérmica de aloinjertos tumorales de cáncer de colon CT-26 en ratones de la cepa BALB/c.

Un total de 5×10^4 células CT-26 (en 50 µL de PBS) fueron implantadas por vía subcutánea (s.c.), en el panículo del flanco lateral afeitado de ratones BALB/c de tipo silvestre (+/+) o desnudos (*nu/nu*), utilizando una aguja de 25G × 1 ½ in. Una vez que los aloinjertos tumorales alcanzaron volúmenes entre 25 y 50 mm³, los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo control tratado con vehículo (PBS) o al grupo de tratamiento con *rTBL-1* (6 mg por kg de peso corporal, disueltos en PBS), asegurando la coincidencia del volumen tumoral inicial medio entre los grupos experimentales. Aquellos individuos que desarrollaron más de un tumor fueron descartados.

La salud de los animales y el desarrollo de los aloinjertos tumorales fueron respectivamente monitoreados, por observación diaria y medición directa (calibrador vernier digital, Gyros DIGI-Science Accumatic SKU EO-254, Monsey, NY, EE. UU.) cada 72 h. Para evitar el sufrimiento animal, aquellos ratones que alcanzaron volúmenes superiores a 1,000 mm³ y/o mostraron signos de necrosis en la masa tumoral, fueron sacrificados por asfixia en una cámara de dióxido de carbono. Para los ratones BALB/c (*nu/nu*), el volumen del punto final se determinó en ≥ 2,000 mm³, debido a la mayor resistencia de su piel en tanto que más laxa, gruesa e hiperplásica; típica del fenotipo FOXN1 con mutaciones de pérdida de función [263]. El volumen de cada tumor y la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se calcularon, respectivamente, utilizando las siguientes fórmulas:

$$0.5 \times \text{longitud} \times \text{anchura}^2$$

Donde “longitud” fue la dimensión más larga.

$$[(C_t - C_0) - (T_t - T_0)] / (C_t - C_0) \times 100$$

Donde: C_t fue el volumen tumoral medio en el grupo de control en el tiempo (t); C_0 fue el volumen tumoral medio en el grupo de control en t_0 ; T_t fue el volumen tumoral medio en el grupo de tratamiento en t , y T_0 fue el volumen tumoral medio en el grupo de tratamiento en t_0 [264].

6.2.5 Evaluación de la actividad antitumoral de *rTBL-1 in vivo*.

Para examinar la actividad antitumoral de *rTBL-1* se determinó el efecto de su administración intralesional sobre el crecimiento de tumores palpables preexistentes en ratones BALB/c (+/+). Brevemente, 24 h después de la aleatorización de los individuos, se inyectaron 50 µL de PBS (vehículo) en el tumor de 7 individuos BALB/c y, en paralelo, se inyectó una dosis de *rTBL-1* (en el mismo volumen de vehículo) en el tumor de un número igual de individuos, para un esquema de cuatro dosis en total, cada cinco días (Figura 16). El diámetro de cada tumor fue medido longitudinalmente cada 72 h.

6.2.6 Evaluación de la dependencia de las células T en la actividad antitumoral de *rTBL-1*.

Con el objetivo de determinar si la actividad terapéutica de *rTBL-1* presentaba dependencia de las células T en el anfitrión, 14 ratones BALB/c (*nu/nu*) fueron sometidos al esquema de inoculación tumoral descrito previamente, así como al tratamiento con *rTBL-1* ($n = 7$), en el mismo esquema de administración. El efecto del tratamiento se evaluó respecto a un grupo control administrado con vehículo ($n = 7$).

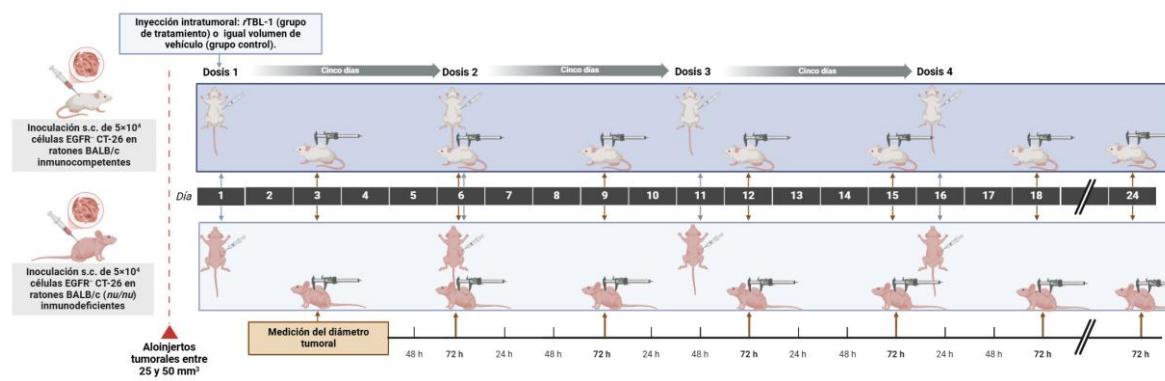


Figura 16. Diseño experimental para la evaluación del efecto de *rTBL-1* intralesional sobre el desarrollo de tumores de CCR y la posible participación del sistema inmune del anfitrión. Para evitar el sufrimiento animal, datos de necrosis tumoral, volúmenes $\geq 1,000$ mm³ en ratones BALB/c de cepa silvestre y $\geq 2,000$ mm³ en ratones BALB/c (*nu/nu*), fueron establecidos como puntos finales del ensayo. La figura fue elaborada utilizando la plataforma BioRender (<https://biorender.com>, último acceso en febrero de 2025).

6.3 Análisis estadístico.

Las curvas concentración-respuesta se analizaron mediante regresión no lineal y ANOVA unidireccional utilizando las medias de tres experimentos independientes, mediante pruebas post hoc de Dunnett o Tukey utilizando GraphPad Prism 8.0.1 (la agrupación de la información mediante el método de Tukey se realizó en Minitab® 18.1). La cuantificación densitométrica de Western blots se realizó utilizando el software ImageJ 1.54g [265]. La comparación de las respuestas al tratamiento *in vitro* entre ambos tipos celulares se realizó mediante la prueba *t* de Student de dos muestras utilizando Minitab® 18.1. La comparación del desarrollo de los aloinjertos tumorales se realizó mediante la prueba *t* de razón pareada y los datos de supervivencia se analizaron mediante curvas de Kaplan-Meier y la prueba log-rank (Mantel-Cox) utilizando GraphPad Prism 8.0.1. Para todos los análisis, un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 *rTBL-1* provoca efectos citotóxicos de manera dependiente de la concentración en células de colon murinas EGFR⁺ y EGFR⁻.

Inicialmente, y una vez completada la efectiva purificación de *rTBL-1* (Figura 17 A,B), se procedió a la confirmación de su identidad en solución estéril de PBS, mediante Western blot (Figura 17 C).

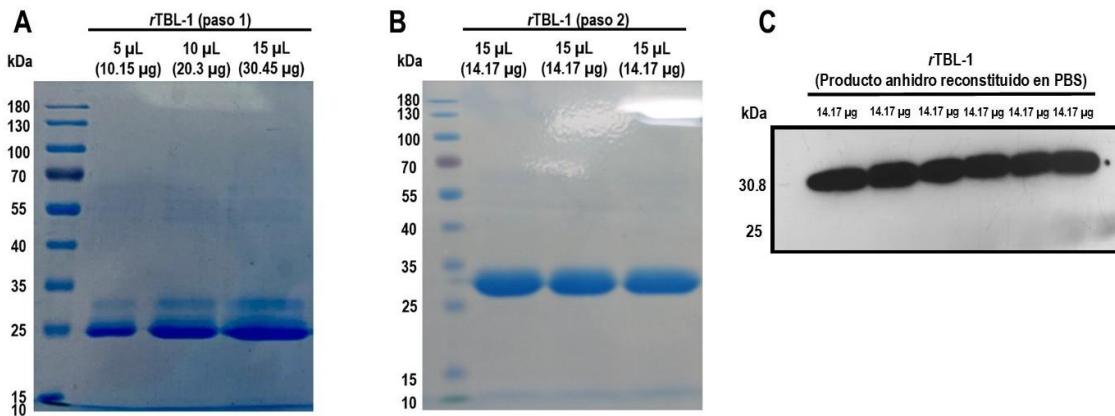


Figura 17. Purificación y confirmación de la identidad de *rTBL-1*. (A) Análisis por SDS-PAGE al 10% confirma la presencia de una banda de proteína con un peso molecular de ~30,8 kDa, junto con otra que constituye una impureza mayor (25 kDa). (B) Un segundo paso de purificación con cromatografía de afinidad de níquel permite la eliminación de la proteína contaminante en correlación con el enriquecimiento de la banda diana. (C) La identidad de *rTBL-1* se confirma mediante Western blot para 6xHis-tag.

Tras el establecimiento del sistema para la producción heteróloga de la lectina mayoritaria en la TBLF (TBL-1) y la consiguiente obtención de la *rTBL-1* [22], Dena-Beltrán et al. [21] observaron que la exposición a concentraciones a partir de 61 μg/mL durante 24 h, resultó eficaz para reproducir los efectos apoptóticos de la TBLF sobre células SW-480, derivadas de un adenocarcinoma colorrectal tipo B de Dukes localmente avanzado [266] con alta expresión de EGFR de tipo silvestre [267], en términos de activación proteolítica de caspasa-3, escisión de PARP-1 y fosforilación (Ser139) de la histona HA2X [268]. Análisis adicionales por inmunofluorescencia, revelaron una colocalización de *rTBL-1* y EGFR en la

superficie celular, seguida de incrementos en la fosforilación (Tyr1068) y la degradación lisosomal del receptor. Posteriormente, se detectaron aumentos de la fosforilación de la quinasa p38 (Thr180/Tyr182), así como de los reguladores transcripcionales STAT1 (Tyr701) y p53 (Ser15). Asociados causalmente con la detención del ciclo celular y la apoptosis observada en las células SW-480 tratadas, los aumentos de fosfo-STAT1 y fosfo-p53 llevaron a la postulación de una posible señalización sesgada de *r*TBL-1 a través de EGFR [21]. En este mismo sentido, las células CHO-K1 (derivadas de ovario de hámster chino) negativas para la expresión de EGFR [269] fueron marcadamente refractarias a los efectos de *r*TBL-1, al no detectarse activación proteolítica de caspasa-3 en células expuestas a concentraciones de hasta 122 µg/mL durante 24 h. Sin embargo, dadas las previsibles diferencias fenotípicas que supone un tipo celular no tumoral, la validez de las células CHO-K1 como modelo EGFR⁻ de referencia podría ser discutible. Asimismo, dado que la posible interdependencia entre la fosforilación del EGFR y la apoptosis inducida por *r*TBL-1 en células de cáncer de colon no ha sido comprobada en forma experimental, inicialmente, nos propusimos evaluar si la actividad proapoptótica de *r*TBL-1 sobre células de cáncer de colon depende de la disponibilidad de EGFR en el sistema celular, mediante la evaluación de sus efectos en un rango de concentraciones de 0 a 100 µg de *r*TBL-1/mL sobre dos tipos de células de cáncer de colon: MC-38, EGFR⁺ [259], y CT-26, EGFR⁻ [257].

A continuación, curvas concentración-respuesta fueron preparadas por diluciones seriadas, empleando el medio de ensayo adecuado para tipo celular (Figura 18A). A las 8 h de exposición, las células MC-38 registraron la mayor responsividad al tratamiento, presentando caídas estadísticamente significativas a partir de 20 µg de *r*TBL-1/mL (Dunnett, $p = 0.0127$). Mientras que, a concentraciones > 30 µg/mL, la supervivencia cayó por debajo del 25% ($p < 0.0001$). Por su parte, si bien la respuesta de las células CT-26 al tratamiento fue ligeramente menor, su supervivencia fue significativamente afectada a >30 µg/mL ($p < 0.0001$) con una caída al $54.03\% \pm 5.43$, y concentraciones más elevadas de *r*TBL-1, produjeron la muerte de más del 85% de la población celular inicial ($p < 0.0001$).

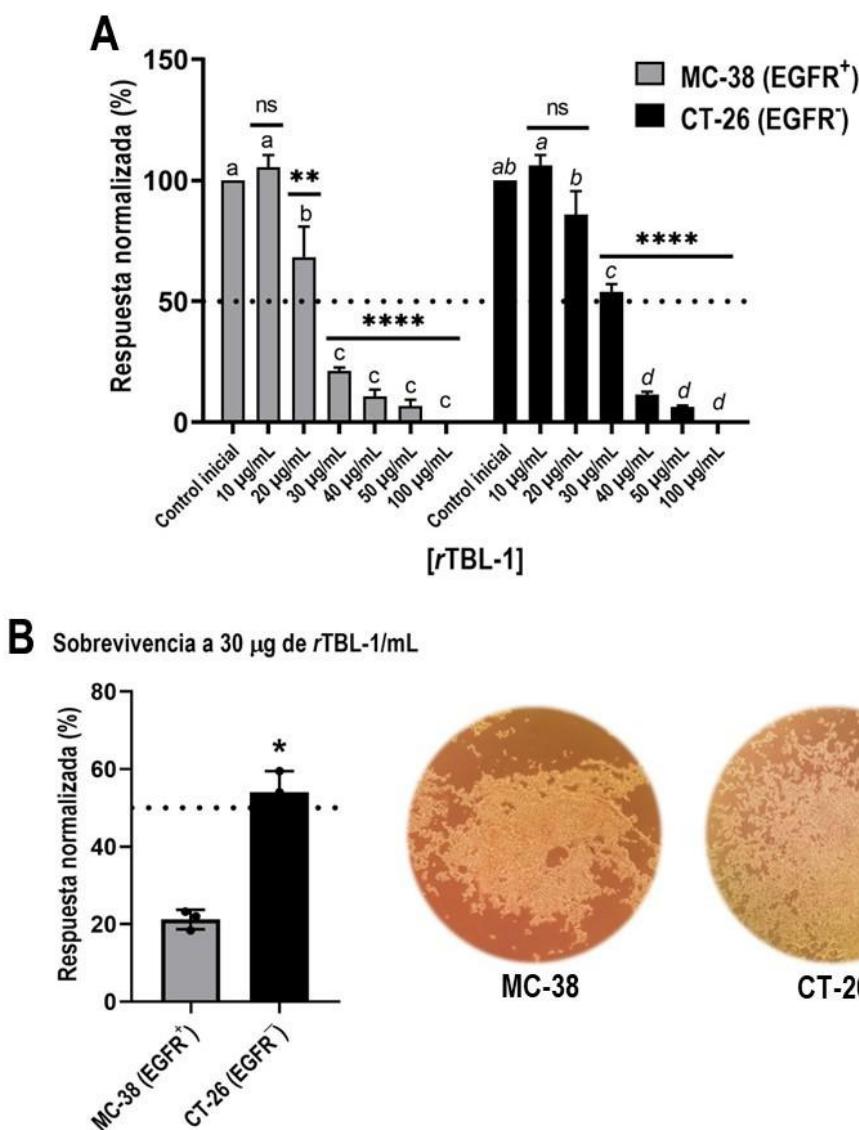


Figura 18. rTBL-1 produce efectos citotóxicos en células de cáncer de colon en manera dependiente de la concentración. (A) Ensayos concentración-respuesta revelan patrones de responsividad a 8 h de exposición a rTBL-1 en ambos tipos celulares (pruebas post hoc de Dunnett y Tukey). **(B)** La tolerancia al tratamiento entre linajes celulares a 30 µg de rTBL-1/mL (prueba *t* de Student) y micrografías representativas de campo completo (10x) muestran el estado post-tratamiento de los cultivos. Los datos se presentan como media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. ANOVA de una vía con pruebas post hoc; para Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ y **** $p < 0.0001$; y para Tukey, aquellas medias que no comparten letra fueron significativamente diferentes; ns indica diferencias sin significancia estadística.

Un análisis de comparación entre los patrones responsividad reveló que la tolerancia entre linajes celulares fue significativamente diferente a 30 µg de rTBL-

1/mL (prueba *t* de Student, $p = 0.011$) (Figura 18B), con una mayor sobrevida de las células CT-26 respecto a la observada en las células MC-38 EGFR⁺.

Finalmente, las curvas concentración-respuesta (Figura 19) confirmaron que, a pesar de la diferencia observada en los patrones de respuesta, ambos tipos tumorales resultaron marcadamente responsivos al tratamiento con *rTBL-1*; aunque las células EGFR⁻ presentaron una tolerancia un 21.69% mayor que las células EGFR⁺, en términos de su CL₅₀, siendo de 23.50 µg de *rTBL-1*/mL para células MC-38 y de 30.01 µg de *rTBL-1*/mL para células CT-26.

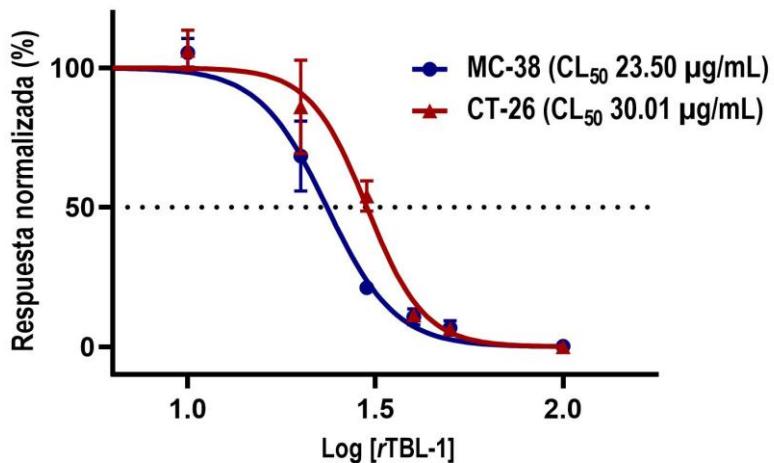


Figura 19. Curvas concentración-respuesta de *rTBL-1*. Análisis por regresión no lineal demuestran que las células de cáncer de colon MC-38 EGFR⁺ y CT-26 EGFR⁻ resultaron responsivas al tratamiento con *rTBL-1*, presentando valores de CL₅₀ de 23.50 y 30.01 µg de *rTBL-1*/mL, respectivamente ($p = 0.063$). Los datos se presentan como media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Nuestros resultados indican que las células de cáncer de colon, tanto EGFR⁺ (MC-38) como EGFR⁻ (CT-26), son responsivas al tratamiento *in vitro* con *rTBL-1* a 8 h, presentando valores de CL₅₀ de 23.50 y 30.01 µg/mL, respectivamente ($p = 0.063$). Aunque las células CT-26 EGFR⁻ mostraron una tolerancia 21.69% mayor que la observada en las células MC-38 EGFR⁺, esta representa tan solo el 53.59% de la previamente reportada, CL₅₀ de *rTBL-1* de las células HT-29 (56 µg/mL) [254], cuyos

niveles de expresión de EGFR de tipo silvestre [270] son aproximadamente iguales a los observados en células normales [271].

Por otro lado, cabe destacar que de los cuatro tipos celulares de cáncer de colon que hasta ahora se han confirmado *in vitro* como responsivos a *rTBL-1*, sólo las células MC-38 presentan una mutación en EGFR (G1103C) a nivel de la cola C-terminal [259]. Sin embargo, se piensa que se trata de una mutación pasajera ya que, hasta donde se sabe, no tiene carácter oncogénico [272]. Además, dado que esta mutación produce una alteración en el extremo C-terminal, estrictamente intracitoplasmático, es poco probable que tal alteración esté implicada en las interacciones moleculares establecidas con *rTBL-1* en el entorno extracelular.

