



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Efecto de Macrófagos Estimulados con Agonistas
de Receptores TLR3, TLR 2/6 y Anticuerpo anti
IL-10 R α sobre Líneas Celulares de Cáncer de Mama**

T E S I S

que presenta

LN Anna Patricia Islas Zamorano

como requisito para
obtener el título de

**Maestra en Ciencias con
Orientación en Biotecnología de Salud**

Director de Tesis

Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez

Dr Noé Ontiveros Apodaca

Culiacán Rosales, SIN, MEX

Febrero 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán, Sinaloa el día 05 del mes Agosto del año 2020, el (la) que suscribe Anna Patricia Islas Zamorano alumno (a) del Programa de Posgrado en Biotecnología con número de cuenta 1269911-1, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez y Dr. Noé Ontiveros Apodaca y cede los derechos del trabajo titulado "Efecto de macrófago estimulados con agonistas de receptores TLR3, TLR 2/6 y anticuerpo anti IL-10 R α sobre líneas celulares de cáncer de mama", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Anna Patricia Islas Zamorano

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a la Universidad Autónoma de Sinaloa y a la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas por brindar programas de calidad como el Posgrado en Biotecnología, el cual me permitió continuar mi formación en la investigación. Asimismo, agradezco a PRODEP-2017 (ejercicio 2017-2018; USO513003457) por el financiamiento a este proyecto.

También quiero agradecer a la Dra. Edith Cuevas y el Dr. Noé Ontiveros por la confianza al aceptar ser mis directores de tesis, por sus valiosas aportaciones durante este proceso, por su confianza, paciencia y apoyo necesario. Gracias a la Dra. Guadalupe González (Universidad de Sonora), a MC. Mónica Reséndiz y Dr. Víctor Hernández (CIAD Hermosillo), a la Dra. Guadalupe Delgado y Dr. Julio Reyes (CIBIOR) por darme el acceso a las instalaciones de sus laboratorios para realizar parte de los experimentos, además de estar siempre a la disposición de ayudar.

Muchas gracias a quiénes fueron mis compañeros de laboratorio: Rosario, Iliana, Jeovani y Daniela, por enseñarme todas las técnicas necesarias y ayudarme para culminar con mis experimentales.

Gracias a mi familia por siempre apoyarme en todo lo que hago, aunque eso implique distancia y ausencia en momentos importantes.

Finalmente, quiero agradecer y dedicar esta tesis a la Dra. Lilian Karem Flores Mendoza, porque siempre fue pieza fundamental en este proceso. Gracias a su apoyo académico, moral, emocional e incluso económico, es que logré realizar este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

	Pag
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE CUADROS	Vii
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN DE LITERATURA	5
A Cáncer de mama	5
1 Factores de Riesgo y Factores Protectores	6
2 Clasificación Tumoral	8
3 Tratamiento actual del cáncer de mama	13
B Microambiente Tumoral	16
C El cultivo de macrófagos, su polarización y uso en terapias	22
1 Polarización a macrófagos M1	23
2 Polarización a macrófagos M2	26
3 Polarización de macrófagos como terapia contra el cáncer de mama	31
IV JUSTIFICACIÓN	35
V HIPÓTESIS	36
VI OBJETIVOS	37
VII MATERIALES Y MÉTODOS	38

A MATERIALES	38
1 Líneas y cultivos celulares	38
B METODOS	38
1 Diferenciación de monocitos a macrófagos	38
2 Estímulos	39
3 Determinación del fenotipo de macrófagos	40
a Amplificación de los genes IRF4, IRF5, SOCS1, SOCS3, TNF- α y TGF- β por la reacción en cadena de la polimerasa	40
b Determinación de marcadores de superficie por citometría de flujo	42
c Evaluación de citocinas y quimiocinas por ELISA	44
4 Co-cultivo de macrófagos con la línea celular de cáncer de mama T47D	46
a Actividad anti-proliferativa	46
b Análisis Estadísticos	47
VIII RESULTADOS	48
1 Condiciones de diferenciación y polarización de macrófagos.	48
2 Evaluación de la diferenciación morfológica de monocitos a macrófagos	48
3 Estandarización de la polarización de macrófagos THP-1 estimulados con LPS e IL-4	51
4 Expresión génica de los factores reguladores de interferón (IRF) 4 y 5	51