Por otro lado, la alteración oncogénica de una variedad de efectoras subordinadas al EGFR, las libera de su regulación y determina tanto su señalización desenfrenada como una proliferación celular sin sujeción al receptor y su ligando [6]. En este sentido, las mutaciones oncogénicas en las proteínas GTPasas de la familia RAS, así como en la serina/treonina quinasa BRAF, se destacan como afectaciones subyacentes a la autonomía proliferativa en el 52 y el 10% de todos los casos de CCR, respectivamente [273,274]. Como tal, la detección clínica de los estados mutacionales en RAS y BRAF constituyen prominentes marcadores para guiar la elección terapéutica en CCRm [275], mientras que en casos con expresión de RAS/BRAF de tipo silvestre, el EGFR permanece como un objetivo terapéutico por excelencia [11]. En este sentido, considerando los estados mutacionales oncogénicos de KRAS y BRAF albergados en líneas celulares de cáncer de colon con responsividad confirmada a *rTBL-1* (Tabla 4), un enfoque terapéutico basado en bloquear o inhibir EGFR constituiría una estrategia ineficaz, ya que, en todos estos modelos, la señalización se transduce incluso en ausencia de cualquier señal ascendente. Por lo tanto, podría ser válido hipotetizar que, los principales componentes mecanísticos en la apoptosis inducida por *rTBL-1* son parcialmente independientes de EGFR y permanecen por ser identificados.

Tabla 4. Estados mutacionales de los principales marcadores moleculares que norman la elección terapéutica en cáncer colorrectal metastásico en las líneas celulares de cáncer de colon responsivas a rTBL-1.

Línea celular de cáncer (Tejido de origen y especie)	Estado mutacional		
	EGFR	KRAS	BRAF
HT-29 (Adenocarcinoma colorrectal humano)	Tipo silvestre [270] Normalmente expresado [271]	Tipo silvestre [276]	Mutación heterocigótica ^{V600E} [277,278]
SW-480 (Adenocarcinoma colorrectal de Dukes tipo B)	Tipo silvestre, Sobreexpresado [267]	Mutado ^{G12V} [279–281]	Tipo silvestre [277]
CT-26 (Carcinoma de colon murino)	No expresado [257]	Mutado ^{G12D} [257,281]	Tipo silvestre [257]
MC-38 (Adenocarcinoma de colon murino)	¹ Mutado ^{G1103C} [259,272] Sobreexpresado [258]	Tipo silvestre [256]	Mutado ^{W487C} [256,282]

¹ Mutación pasajera.

7.2 A valores de su CL₅₀ rTBL-1 produce efecto apoptótico en células de cáncer de colon MC-38 EGFR⁺ y CT-26 EGFR⁻.

Estudios previos han demostrado que la citotoxicidad inducida por rTBL-1 en células de cáncer de colon humano EGFR⁺, está relacionada con la inducción de apoptosis [21]. Dado que esta es la primera vez que evalúa la bioactividad de rTBL-1 contra células de cáncer de colon murino, así como en un tipo tumoral EGFR⁻, se evaluó el nivel de apoptosis inducido por el tratamiento. Observamos que a sus valores de CL₅₀, rTBL-1 produce una respuesta apoptótica diferencial en células de cáncer de colon murino MC-38 y CT-26 tras 8 h de exposición, sin causar diferencias apreciables en la necrosis celular (Figura 20).

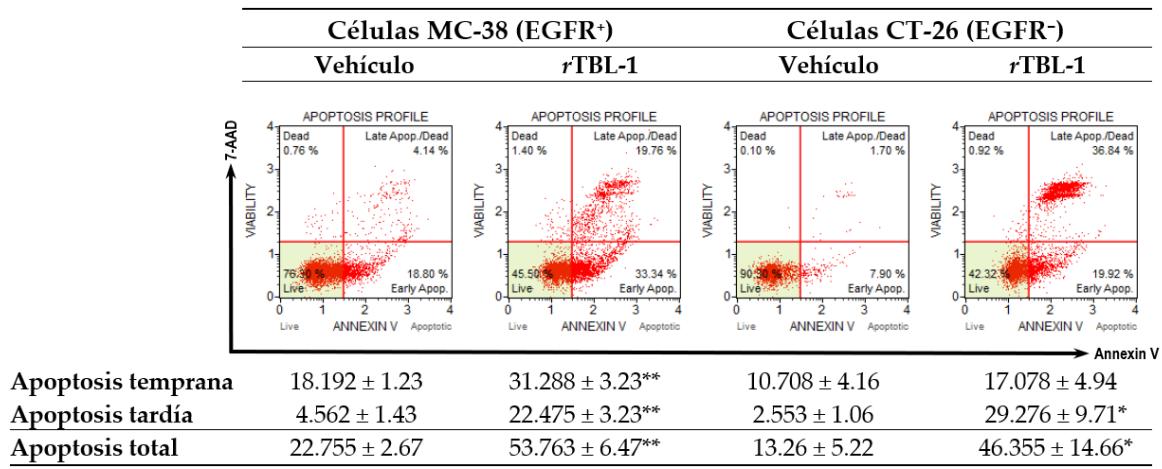


Figura 20. El tratamiento con rTBL-1 produce una respuesta apoptótica diferencial en células de cáncer de colon EGFR⁺ MC-38 y EGFR⁻ CT-26. Diagramas de puntos representativos del análisis de apoptosis por citometría de flujo para células MC-38 y CT-26 expuestas durante 8 h al vehículo o su correspondiente rTBL-1-LC₅₀, en ausencia de SFB y en su lugar con 0.5% BSA (p/v). Los datos se presentan como media ± desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Prueba *t* de Student para dos muestras, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.005 indican diferencias significativas con respecto a las células de control.

El porcentaje de células MC-38 en apoptosis temprana postratamiento fue de $31.28\% \pm 3.23$ (*t* de Student, *p* < 0.005), 1.72 veces mayor que en las células control, y similar a las células CT-26, para las que el incremento fue de 1.6 veces con respecto a las células control, aunque no se alcanzó la significación estadística. Los efectos del tratamiento se reflejaron predominantemente en la apoptosis tardía, con un incremento de 11.5 veces más en las células EGFR⁻ CT-26 (*p* = 0.012) frente al incremento de 5 veces de las células MC-38 (*p* = 0.001). La apoptosis total se incrementó 2.36 y 3.5 veces para las células MC-38 y CT-26, respectivamente, en comparación con las células control. Las células control MC-38 mostraron un porcentaje de apoptosis total mayor de $22.76\% \pm 2.67$ que las células CT-26 ($13.26\% \pm 5.22$) a las 8 h.

7.3 El proceso inducido por rTBL-1 en células de cáncer de colon es más lento y duradero en las células MC-38 EGFR⁺ que en las células CT-26 EGFR⁻.

Tras observar cierta asincronía en la progresión de la apoptosis inducida por rTBL-1 en los tipos tumorales MC-38 y CT-26 se profundizó en su cinética, comparando las subpoblaciones celulares de ambos tipos celulares en la apoptosis temprana y

tardía tras 8 h de tratamiento. El análisis confirmó que, mientras que el porcentaje de células CT-26 en apoptosis temprana no difirió significativamente del grupo tratado con vehículo (Figura 21A), las células MC-38 mantuvieron una representación significativamente mayor respecto a las células control, así como a las células CT-26 tratadas ($p = 0.005$), confirmando que, a pesar de presentar una tolerancia a *rTBL-1* 21.69% menor (en términos de su CL_{50}), las células MC-38 experimentaron la apoptosis de forma más gradual que las células CT-26, cuya respuesta al tratamiento fue notablemente más ávida, alcanzando consistentemente la mayor subpoblación celular en apoptosis tardía en cada ensayo. Además, la baja representación observada de células CT-26 en apoptosis temprana sugiere un cese de la respuesta apoptótica en la subpoblación superviviente; a diferencia de las células MC-38, cuya subpoblación apoptótica temprana persistió significativamente elevada a las 8 h de exposición a *rTBL-1*, sugiriendo la continuidad de su proceso apoptótico.

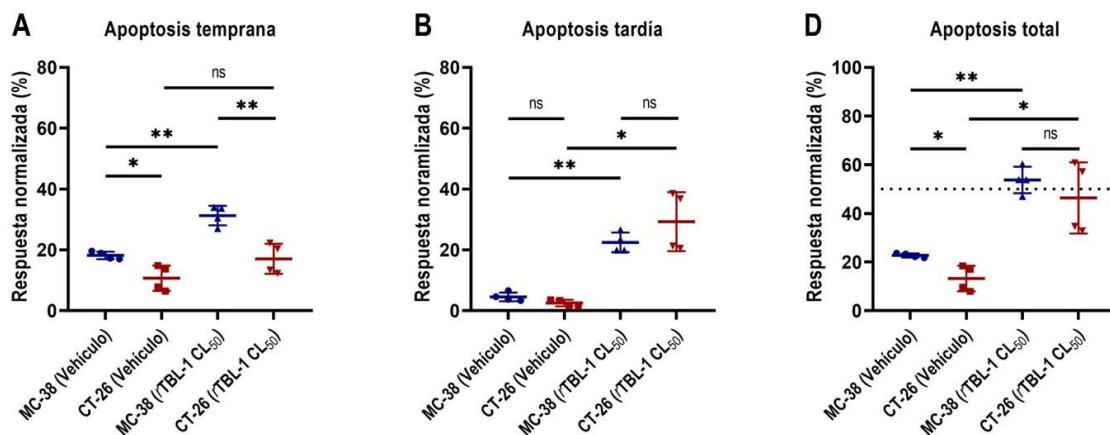


Figura 21. La apoptosis inducida por *rTBL-1* es más lenta y duradera en las células MC-38 EGFR⁺ que en las células CT-26 EGFR⁻. Análisis detallado de la cinética apoptótica de las células MC-38 y CT-26 en (A) apoptosis temprana, (B) tardía y (C) apoptosis total. Los datos se presentan como media ± desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Prueba *t* de Student para dos muestras, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ y **** $p < 0.0001$; ns indica diferencias sin significancia estadística.

La comparación de la apoptosis tardía entre líneas celulares no alcanzó significancia estadística (Figura 21B). Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de células MC-38 y CT-26 en apoptosis total postratamiento

(Figura 21C). La diferencia observada entre los tipos celulares expuestos al vehículo fue estadísticamente significativa ($p = 0.041$) en la apoptosis temprana y vinculable a su denotada sensibilidad a la privación de SFB.

En correspondencia con los efectos previamente reportados en otros tipos de células cancerosas, las propiedades inhibitorias de *rTBL-1* sobre células MC-38 y CT-26 consisten en un efecto apoptótico, con incrementos de 2.36 y 3.5 veces la apoptosis total, respectivamente, tras de 8 h de exposición a la correspondiente CL₅₀. Las diferencias observadas entre los efectos apoptóticos observados en cada tipo tumoral demostraron que las células MC-38 exhibieron una apoptosis más lenta y duradera que la observada en las células CT-26, cuyo nivel de apoptosis se detectó principalmente en la fase tardía, pero cesó después de 8 h de exposición, como lo demuestra la baja representación de células en apoptosis temprana postratamiento.

Al respecto, estudios previos señalan que *rTBL-1* se une en forma específica a *N*-glicanos β 1-6 ramificados asociados al cáncer [22] y más recientemente, Martínez Alarcón y col., [20] ampliaron sus observaciones al predecir mediante análisis de acoplamiento molecular, elevadas afinidades de asociación entre *rTBL-1* y diversos *N*-glicanos aberrantes expresados en el EGFR de células tumorales, en manera dependiente del CBP de *rTBL-1* [20]. En este sentido, podría ser razonable hipotetizar que, dado su fenotipo EGFR⁺, las células MC-38 experimentaron un mayor nivel de agregación de *rTBL-1* que las células CT-26, determinando la aglutinación de monómeros de EGFR con otros receptores de superficie (dotados con motivos de carbohidratos afines al CBP de *rTBL-1*), cuya colectiva interacción, confluyó en un estímulo proapoptótico de mayor duración que en las células CT-26, cuya disponibilidad de glicanos de superficie no incluiría a los del EGFR.

En línea con la hipótesis anterior, Parshenkov y Hennet [283], estudiaron los efectos de una variedad de lectinas vegetales y fúngicas sobre células MC-38, encontrando que la aglutinina de germen de trigo, la lectina I de *Maackia amurensis* y la lectina de *Aleuria aurantia*, indujeron diversas vías de muerte celular por medio de la

reticulación y entrecruzamiento de los receptores glicosilados: *Fas-associated death domain* (FADD), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD) y *Toll-Like Receptors* (TLRs), conduciendo respectivamente a desenlaces por apoptosis extrínseca, necroptosis y piroptosis [283]. De manera análoga aunque en dirección opuesta, la lectina concanavalin A puede sustentar el entrecruzamiento de TKR glicosilados con resultados mitogénicos en linfocitos T [284]. Bajo este marco, la reticulación de monómeros de EGFR producida por el tratamiento con *rTBL-1*, podría haber posibilitado su autofosforilación intermolecular [285] y en forma paralela, inducir la activación de alguna modalidad de muerte celular mediada por receptores. Sin embargo, estas observaciones requieren demostraciones experimentales adecuadas.

7.4 *rTBL-1* induce la activación proteolítica de la caspasa-3 en correlación con la escisión de PARP1 en ambos tipos tumorales, a pesar de una reostasis de PARP1 en el fenotipo EGFR⁻.

La proteína nuclear poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) desempeña un papel clave en la activación de los complejos de reparación del ADN. Niveles elevados de PARP1 han sido asociados con una mayor competencia proliferativa en células de CCR, así como con una disminución de la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de recaídas (SSR) en pacientes con CCR [286]. La escisión de PARP1 mediada por las caspasas efectoras 3 y 7 inhibe su actividad, lo que da lugar a una acumulación de lesiones en el ADN de consecuencias letales para las células [287]. Adicionalmente, el fragmento de 89 kDa de PARP1 (cPARP1) amplifica el estímulo apoptótico a través de una variedad de mecanismos a nivel del citosol [288,289].

El tratamiento con *rTBL-1* aumentó la escisión de PARP1 tanto en células MC-38 (Dunnett, $p = 0.033$) como en células CT-26 ($p = 0.003$), independientemente de su expresión de EGFR (Figura 22A-C). En correlación, se detectaron incrementos significativos en los niveles totales de caspasa-3 en ambos tipos de tumores después del tratamiento con *rTBL-1* (Figura 22D), con enriquecimientos evidentes

en el inmunoblot de procaspasa-3 (~31 kDa) y caspasa-3 (17 kDa), lo que sugiere aumentos tanto en la expresión como en la activación proteolítica de la caspasa efectora (MC-38, $p = 0.004$; CT-26, $p = 0.042$).

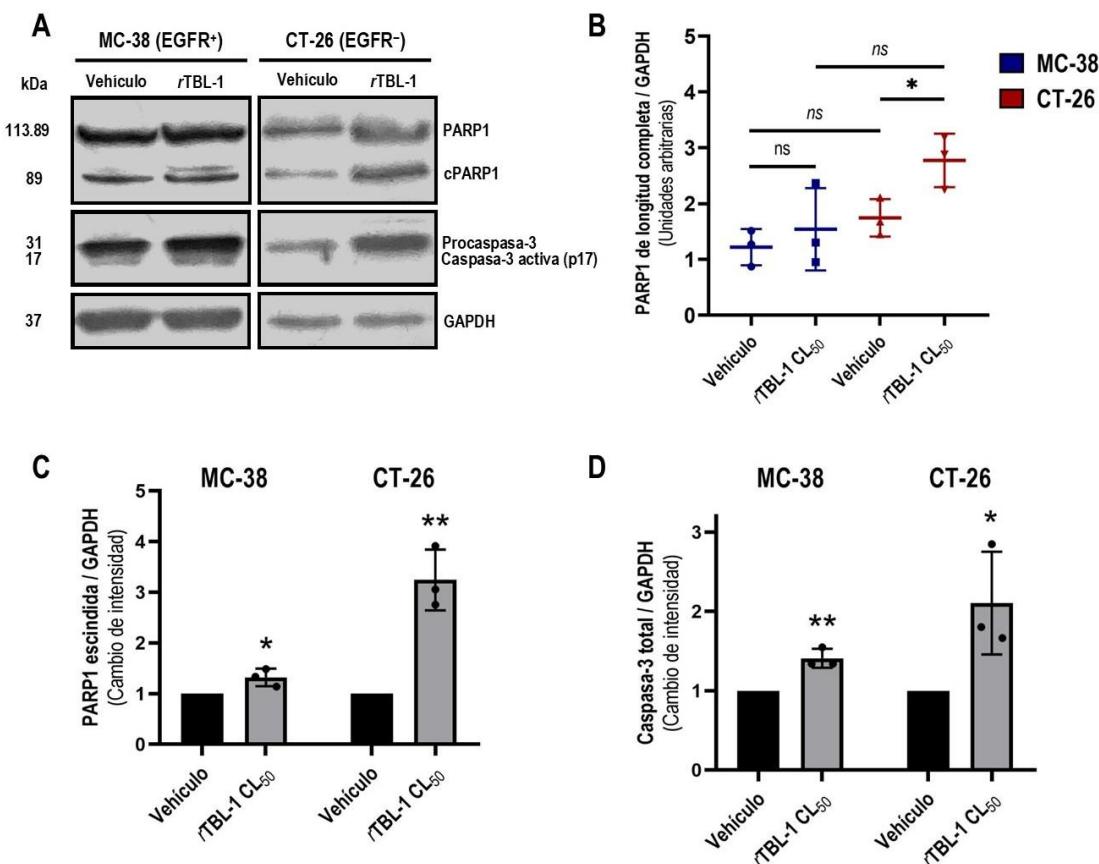


Figura 22. La exposición a rTBL-1 produce aumentos en la activación proteolítica de caspasa-3 y la escisión de PARP1 en células de cáncer de colon murino EGFR⁺ y EGFR⁻. **(A)** Los efectos del tratamiento con rTBL-1 sobre los marcadores de apoptosis se analizaron mediante Western blot después de 8 h de exposición a la CL₅₀ correspondiente, utilizando a GAPDH como control de carga. **(B)** Las células CT-26 aumentaron sus niveles de PARP1 de longitud completa de manera reostática al tratamiento (prueba t de Student). **(C)** Niveles de escisión de PARP1 inducidos por el tratamiento en células MC-38 y CT-26. **(D)** Niveles inducidos por el tratamiento de procaspasa-3 y caspasa-3 en células MC-38 y CT-26. Los datos de cuantificación se presentan como media ± desviación estándar de los datos de densitometría de Western blots con anticuerpos indicados en extractos de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía con prueba post hoc de Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.0005$; ns indica diferencias sin significancia estadística.

Interesantemente, los niveles postratamiento de PARP1 no escindido también se elevaron significativamente en las células CT-26 (Dunnett, $p = 0.038$; Figura 22A,

B). Lo anterior, incluso a pesar de que los niveles basales de PARP1 de longitud completa fueron equivalentes en las células de control de ambos tipos tumorales, lo que podría indicar una expresión accionable de PARP1 o su estabilización por mecanismos postraduccionales [290]. Dado que las células CT-26 mostraron una tolerancia ligeramente mayor a *r*TBL-1, la elevación de PARP1 podría representar un mecanismo de resistencia al tratamiento, también en correlación con la baja representación de células CT-26 en apoptosis temprana tras 8 h de exposición a *r*TBL-1. Al respecto, se sabe que los incrementos accionables de PARP1 en CCR están relacionados con el eje IL-6 / Phospho (Tyr705)-Stat3 [291] el cuál, promueve la proliferación y supervivencia celular mediada por ciclina D1 y BCL-xL, respectivamente [292]. Por lo tanto, podría ser válido postular que dicha respuesta podría constituir una maniobra reostática de las células CT-26 al tratamiento, posiblemente relacionada con su mayor tolerancia, así como con la menor duración del estímulo apoptótico observado en este tipo celular. Sin embargo, cabe señalar que las células HT-29 (EGFR⁺) tratadas con la TBLF o *r*TBL-1 a valores de su CL₅₀ correspondiente, mostraron aumentos similares en sus niveles de PARP1 de longitud completa [21], lo que podría sugerir que la expresión de EGFR en el sistema celular no es la causa subyacente directa o única. Actualmente, el uso conjunto de agentes inhibidores de PARP1 (como sensibilizadores) y quimioterapia sistémica, es postulado para el tratamiento del CCR con deficiencia de reparación por recombinación homóloga (HR) [293]. Por lo tanto, un uso conjunto de *r*TBL-1 e inhibidores de PARP1 podría tener resultados sinérgicos en estos modelos.

Colectivamente, estos resultados indican que, si bien la capacidad de *r*TBL-1 para inducir apoptosis en células de cáncer de colon no depende estrictamente de la abundancia o disponibilidad de EGFR en el sistema celular, su expresión podría estar asociada con respuestas más profundas. Por lo tanto, la evaluación preclínica de *r*TBL-1 en el CCR es relevante, independientemente del nivel de expresión de EGFR en el tumor.

7.5 El tratamiento con *r*TBL-1 intralesional inhibe el crecimiento de tumores de cáncer de colon implantados en ratones BALB/c inmunocompetentes.

Habiendo demostrado que la actividad proapoptótica de *r*TBL-1 no está restringida a los cánceres expresores de EGFR, y dado que, a diferencia de su contraparte nativa, *r*TBL-1 no exhibe propiedades eritroaglutinantes [244] que contraindiquen su administración por vía intralesional, se investigó si la actividad proapoptótica de *r*TBL-1 es capaz de producir respuestas antitumorales en cáncer de colon *in vivo* en un escenario de entrega dirigida. Para este propósito, se eligieron las células CT-26, cuya caracterización genómica las acredita como EGFR⁻, además de ser competentes en reparación de desajustes y por lo tanto, con baja carga de neoantígenos y menor inmunogenicidad que las células MC-38 [256,257,294].

Tras la implantación de las células, se evaluó el efecto de un esquema intralesional de cuatro dosis de 6 mg de *r*TBL-1/kg en 50 µL de PBS estéril, como vehículo, sobre la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) en comparación con el de un grupo control tratado con el mismo volumen de vehículo. Los ratones BALB/c (+/+) presentaron una cinética de crecimiento tumoral que se extendió durante tres semanas, durante las cuales, con la única excepción de un individuo del grupo control, todos los animales completaron el esquema de administración indicado. Un día después de la tercera dosis (día 12), el grupo tratado con *r*TBL-1 presentó un volumen tumoral medio significativamente menor que el grupo control (prueba *t* de Student, $p = 0.005$), seguido de una trayectoria asintótica en la curva de crecimiento tumoral (Figura 23A). El día 20, el tratamiento con *r*TBL-1 resultó en un TGI del 27.81% (prueba *t* de razón pareada, $p = 0.0008$; intervalo de confianza de la razón de 0.6181 a 0.8310) con respecto al grupo tratado con vehículo. No se observó ninguna regresión tumoral completa.

En consonancia con el TGI observado, el tratamiento con *r*TBL-1 aportó un beneficio de supervivencia en ratones BALB/c (+/+) (prueba Log-rank [Mantel–Cox], $p = 0.022$; HR [método logrank] = 0.34), con un 20% del grupo control por debajo del punto final por volumen tumoral al día 24 (Figura 23B).

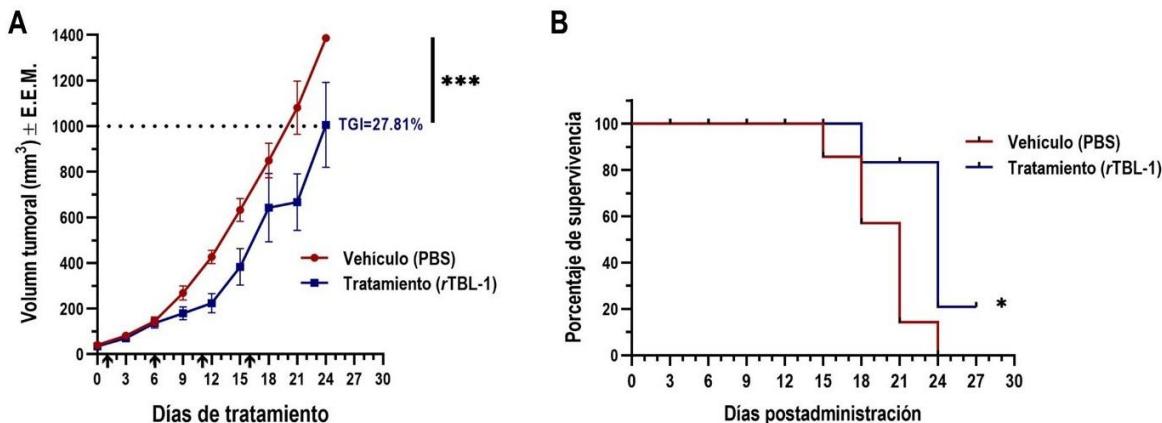


Figura 23. La administración intralesional de *r*TBL-1 inhibe el crecimiento de tumores de cáncer de colon singénico CT-26 EGFR⁻ en ratones BALB/c inmunocompetentes (+/+) con beneficio en la supervivencia. (A) Efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral en huéspedes inmunocompetentes BALB/c (+/+). El volumen tumoral se representa como media ± error estándar de la media (E.E.M.) de cinco a siete animales por grupo. El porcentaje de TGI se presenta cuando la diferencia en el volumen tumoral medio del grupo de tratamiento alcanzó significancia estadística en comparación con el grupo de control. Las flechas indican los puntos temporales de cada administración. Prueba *t* de razón pareada. La línea de puntos indica el punto final definido para los ratones BALB/c (+/+). (B) Efecto del tratamiento sobre la supervivencia de punto final mediante gráficos de Kaplan-Meier en huéspedes inmunocompetentes BALB/c (+/+). Prueba de log-rank (Mantel-Cox), * *p* < 0.05, *** *p* < 0.0005.

7.6 El tratamiento intralesional con *r*TBL-1 no inhibió el crecimiento de tumores implantados en ratones BALB/c (*nu/nu*) inmunodeficientes.

Para abordar la cuestión de una posible colaboración inmunológica en la concreción de la respuesta antitumoral de *r*TBL-1, un ensayo análogo fue realizado en ratones BALB/c (*nu/nu*), cuyo genotipo FOXN1^{nu} determina el desarrollo de un timo rudimentario disfuncional e incapaz de producir células T [295]. La cinética de crecimiento tumoral fue dos veces más rápida en los ratones BALB/c (*nu/nu*), con el 100% de los animales alcanzando el punto final por volumen tumoral (>2,000 mm³) en tan sólo 15 días. El beneficio del tratamiento con *r*TBL-1 fue dependiente de la disponibilidad de células T en el anfitrión, al no haber sido observada TGI respecto al grupo tratado con vehículo (Figura 24A). Asimismo, la administración de *r*TBL-1 no aportó beneficio en el desenlace secundario de supervivencia en los

ratones BALB/c (*nu/nu*), incluso a pesar de la excelente responsividad previamente observada en células CT-26 tratadas en un contexto *in vitro*.

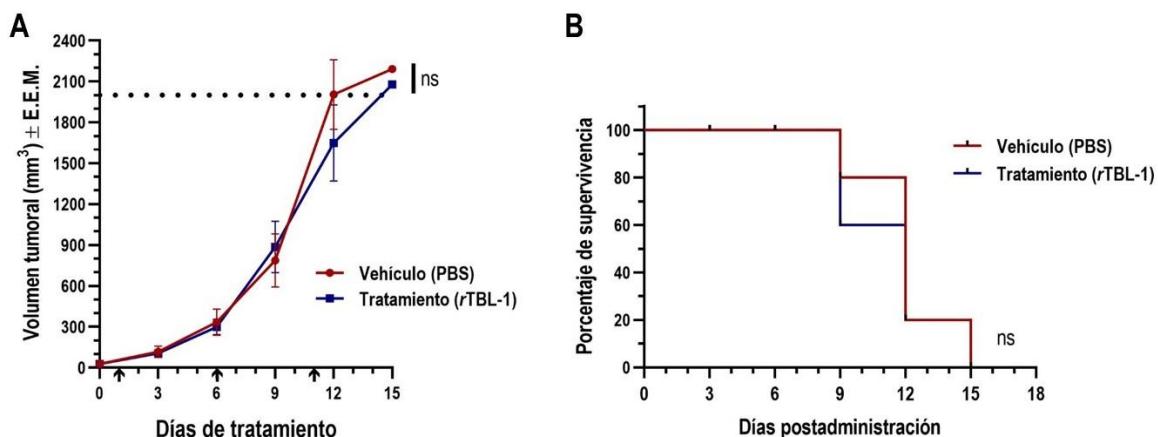


Figura 24. La administración intralesional de *rTBL-1* no inhibe el crecimiento de tumores de la misma estirpe celular implantados en ratones BALB/c inmunodeficientes (*nu/nu*). **(A)** Efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral en huéspedes inmunodeficientes BALB/c (*nu/nu*). El volumen tumoral se representa como media ± E.E.M. de cinco a siete animales por grupo. Las flechas indican los puntos temporales de cada administración. Prueba *t* de razón pareada. La línea de puntos indica el punto final definido para los ratones BALB/c (*nu/nu*). **(B)** Efecto del tratamiento sobre la supervivencia de punto final mediante gráficos de Kaplan-Meier en huéspedes inmunodeficientes BALB/c (*nu/nu*). Prueba de log-rank (Mantel-Cox), ns indica diferencias sin significancia estadística.

Hasta ahora, los datos disponibles sobre la actividad terapéutica de las lectinas de *Phaseolus acutifolius* en modelos animales de cáncer de colon se limitaban a los de TBLF, obtenidos e informados por nuestro grupo. En este trabajo, se presenta la primera evidencia de la actividad antitumoral de *rTBL-1* sobre cáncer de colon en un modelo murino alotrasplantable. También se demuestra que la contribución de los mecanismos inmunológicos mediados por células T es un aspecto crucial para la concreción de la respuesta antitumoral *in vivo* de *rTBL-1*.

Un cúmulo de evidencia preclínica demuestra que la TBLF exhibe, tal como múltiples lectinas producidas en plantas de la familia Fabaceae [296], propiedades eritroaglutinantes sobre eritrocitos humanos de tipo A+ y de conejo, fijados con glutaraldehído, así como una considerable resistencia a la digestión [23,24]. Tales factores, resultaron determinantes para que la evaluación del potencial terapéutico

de la TBLF *in vivo* fuera desarrollada mediante administración intragástrica y sobre cáncer de colon, cuya locación anatómica confería relativa idoneidad para su abordaje experimental con TBLF. Por su parte, *rTBL-1* resiste parcialmente las condiciones digestivas, pero no posee actividad eritroaglutinante [244]; por lo que la exploración preclínica de sus efectos podría ampliarse potencialmente a otros tumores sólidos, no limitados al tubo digestivo. Sin embargo, para ello son necesarios más datos relativos al perfil de seguridad de la *rTBL-1* administrada por vías alternas.

En este trabajo, se probó la eficacia de un esquema de 4 dosis intralesionales de *rTBL-1* (6 mg/Kg) para producir una respuesta antitumoral en masas ectópicas subérnicas de cáncer de colon singénico CT-26, establecidas en ratones BALB/c (+/+). El tratamiento produjo una TGI del 27.81% ($p = 0.0008$) con un modesto, pero significativo beneficio en la sobrevivencia a 27 días ($p = 0.022$). Dado que las células CT-26 se derivan de un carcinoma de colon indiferenciado de grado IV, de rápido crecimiento y altamente metastásicas [297], los resultados de este ensayo indican que la administración de *rTBL-1* por vía intralesional, podría contribuir a mejorar su eficacia en estadios más avanzados de la enfermedad.

Por su parte, los ratones BALB/c (*nu/nu*) inmunodeficientes sometidos al mismo tratamiento, no experimentaron TGI, ni mejoras en la supervivencia a 15 días de iniciado el ensayo. La disparidad en las respuestas, parece indicar que el efecto antitumoral de la *rTBL-1*, constituye el resultado sinérgico de la inducción de apoptosis en la masa tumoral y la citotoxicidad mediada por células T. Al respecto, APCs profesionales de diversos linajes [212,298,299], pueden adquirir aptitudes para captar antígenos tumorales no sólo en el contexto de inflamación inherente a determinados cánceres [300], sino también como resultado de determinadas intervenciones terapéuticas [301–303]. En tales casos, los antígenos peptídicos derivados son presentados a los receptores de células T, expresados en células CD4⁺ [304] y CD8⁺ [305], junto con varios correceptores accesorios que colectivamente sostienen su activación como células Th1 y CTLs, dotados con la

capacidad de amplificar y ejecutar, respectivamente, respuestas inmunes antitumorales específicas de antígeno [306].

En este sentido, análisis relativos a la posible modulación de subpoblaciones inmunitarias infiltrantes postratamiento no pudieron ser realizados en este trabajo, debido a que los volúmenes tumorales alcanzados provocaron una presencia generalizada de necrosis en los especímenes, comprometiendo severamente su utilidad analítica. Otra limitante experimentada, fue la pérdida de hasta dos individuos de un mismo grupo experimental, a causa del establecimiento de dos tumores simultáneos en un mismo anfitrión y la imposibilidad de su abordaje experimental por medio de inyección intralesional.

A la luz de los resultados de este trabajo, cabe recordar que la administración de TBLF en animales sanos, condujo a elevaciones en la concentración sérica de IL-6, incrementos en la pulpa blanca esplénica, así como en los folículos linfáticos de las placas de Peyer en duodeno [24]. Si bien, tales efectos podrían ser resultado de la LN-1 y otras proteínas contenidas en la TBLF, operando como inmunógenos, el incremento en la infiltración linfocitaria observado en el colon de ratas desafiadas con AOM/DSS y tratadas con TBLF, podría haber sido indicativo de la inducción de una respuesta $T_{h}1$, dada la actividad apoptótica observada en lesiones precancerosas [19]. Estudios futuros se enfocarán a la elucidación de los efectos inmunogénicos desencadenados por la actividad antitumoral de la *rTBL-1* en cáncer de colon.

8. CONCLUSIONES

Aunque la expresión de EGFR podría asociarse a respuestas apoptóticas más profundas, posiblemente relacionadas con un mayor nivel de unión de *rTBL-1* a la superficie celular y el consecuente entrecruzamiento de receptores glicosilados aún por identificar, la capacidad de *rTBL-1* para inducir apoptosis en células de cáncer de colon no es estrictamente dependiente de la abundancia o disponibilidad de EGFR en la célula tumoral, dada la existencia de mecanismos inexplorados e independientes de este receptor. Por lo anterior, la exploración preclínica del potencial antitumoral de *rTBL-1* sobre cáncer de colon es relevante, independientemente del nivel de expresión de EGFR en el tumor.

Hasta hoy, los datos disponibles sobre la actividad terapéutica de las lectinas de *Phaseolus acutifolius* en modelos animales de cáncer de colon se limitaban a los de TBLF, obtenidos e informados por nuestro grupo. En este trabajo, presentamos la primera evidencia *in vivo* de actividad antitumoral de la *rTBL-1* en un modelo murino de cáncer de colon alotrasplantable. El beneficio del tratamiento con *rTBL-1* fue dependiente de las células T en el anfitrión, lo que podría indicar que el efecto antitumoral de *rTBL-1* constituye el resultado sinérgico de la inducción de apoptosis y la citotoxicidad mediada por células T infiltrantes.

Dada la imposibilidad de estudiar la modulación de subpoblaciones infiltrantes de células inmunes tras el tratamiento con *rTBL-1* en los especímenes obtenidos, la elucidación de los efectos inmunogénicos desencadenados por la actividad antitumoral de *rTBL-1* en cáncer de colon será abordada en estudios futuros.

9. REFERENCIAS

1. Pezzella, F., Tavassoli, M., Kerr, D.J. *Oxford Textbook of Cancer Biology*; Oxford University Press, **2019**; ISBN 9780198779452.
2. Fidler, I.J. The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The “seed and Soil” Hypothesis Revisited. *Nat Rev Cancer* **2003**, 3, 453–458, doi:10.1038/nrc1098.
3. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* **2018**, 68, 7–30, doi:10.3322/caac.21442.
4. Lozano-Esparza, S.; Sánchez-Blas, H.R.; Huitzil-Meléndez, F.D.; Meneses-Medina, M.I.; Van Loon, K.; Potter, M.B.; Mohar, A.; Lajous, M. Colorectal Cancer Survival in Mexico: Leveraging a National Health Insurance Database. *Cancer Epidemiol* **2025**, 94, 102698, doi:10.1016/j.canep.2024.102698.
5. Kuipers, E.J.; Grady, W.M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T.; Sung, J.J.; Boelens, P.G.; Van De Velde, C.J.H.; Watanabe, T. Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, 1, doi:10.1038/nrdp.2015.65.
6. Wee, P.; Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* **2017**, Vol. 9, Page 52 **2017**, 9, 52, doi:10.3390/CANCERS9050052.
7. Spano, J.P.; Fagard, R.; Soria, J.C.; Rixe, O.; Khayat, D.; Milano, G. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Colorectal Cancer: Preclinical Data and Therapeutic Perspectives. *Annals of Oncology* **2005**, 16, 189–194, doi:10.1093/ANNONC/MDI057.
8. Kim, N.; Cho, D.; Kim, H.; Kim, S.; Cha, Y. je; Greulich, H.; Bass, A.; Cho, H.S.; Cho, J. Colorectal Adenocarcinoma-Derived EGFR Mutants Are Oncogenic and Sensitive to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies, Cetuximab and Panitumumab. *Int J Cancer* **2020**, 146, 2194–2200, doi:10.1002/ijc.32499.
9. Zubair, T.; Bandyopadhyay, D. Small Molecule EGFR Inhibitors as Anti-Cancer Agents: Discovery, Mechanisms of Action, and Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 2651, doi:10.3390/ijms24032651.
10. Sharma, B.; Singh, V.J.; Chawla, P.A. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors as Potential Anticancer Agents: An Update of Recent Progress. *Bioorg Chem* **2021**, 116, 105393, doi:10.1016/J.BIOORG.2021.105393.
11. Yoshino T, Hooda N, Younan D, Muro K, Shitara K, Heinemann V, O'Neil BH, Herrero FR, Peeters M, Soeda J, Suh M, Reichert H, Mezzi K, Fryzek J, Chia V, Rehn M, Stintzing S. A Meta-Analysis of Efficacy and Safety Data from Head-to-Head First-Line Trials of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors versus Bevacizumab in Adult Patients with RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer by Sidedness. *Eur J Cancer* **2024**, 202, 113975, doi:10.1016/J.EJCA.2024.113975.
12. Boland, C.R.; Goel, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2010**, 138, 2073-2087.e3, doi:10.1053/J.GASTRO.2009.12.064/ASSET/342246E7-B244-45BA-BF13-71A4094954D5/MAIN.ASSETS/GR5.JPG.