5	Expresión de proteínas (IL-10 y CXCL10) por macrófagos THP-1 estimulados con LPS e IL-4	55
6	Polarización de macrófagos derivados de monocitos THP-1 y U937	57
7	Efecto de agonistas de TLRs sobre la polarización de macrófagos U937	61
8	La maduración de monocitos U937 a macrófagos mediante estimulación con PMA genera macrófagos con diferentes morfologías.	61
9	La estimulación con INF- γ /LPS suprime la expresión de IRF4 pero induce una mayor expresión de SOCS3	63
10	La estimulación con Poly I:C/anti IL-10R α aumenta la expresión de marcadores de superficie M2.	69
11	Poblaciones heterogéneas de macrófagos M1 y M2 en estímulos de agonistas de TLRs a nivel funcional	72
12	Estandarización de Co-cultivo	77
13	Actividad anti-proliferativa inducida por macrófagos en Co-cultivo con células de cáncer de mama T47-D.	79
IX	DISCUSIÓN	82
X	CONCLUSIÓN	89
XI	BIBLIOGRAFÍA	90
XII	ANEXOS	98
A	Expresión de CD197 y CD163 en macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs y anti IL-10 R α	
B	Constancias de Estancias en CIBIOR y UNISON	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Mecanismo de acción de diferentes estímulos relacionados a macrófagos con fenotipo M1	26
2	Mecanismo de acción de diferentes estímulos relacionados a macrófagos con fenotipo M2	28
3	Morfología de monocitos y macrófagos THP-1 diferenciados con PMA observados a 20X y 40X	49
4	Morfología de monocitos y macrófagos U937 diferenciados con PMA observados a 20X y 40X	50
5	Expresión de <i>IRFs</i> en macrófagos THP-1 estimulados con LPS e IL-4.	53
6	Expresión de marcadores en macrófagos THP-1 estimulados con LPS e IL-4. a) expresión de <i>SOCS1</i> , expresión de <i>SOCS3</i> , expresión de <i>TNF-α</i> , expresión de <i>TGF-β</i> .	54
7	Concentración de IL-10 e IP-10 en sobrenadante de cultivo de macrófagos polarizados con LPS e IL-4	56
8	Secreción de IL-10 por macrófagos U937 y THP-1 después de 24 y 72 horas de estimulación.	58
9	Morfología de macrófagos U937 estimulados con los controles de polarización M1 (IFN- γ /LPS) y M2 (IL-4/L-13)	62
10	Expresión génica de macrófagos U937 expuestos a diferentes estímulos	65
11	Expresión de marcadores en macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs	68
12	Secreción de IL-10 por macrófagos estimulados con agonistas TLRs.	73
13	Secreción de IP-10 por macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs.	78

- 14 Curva del tiempo de incubación del MTT.
- 15 Proliferación de las células T47-D co-cultivadas con macrófagos 80
estimulados con IFN- γ /LPS, IL-4/IL-13, Poly I:C/anti IL-10 R α , FSL-
1 y FSL/ anti IL-10 R α . Valores normalizados respecto a las células
de cáncer sin macrófagos. CTRL: co-cultivo con macrófagos sin
estímulos.
- 16 Proliferación de las células T47-D co-cultivadas con macrófagos 82
estimulados con IFN- γ /LPS, IL-4/IL-13, Poly I:C/anti IL-10 R α , FSL-
1 y FSL/ anti IL-10 R α . Valores normalizados respecto a las células
de cáncer en co-cultivo con macrófagos sin estímulos.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación del carcinoma según el grado de invasión, lugar de origen y aspecto celular.	11
2	Etapas del cáncer de mama.	12
3	Características moleculares de células tumorales en cáncer de mama.	13 12
4	Marcadores de Macrófagos M1 y M2.	30
5	Secuencias de los cebadores utilizados para la evaluación de la expresión de los genes de interés por PCR.	43
6	Expresión de marcadores de superficie de células U937 y THP-1 diferenciadas y polarizadas.	60
7	Expresión de marcadores de superficie en macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs.	71