13. Morris V.K., Kennedy E.B., Baxter N.N., Benson A.B. 3rd, Cercek A., Cho M., Ciombor K.K., Cremolini C., Davis A., Deming D.A., Fakih M.G., Gholami S., Hong T.S., Jaiyesimi I., Klute K., Lieu C., Sanoff H., Strickler J.H., White S., Willis J.A., Eng C. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology* **2023**, *41*, 678–700, doi:10.1200/JCO.22.01690/ASSET/B9EDBA10-3DE7-4BB9-B109-3A1D6732259B/ASSETS/IMAGES/LARGE/JCO.22.01690TA2.JPG.
14. Davidson, B.; Murphy, J.; Underwood, P.W.; Pawlik, T.M. Precision Medicine for Metastatic Colorectal Cancer: Where Do We Stand? *Cancers* **2024**, *Vol. 16, Page 3870* **2024**, *16*, 3870, doi:10.3390/CANCERS16223870.
15. Huang, Z.; Li, C.; Huang, Y.; Liang, W.; Tao, H. Efficacy and Safety of PD-1/L1 Inhibitors as First-Line Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1425596, doi:10.3389/FIMMU.2024.1425596/BIBTEX.
16. Valadez-Vega, C.; Alvarez-Manilla, G.; Riverón-Negrete, L.; García-Carrancá, A.; Morales-González, J.A.; Zuniga-Pérez, C.; Madrigal-Santillán, E.; Esquivel-Soto, J.; Esquivel-Chirino, C.; Villagómez-Ibarra, R.; Bautista M.; Morales-González A. Detection of Cytotoxic Activity of Lectin on Human Colon Adenocarcinoma (Sw480) and Epithelial Cervical Carcinoma (C33-A). *Molecules* **2011**, *16*, 2107–2118, doi:10.3390/molecules16032107.
17. García-Gasca, T.; García-Cruz, M.; Hernandez-Rivera, E.; Josue López-Matínez; Castañeda-Cuevas, A.L.; Yllescas-Gasca, L.; Mendiola-Olaya, E.; Castro-Guilén, J.L.; Blanco-Labra, A. Effects of Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius*) Protease Inhibitor and Semipure Lectin Fractions on Cancer Cells. *Nutr Cancer* **2012**, *64*, 1269–1278, doi:10.1080/01635581.2012.722246.
18. Moreno-Celis, U.; López-Martínez, F.J.; Cervantes-Jiménez, R.; Ferríz-Martínez, R.A.; Blanco-Labra, A.; García-Gasca, T. Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius*) Lectins Induce Apoptosis and Cell Arrest in G0/G1 by P53(Ser46) Phosphorylation in Colon Cancer Cells. *Molecules* **2020**, *Vol. 25, Page 1021* **2020**, *25*, 1021, doi:10.3390/MOLECULES25051021.
19. Moreno-Celis, U.; López-Martínez, J.; Blanco-Labra, A.; Cervantes-Jiménez, R.; Estrada-Martínez, L.E.; García-Pascalin, A.E.; De Jesús Guerrero-Carrillo, M.; Rodríguez-Méndez, A.J.; Mejía, C.; Ferríz-Martínez, R.A.; García-Gasca T. *Phaseolus Acutifolius* Lectin Fractions Exhibit Apoptotic Effects on Colon Cancer: Preclinical Studies Using Dimethylhydrazine or Azoxi-Methane as Cancer Induction Agents. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22101670.
20. Martínez-Alarcón, D.; Castro-Guillén, J.L.; Fitches, E.; Gatehouse, J.A.; Przyborski, S.; Moreno-Celis, U.; Blanco-Labra, A.; García-Gasca, T. Directed Mutagenesis for Arginine Substitution of a *Phaseolus Acutifolius* Recombinant Lectin Disrupts Its Cytotoxic Activity. *Int J Mol Sci* **2024**, *25*, 13258, doi:10.3390/IJMS252413258/S1.
21. Dena-Beltrán, J.L.; Nava-Domínguez, P.; Palmerín-Carreño, D.; Martínez-Alarcón, D.; Moreno-Celis, U.; Valle-Pacheco, M.; Castro-Guillén, J.L.; Blanco-Labra, A.; García-Gasca, T. EGFR and P38MAPK Contribute to the Apoptotic Effect of the Recombinant Lectin from Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius*) in Colon Cancer Cells. *Pharmaceuticals* **2023**, *Vol. 16, Page 290* **2023**, *16*, 290, doi:10.3390/PH16020290.

22. Martínez-Alarcón, D.; Varrot, A.; Fitches, E.; Gatehouse, J.A.; Cao, M.; Pyati, P.; Blanco-Labra, A.; Garcia-Gasca, T. Recombinant Lectin from Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*) with Specific Recognition for Cancer-Associated Glycans: Production, Structural Characterization, and Target Identification. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1–16, doi:10.3390/biom10040654.
23. Ferriz-Martínez, R.; García-García, K.; Torres-Arteaga, I.; Rodriguez-Mendez, A.J.; Guerrero-Carrillo, M. de J.; Moreno-Celis, U.; Ángeles-Zaragoza, M.V.; Blanco-Labra, A.; Gallegos-Corona, M.A.; Robles-Álvarez, J.P.; Mendiola-Olaya E., Andrade-Montemayor H.M., Garcia O.P., Garcia-Gasca T. Tolerability Assessment of a Lectin Fraction from Tepary Bean Seeds (*Phaseolus Acutifolius*) Orally Administered to Rats. *Toxicol Rep* **2015**, *2*, 63–69, doi:10.1016/j.toxrep.2014.10.015.
24. Alatorre-Cruz, J.M.; Pita-López, W.; López-Reyes, R.G.; Ferriz-Martínez, R.A.; Cervantes-Jiménez, R.; de Jesús Guerrero Carrillo, M.; Vargas, P.J.A.; López-Herrera, G.; Rodríguez-Méndez, A.J.; Zamora-Arroyo, A.; Gutiérrez-Sánchez H.; de Souza TR.; Blanco-Labra A.; García-Gasca T. Effects of Intragastrically-Administered Tepary Bean Lectins on Digestive and Immune Organs: Preclinical Evaluation. *Toxicol Rep* **2018**, *5*, 56–64, doi:10.1016/j.toxrep.2017.12.008.
25. DeVita Jr., V.T., Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology, 11e; Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, **2019**; ISBN 978-1-496394-63-7.
26. Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 309–322, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
27. Boffetta, P.; Hainaut, P. Encyclopedia of Cancer. Volume 1. Borsig, L; Läubli, H. *Cell adhesion during tumorigenesis and metastasis*. In: Boffetta, P; Hainaut, Philippe. Encyclopedia of cancer. Amsterdam: Elsevier, 307–314. **2019**, 307–314, doi:10.5167/uzh-186023.
28. Willyard, C. Cancer therapy: an evolved approach. *Nature* **2016**, *532*, 166–168, doi:10.1038/532166a
29. Robinson, D.R.; Wu, Y.M.; Lonigro, R.J.; Vats, P.; Cobain, E.; Everett, J.; Cao, X.; Rabban, E.; Kumar-Sinha, C.; Raymond, V.; Schuetze S.; Alva A.; Siddiqui J.; Chugh R.; Worden F.; Zalupski M.M.; Innis J.; Mody R.J.; Tomlins S.A.; Lucas D.; Baker L.H.; Ramnath N.; Schott A.F.; Hayes D.F.; Vijai J.; Offit K.; Stoffel E.M.; Roberts J.S.; Smith D.C.; Kunju L.P.; Talpaz M.; Cieślik M.; Chinnaiyan A.M.; Integrative Clinical Genomics of Metastatic Cancer. *Nature* **2017**, *548*, 297–303, doi:10.1038/nature23306.
30. Garner, H.; de Visser, K.E. Immune Crosstalk in Cancer Progression and Metastatic Spread: A Complex Conversation. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20*, 483–497, doi:10.1038/s41577-019-0271-z.
31. Loeb, L.A. Human Cancers Express Mutator Phenotypes: Origin, Consequences and Targeting. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 450–457, doi:10.1038/nrc3063.
32. Lodish, H.F.; Berk, A.J.; Kaiser, C.A. *Molecular Cell Biology*. Published in **2016** in New York by W H Freeman and Company **2016**. ISBN 1464183392.

33. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular Biology of the Cell. *Mol Biol Cell* **2017**, doi:10.1201/9781315735368.
34. Greenman, C.; Stephens, P.; Smith, R.; Dalgliesh, G.L.; Hunter, C.; Bignell, G.; Davies, H.; Teague, J.; Butler, A.; Stevens, C.; Edkins, S.; O'Meara S.; Vastrik I.; Schmidt E.E.; Avis T.; Barhorpe S.; Bhamra G.; Buck G.; Choudhury B.; Clements J.; Cole J.; Dicks E.; Forbes S.; Gray K.; Halliday K.; Harrison R.; Hills K.; Hinton J.; Jenkinson A.; Jones D.; Menzies A.; Mironenko T.; Perry J.; Raine K.; Richardson D.; Shepherd R.; Small A.; Tofts C.; Varian J.; Webb T.; West S.; Widaa S.; Yates A.; Cahill DP.; Louis DN.; Goldstraw P.; Nicholson AG.; Brasseur F.; Looijenga L.; Weber B.L.; Chiew Y.E.; DeFazio A.; Greaves M.F.; Green A.R.; Campbell P.; Birney E.; Easton D.F.; Chenevix-Trench G.; Tan M.H.; Khoo S.K.; Teh B.T.; Yuen S.T.; Leung S.Y.; Wooster R.; Futreal P.A.; Stratton M.R. Patterns of Somatic Mutation in Human Cancer Genomes. *Nature* **2007**, 446, 153–158, doi:10.1038/nature05610.
35. Hoffmann, J.-S.; Cazaux, C. Aberrant Expression of Alternative DNA Polymerases: A Source of Mutator Phenotype as Well as Replicative Stress in Cancer. *Semin Cancer Biol* **2010**, 20, 312–319, doi:10.1016/j.semcancer.2010.10.001.
36. Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Cancer Genes and the Pathways They Control. *Nat Med* **2004**, 10, 789–799, doi:10.1038/nm1087.
37. Taylor, J.; Abdel-Wahab, O. PTEN Isoforms with Dual and Opposing Function. *Nat Cell Biol* **2019**, 21, 1306–1308, doi:10.1038/s41556-019-0405-3.
38. Nishida, N.; Kudo, M. Oxidative Stress and Epigenetic Instability in Human Hepatocarcinogenesis. *Digestive Diseases* **2013**, 31, 447–453, doi:10.1159/000355243.
39. Fields, C.; Levin, M. Somatic Multicellularity as a Satisficing Solution to the Prediction-Error Minimization Problem. *Commun Integr Biol* **2019**, 12, 119–132, doi:10.1080/19420889.2019.1643666.
40. Gatenby, R.A.; Brown, J. Mutations, Evolution and the Central Role of a Self-Defined Fitness Function in the Initiation and Progression of Cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **2017**, 1867, 162–166, doi:10.1016/j.bbcan.2017.03.005.
41. Crespi, B.; Summers, K. Evolutionary Biology of Cancer. *Trends Ecol Evol* **2005**, 20, 545–552, doi:10.1016/j.tree.2005.07.007.
42. Greaves, M.; Maley, C.C. Clonal Evolution in Cancer. *Nature* **2012**, 481, 306–313, doi:10.1038/nature10762.
43. Qian, J.; Olbrecht, S.; Boeckx, B.; Vos, H.; Laoui, D.; Etlioglu, E.; Wauters, E.; Pomella, V.; Verbandt, S.; Busschaert, P.; Bassez A.; Franken A.; Bempt MV.; Xiong J.; Weynand B.; van Herck Y.; Antoran A.; Bosisio FM.; Thienpont B.; Floris G.; Vergote I.; Smeets A.; Tejpar S.; Lambrechts D. A Pan-Cancer Blueprint of the Heterogeneous Tumor Microenvironment Revealed by Single-Cell Profiling. *Cell Res* **2020**, 30, 745–762, doi:10.1038/s41422-020-0355-0.
44. Zhang, S.; Dolgalev, I.; Zhang, T.; Ran, H.; Levine, D.A.; Neel, B.G. Both Fallopian Tube and Ovarian Surface Epithelium Are Cells-of-Origin for High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *Nat Commun* **2019**, 10, 5367, doi:10.1038/s41467-019-13116-2.

45. Lawson, D.A.; Kessenbrock, K.; Davis, R.T.; Pervolarakis, N.; Werb, Z. Tumour Heterogeneity and Metastasis at Single-Cell Resolution. *Nat Cell Biol* **2018**, *20*, 1349–1360, doi:10.1038/s41556-018-0236-7.
46. Widmer, D.S.; Hoek, K.S.; Cheng, P.F.; Eichhoff, O.M.; Biedermann, T.; Raaijmakers, M.I.G.; Hemmi, S.; Dummer, R.; Levesque, M.P. Hypoxia Contributes to Melanoma Heterogeneity by Triggering HIF1 α -Dependent Phenotype Switching. *Journal of Investigative Dermatology* **2013**, *133*, 2436–2443, doi:10.1038/jid.2013.115.
47. Kwon, M.J.; Byeon, S.; Kang, S.Y.; Kim, K.-M. Gastric Adenocarcinoma with Enteroblastic Differentiation Should Be Differentiated from Hepatoid Adenocarcinoma: A Study with Emphasis on Clear Cells and Clinicopathologic Spectrum. *Pathol Res Pract* **2019**, *215*, 152525, doi:10.1016/j.prp.2019.152525.
48. Sarode, P.; Mansouri, S.; Karger, A.; Schaefer, M.B.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Savai, R. Epithelial Cell Plasticity Defines Heterogeneity in Lung Cancer. *Cell Signal* **2020**, *65*, 109463, doi:10.1016/j.cellsig.2019.109463.
49. Barker, N.; Ridgway, R.A.; van Es, J.H.; van de Wetering, M.; Begthel, H.; van den Born, M.; Danenberg, E.; Clarke, A.R.; Sansom, O.J.; Clevers, H. Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer. *Nature* **2009**, *457*, 608–611, doi:10.1038/nature07602.
50. Bielas, J.H.; Loeb, L.A. Quantification of Random Genomic Mutations. *Nat Methods* **2005**, *2*, 285–290, doi:10.1038/nmeth751.
51. Visvader, J.E. Cells of Origin in Cancer. *Nature* **2011**, *469*, 314–322, doi:10.1038/nature09781.
52. Vlashi, E.; Pajonk, F. Cancer Stem Cells, Cancer Cell Plasticity and Radiation Therapy. *Semin Cancer Biol* **2015**, *31*, 28–35, doi:10.1016/j.semancer.2014.07.001.
53. Wan, L.; Pantel, K.; Kang, Y. Tumor Metastasis: Moving New Biological Insights into the Clinic. *Nat Med* **2013**, *19*, 1450–1464, doi:10.1038/nm.3391.
54. Keller, L.; Pantel, K. Unravelling Tumour Heterogeneity by Single-Cell Profiling of Circulating Tumour Cells. *Nat Rev Cancer* **2019**, *19*, 553–567, doi:10.1038/s41568-019-0180-2.
55. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. **2000**; *100*(1):57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9..
56. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
57. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **2022**, *12*, 31–46, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
58. Pecorino, L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. **2012**, 360, ISBN: 9780198833024.
59. London, M.; Gallo, E. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Involvement in Epithelial-Derived Cancers and Its Current Antibody-Based Immunotherapies. *Cell Biol Int* **2020**, *44*, 1267–1282, doi:10.1002/cbin.11340.

60. Koes, M.; Rentero, C.; Kota, B.P.; Hoque, M.; Cairns, R.; Wood, P.; Vilà de Muga, S.; Reverter, M.; Alvarez-Guaita, A.; Monastyrskaya, K.; Hughes W.E.; Swarbrick A.; Tebar F.; Daly R.J.; Enrich C.; Grewal T. Annexin A6 Is a Scaffold for PKC α to Promote EGFR Inactivation. *Oncogene* **2013**, *32*, 2858–2872, doi:10.1038/onc.2012.303.
61. Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK Signalling through Scaffolds and Inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, *6*, 827–837, doi:10.1038/nrm1743.
62. Stalnecker, C.A.; Der, C.J. RAS , Wanted Dead or Alive : Advances in Targeting RAS Mutant Cancers. *2020*, *12*, 1–7, doi: 10.1126/scisignal.aay6013.
63. Stewart, D.R.H.; Clark, G.J. Pumping the Brakes on RAS – Negative Regulators and Death Effectors of RAS. *2020*, *1*–10, doi:10.1242/jcs.238865.
64. Asland, R.; Akslen, L.A.; Varhaug, J.E.; Lillehaug, J.R. Co-Expression of the Genes Encoding Transforming Growth Factor- α and Its Receptor in Papillary Carcinomas of the Thyroid. *Int J Cancer* **1990**, *46*, 382–387, doi:10.1002/IJC.2910460308.
65. Yoshida, K.; Kuniyasu, H.; Yasui, W.; Kitadai, Y.; Toge, T.; Tahara, E. Expression of Growth Factors and Their Receptors in Human Esophageal Carcinomas: Regulation of Expression by Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor α . *J Cancer Res Clin Oncol* **1993**, *119*, 401–407, doi:10.1007/BF01218421.
66. Pietsch, T.; Nicotra, M.R.; Fraioli, R.; Wolf, H.K.; Mottolese, M.; Natali, P.G. Expression of the C-Kit Receptor and Its Ligand SCF in Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *Int J Cancer* **1998**, *75*, 171–175, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19980119)75:2<171::AID-IJC1>3.0.CO;2-R.
67. Jurj, A.; Zanoaga, O.; Braicu, C.; Lazar, V.; Tomuleasa, C.; Irimie, A.; Berindan-neagoe, I. A Comprehensive Picture of Extracellular Vesicles and Their Contents. Molecular Transfer to Cancer Cells. *Cancers* **2020**, Vol. 12, Page 298 **2020**, *12*, 298, doi:10.3390/CANCERS12020298.
68. Olea-Flores, M.; Zuñiga-Eulogio, M.D.; Mendoza-Catalán, M.A.; Rodríguez-Ruiz, H.A.; Castañeda-Saucedo, E.; Ortúñoz-Pineda, C.; Padilla-Benavides, T.; Navarro-Tito, N. Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial–Mesenchymal Transition in Cancer. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20122885.
69. Garvalov, B.K.; Foss, F.; Henze, A.T.; Bethani, I.; Gräf-Höchst, S.; Singh, D.; Filatova, A.; Dopeso, H.; Seidel, S.; Damm, M.; Acker-Palmer A.; Acker T. PHD3 Regulates EGFR Internalization and Signalling in Tumours. *Nat Commun* **2014**, *5*, 5577–5577, doi:10.1038/NCOMMS6577.
70. Olsen, S.N.; Wronski, A.; Castaño, Z.; Dake, B.; Malone, C.; De Raedt, T.; Enos, M.; Deroose, Y.S.; Zhou, W.; Guerra, S.; Loda M.; Welm A.; Partridge A.H.; McAllister S.S.; Kuperwasser C.; Cichowski K. Loss of RasGAP Tumor Suppressors Underlies the Aggressive Nature of Luminal B Breast Cancers. *Cancer Discov* **2017**, *7*, 202–217, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0520.
71. Dischinger, P.S.; Tovar, E.A.; Essenburg, C.J.; Madaj, Z.B.; Gardner, E.; Callaghan, M.; Turner, A.N.; Challa, A.K.; Kempston, T.; Eagleson, B.; Kesterson R.A.; Bronson R.T.; Bowman M.J.; Graveel C.R.; Steensma M.R. NF1