I RESUMEN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte de mujeres a nivel mundial. El desarrollo y complicaciones de esta condición se ha relacionado con células asociadas a procesos inflamatorios, como macrófagos. Estas células pueden desarrollar un fenotipo antitumoral (M1) o protumoral (M2) dependiendo de los estímulos que reciban del microambiente. Algunos agonistas de receptores tipo toll (TLR) y moléculas inmunomoduladoras no tóxicas podrían inducir macrófagos con una respuesta antitumoral. Esto podría coadyuvar en el tratamiento de algunos tipos de cáncer y a la vez podría disminuir el uso de terapias anticáncer que ocasionan efectos adversos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de macrófagos estimulados con agonistas de los receptores TLR 3, TLR 2/6 y anticuerpo anti IL-10 R α sobre líneas celulares de cáncer de mama. Monocitos U937 fueron diferenciados con PMA a macrófagos. Posteriormente, los macrófagos se estimularon con agonistas TLR: TLR3 Poly I:C, TLR 2 *Listeria monocytogenes* inactivada por calor (HKLM), TLR4 LPS *E. coli* K12, TLR 2/6 FSL-1, y un anticuerpo monoclonal anti IL-10 R α . Se evaluó la expresión génica de SOCS1, SOCS3, IRF4, IRF5, TGF- β y TNF- α . Los marcadores de superficie: CD197, CD80, CD163 y CD206 fueron evaluados por citometría de flujo. La producción de IL-10 e IP-10 fue cuantificada por ensayo de ELISA. Los macrófagos estimulados con agonistas de TLR y el anti IL-10 R α fueron co-cultivados con las líneas celulares de cáncer de mama T47-D y MCF-7. La proliferación fue evaluada mediante ensayo de MTT a las 72 horas de co-cultivo. La estimulación con Poly I:C en conjunto con el anticuerpo anti IL-10 R α disminuyó significativamente la producción de IL-10 aunque indujo la expresión de marcadores M2 (IRF4 y CD163). Por otro lado, los estímulos con HKLM/LPS y FSL-1 promovieron la expresión de marcadores de macrófagos M1. Los macrófagos estimulados con los agonistas de TLRs junto con el anti IL-10 R α disminuyeron la proliferación de células de cáncer aunque presentaron características de una población heterogénea M1/M2. La diferenciación de monocitos a macrófagos con PMA induce una población heterogénea (M1/M2) de estos fagocitos. No obstante, bajo el estímulo con Poly I:C/anti IL-10 R α los macrófagos lograron disminuir la proliferación de células de cáncer. Los resultados sugieren que el uso de moléculas

con potencial para activar al receptor TLR3 y que limitan la disponibilidad de IL-10 podrían utilizarse como una terapia anticancerígena.

Palabras clave: Macrofagos, Cáncer de mama, Receptores TLR

II INTRODUCCIÓN

La división celular es un proceso que se encuentra finamente regulado de acuerdo con las necesidades del organismo. En los adultos, debe existir un equilibrio entre la división celular y la apoptosis (muerte celular programada). Algunas veces los puntos de control mitótico se encuentran alterados de tal forma que se inhibe el proceso apoptótico y las células se dividen sin límite dando lugar a células inmortales (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2015; Lund, To, O'Brien, & Donnelly, 2016). Esta desregularización es conocida como cáncer y generalmente se debe a daños genéticos que activan protooncogenes e inactivan genes supresores de tumores originándose un tumor maligno. Aparte de la proliferación acelerada, desordenada, y no controlada, las células tumorales tienen la capacidad de diseminarse e invadir otros órganos en un proceso conocido como metástasis (Abbas et al., 2015; Bertos & Park, 2011).

El cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial por su alto índice de mortalidad y los gastos que genera tanto a los pacientes como a los servicios de salud pública. Según los resultados de GLOBOCAN, los casos nuevos de cáncer y las muertes a causa de este han ido en aumento. En 2018, se registraron 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes por cáncer duplicándose las cifras reportadas en 2012 (Bray et al., 2018; Gelband, Jha, Sankaranarayanan, & Horton, 2015). A nivel global, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en tasa de incidencia y mortalidad en mujeres (Bray et al., 2018; Torre et al., 2015). La gran cantidad de decesos por cáncer se atribuye principalmente a que es detectado en etapas tardías, cuando los tratamientos no son tan efectivos, o bien, por

las complicaciones que pueden ocasionar los efectos adversos de las terapias actuales, principalmente la quimioterapia (Gelband et al., 2015).

Se ha establecido que el cáncer está relacionado con procesos inflamatorios prolongados aunque durante su desarrollo se producen citocinas y quimiocinas que atraen linfocitos Th2 y fagocitos. Entre los principales fagocitos partícipes del proceso tumoral se encuentran los macrófagos (Coussens & Werb, 2002), los cuales pueden polarizar su respuesta de acuerdo con el microambiente en el que se encuentren sus células precursoras. Así, pueden generarse macrófagos con fenotipo M1 o M2. Por un lado, la respuesta M1 ha demostrado tener un efecto antitumoral, el cual se atribuye a la activación de genes que codifican citocinas como la IL-12 y otros que promueven la activación de células citotóxicas CD8⁺. Por otro lado, la población M2 ha demostrado tener un efecto protumoral debido a la activación de genes de regulación de la respuesta inmune como la IL10, la cual es capaz de activar linfocitos T reguladores (Martinez & Gordon, 2014). Sin embargo, la evidencia científica actual sobre los cambios del microambiente tumoral no es suficiente para promover en la práctica clínica la aplicación de moléculas agonistas de TLR y otras que inhiban la acción de la IL-10 para tratar los casos de cáncer de mama. Así, en el presente proyecto se evaluó el efecto de diferentes estímulos sobre la diferenciación fenotípica de macrófagos, así como el potencial antitumoral de estas células en líneas celulares de cáncer de mama. Este estudio sienta las bases para posteriores intervenciones *in vivo* que podrían generar evidencia científica de una posible terapia que ofrezca un pronóstico favorable para los pacientes.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A. Cáncer de mama

La mama se conforma por un sistema de conductos galactóforos que se van ramificando desde el pezón hasta las glándulas mamarias o lóbulos. Estos últimos se conforman por lobulillos, los cuales se componen por alvéolos productores y secretores de leche materna. Histológicamente, los conductos y los lóbulos se encuentran recubiertos por una lámina simple de células epiteliales luminales rodeadas de células mioepiteliales orientadas transversalmente. Toda esta estructura se encuentra sostenida por el estroma, el cual está compuesto por una matriz extracelular, células (fibroblastos, células del sistema inmunológico, adipocitos) y vasos sanguíneos. El estroma se separa de los conductos y los lóbulos por una membrana basal (Bertos & Park, 2011).

Fisiológicamente, los macrófagos participan en el desarrollo de la glándula mamaria. Estos fagocitos participan en el proceso de elongación de los conductos terminales durante la pubertad y podrían participar en el desarrollo de los alvéolos durante el embarazo. Estas funciones las llevan a cabo gracias a la producción de numerosos factores de crecimiento, citocinas angiogénicas, quimiocinas y mediadores inflamatorios (Schwertfeger, Rosen, & Cohen, 2006; Tamma et al., 2017).

En el cáncer de mama las células tumorales proliferan en diferentes estructuras de la mama. Debido a su capacidad de remodelar la matriz extracelular e interactuar directamente con otros tipos celulares como las células mesenquimales, hematopoyéticas y linfoides, las células tumorales pueden invadir tanto los conductos

galactóforos como el estroma, a través de los ganglios linfáticos y el torrente sanguíneo, y órganos distantes como lo son hueso, pulmón e hígado, (Bertos & Park, 2011; Yustos, Angulo, & Soto, 2017). Por lo tanto, si el proceso invasivo se detecta en etapas tardías cuando las células cancerígenas ya han logrado migrar hacia otros tejidos es más difícil su eliminación empeorando el pronóstico del paciente.