- Deficiency Correlates with Estrogen Receptor Signaling and Diminished Survival in Breast Cancer. *bioRxiv* **2018**, 272815, doi:10.1101/272815.
72. Volodko, N.; Gordon, M.; Salla, M.; Ghazaleh, H.A.; Baksh, S. RASSF Tumor Suppressor Gene Family: Biological Functions and Regulation. *FEBS Lett* **2014**, *588*, 2671–2684, doi:10.1016/J.FEBSLET.2014.02.041.
73. Knudson, A.G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1971**, *68*, 820–823, doi:10.1073/PNAS.68.4.820.
74. Sedic, M.; Skibinski, A.; Brown, N.; Gallardo, M.; Mulligan, P.; Martinez, P.; Keller, P.J.; Glover, E.; Richardson, A.L.; Cowan, J.; Toland A.E.; Ravichandran K.; Riethman H.; Naber S.P.; Näär A.M.; Blasco M.A.; Hinds P.W.; Kuperwasser C. Haploinsufficiency for BRCA1 Leads to Cell-Type-Specific Genomic Instability and Premature Senescence. *Nature Communications* **2015** *6:1* **2015**, *6*, 1–14, doi:10.1038/ncomms8505.
75. Hafner, A.; Bulyk, M.L.; Jambhekar, A.; Lahav, G. The Multiple Mechanisms That Regulate P53 Activity and Cell Fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2019** *20:4* **2019**, *20*, 199–210, doi:10.1038/s41580-019-0110-x.
76. Kastenhuber, E.R.; Lowe, S.W. Putting P53 in Context. *Cell* **2017**, *170*, 1062–1078, doi:10.1016/J.CELL.2017.08.028.
77. Dyson, N.J. RB1: A Prototype Tumor Suppressor and an Enigma. *Genes Dev* **2016**, *30*, 1492, doi:10.1101/GAD.282145.116.
78. Li, W.; Cooper, J.; Karajannis, M.A.; Giancotti, F.G. Merlin: A Tumour Suppressor with Functions at the Cell Cortex and in the Nucleus. *EMBO Rep* **2012**, *13*, 204–215, doi:10.1038/EMBOR.2012.11.
79. Curto, M.; Cole, B.K.; Lallemand, D.; Liu, C.H.; McClatchey, A.I. Contact-Dependent Inhibition of EGFR Signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol* **2007**, *177*, 893–903, doi:10.1083/JCB.200703010.
80. Mota, M.; Shevde, L.A. Merlin Regulates Signaling Events at the Nexus of Development and Cancer. *Cell Communication and Signaling* **2020**, *18*, 1–8, doi:10.1186/S12964-020-00544-7/FIGURES/2.
81. Burnet, F.M. Immunological Aspects of Malignant Disease. *Med J Aust* **1971**, *2*, 317–325, doi:10.5694/j.1326-5377.1971.tb50568.x.
82. Fridman, W.H.; Zitvogel, L.; Sautès-Fridman, C.; Kroemer, G. The Immune Contexture in Cancer Prognosis and Treatment. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**, *14*, 717–734, doi:10.1038/nrclinonc.2017.101.
83. Hwang, J.R.; Byeon, Y.; Kim, D.; Park, S.G. Recent Insights of T Cell Receptor-Mediated Signaling Pathways for T Cell Activation and Development. *Exp Mol Med* **2020**, *52*, 750–761, doi:10.1038/s12276-020-0435-8.
84. van der Leun, A.M.; Thommen, D.S.; Schumacher, T.N. CD8+ T Cell States in Human Cancer: Insights from Single-Cell Analysis. *Nat Rev Cancer* **2020**, *20*, 218–232, doi:10.1038/s41568-019-0235-4.
85. Gitlin, A.D.; Shulman, Z.; Nussenzweig, M.C. Clonal Selection in the Germinal Centre by Regulated Proliferation and Hypermutation. *Nature* **2014**, *509*, 637–640, doi:10.1038/nature13300.

86. Joffre, O.P.; Segura, E.; Savina, A.; Amigorena, S. Cross-Presentation by Dendritic Cells. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12*, 557–569, doi:10.1038/nri3254.
87. Idoyaga, J.; Steinman, R.M. SnapShot: Dendritic Cells. *Cell* **2011**, *146*, 660–660.e2, doi:10.1016/j.cell.2011.08.010.
88. Jung, S.; Unutmaz, D.; Wong, P.; Sano, G.I.; De Los Santos, K.; Sparwasser, T.; Wu, S.; Vuthoori, S.; Ko, K.; Zavala, F.; Pamer E.G.; Littman D.R.; Lang R.A. In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity* **2002**, *17*, 211–220, doi:10.1016/S1074-7613(02)00365-5.
89. Steinman, R.M.; Idoyaga, J. Features of the Dendritic Cell Lineage. *Immunol Rev* **2010**, *234*, 5–17, doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00888.x.
90. Cebrian, I.; Visentin, G.; Blanchard, N.; Jouve, M.; Bobard, A.; Moita, C.; Enninga, J.; Moita, L.F.; Amigorena, S.; Savina, A. Sec22b Regulates Phagosomal Maturation and Antigen Crosspresentation by Dendritic Cells. *Cell* **2011**, *147*, 1355–1368, doi:10.1016/j.cell.2011.11.021.
91. Lanzavecchia, A.; Sallusto, F. The Instructive Role of Dendritic Cells on T Cell Responses: Lineages, Plasticity and Kinetics. *Curr Opin Immunol* **2001**, *13*, 291–298, doi:10.1016/S0952-7915(00)00218-1.
92. Broz, M.L.; Binnewies, M.; Boldajipour, B.; Nelson, A.E.; Pollack, J.L.; Erle, D.J.; Barczak, A.; Rosenblum, M.D.; Daud, A.; Barber, D.L.; Amigorena S.; Van't Veer L.J.; Sperling A.I.; Wolf D.M.; Krummel M.F. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 638–652, doi:10.1016/j.ccr.2014.09.007.
93. Becht, E.; Giraldo, N.A.; Germain, C.; de Reyniès, A.; Laurent-Puig, P.; Zucman-Rossi, J.; Dieu-Nosjean, M.C.; Sautès-Fridman, C.; Fridman, W.H. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Adv Immunol* **2016**, *130*, 95–190, doi:10.1016/bs.ai.2015.12.002.
94. Garg, A.D.; Martin, S.; Golab, J.; Agostinis, P. Danger Signalling during Cancer Cell Death: Origins, Plasticity and Regulation. *Cell Death Differ* **2014**, *21*, 26–38, doi:10.1038/cdd.2013.48.
95. Smith-Garvin, J.E.; Koretzky, G.A.; Jordan, M.S. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol* **2009**, *27*, 591–619, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
96. von Boehmer H, P.K. Self-Nonself Discrimination by T Cells. *Science* (1979) **1990**, *248*, 1369–1373, doi:10.1038/s41577-024-01102-9.
97. Artyomov, M.N.; Lis, M.; Devadas, S.; Davis, M.M.; Chakraborty, A.K. CD4 and CD8 Binding to MHC Molecules Primarily Acts to Enhance Lck Delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 16916–16921, doi:10.1073/pnas.1010568107.
98. Hořejší, V.; Zhang, W.; Schraven, B. Transmembrane Adaptor Proteins: Organizers of Immunoreceptor Signalling. *Nat Rev Immunol* **2004**, *4*, 603–616, doi:10.1038/nri1414.

99. Gaud, G.; Lesourne, R.; Love, P.E. Regulatory Mechanisms in T Cell Receptor Signalling. *Nat Rev Immunol* **2018**, *18*, 485–497, doi:10.1038/s41577-018-0020-8.
100. Xu, X.; Li, H.; Xu, C. Structural Understanding of T Cell Receptor Triggering. *Cell Mol Immunol* **2020**, *17*, 193–202, doi:10.1038/s41423-020-0367-1.
101. Ando, M.; Ito, M.; Srirat, T.; Kondo, T. Memory T Cell, Exhaustion, and Tumor Immunity. *Immunol Med* **2020**, *43*, 1–9, doi:10.1080/25785826.2019.1698261.
102. Ahrends, T.; Busselaar, J.; Severson, T.M.; Bąbała, N.; de Vries, E.; Bovens, A.; Wessels, L.; van Leeuwen, F.; Borst, J. CD4+ T Cell Help Creates Memory CD8+ T Cells with Innate and Help-Independent Recall Capacities. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1–13, doi:10.1038/s41467-019-13438-1.
103. He, Y.; Tian, Z. NK Cell Education via Nonclassical MHC and Non-MHC Ligands. *Cell Mol Immunol* **2017**, *14*, 321–330, doi:10.1038/cmi.2016.26.
104. Raulet, D.H.; Guerra, N. Oncogenic Stress Sensed by the Immune System: Role of Natural Killer Cell Receptors. *Nat Rev Immunol* **2009**, *9*, 568–580, doi:10.1038/nri2604.
105. Tassi, I.; Klesney-Tait, J.; Colonna, M. Dissecting Natural Killer Cell Activation Pathways through Analysis of Genetic Mutations in Human and Mouse. *Immunol Rev* **2006**, *214*, 92–105, doi:10.1111/J.1600-065X.2006.00463.X.
106. Kwon, H.; Kim, N.; Kim, H.S. Molecular Checkpoints Controlling Natural Killer Cell Activation and Their Modulation for Cancer Immunotherapy. *Exp Mol Med* **2017**, *1*–11, doi:10.1038/emm.2017.42.
107. Long, E.O. Negative Signaling by Inhibitory Receptors: The NK Cell Paradigm. *Immunol Rev* **2008**, *224*, 70–84, doi:10.1111/J.1600-065X.2008.00660.X.
108. Cullen, S.P.; Brunet, M.; Martin, S.J. Granzymes in Cancer and Immunity. *Cell Death Differ* **2010**, *616–623*, doi:10.1038/cdd.2009.206.
109. Cullen, S.P.; Martin, S.J. Mechanisms of Granule-Dependent Killing. *Cell Death & Differentiation* **2008 15:2** *2007*, *15*, 251–262, doi:10.1038/sj.cdd.4402244.
110. Voskoboinik, I.; Whisstock, J.C.; Trapani, J.A. Perforin and Granzymes: Function, Dysfunction and Human Pathology. *Nat Rev Immunol* **2015**, *15*, 388–400, doi:10.1038/nri3839.
111. Stewart, S.E.; Kondos, S.C.; Matthews, A.Y.; D'Angelo, M.E.; Dunstone, M.A.; Whisstock, J.C.; Trapani, J.A.; Bird, P.I. The Perforin Pore Facilitates the Delivery of Cationic Cargos. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 9172–9181, doi:10.1074/jbc.M113.544890.
112. Russell, J.H.; Ley, T.J. Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **2002**, *20*, 323–370, doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.20.100201.131730/CITE/REFWORKS.
113. Chiossone, L.; Dumas, P.Y.; Vienne, M.; Vivier, E. Natural Killer Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Cancer. *Nature Reviews Immunology* **2018 18:11** *2018*, *18*, 671–688, doi:10.1038/s41577-018-0061-z.

114. Fan, Z.; Beresford, P.J.; Zhang, D.; Xu, Z.; Novina, C.D.; Yoshida, A.; Pommier, Y.; Lieberman, J. Cleaving the Oxidative Repair Protein Ape1 Enhances Cell Death Mediated by Granzyme A. *Nat Immunol* 2003 4:2 **2003**, 4, 145–153, doi:10.1038/ni885.
115. Fan, Z.; Beresford, P.J.; Oh, D.Y.; Zhang, D.; Lieberman, J. Tumor Suppressor NM23-H1 Is a Granzyme A-Activated DNase during CTL-Mediated Apoptosis, and the Nucleosome Assembly Protein Set Is Its Inhibitor. *Cell* **2003**, 112, 659–672, doi:10.1016/S0092-8674(03)00150-8/ASSET/1E532B0B-CD34-4950-B18F-9ECC721BBADD/MAIN.ASSETS/GR7.JPG.
116. Chowdhury, D.; Beresford, P.J.; Zhu, P.; Zhang, D.; Sung, J.S.; Demple, B.; Perrino, F.W.; Lieberman, J. The Exonuclease TREX1 Is in the SET Complex and Acts in Concert with NM23-H1 to Degrade DNA during Granzyme A-Mediated Cell Death. *Mol Cell* **2006**, 23, 133–142, doi:10.1016/j.molcel.2006.06.005.
117. Zhang, D.; Beresford, P.J.; Greenberg, A.H.; Lieberman, J. Granzymes A and B Directly Cleave Lamins and Disrupt the Nuclear Lamina during Granule-Mediated Cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98, 5746–5751, doi:10.1073/PNAS.101329598/ASSET/497AC982-C303-451C-9D58-4549E53D3961/ASSETS/GRAPHIC/PQ1013295006.jpeg.
118. Zha, J.; Weiler, S.; Oh, K.J.; Wei, M.C.; Korsmeyer, S.J. Posttranslational N-Myristoylation of BID as a Molecular Switch for Targeting Mitochondria and Apoptosis. *Science (1979)* **2000**, 290, 1761–1765, doi:10.1126/science.290.5497.1761.
119. Hockings, C.; Anwari, K.; Ninnis, R.L.; Brouwer, J.; O'Hely, M.; Evangelista, M.; Hinds, M.G.; Czabotar, P.E.; Lee, E.F.; Fairlie, W.D.; Dewson G.; Kluck R.M. Bid Chimeras Indicate That Most BH3-Only Proteins Can Directly Activate Bak and Bax, and Show No Preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis* **2015**, 6, 1–9, doi:10.1038/cddis.2015.105.
120. Dorstyn, L.; Akey, C.W.; Kumar, S. New Insights into Apoptosome Structure and Function. *Cell Death Differ* **2018**, 25, 1194–1208, doi:10.1038/s41418-017-0025-z.
121. Chávez-Galán, L.; Arenas-Del Angel, M.C.; Zenteno, E.; Chávez, R.; Lascurain, R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell Mol Immunol* **2009**, 6, 15–25, doi:10.1038/cmi.2009.3.
122. Luo, M.; Lu, Z.; Sun, H.; Yuan, K.; Zhang, Q.; Meng, S.; Wang, F.; Guo, H.; Ju, X.; Liu, Y.; Ye T.; Lu Z.; Zhai Z. Nuclear Entry of Active Caspase-3 Is Facilitated by Its P3-Recognition-Based Specific Cleavage Activity. *Cell Res* **2010**, 20, 211–222, doi:10.1038/cr.2010.9.
123. Pinkoski, M.J.; Heibein, J.A.; Barry, M.; Bleackley, R.C. Nuclear Translocation of Granzyme B in Target Cell Apoptosis. *Cell Death Differ* **2000**, 7, 17–24, doi:10.1038/sj.cdd.4400604.
124. McGranahan, N.; Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **2017**, 168, 613–628, doi:10.1016/j.cell.2017.01.018.
125. Palucka, A.K.; Coussens, L.M. The Basis of Oncoimmunology. *Cell* **2016**, 164, 1233–1247, doi:10.1016/j.cell.2016.01.049.

126. Rosenthal, R.; Cadieux, E.L.; Salgado, R.; Al-Bakir, M.; Moore, D.A.; Hiley, C.T.; Lund, T.; Tanić, M.; Reading, J.L.; Joshi, K.; Henry J.Y.; Ghorani E.; Wilson G.A.; Birkbak N.J.; Jamal-Hanjani M.; Veeriah S.; Szallasi Z.; Loi S.; Hellmann M.D.; Feber A.; Chain B.; Herrero J.; Quezada S.A.; Demeulemeester J.; Van Loo P.; Beck S.; McGranahan N.; Swanton C.; TRACERx consortium. Neoantigen-Directed Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Nature* **2019**, *567*, 479–485, doi:10.1038/s41586-019-1032-7.
127. Schreiber, R.D.; Old, L.J.; Smyth, M.J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* (1979) **2011**, *331*, 1565–1570, doi:10.1126/SCIENCE.1203486/SUPPL_FILE/1565.MP3.
128. Nakamura, K.; Smyth, M.J. Myeloid Immunosuppression and Immune Checkpoints in the Tumor Microenvironment. *Cell Mol Immunol* **2020**, *17*, 1–12, doi:10.1038/s41423-019-0306-1.
129. Anderson, K.G.; Stromnes, I.M.; Greenberg, P.D. Perspective Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T Cell Activity : A Case for Synergistic Therapies. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 311–325, doi:10.1016/j.ccr.2017.02.008.
130. Martinon, F.; Mayor, A.; Tschopp, J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev Immunol* **2009**, *27*, 229–265, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715.
131. Elliott, M.R.; Ravichandran, K.S. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Dev Cell* **2016**, *38*, 147–160, doi:10.1016/j.devcel.2016.06.029.
132. Meylan, E.; Tschopp, J.; Karin, M. Intracellular Pattern Recognition Receptors in the Host Response. *Nature* **2006**, *442*, 39–44, doi:10.1038/nature04946.
133. Olive, A.J.; Sassevi, C.M. Metabolic Crosstalk between Host and Pathogen: Sensing, Adapting and Competing. *Nat Rev Microbiol* **2016**, *14*, 221–234, doi:10.1038/nrmicro.2016.12.
134. Korhonen, R.; Lahti, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2005**, *4*, 471–479, doi:10.2174/1568010054526359.
135. Kruk, J.; Aboul-Enein, H.Y. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Carcinogenesis: Implications of Oxidative Stress on the Progression and Development of Several Cancer Types. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2017**, *17*, 904–919, doi:10.2174/1389557517666170228115324.
136. Fernandes, J.V.; Cobucci, R.N.O.; Jatobá, C.A.N.; de Medeiros Fernandes, T.A.A.; de Azevedo, J.W.V.; de Araújo, J.M.G. The Role of the Mediators of Inflammation in Cancer Development. *Pathology and Oncology Research* **2015**, *21*, 527–534, doi: 10.1007/s12253-015-9913-z.
137. Zhong, Z.; Sanchez-Lopez, E.; Karin, M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell* **2016**, *166*, 288–298, doi:10.1016/j.cell.2016.05.051.
138. Coffelt, S.B.; Wellenstein, M.D.; De Visser, K.E. Neutrophils in Cancer: Neutral No More. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 431–446, doi:10.1038/nrc.2016.52.

139. Sies, H.; Jones, D.P. Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21*, 363–383, doi:10.1038/s41580-020-0230-3.
140. Dunn, G.P.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* **2004**, *22*, 329–360, doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
141. Wilkie, K.P.; Hahnfeldt, P. Modeling the Dichotomy of the Immune Response to Cancer: Cytotoxic Effects and Tumor-Promoting Inflammation. *Bull Math Biol* **2017**, *79*, 1426–1448, doi:10.1007/s11538-017-0291-4.
142. Poh, A.R.; Ernst, M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol* **2018**, *8*, 343581, doi:10.3389/FONC.2018.00049/PDF.
143. Karihtala, K.; Leivonen, S.K.; Brück, O.; Karjalainen-Lindsberg, M.L.; Mustjoki, S.; Pellinen, T.; Leppä, S. Prognostic Impact of Tumor-Associated Macrophages on Survival Is Checkpoint Dependent in Classical Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12040877.
144. Liang, P.; Chai, Y.; Zhao, H.; Wang, G. Predictive Analyses of Prognostic-Related Immune Genes and Immune Infiltrates for Glioblastoma. *Diagnostics* **2020**, *10*, doi:10.3390/diagnostics10030177.
145. Xu, C.; Sui, S.; Shang, Y.; Yu, Z.; Han, J.; Zhang, G.; Ntim, M.; Hu, M.; Gong, P.; Chen, H.; Zhang X. The Landscape of Immune Cell Infiltration and Its Clinical Implications of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Adv Res* **2020**, *24*, 139–148, doi:10.1016/j.jare.2020.03.009.
146. Bellora, F.; Castriconi, R.; Dondero, A.; Pessino, A.; Nencioni, A.; Liggieri, G.; Moretta, L.; Mantovani, A.; Moretta, A.; Bottino, C. TLR Activation of Tumor-Associated Macrophages from Ovarian Cancer Patients Triggers Cytolytic Activity of NK Cells. *Eur J Immunol* **2014**, *44*, 1814–1822, doi:10.1002/eji.201344130.
147. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. *Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease*; **2018**; Vol. 233; ISBN 9177948564.
148. Maldonado, R.F.; Sá-Correia, I.; Valvano, M.A. Lipopolysaccharide Modification in Gram-Negative Bacteria during Chronic Infection. *FEMS Microbiol Rev* **2016**, *40*, 480–493, doi:10.1093/femsre/fuw007.
149. Wong, S.C.; Puaux, A.L.; Chittezhath, M.; Shalova, I.; Kajiji, T.S.; Wang, X.; Abastado, J.P.; Lam, K.P.; Biswas, S.K. Macrophage Polarization to a Unique Phenotype Driven by B Cells. *Eur J Immunol* **2010**, *40*, 2296–2307, doi:10.1002/eji.200940288.
150. Murray, P.J.; Allen, J.E.; Biswas, S.K.; Fisher, E.A.; Gilroy, D.W.; Goerdt, S.; Gordon, S.; Hamilton, J.A.; Ivashkiv, L.B.; Lawrence, T.; Locati M.; Mantovani A.; Martinez F.O.; Mege J.L.; Mosser D.M.; Natoli G.; Saeij J.P.; Schultze J.L.; Shirey K.A.; Sica A.; Suttles J.; Udalova I.; van Ginderachter J.A.; Vogel S.N.; Wynn T.A. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **2014**, *41*, 14–20, doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.06.008.