En México, en el periodo de 2011-2016 se incrementó el porcentaje de muertes por cáncer de mama, el cual pasó del 13.2% al 14.2% viéndose afectadas sobre todo las mujeres de 30 a 59 años de edad (Informática, 2007). Estos datos ubican al cáncer de mama como la tercera causa de muerte en México y se estima que para el 2020 la tasa de mortalidad incremente a 79 por cada 100,000 habitantes (Mohar-Betancourt, Reynoso-Noverón, Armas-Texta, Gutiérrez-Delgado, & Torres-Domínguez, 2017).

1. Factores de Riesgo y Factores Protectores

Las causas precisas del desarrollo de cáncer de mama son inciertas aunque hay una serie de factores de riesgo que se han relacionado con una mayor incidencia de la enfermedad. Entre estos factores encontramos la edad, antecedentes familiares y personales de cáncer de mama, alto porcentaje de grasa corporal, antecedentes de enfermedad benigna de la mama y factores hormonales y reproductivos (Barnard, Boeke, & Tamimi, 2015; Dossus & Benusiglio, 2015).

Entre los factores hormonales y reproductivos el estrógeno cobra una gran relevancia debido a su potencial para favorecer la proliferación de células y ramificación de los conductos. Además, el estrógeno aumenta los errores genéticos asociados al cáncer y genera metabolitos mutagénicos (Yager & Davidson, 2006). Por

otro lado, la progesterona favorece la diferenciación de las células alveolares y la dilatación de los conductos durante la fase lútea (Neville & Morton, 2001). Así, las mujeres con una menarquía precoz (antes de los 12 años de edad) y/o una menopausia tardía (después de los 55 años de edad) tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama ya que estarían expuestas al estrógeno por más tiempo. Por otro parte, la nuliparidad y la paridad después de los 35 años aumentan el riesgo de cáncer de mama ya que un embarazo después de los 35 años puede estimular el crecimiento del epitelio atípico preexistente (Romieu et al., 2018; SOCIAL).

En cuanto al trasfondo genético, los genes más importantes relacionados al cáncer de mama hereditario son *BRCA (Breast Cancer) 1* y *BRCA2*, los cuales son supresores de tumores. El gen *BCRA1* se encuentra en el cromosoma 17, tiene herencia autosómica dominante y su mutación se asocia con un riesgo del 85% de padecer cáncer de mama. Este gen se encuentra involucrado en la regulación del ciclo celular, reparación de ácido desoxirribonucleico (DNA) y regulación de la transcripción. Mientras que las mutaciones en el gen *BCRA2* predisponen a cáncer de mama masculino y otros tipos de cáncer como de páncreas, estómago, etc. (Gelband et al., 2015; Guzmán-Santos, Morales-Cordero, Torres, & SánchezRodríguez, 2012; Yustos et al., 2017).

Contrario a los factores asociados al cancer de mama, se han encontrado factores protectores. El aumento en el consumo de ácidos grasos omega-3 disminuye hasta el 35% la incidencia y la mortalidad por cáncer de mama (Fabian, Kimler, & Hursting, 2015). Además, estudios en ratones sugieren que la suplementación de ácidos grasos omega-3/omega-6 en combinación con otro agente modulador del

receptor de estrógeno logra prevenir el desarrollo de cáncer de mama positivo en receptor de estrógeno (Manni et al., 2014). Asimismo, la lactancia materna se ha propuesto como un factor protector del desarrollo de cáncer de mama. En este caso, la mayoría de los estudios indican que amamantar reduce el riesgo de cáncer de mama triple negativo. Similarmente, la actividad física es importante para prevenir el cáncer de mama debido a que reduce los niveles de estrógeno libre (Rojas & Stuckey, 2016).