151. Vergadi, E.; Ieronymaki, E.; Lyroni, K.; Vaporidi, K.; Tsatsanis, C. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *The Journal of Immunology* **2017**, *198*, 1006–1014, doi:10.4049/jimmunol.1601515.
152. Weichhart, T.; Säemann, M.D. The PI3K/Akt/MTOR Pathway in Innate Immune Cells: Emerging Therapeutic Applications. *Ann Rheum Dis* **2008**, *67*, 70–75, doi:10.1136/ard.2008.098459.
153. Liu, Q.; Yang, C.; Wang, S.; Shi, D.; Wei, C.; Song, J.; Lin, X.; Dou, R.; Bai, J.; Xiang, Z.; Huang S.; Liu K.; Xiong B. Wnt5a-Induced M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages via IL-10 Promotes Colorectal Cancer Progression. *Cell Communication and Signaling* **2020**, *18*, 1–19, doi:10.1186/s12964-020-00557-2.
154. Fang, X.; Yu, S.X.; Lu, Y.; Bast, R.C.; Woodgett, J.R.; Mills, G.B. Phosphorylation and Inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 by Protein Kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 11960–11965, doi:10.1073/pnas.220413597.
155. Beurel, E.; Grieco, S.F.; Jope, R.S. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Regulation, Actions, and Diseases. *Pharmacol Ther* **2015**, *148*, 114–131, doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
156. Wu, G.; He, X. Threonine 41 in β-Catenin Serves as a Key Phosphorylation Relay Residue in β-Catenin Degradation. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5319–5323, doi:10.1021/bi0601149.
157. Kaler, P.; Augenlicht, L.; Klampfer, L. Macrophage-Derived IL-1B Stimulates Wnt Signaling and Growth of Colon Cancer Cells: A Crosstalk Interrupted by Vitamin D³. *Oncogene* **2009**, *28*, 3892–3902, doi:10.1038/onc.2009.247.
158. Feng, Y.; Ren, J.; Gui, Y.; Wei, W.; Shu, B.; Lu, Q.; Xue, X.; Sun, X.; He, W.; Yang, J.; Dai C. Wnt/b-Catenin-Promoted Macrophage Alternative Activation Contributes to Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* **2018**, *29*, 182–193, doi:10.1681/ASN.2017040391.
159. Yang, Y.; Ye, Y.C.; Chen, Y.; Zhao, J.L.; Gao, C.C.; Han, H.; Liu, W.C.; Qin, H.Y. Crosstalk between Hepatic Tumor Cells and Macrophages via Wnt/β-Catenin Signaling Promotes M2-like Macrophage Polarization and Reinforces Tumor Malignant Behaviors. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41419-018-0818-0.
160. Biswas, S.K.; Mantovani, A. Macrophage Plasticity and Interaction with Lymphocyte Subsets: Cancer as a Paradigm. *Nat Immunol* **2010**, *11*, 889–896, doi:10.1038/ni.1937.
161. Jetten, N.; Verbruggen, S.; Gijbels, M.J.; Post, M.J.; De Winther, M.P.J.; Donners, M.M.P.C. Anti-Inflammatory M2, but Not pro-Inflammatory M1 Macrophages Promote Angiogenesis in Vivo. *Angiogenesis* **2014**, *17*, 109–118, doi:10.1007/s10456-013-9381-6.
162. Wang, Y.C.; He, F.; Feng, F.; Liu, X.W.; Dong, G.Y.; Qin, H.Y.; Hu, X. Bin; Zheng, M.H.; Liang, L.; Feng, L.; Liang Y.M.; Han H. Notch Signaling Determines the M1 versus M2 Polarization of Macrophages in Antitumor Immune Responses. *Cancer Res* **2010**, *70*, 4840–4849, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0269/656177/P/NOTCH-SIGNALING-DETERMINES-THE-M1-VERSUS-M2.

163. Shaath, H.; Toor, S.M.; Nair, V.S.; Elkord, E.; Alajez, N.M. Transcriptomic Analyses Revealed Systemic Alterations in Gene Expression in Circulation and Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11121994.
164. Halim, L.; Romano, M.; McGregor, R.; Correa, I.; Pavlidis, P.; Grageda, N.; Hoong, S.J.; Yuksel, M.; Jassem, W.; Hannen, R.F.; Ong M.; Mckinney O.; Hayee B.; Karagiannis S.N.; Powell N.; Lechler R.I.; Nova-Lamperti E.; Lombardi G. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs That Support a Tumorigenic Environment. *Cell Rep* **2017**, *20*, 757–770, doi:10.1016/j.celrep.2017.06.079.
165. Chen, Z.; Zhu, Y.; Du, R.; Pang, N.; Zhang, F.; Dong, D.; Ding, J.; Ding, Y. Role of Regulatory B Cells in the Progression of Cervical Cancer. *Mediators Inflamm* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/6519427.
166. Gabrilovich, D.I.; Ostrand-Rosenberg, S.; Bronte, V. Coordinated Regulation of Myeloid Cells by Tumours. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12*, 253–268, doi:10.1038/nri3175.
167. Bergenfelz, C.; Leandersson, K. The Generation and Identity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Front Oncol* **2020**, *10*, 17–19, doi:10.3389/fonc.2020.00109.
168. Mantovani, A.; Barajon, I.; Garlanda, C. IL-1 and IL-1 Regulatory Pathways in Cancer Progression and Therapy. *Immunol Rev* **2018**, *281*, 57–61, doi:10.1111/imr.12614.
169. Elkabets, M.; Ribeiro, V.S.G.; Dinarello, C.A.; Ostrand-Rosenberg, S.; Di Santo, J.P.; Apte, R.N.; Vosshenrich, C.A.J. IL-1 β Regulates a Novel Myeloid-Derived Suppressor Cell Subset That Impairs NK Cell Development and Function. *Eur J Immunol* **2010**, *40*, 3347–3357, doi:10.1002/eji.201041037.
170. Josephs, D.H.; Bax, H.J.; Karagiannis, S.N. Tumour-Associated Macrophage Polarisation and Re-Education with Immunotherapy Development , Growth and Metastasis Activity to Target Tumour Cells 6. Targeting TAMs as an Immunotherapeutic Strategy for Cancer Antibodies Macrophages In Vitro and In Vivo 2. *Frontiers in Bioscience* **2015**, *7*, 334–351.
171. Qian, B.Z.; Pollard, J.W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* **2010**, *141*, 39–51, doi:10.1016/j.cell.2010.03.014.
172. Müller, S.; Kohanbash, G.; Liu, S.J.; Alvarado, B.; Carrera, D.; Bhaduri, A.; Watchmaker, P.B.; Yagnik, G.; Di Lullo, E.; Malatesta, M.; Amankulor N.M.; Kriegstein A.R.; Lim D.A.; Aghi M.; Okada H.; Diaz A. Single-Cell Profiling of Human Gliomas Reveals Macrophage Ontogeny as a Basis for Regional Differences in Macrophage Activation in the Tumor Microenvironment. *Genome Biol* **2017**, *18*, 1–14, doi:10.1186/s13059-017-1362-4.
173. Paardekooper, L.M.; Vos, W.; Bogaart, G. van den; Paardekooper, L.M.; Vos, W.; Bogaart, G. van den Oxygen in the Tumor Microenvironment: Effects on Dendritic Cell Function. *Oncotarget* **2019**, *10*, 883–896, doi:10.18632/ONCOTARGET.26608.
174. Herber, D.L.; Cao, W.; Nefedova, Y.; Novitskiy, S. V.; Nagaraj, S.; Tyurin, V.A.; Corzo, A.; Cho, H.I.; Celis, E.; Lennox, B.; Knight S.C.; Padhya T.; McCaffrey TV.; McCaffrey JC.; Antonia S.; Fishman M.; Ferris RL.; Kagan VE.; Gabrilovich

- DI.. Lipid Accumulation and Dendritic Cell Dysfunction in Cancer. *Nat Med* 2010 16:8 **2010**, 16, 880–886, doi:10.1038/nm.2172.
175. Noubade, R.; Majri-Morrison, S.; Tarbell, K. V. Beyond CDC1: Emerging Roles of DC Crosstalk in Cancer Immunity. *Front Immunol* **2019**, 10, 421805, doi:10.3389/FIMMU.2019.01014/PDF.
176. Borst, J.; Ahrends, T.; Bąbała, N.; Melief, C.J.M.; Kastenmüller, W. CD4+ T Cell Help in Cancer Immunology and Immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2018**, 18, 635–647, doi:10.1038/s41577-018-0044-0.
177. Molon, B.; Ugel, S.; Del Pozzo, F.; Soldani, C.; Zilio, S.; Avella, D.; De Palma, A.; Mauri, P.L.; Monegal, A.; Rescigno, M.; Savino B.; Colombo P.; Jonjic N.; Pecanic S.; Lazzarato L.; Fruttero R.; Gasco A.; Bronte V.; Viola A. Chemokine Nitration Prevents Intratumoral Infiltration of Antigen-Specific T Cells. *J Exp Med* **2011**, 208, 1949–1962, doi:10.1084/JEM.20101956.
178. Bubeník, J. Tumour MHC Class I Downregulation and Immunotherapy (Review). *Oncol Rep* **2003**, 10, 2005–2008, doi:10.3892/OR.10.6.2005/HTML.
179. Daassi, D.; Mahoney, K.M.; Freeman, G.J. The Importance of Exosomal PDL1 in Tumour Immune Evasion. *Nat Rev Immunol* **2020**, 20, 209–215, doi:10.1038/s41577-019-0264-y.
180. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, Chung HC, Kindler HL, Lopez-Martin JA, Miller WH Jr, Italiano A, Kao S, Piha-Paul SA, Delord JP, McWilliams RR, Fabrizio DA, Aurora-Garg D, Xu L, Jin F, Norwood K, Bang YJ. Association of Tumour Mutational Burden with Outcomes in Patients with Advanced Solid Tumours Treated with Pembrolizumab: Prospective Biomarker Analysis of the Multicohort, Open-Label, Phase 2 KEYNOTE-158 Study. *Lancet Oncol* **2020**, 21, 1353–1365, doi:10.1016/S1470-2045(20)30445-9.
181. Ricciuti, B.; Wang, X.; Alessi, J. V.; Rizvi, H.; Mahadevan, N.R.; Li, Y.Y.; Polio, A.; Lindsay, J.; Umeton, R.; Sinha, R.; Vokes N.I.; Recondo G.; Lamberti G.; Lawrence M.; Vaz V.R.; Leonardi G.C.; Plodkowski A.J.; Gupta H.; Cherniack A.D.; Tolstorukov M.Y.; Sharma B.; Felt K.D.; Gainor J.F.; Ravi A.; Getz G.; Schalper K.A.; Henick B.; Forde P.; Anagnostou V.; Jänne P.A.; Van Allen E.M.; Nishino M.; Sholl L.M.; Christiani D.C.; Lin X.; Rodig S.J.; Hellmann M.D.; Awad M.M. Association of High Tumor Mutation Burden in Non-Small Cell Lung Cancers with Increased Immune Infiltration and Improved Clinical Outcomes of PD-L1 Blockade Across PD-L1 Expression Levels. *JAMA Oncol* **2022**, 8, 1160–1168, doi:10.1001/jamaoncol.2022.1981.
182. Ferrara, R.; Imbimbo, M.; Malouf, R.; Paget-Bailly, S.; Calais, F.; Marchal, C.; Westeel, V. Single or Combined Immune Checkpoint Inhibitors Compared to First-Line Platinum-Based Chemotherapy with or without Bevacizumab for People with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2020**, doi:10.1002/14651858.CD013257.pub2.
183. Baas, P.; Scherpereel, A.; Nowak, A.K.; Fujimoto, N.; Peters, S.; Tsao, A.S.; Mansfield, A.S.; Popat, S.; Jahan, T.; Antonia, S.; Oulkhouir Y.; Bautista Y.; Cornelissen R.; Greillier L.; Grossi F.; Kowalski D.; Rodríguez-Cid J.; Aanur P.; Ouksou A.; Baudelet C.; Zalcman G.. First-Line Nivolumab plus Ipilimumab in Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma (CheckMate 743): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *The Lancet* **2021**, 397, 375–386, doi:10.1016/S0140-6736(20)32714-8.

184. Janjigian, Y.Y.; Shitara, K.; Moehler, M.; Garrido, M.; Salman, P.; Shen, L.; Wyrwicz, L.; Yamaguchi, K.; Skoczyłas, T.; Campos Bragagnoli, A.; Liu T.; Schenker M.; Yanez P.; Tehfe M.; Kowalyszyn R.; Karamouzis M.V.; Bruges R.; Zander T.; Pazo-Cid R.; Hitre E.; Feeney K.; Cleary J.M.; Poulat V.; Cullen D.; Lei M.; Xiao H.; Kondo K.; Li M.; Ajani J.A. First-Line Nivolumab plus Chemotherapy versus Chemotherapy Alone for Advanced Gastric, Gastro-Oesophageal Junction, and Oesophageal Adenocarcinoma (CheckMate 649): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *The Lancet* **2021**, *398*, 27–40, doi:10.1016/S0140-6736(21)00797-2.
185. Quhal, F.; Mori, K.; Bruchbacher, A.; Resch, I.; Mostafaie, H.; Pradere, B.; Schuettfort, V.M.; Laukhtina, E.; Egawa, S.; Fajkovic, H.; Remzi M.; Shariat S.F.; Schmidinger M. First-Line Immunotherapy-Based Combinations for Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Eur Urol Oncol* **2021**, *4*, 755–765, doi:10.1016/j.euro.2021.03.001.
186. Cheng, A.L.; Qin, S.; Ikeda, M.; Galle, P.R.; Ducreux, M.; Kim, T.Y.; Lim, H.Y.; Kudo, M.; Breder, V.; Merle, P.; Kaseb A.O.; Li D.; Verret W.; Ma N.; Nicholas A.; Wang Y.; Li L.; Zhu A.X.; Finn R.S. Updated Efficacy and Safety Data from IMbrave150: Atezolizumab plus Bevacizumab vs. Sorafenib for Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatol* **2022**, *76*, 862–873, doi:10.1016/j.jhep.2021.11.030.
187. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
188. Vasen, H.F.A.; Tomlinson, I.; Castells, A. Clinical Management of Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **2015** *12*:2 **2015**, *12*, 88–97, doi:10.1038/nrgastro.2014.229.
189. Keum, N.N.; Giovannucci, E. Global Burden of Colorectal Cancer: Emerging Trends, Risk Factors and Prevention Strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2019**, *16*, 713–732, doi:10.1038/s41575-019-0189-8.
190. Colussi, D.; Brandi, G.; Bazzoli, F.; Ricciardiello, L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, 16365–16385, doi:10.3390/ijms140816365.
191. Galon, J.; Mlecnik, B.; Bindea, G.; Angell, H.K.; Berger, A.; Lagorce, C.; Lugli, A.; Zlobec, I.; Hartmann, A.; Bifulco, C.; Nagtegaal I.D.; Palmqvist R.; Masucci G.V.; Botti G.; Tatangelo F.; Delrio P.; Maio M.; Laghi L.; Grizzi F.; Asslaber M.; D'Arrigo C.; Vidal-Vanaclocha F.; Zavadova E.; Chouchane L.; Ohashi P.S.; Hafezi-Bakhtiari S.; Wouters B.G.; Roehrl M.; Nguyen L.; Kawakami Y.; Hazama S.; Okuno K.; Ogino S.; Gibbs P.; Waring P.; Sato N.; Torigoe T.; Itoh K.; Patel P.S.; Shukla S.N.; Wang Y.; Kopetz S.; Sinicrope F.A.; Scripcariu V.; Ascierto P.A.; Marincola F.M.; Fox B.A.; Pagès F. Towards the Introduction of the ‘Immunoscore’ in the Classification of Malignant Tumours. *J Pathol* **2013**, *232*, 199, doi:10.1002/PATH.4287.
192. Jones, S.; Chen, W.D.; Parmigiani, G.; Diehl, F.; Beerenswinkel, N.; Antal, T.; Traulsen, A.; Nowak, M.A.; Siegel, C.; Velculescu, V.E.; Kinzler K.W.; Vogelstein B.; Willis J.; Markowitz S.D. Comparative Lesion Sequencing Provides Insights into Tumor Evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 4283–4288, doi:10.1073/PNAS.0712345105/SUPPL_FILE/INDEX.HTML.

193. Bettington, M.; Walker, N.; Clouston, A.; Brown, I.; Leggett, B.; Whitehall, V. The Serrated Pathway to Colorectal Carcinoma: Current Concepts and Challenges. *Histopathology* **2013**, *62*, 367–386, doi:10.1111/HIS.12055.
194. Pai, R.K.; Bettington, M.; Srivastava, A.; Rosty, C. An Update on the Morphology and Molecular Pathology of Serrated Colorectal Polyps and Associated Carcinomas. *Modern Pathology* **2019** *32:10* **2019**, *32*, 1390–1415, doi:10.1038/s41379-019-0280-2.
195. Parsons, D.W.; Wang, T.L.; Samuels, Y.; Bardelli, A.; Cummins, J.M.; DeLong, L.; Silliman, N.; Ptak, J.; Szabo, S.; Willson, J.K.V.; Markowitz S.; Kinzler K.W.; Vogelstein B.; Lengauer C.; Velculescu V.E. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* **2005** *436:7052* **2005**, *436*, 792–792, doi:10.1038/436792a.
196. Maffeis, V.; Nicolè, L.; Cappellessi, R. RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Front Oncol* **2019**, *9*, 486074, doi:10.3389/FONC.2019.01255/PDF.
197. De Martel, C.; Ferlay, J.; Franceschi, S.; Vignat, J.; Bray, F.; Forman, D.; Plummer, M. Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2008: A Review and Synthetic Analysis. *Lancet Oncol* **2012**, *13*, 607–615, doi:10.1016/S1470-2045(12)70137-7.
198. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*, 7–30, doi:10.3322/caac.21442.
199. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods. *Int J Cancer* **2019**, *144*, 1941–1953, doi:10.1002/IJC.31937.
200. Cáncer de Colon y Recto Available online: <https://www.insp.mx/infografias/cancer-colon-recto.html> (accessed on 15 February 2025).
201. Rojas-Puentes, L.; De, J.G.; Garza-Salazar, L.; Calderillo-Ruiz, G.; Lino-Silva, L.S.; Vidal Millán, S.; Reynoso Noverón, N.; Meneses-García, A.; Astudillo De, H.; Vega, L. Ruiz-García E. *Increased Incidence of Colorectal Cancer in Young People (Less Than 40 Years Old) Over the Last Ten Years*; **2014**; Vol. 1.
202. Borja-Aburto, V.H.; Dávila-Torres, J.; Rascón-Pacheco, R.A.; González-León, M.; Fernández-Gárate, J.E.; Mejía-Rodríguez, I.; de Jesús González-Izquierdo, J.; Escudero-de los Ríos., P.M. Cancer Mortality in the Mexican Social Security Institute, 1989-2013. *Salud Publica Mex* **2016**, *58*, 153–161, doi:10.21149/spm.v58i2.7784.
203. Sánchez-Barriga, J.J. Tendencias de Mortalidad y Riesgo de Muerte Por Cáncer Colorrectal En Las 7 Regiones Socioeconómicas de México, 2000-2012. *Rev Gastroenterol Mex* **2017**, *82*, 217–225, doi:10.1016/j.rgmx.2016.10.005.
204. Espinosa-Tamez, P.; Suazo-Zepeda, E.; Sánchez-Blas, H.; Meneses-Medina, M.; Huitzil-Meléndez, F.D.; Loon, K. Van; Potter, M.B.; Lajous, M. National and State-Level Colorectal Cancer Mortality Trends in Mexico, 1998-2018. *Salud Publica Mex* **2022**, *64*, 5–13, doi:10.21149/12522.
205. Tamas, K.; Walenkamp, A.M.E.; de Vries, E.G.E.; van Vugt, M.A.T.M.; Beets-Tan, R.G.; van Etten, B.; de Groot, D.J.A.; Hospers, G.A.P. Rectal and Colon Cancer: Not Just a Different Anatomic Site. *Cancer Treat Rev* **2015**, *41*, 671–679, doi:10.1016/J.CTRV.2015.06.007.