En general, el cáncer de mama se caracteriza por ser muy heterogéneo, complejo y en la mayoría de los casos de evolución lenta, lo cual dificultó por años un diagnóstico temprano. Sin embargo, los sistemas de salud han emprendido campañas de concientización sobre la autoexploración incrementándose el número de diagnósticos oportunos y mejorándose el pronóstico de los pacientes (Cárdenas-Sánchez, Erazo-Valle, Maafs-Molina, & Poitevin-Chacón, 2011; SOCIAL; Yustos et al., 2017).

2. Clasificación Tumoral

Los tumores más frecuentes de la mama se originan en el epitelio ductoglandular y se denominan carcinomas (Yustos et al., 2017). El tipo de cáncer de mama más frecuente en población mexicana es el carcinoma ductal infiltrante, seguido del carcinoma lobular (Guzmán-Santos et al., 2012). Entre otras clasificaciones, el carcinoma puede clasificarse según el grado de invasión y puede ser subdividido de acuerdo con el lugar de origen y aspecto celular, como se explica en el Cuadro 1 (Gelband et al., 2015; SOCIAL). Para poder establecer un pronóstico y tratamiento es importante conocer la evolución del cáncer de mama, la cual se divide en estadios o etapas como se muestra en el Cuadro 2 (Bertos & Park, 2011; Gelband et al., 2015).

Sin embargo, la principal clasificación clínica es con base en las características moleculares de las células tumorales, el estado de los receptores hormonales y presencia del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), como se describe en el cuadro 3 (Gelband et al., 2015; Yustos et al., 2017).

3. Tratamiento actual del cáncer de mama

Entre los tratamientos del cáncer de mama se encuentran la cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica. La selección de los tratamientos depende de las características del tumor y el estadio de la enfermedad. Por lo general se utiliza más de un tratamiento y el proceso es manejado por un equipo multidisciplinario.

La cirugía es el tratamiento de primera línea en todos los casos de cáncer de mama y consiste en extirpar el tumor con los márgenes que se consideren necesarios. Con este tratamiento se puede determinar el pronóstico de la enfermedad y mediante el análisis histológico de una biopsia selectiva del ganglio centinela se puede saber si se han afectado los ganglios axilares para seleccionar el tratamiento adyuvante más adecuado. Actualmente, se realiza la mastectomía radical modificada. Este procedimiento incluye la mama y la fascia del pectoral mayor, pero se mantienen los músculos pectorales, lo cual permite realizar una reconstrucción estética posteriormente (Gelband et al., 2015; Yustos et al., 2017).

La radioterapia puede ser utilizada desde estadios tempranos hasta en metástasis y es de uso obligatorio tras una cirugía de tipo conservador.

Cuadro 1. Clasificación del carcinoma según el grado de invasión, lugar de origen y aspecto celular.

Clasificación	Grado de Invasión
In situ	Se limita a los conductos galactóforos, y no tiene capacidad de invasión ganglionar
Infiltrate	Se invade el estroma traspasando la membrana basal, representa el 95% de los tumores malignos y puede ocurrir metástasis. El tumor más común se origina a nivel ductal y puede invadir rápidamente los ganglios axilares
Subclasificación	Lugar de Origen y Aspecto Celular
Lobular (Adenocarcinoma)	Se origina en los lobulillos o glándulas productoras de leche materna
Ductal	Presencia de células anormales en el revestimiento de los conductos galactóforos
Medular	Agrupamiento de las células cancerosas, suelen ser de gran tamaño, y representa el 1-10% de los casos de cáncer de mama. Se le asocia al gen <i>BCRA1</i> .
Tubular	Presencia de formaciones glandulares o tubulares que llegan a infiltrar el estroma, se presenta en el 10-20% de los casos
Mucinoso o Coloide	Tan solo afecta al 1-2% de los casos, suelen ser lesiones bien definidas de gran tamaño y un crecimiento lento
Inflamatorio	Se bloquean los vasos linfáticos por las células cancerosas y se produce una inflamación de la mama