206. Van De Velde, C.J.H.; Boelens, P.G.; Borras, J.M.; Coebergh, J.W.; Cervantes, A.; Blomqvist, L.; Beets-Tan, R.G.H.; Van Den Broek, C.B.M.; Brown, G.; Van Cutsem, E.; Espin E.; Haustermans K.; Glimelius B.; Iversen L.H.; van Krieken J.H.; Marijnen C.A.; Henning G.; Gore-Booth J.; Meldolesi E.; Mroczkowski P.; Nagtegaal I.; Naredi P.; Ortiz H.; Pählman L.; Quirke P.; Rödel C.; Roth A.; Rutten H.; Schmoll H.J.; Smith J.J.; Tanis P.J.; Taylor C.; Wibe A.; Wiggers T.; Gambacorta M.A.; Aristei C.; Valentini V. EURECCA Colorectal: Multidisciplinary Management: European Consensus Conference Colon & Rectum. *Eur J Cancer* **2014**, *50*, 1.e1-1.e34, doi:10.1016/J.EJCA.2013.06.048.
207. Quirke, P.; West, N.P.; Nagtegaal, I.D. EURECCA Consensus Conference Highlights about Colorectal Cancer Clinical Management: The Pathologists Expert Review. *Virchows Archiv* **2014**, *464*, 129–134, doi:10.1007/S00428-013-1534-X/FIGURES/2.
208. Breugom, A.J.; Boelens, P.G.; van den Broek, C.B.M.; Cervantes, A.; Van Cutsem, E.; Schmoll, H.J.; Valentini, V.; van de Velde, C.J.H. Quality Assurance in the Treatment of Colorectal Cancer: The EURECCA Initiative. *Annals of Oncology* **2014**, *25*, 1485–1492, doi:10.1093/ANNONC/MDU039.
209. Labianca, R.; Nordlinger, B.; Beretta, G.D.; Mosconi, S.; Mandalà, M.; Cervantes, A.; Arnold, D. Early Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up†. *Annals of Oncology* **2013**, *24*, vi64–vi72, doi:10.1093/ANNONC/MDT354.
210. Xie, Y.H.; Chen, Y.X.; Fang, J.Y. Comprehensive Review of Targeted Therapy for Colorectal Cancer. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, *5*, doi:10.1038/s41392-020-0116-z.
211. Lake, R.A.; Robinson, B.W.S. Immunotherapy and Chemotherapy — a Practical Partnership. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 397–405, doi:10.1038/nrc1613.
212. Kvedaraite, E.; Ginhoux, F. Human Dendritic Cells in Cancer. *Sci Immunol* **2023**, *7*, eabm9409, doi:10.1126/sciimmunol.abm9409.
213. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Zitvogel, L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu Rev Immunol* **2013**, *31*, 51–72, doi:10.1038/s41573-024-00920-9.
214. Kodama, N.; Murata, Y.; Asakawa, A.; Inui, A.; Hayashi, M.; Sakai, N.; Nanba, H. Maitake D-Fraction Enhances Antitumor Effects and Reduces Immunosuppression by Mitomycin-C in Tumor-Bearing Mice. *Nutrition* **2005**, *21*, 624–629, doi:10.1016/j.nut.2004.09.021.
215. Nickel, R.S.; Keller, F.; Bergsagel, J.; Cooper, T.; Daves, M.; Sabnis, H.; Lew, G. Mitoxantrone as a Substitute for Daunorubicin during Induction in Newly Diagnosed Lymphoblastic Leukemia and Lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* **2014**, *61*, 810–814, doi:10.1002/PBC.24892.
216. Que, L.; He, L.; Yu, C.; Yin, W.; Ma, L.; Cao, B.; Yu, S. Activation of Nrf2-ARE Signaling Mitigates Cyclophosphamide-Induced Myelosuppression. *Toxicol Lett* **2016**, *262*, 17–26, doi:10.1016/J.TOXLET.2016.09.003.
217. Chang, S.M.; Zhang, P.; Cairncross, J.G.; Gilbert, M.R.; Bahary, J.-P.; Dolinskas, C.; Aldape, K.D.; Chakravarti, A.; Schiff, D.; Jaeckle, K.A.; Brown P.D.; Barger G.R.; Werner-Wasik M.; Shih H.; Brachman D.; Penas-Prado M.; Robins H.I.; Belanger K.; Schultz C.; Hunter G.; Mehta M. Results of NRG Oncology/RTOG 9813: A Phase III Randomized

- Study of Radiation Therapy (RT) and Temozolomide (TMZ) versus RT and Nitrosourea (NU) Therapy for Anaplastic Astrocytoma (AA). *Journal of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 2002–2002, doi:10.1200/JCO.2015.33.15_SUPPL.2002.
218. Akin, S.; Dizdar, O.; Karakas, Y.; Turker, A.; Kars, A. Ifosfamide and Doxorubicin in the Treatment of Advanced Leiomyosarcoma. *Curr Probl Cancer* **2018**, *42*, 344–349, doi:10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2018.01.011.
219. Chang, A.E.; Wu, Q. V.; Jenkins, I.C.; Specht, J.M.; Gadi, V.K.; Gralow, J.R.; Salazar, L.G.; Kurland, B.F.; Linden, H.M. Phase I/II Trial of Combined Pegylated Liposomal Doxorubicin and Cyclophosphamide in Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* **2018**, *18*, e143–e149, doi:10.1016/J.CLBC.2017.10.005.
220. Lee, J.J.; Chu, E. The Adjuvant Treatment of Stage III Colon Cancer: Might Less Be More? *Oncology (United States)* **2018**, *32*, 437–444.
221. Basu, A.; Ghosh, P.; Bhattacharjee, A.; Patra, A.R.; Bhattacharya, S. Prevention of Myelosuppression and Genotoxicity Induced by Cisplatin in Murine Bone Marrow Cells: Effect of an Organovanadium Compound Vanadium(III)-l-Cysteine. *Mutagenesis* **2015**, *30*, 509–517, doi:10.1093/mutage/gev011.
222. Melis, M.H.M.; Simpson, K.L.; Dovedi, S.J.; Welman, A.; MacFarlane, M.; Dive, C.; Honeychurch, J.; Illidge, T.M. Sustained Tumour Eradication after Induced Caspase-3 Activation and Synchronous Tumour Apoptosis Requires an Intact Host Immune Response. *Cell Death Differ* **2013**, *20*, 765–773, doi:10.1038/cdd.2013.8.
223. Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; Barlesi F.; Kohlhäufl M.; Arrieta O.; Burgio M.A.; Fayette J.; Lena H.; Poddubskaya E.; Gerber D.E.; Gettinger S.N.; Rudin C.M.; Rizvi N.; Crinò L.; Blumenschein G.R. Jr.; Antonia S.J.; Dorange C.; Harbison C.T.; Graf Finckenstein F.; Brahmer J.R. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **2015**, *373*, 1627–1639, doi:10.1056/NEJMoa1507643/SUPPL_FILE/NEJMoa1507643_DISCLOSURES.PDF.
224. Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; Akerley W.; van den Eertwegh A.J.; Lutzky J.; Lorigan P.; Vaubel J.M.; Linette G.P.; Hogg D.; Ottensmeier C.H.; Lebbé C.; Peschel C.; Quirt I.; Clark J.I.; Wolchok J.D.; Weber J.S.; Tian J.; Yellin M.J.; Nichol G.M.; Hoos A.; Urba W.J. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 711–723, doi:10.1056/NEJMoa1003466/SUPPL_FILE/NEJMoa1003466_DISCLOSURES.PDF.
225. Ciardiello, D.; Vitiello, P.P.; Cardone, C.; Martini, G.; Troiani, T.; Martinelli, E.; Ciardiello, F. Immunotherapy of Colorectal Cancer: Challenges for Therapeutic Efficacy. *Cancer Treat Rev* **2019**, *76*, 22–32, doi:10.1016/j.ctrv.2019.04.003.
226. Liao, W.; Overman, M.J.; Boutin, A.T.; Shang, X.; Zhao, D.; Dey, P.; Li, J.; Wang, G.; Lan, Z.; Li, J.; Wang G.; Lan Z.; Li J.; Tang M.; Jiang S.; Ma X.; Chen P.; Katkhuda R.; Korphaisarn K.; Chakravarti D.; Chang A.; Spring D.J.; Chang Q.; Zhang J.; Maru D.M.; Maeda D.Y.; Zebala J.A.; Kopetz S.; Wang Y.A.; DePinho R.A. KRAS-IRF2 Axis Drives Immune Suppression and Immune Therapy Resistance in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 559–572.e7, doi:10.1016/j.ccr.2019.02.008.

227. Kim, S.Y.; Kim, T.W. Current Challenges in the Implementation of Precision Oncology for the Management of Metastatic Colorectal Cancer. *ESMO Open* **2020**, *5*, doi:10.1136/esmoopen-2019-000634.
228. Diederich, M. Natural Compound Inducers of Immunogenic Cell Death. *Arch Pharm Res* **2019**, *42*, 629–645, doi:10.1007/s12272-019-01150-z.
229. Radogna, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Natural Modulators of the Hallmarks of Immunogenic Cell Death. *Biochem Pharmacol* **2019**, *162*, 55–70, doi:10.1016/j.bcp.2018.12.016.
230. Garg, A.D.; Romano, E.; Rufo, N.; Agostinis, P. Immunogenic versus Tolerogenic Phagocytosis during Anticancer Therapy: Mechanisms and Clinical Translation. *Cell Death Differ* **2016**, *23*, 938–951, doi:10.1038/cdd.2016.5.
231. Galluzzi, L.; Buqué, A.; Kepp, O.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Immunogenic Cell Death in Cancer and Infectious Disease. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 97–111, doi:10.1038/nri.2016.107.
232. Obeid, M.; Tesniere, A.; Ghiringhelli, F.; Fimia, G.M.; Apetoh, L.; Perfettini, J.-L.; Castedo, M.; Mignot, G.; Panaretakis, T.; Casares, N.; Métivier D.; Larochette N.; van Endert P.; Ciccosanti F.; Piacentini M.; Zitvogel L.; Kroemer G. Calreticulin Exposure Dictates the Immunogenicity of Cancer Cell Death. *Nat Med* **2007**, *13*, 54–61, doi:10.1038/nm1523.
233. Tesniere, A.; Panaretakis, T.; Kepp, O.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Molecular Characteristics of Immunogenic Cancer Cell Death. *Cell Death Differ* **2008**, *15*, 3–12, doi:10.1038/sj.cdd.4402269.
234. Estrada-Martínez, L.E.; Moreno-Celis, U.; Cervantes-Jiménez, R.; Ferriz-Martínez, R.A.; Blanco-Labra, A.; García-Gasca, T. Plant Lectins as Medical Tools against Digestive System Cancers. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18071403.
235. Lagarda-Diaz, I.; Guzman-Partida, A.M.; Vazquez-Moreno, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 1–18, doi:10.3390/ijms18061242.
236. Gautam, A.K.; Sharma, D.; Sharma, J.; Saini, K.C. Legume Lectins: Potential Use as a Diagnostics and Therapeutics against the Cancer. *Int J Biol Macromol* **2020**, *142*, 474–483, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.119.
237. Hamid, R.; Masood, A.; Wani, I.H.; Rafiq, S. Lectins: Proteins with Diverse Applications. *J Appl Pharm Sci* **2013**, *3*, 93–103, doi:10.7324/JAPS.2013.34.S18.
238. Sharon, N.; Lis, H. Legume Lectins--a Large Family of Homologous Proteins. *FASEB J* **1990**, *4*, 3198–3208, doi:10.1096/FASEBJ.4.14.2227211.
239. Cummings, R.D.; Etzler, M.E. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. *Essentials of Glycobiology* **2009**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 13:9780879697709
240. Yau, T.; Dan, X.; Ng, C.C.W.; Ng, T.B. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules* **2015**, *20*, 3791–3810, doi:10.3390/molecules20033791.

241. Poiroux, G.; Barre, A.; van Damme, E.J.M.; Benoist, H.; Rougé, P. Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18061232.
242. Bhutia, S.K.; Panda, P.K.; Sinha, N.; Praharaj, P.P.; Bhol, C.S.; Panigrahi, D.P.; Mahapatra, K.K.; Saha, S.; Patra, S.; Mishra, S.R.; Behera B.P.; Patil S.; Maiti T.K. Plant Lectins in Cancer Therapeutics: Targeting Apoptosis and Autophagy-Dependent Cell Death. *Pharmacol Res* **2019**, *144*, 8–18, doi:10.1016/j.phrs.2019.04.001.
243. Pita-López, W.; Gomez-Garay, M.; Blanco-Labra, A.; Aguilera-Barreyro, A.; Reis-De Souza, T.C.; Olvera-Ramírez, A.; Ferriz-Martinez, R.; García-Gasca, T. Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius*) Lectin Fraction Provokes Reversible Adverse Effects on Rats' Digestive Tract. *Toxicol Res (Camb)* **2020**, *9*, 714–725, doi:10.1093/TOXRES/TFAA062.
244. Vega-Rojas, L.J.; Luzardo-Ocampo, I.; Mosqueda, J.; Palmerín-Carreño, D.M.; Escobedo-Reyes, A.; Blanco-Labra, A.; Escobar-García, K.; García-Gasca, T. Bioaccessibility and in Vitro Intestinal Permeability of a Recombinant Lectin from Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius*) Using the Everted Intestine Assay. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–22, doi:10.3390/ijms22031049.
245. Castillo-Villanueva, A.; Caballero-Ortega, H.; Abdullaev-Jafarova, F.; Garfias, Y.; Jiménez-Martínez, M.D.C.; Bouquelet, S.; Martínez, G.; Mendoza-Hernández, G.; Zenteno, E. Lectin from *Phaseolus Acutifolius* Var. Escumite: Chemical Characterization, Sugar Specificity, and Effect on Human T-Lymphocytes. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, 5781–5787, doi:10.1021/jf063644k.
246. Reyes-Rocha, B.L. Efecto de La Administración de La Fracción Concentrada En Lectinas de Frijol Tépari (*Phaseolus Acutifolius*) Sobre El Sistema Inmune. **2011**. Universidad Autónoma de Querétaro.
247. Reyes-López, R.G. Estudio Del Efecto Inmunomulador de Una Fracción Concentrada de Lectinas de Frijol Tépari (*Phaseolus Acutifolius*) En Ratas. **2016**. Universidad Autónoma de Querétaro.
248. Pearce, O.M.T.; Läubli, H. Sialic Acids in Cancer Biology and Immunity. *Glycobiology* **2016**, *26*, 111–128, doi:10.1093/GLYCOB/CWV097.
249. Rodrigues, E.; Macauley, M.S. Hypersialylation in Cancer: Modulation of Inflammation and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 1–19, doi:10.3390/cancers10060207.
250. Yeo, H.L.; Fan, T.C.; Lin, R.J.; Yu, J.C.; Liao, G.S.; Chen, E.S.W.; Ho, M.Y.; Lin, W. Der; Chen, K.; Chen, C.H.; Hung JT.; Wu JC.; Chang NC.; Chang MD.; Yu J.; Yu AL. Sialylation of Vasorin by ST3Gal1 Facilitates TGF-B1-Mediated Tumor Angiogenesis and Progression. *Int J Cancer* **2019**, *144*, 1996–2007, doi:10.1002/IJC.31891.
251. Black, L.V.; Saunderson, S.C.; Coutinho, F.P.; Muhsin-Sharafaldine, M.R.; Damani, T.T.; Dunn, A.C.; McLellan, A.D. The CD169 Sialoadhesin Molecule Mediates Cytotoxic T-Cell Responses to Tumour Apoptotic Vesicles. *Immunol Cell Biol* **2016**, *94*, 430–438, doi:10.1038/icb.2015.111.
252. Simona Serini, and; Díaz-Betancourt, A.; Elizabeth Galicia-Castillo, M.; Morales-Tlapán, V.; Luis Chávez-Servín, J.; Blanco-Labra, A.; García-Gasca, T.; Saldaña, C. Tepary Bean (*Phaseolus Acutifolius*) Lectins as Modulators of Intracellular Calcium Mobilization in Breast Cancer and Normal Breast Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2025**, Vol. 26, Page 1064 **2025**, *26*, 1064, doi:10.3390/IJMS26031064.

253. Krysko, D. V.; Garg, A.D.; Kaczmarek, A.; Krysko, O.; Agostinis, P.; Vandenabeele, P. Immunogenic Cell Death and DAMPs in Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 860–875, doi:10.1038/nrc3380.
254. Palmerín-Carreño, D.; Martínez-Alarcón, D.; Dena-Beltrán, J.L.; Vega-Rojas, L.J.; Blanco-Labra, A.; Escobedo-Reyes, A.; García-Gasca, T. Optimization of a Recombinant Lectin Production in *Pichia Pastoris* Using Crude Glycerol in a Fed-Batch System. *Processes* **2021**, *Vol. 9, Page 876* **2021**, *9*, 876, doi:10.3390/PR9050876.
255. LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685, doi:10.1038/227680a0.
256. Efremova, M.; Rieder, D.; Klepsch, V.; Charoentong, P.; Finotello, F.; Hackl, H.; Hermann-Kleiter, N.; Löwer, M.; Baier, G.; Krogsdam, A.; Trajanoski Z. Targeting Immune Checkpoints Potentiates Immunoediting and Changes the Dynamics of Tumor Evolution. *Nature Communications* **2017 9:1** **2018**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41467-017-02424-0.
257. Castle, J.C.; Loewer, M.; Boegel, S.; de Graaf, J.; Bender, C.; Tadmor, A.D.; Boisguerin, V.; Bukur, T.; Sorn, P.; Paret, C.; Diken M.; Kreiter S.; Türeci Ö.; Sahin U. Immunomic, Genomic and Transcriptomic Characterization of CT26 Colorectal Carcinoma. *BMC Genomics* **2014**, *15*, doi:10.1186/1471-2164-15-190.
258. Lozano, T.; Chocarro, S.; Martin, C.; Lasarte-Cia, A.; del Valle, C.; Gorraiz, M.; Sarrión, P.; Ruiz de Galarreta, M.; Lujambio, A.; Hervás-Stubbs, S.; Sarobe P.; Casares N.; Lasarte J.J. Genetic Modification of CD8+ T Cells to Express EGFR: Potential Application for Adoptive T Cell Therapies. *Front Immunol* **2019**, *10*, 494270, doi:10.3389/FIMMU.2019.02990/BIBTEX.
259. Zhang, L.; Zhang, J.; Shi, Q. 201 Profiling of Syngeneic Models by Anti-PD1, PD-L1 and CTLA4 Immunotherapeutics and RNAseq Analysis Provide Predictive Biomarkers for Cancer Immunotherapy. *Eur J Cancer* **2015**, *51*, S27, doi:10.1016/s0959-8049(16)30089-2.
260. Rashid, M. ur; Coombs, K.M. Serum-Reduced Media Impacts on Cell Viability and Protein Expression in Human Lung Epithelial Cells. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 7718–7724, doi:10.1002/jcp.27890.
261. Ligasová, A.; Koberna, K. Strengths and Weaknesses of Cell Synchronization Protocols Based on Inhibition of DNA Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *Vol. 22, Page 10759* **2021**, *22*, 10759, doi:10.3390/IJMS221910759.
262. Sagar, V.; Vatapalli, R.; Lysy, B.; Pamarthi, S.; Anker, J.F.; Rodriguez, Y.; Han, H.; Unno, K.; Stadler, W.M.; Catalona, W.J.; Hussain M.; Gill P.S.; Abdulkadir S.A. EPHB4 Inhibition Activates ER Stress to Promote Immunogenic Cell Death of Prostate Cancer Cells. *Cell Death & Disease* **2019 10:11** **2019**, *10*, 1–14, doi:10.1038/s41419-019-2042-y.
263. Lee, D.; Prowse, D.M.; Brissette, J.L. Association between MousenudeGene Expression and the Initiation of Epithelial Terminal Differentiation. *Dev Biol* **1999**, *208*, 362–374, doi:10.1006/DBIO.1999.9221.
264. Md Sakib Hossain, D.; Javaid, S.; Cai, M.; Zhang, C.; Sawant, A.; Hinton, M.; Sathe, M.; Grein, J.; Blumenschein, W.; Pinheiro, E.M.; Chackerian A. Dinaciclib Induces Immunogenic Cell Death and Enhances Anti- PD1–Mediated Tumor Suppression. *Journal of Clinical Investigation* **2018**, *128*, 644–654, doi:10.1172/JCI94586.

265. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis *Nat Methods*. **2012**; 9(7):671-5. doi:10.1038/nmeth.2089.
266. Leibovitz, A.; Stinson, J.C.; McCombs, W.B.; McCoy, C.E.; Mazur, K.C.; Mabry, N.D. Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res* **1976**, 36, 4562–4569.
267. Yang, J.L.; Qu, X.J.; Russell, P.J.; Goldstein, D. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Colon Cancer Cell Lines by Interferon α . *Gut* **2004**, 53, 123–129, doi:10.1136/gut.53.1.123.
268. Stiff, T.; O'Driscoll, M.; Rief, N.; Iwabuchi, K.; Löbrich, M.; Jeggo, P.A. ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Res* **2004**, 64, 2390–2396, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3207.
269. Xu, X.; Nagarajan, H.; Lewis, N.E.; Pan, S.; Cai, Z.; Liu, X.; Chen, W.; Xie, M.; Wang, W.; Hammond, S.; Andersen M.R.; Neff N.; Passarelli B.; Koh W.; Fan HC.; Wang J.; Gui Y.; Lee K.H.; Betenbaugh M.J.; Quake S.R.; Famili I.; Palsson B.O.; Wang J. The Genomic Sequence of the Chinese Hamster Ovary (CHO)-K1 Cell Line. *Nature Biotechnology* **2011** 29:8 **2011**, 29, 735–741, doi:10.1038/nbt.1932.
270. Troiani, T.; Napolitano, S.; Vitagliano, D.; Morgillo, F.; Capasso, A.; Sforza, V.; Nappi, A.; Ciardiello, D.; Ciardiello, F.; Martinelli, E. Primary and Acquired Resistance of Colorectal Cancer Cells to Anti-EGFR Antibodies Converge on MEK/ERK Pathway Activation and Can Be Overcome by Combined MEK/EGFR Inhibition. *Clinical Cancer Research* **2014**, 20, 3775–3786, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2181/85982/AM/PRIMARY-AND-ACQUIRED-RESISTANCE-OF-COLORECTAL.
271. Gruis, M.; Braster, R.; Overdijk, M.B.; Hellingman, T.; Verploegen, S.; Korthouwer, R.; Van Der Wilk, B.J.; Parren, P.W.H.I.; Van Der Vliet, H.J.; Bogels, M.; van Egmond M. Epidermal Growth Factor Receptor as Target for Perioperative Elimination of Circulating Colorectal Cancer Cells. *J Oncol* **2022**, 2022, 3577928, doi:10.1155/2022/3577928.
272. Anoosha, P.; Huang, L.T.; Sakthivel, R.; Karunagaran, D.; Gromiha, M.M. Discrimination of Driver and Passenger Mutations in Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2015**, 780, 24–34, doi:10.1016/J.MRFMM.2015.07.005.
273. Saeed, O.; Lopez-Beltran, A.; Fisher, K.W.; Scarpelli, M.; Montironi, R.; Cimadamore, A.; Massari, F.; Santoni, M.; Cheng, L. RAS Genes in Colorectal Carcinoma: Pathogenesis, Testing Guidelines and Treatment Implications. *J Clin Pathol* **2019**, 72, 135–139, doi:10.1136/jclinpath-2018-205471.
274. Caputo, F.; Santini, C.; Bardasi, C.; Cerma, K.; Casadei-Gardini, A.; Spallanzani, A.; Andrikou, K.; Cascinu, S.; Gelsomino, F. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, Vol. 20, Page 5369 **2019**, 20, 5369, doi:10.3390/IJMS20215369.
275. Schirripa, M.; Bergamo, F.; Cremolini, C.; Casagrande, M.; Lonardi, S.; Aprile, G.; Yang, D.; Marmorino, F.; Pasquini, G.; Sensi, E.; Lupi C.; De Maglio G.; Borrelli N.; Pizzolitto S.; Fasola G.; Bertorelle R.; Rugge M.; Fontanini G.; Zagonel

- V.; Loupakis F.; Falcone A. BRAF and RAS Mutations as Prognostic Factors in Metastatic Colorectal Cancer Patients Undergoing Liver Resection. *Br J Cancer* **2015**, *112*, 1921–1928, doi:10.1038/bjc.2015.142.
276. Ahmed, D.; Eide, P.W.; Eilertsen, I.A.; Danielsen, S.A.; Eknæs, M.; Hektoen, M.; Lind, G.E.; Lothe, R.A. Epigenetic and Genetic Features of 24 Colon Cancer Cell Lines. *Oncogenesis* **2013** *2.9* **2013**, *2*, e71–e71, doi:10.1038/oncsis.2013.35.
277. Pichler, M.; Balic, M.; Stadelmeyer, E.; Ausch, C.; Wild, M.; Guelly, C.; Bauernhofer, T.; Samonigg, H.; Hoefler, G.; Dandachi, N. Evaluation of High-Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool to Detect the BRAF V600E Mutation in Colorectal Tumors. *Journal of Molecular Diagnostics* **2009**, *11*, 140–147, doi:10.2353/jmoldx.2009.080100.
278. Cantwell-Dorris, E.R.; O’Leary, J.J.; Sheils, O.M. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 385–394, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0799.
279. McGrath, J.P.; Capon, D.J.; Smith, D.H.; Chen, E.Y.; Seeburg, P.H.; Goeddel, D. V.; Levinson, A.D. Structure and Organization of the Human Ki-Ras Proto-Oncogene and a Related Processed Pseudogene. *Nature* **1983** *304*:5926 **1983**, *304*, 501–506, doi:10.1038/304501a0.
280. Kotsinas, A.; Spandidos, D.A.; Romanowski, P.; Wyllie, A.H. Relative Expression of Wild-Type and Activated Ki-Ras2 Oncogene in Colorectal Carcinomas. *Int J Oncol* **1993**, *3*, 841–845, doi:10.3892/IJO.3.5.841.
281. Vatansever, S.; Erman, B.; Gümüş, Z.H. Comparative Effects of Oncogenic Mutations G12C, G12V, G13D, and Q61H on Local Conformations and Dynamics of K-Ras. *Comput Struct Biotechnol J* **2020**, *18*, 1000–1011, doi:10.1016/J.CSBJ.2020.04.003.
282. Dankner, M.; Rose, A.A.N.; Rajkumar, S.; Siegel, P.M.; Watson, I.R. Classifying BRAF Alterations in Cancer: New Rational Therapeutic Strategies for Actionable Mutations. *Oncogene* **2018** *37:24* **2018**, *37*, 3183–3199, doi:10.1038/s41388-018-0171-x.
283. Parshenkov, A.; Hennet, T. Glycosylation-Dependent Induction of Programmed Cell Death in Murine Adenocarcinoma Cells. *Front Immunol* **2022**, *13*, 797759, doi:10.3389/FIMMU.2022.797759/BIBTEX.
284. Weiss, A.; Shields, R.; Newton, M.; Manger, B.; Imboden, J. Ligand-Receptor Interactions Required for Commitment to the Activation of the Interleukin 2 Gene. *Journal of Immunology* **1987**, *138*, 2169–2176, doi:10.4049/JIMMUNOL.138.7.2169.
285. Honegger, A.M.; Kris, R.M.; Ullrich, A.; Schlessinger, J. Evidence That Autophosphorylation of Solubilized Receptors for Epidermal Growth Factor Is Mediated by Intermolecular Cross-Phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86*, 925–929, doi:10.1073/PNAS.86.3.925.
286. Xu, K.; Yu, Z.; Lu, T.; Peng, W.; Gong, Y.; Chen, C. PARP1 Bound to XRCC2 Promotes Tumor Progression in Colorectal Cancer. *Discover Oncology* **2024**, *15*, 1–11, doi:10.1007/S12672-024-01112-Y/FIGURES/5.

287. D'Amours, D.; Germain, M.; Orth, K.; Dixit, V.M.; Poirier, G.G. Proteolysis of Poly(ADP-Ribose) Polymerase by Caspase 3: Kinetics of Cleavage of Mono(ADP-Ribosyl)ated and DNA-Bound Substrates. *Radiat Res* **1998**, *150*, 3–10, doi:10.2307/3579638.
288. Chen, Q.; Ma, K.; Liu, X.; Chen, S.H.; Li, P.; Yu, Y.; Leung, A.K.L.; Yu, X. Truncated PARP1 Mediates ADP-Ribosylation of RNA Polymerase III for Apoptosis. *Cell Discovery* **2021** *8*:1 **2022**, *8*, 1–19, doi:10.1038/s41421-021-00355-1.
289. Mashimo, M.; Onishi, M.; Uno, A.; Tanimichi, A.; Nobeyama, A.; Mori, M.; Yamada, S.; Negi, S.; Bu, X.; Kato, J.; Moss J.; Sanada N.; Kizu R.; Fujii T. The 89-KDa PARP1 Cleavage Fragment Serves as a Cytoplasmic PAR Carrier to Induce AIF-Mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **2021**, *296*, doi:10.1074/jbc.RA120.014479.
290. Sun, X.; Tang, H.; Chen, Y.; Chen, Z.; Hu, Z.; Cui, Z.; Tao, Y.; Yuan, J.; Fu, Y.; Zhuang, Z.; He Q.; Li Q.; Xu X.; Wan X.; Jiang Y.; Mao Z. Loss of the Receptors ER, PR and HER2 Promotes USP15-Dependent Stabilization of PARP1 in Triple-Negative Breast Cancer. *Nature Cancer* **2023** *4*:5 **2023**, *4*, 716–733, doi:10.1038/s43018-023-00535-w.
291. Dörsam, B.; Seiwert, N.; Foersch, S.; Stroh, S.; Nagel, G.; Begaliew, D.; Diehl, E.; Kraus, A.; McKeague, M.; Minneker, V.; Roukos V.; Reißig S.; Waisman A.; Moehler M.; Stier A.; Mangerich A.; Dantzer F.; Kaina B.; Fahrer J.. PARP-1 Protects against Colorectal Tumor Induction, but Promotes Inflammation-Driven Colorectal Tumor Progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, E4061–E4070, doi:10.1073/PNAS.1712345115/-DCSUPPLEMENTAL.
292. Johnson, D.E.; O'Keefe, R.A.; Grandis, J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 Signalling Axis in Cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2018** *15*:4 **2018**, *15*, 234–248, doi:10.1038/nrclinonc.2018.8.
293. Demuth, P.; Thibol, L.; Lemsch, A.; Potlitz, F.; Schulig, L.; Grathwol, C.; Manolikakes, G.; Schade, D.; Roukos, V.; Link, A.; Fahrer J. Targeting PARP-1 and DNA Damage Response Defects in Colorectal Cancer Chemotherapy with Established and Novel PARP Inhibitors. *Cancers (Basel)* **2024**, *16*, 3441, doi:10.3390/CANCERS16203441/S1.
294. Zhong, W.; Myers, J.S.; Wang, F.; Wang, K.; Lucas, J.; Rosfjord, E.; Lucas, J.; Hooper, A.T.; Yang, S.; Lemon, L.A.; Guffroy M.; May C.; Bienkowska J.R.; Reijo P.A. Comparison of the Molecular and Cellular Phenotypes of Common Mouse Syngeneic Models with Human Tumors. *BMC Genomics* **2020**, *21*, 1–17, doi:10.1186/S12864-019-6344-3/FIGURES/6.
295. Nehls, M.; Kyewski, B.; Messerle, M.; Waldschütz, R.; Schüddekopf, K.; Smith, A.J.H.; Boehm, T. Two Genetically Separable Steps in the Differentiation of Thymic Epithelium. *Science* (1979) **1996**, *272*, 886–889, doi:10.1126/SCIENCE.272.5263.886.
296. Adamcová, A.; Laursen, K.H.; Ballin, N.Z. Lectin Activity in Commonly Consumed Plant-Based Foods: Calling for Method Harmonization and Risk Assessment. *Foods* **2021**, *10*, 2796, doi:10.3390/FOODS10112796/S1.
297. Griswold, D.P.; Corbett, T.H. A Colon Tumor Model for Anticancer Agent Evaluation. *Cancer* **1975**, *36*, 2441–2444, doi:[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197512\)36:6<2441::AID-CNCR2820360627>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197512)36:6<2441::AID-CNCR2820360627>3.0.CO;2-P).
298. Rong, L.; Zhang, Y.; Li, W.-S.; Su, Z.; Fadhil, J.I.; Zhang, C. Iron Chelated Melanin-like Nanoparticles for Tumor-Associated Macrophage Repolarization and Cancer Therapy. *Biomaterials* **2019**, *225*, 119515, doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119515.

299. Wennhold, K.; Thelen, M.; Lehmann, J.; Schran, S.; Preugsatz, E.; Garcia-Marquez, M.; Lechner, A.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Ercanoglu, M.S.; Klein, F.; Thangarajah F.; Eidt S.; Löser H.; Bruns C.; Quaas A.; von Bergwelt-Baildon M.; Schlößer H.A. Cd86 Antigen-Presenting b Cells Are Increased in Cancer, Localize in Tertiary Lymphoid Structures, and Induce Specific t-Cell Responses. *Cancer Immunol Res* **2021**, *9*, 1098–1108, doi:10.1158/2326-6066.CIR-20-0949.
300. Butler, S.N.; Blanck, G. Immunoscoring by Correlating MHC Class II and TCR Expression: High Level Immune Functions Represented by the KIRP Dataset of TCGA. *Cell Tissue Res* **2016**, *363*, 491–496, doi:10.1007/s00441-015-2261-1.
301. Gaudreau, P.O.; Negrao, M. V.; Mitchell, K.G.; Reuben, A.; Corsini, E.M.; Li, J.; Karpinets, T. V.; Wang, Q.; Diao, L.; Wang, J.; Federico L.; Parra-Cuentas E.R.; Khairullah R.; Behrens C.; Correa A.M.; Gomez D.; Little L.; Gumbs C.; Kadara H.N.; Fujimoto J.; McGrail D.J.; Vaporciyan A.A.; Swisher S.G.; Walsh G.; Antonoff M.B.; Weissferdt A.; Tran H.; Roarty E.; Haymaker C.; Bernatchez C.; Zhang J.; Futreal P.A.; Wistuba I.I.; Cascone T.; Heymach J.V.; Sepesi B.; Zhang J.; Gibbons D.L. Neoadjuvant Chemotherapy Increases Cytotoxic T Cell, Tissue Resident Memory T Cell, and B Cell Infiltration in Resectable NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology* **2021**, *16*, 127–139, doi:10.1016/j.jtho.2020.09.027.
302. Liu, P.; Zhao, L.; Pol, J.; Levesque, S.; Petrazzuolo, A.; Pfirschke, C.; Engblom, C.; Rickelt, S.; Yamazaki, T.; Iribarren, K.; Senovilla L.; Bezu L.; Vacchelli E.; Sica V.; Melis A.; Martin T.; Xia L.; Yang H.; Li Q.; Chen J.; Durand S.; Aprahamian F.; Lefevre D.; Broutin S.; Paci A.; Bongers A.; Minard-Colin V.; Tartour E.; Zitvogel L.; Apetoh L.; Ma Y.; Pittet M.J.; Kepp O.; Kroemer G. Crizotinib-Induced Immunogenic Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer. *Nature Communications* **2019** *10*:1 **2019**, *10*, 1–17, doi:10.1038/s41467-019-09415-3.
303. Pinato, D.J.; Murray, S.M.; Forner, A.; Kaneko, T.; Fessas, P.; Toniutto, P.; Minguez, B.; Cacciato, V.; Avellini, C.; Diaz, A.; oyton R.J.; Altmann D.M.; Goldin R.D.; Akarca A.U.; Marafioti T.; Mauri F.A.; Casagrande E.; Grillo F.; Giannini E.; Bhoori S.; Mazzaferro V. Trans-Arterial Chemoembolization as a Loco-Regional Inducer of Immunogenic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Immunotherapy. *J Immunother Cancer* **2021**, *9*, e003311, doi:10.1136/JITC-2021-003311.
304. Peng, P.; Lou, Y.; Wang, J.; Wang, S.; Liu, P.; Xu, L.X. Th1-Dominant CD4+ T Cells Orchestrate Endogenous Systematic Antitumor Immune Memory After Cryo-Thermal Therapy. *Front Immunol* **2022**, *13*, 944115, doi:10.3389/FIMMU.2022.944115/BIBTEX.
305. MacNabb, B.W.; Tumuluru, S.; Chen, X.; Godfrey, J.; Kasal, D.N.; Yu, J.; Jongsma, M.L.M.; Spaapen, R.M.; Kline, D.E.; Kline, J. Dendritic Cells Can Prime Anti-Tumor CD8+ T Cell Responses through Major Histocompatibility Complex Cross-Dressing. *Immunity* **2022**, *55*, 982-997.e8, doi:10.1016/j.jimmuni.2022.04.016.
306. Cui, C.; Wang, J.; Fagerberg, E.; Chen, P.M.; Connolly, K.A.; Damo, M.; Cheung, J.F.; Mao, T.; Askari, A.S.; Chen, S.; Fitzgerald B.; Foster G.G.; Eisenbarth S.C.; Zhao H.; Craft J.; Joshi N.S. Neoantigen-Driven B Cell and CD4 T Follicular Helper Cell Collaboration Promotes Anti-Tumor CD8 T Cell Responses. *Cell* **2021**, *184*, 6101-6118.e13, doi:10.1016/j.cell.2021.11.007.