Cuadro 2. Etapas del cáncer de mama

Etapas	Características
Etapa 0	El tumor se encuentra in situ y en los conductos galactóforos
Etapa 1	El tumor forma un nódulo menor a 2 cm de diámetro, sin invasión a otros tejidos
Etapa 2	El tumor tiene un diámetro inferior a 2 cm y se extiende a los ganglios axilares, o el nódulo aumenta su tamaño sin pasar de los 2 cm de diámetro y presenta un 50% de probabilidades de extenderse a los ganglios axilares
Etapa 3	El tumor no llega a los 5 cm de diámetro, pero ha invadido ganglios axilares, o se disemina a tejidos cercanos a la glándula mamaria
Etapa 4	Metástasis a distancia

Cuadro 3. Características moleculares de células tumorales en cáncer de mama.

Clasificación	Características
HER2+/Receptor de Estrógeno (RE)-	Sobreexpresión del receptor HER2, alteración de genes de angiogénesis, topoisomerasa II α y proteólisis
Luminal A	Sobreexpresión de RE
Luminal B y C	Baja expresión de RE y otros genes específicos. El luminal B incluye tumores HER2+ y receptor de progesterona positivo (RP+)
Basal	También se le conoce como triple negativo (RE-/RP-/HER2-)
Normal	Estos tumores tienen características similares al tejido sano

La radioterapia puede ser aplicada de manera externa e interna. La radioterapia externa consiste en sesiones breves y diarias. En estos casos las fuentes de radiación pueden ser: cobaltoterapia, acelerador de electrones, entre otros. La radioterapia interna o braquiterapia es la colocación de sustancias radioactivas cerca o dentro del tumor, y dura unos pocos días. No obstante, uno de los principales efectos adversos de esta terapia es irritación en la piel, además de astenia y linfedema, entre otros.

La quimioterapia es un tratamiento sistémico en el que se administran medicamentos (actualmente antraciclinas y taxanos) clásicamente por vía intravenosa. Esta terapia es considerada como adyuvante de cirugía, neoadyuvante o previo a la cirugía y en metástasis. La aplicación de medicamentos es de forma secuencial y cada una de estas secuencias se conoce como ciclo de tratamiento. Aunque la quimioterapia es muy eficaz logrando la supervivencia sin la enfermedad y reduciendo las tasas de mortalidad por cáncer de mama, disminuye en gran medida la calidad de vida de los pacientes por el alto número de efectos secundarios que produce. Algunos de estos efectos son los siguientes: alopecia, vómitos, neutropenia, amenorrea, menopausia precoz, astenia, neuropatías, y a largo plazo cardiotoxicidad y leucemias agudas (Cárdenas-Sánchez et al., 2011; Gelband et al., 2015; Yustos et al., 2017).

La hormonoterapia es utilizada en aquellos casos en los que las células tienen la capacidad de responder a cambios hormonales como en el tumor luminal RE+/HER2-. Se utilizan medicamentos que suprimen la actividad de las células que producen las hormonas o que contrarrestan el crecimiento celular. Los fármacos aplicados son el tamoxifeno e inhibidores de aromatasas. El primero es el más usado y su mecanismo consiste en bloquear los receptores de estrógenos. Esto evita que las

células cancerosas sigan dividiéndose. El segundo impide que se sinteticen estrógenos inhibiendo a la enzima aromatasa. Los efectos secundarios son sofocos, nerviosismo, ansiedad, dolores articulares, hemorragias, depresión, estreñimiento y disminución de libido.

Los tratamientos biológicos se dirigen específicamente a células cancerosas HER2+ e inhiben su crecimiento. El fármaco empleado se denomina Trastuzumab y es un anticuerpo monoclonal humanizado específico al dominio extracelular de los receptores HER2, el cual al unirse al dominio bloquea las vías de señalización dependientes del receptor. Su actividad terapéutica en el cáncer de mama se relaciona a diversos factores tales como la disminución en la expresión de receptores HER, sensibilización de las células tumorales al TNF y a la quimioterapia, participación en la respuesta inmune mediada por células NK, e inactivación parcial de los heterodímeros HER2/HER3. A pesar de que los efectos secundarios de este medicamento son menores, debe de monitorizarse la cardiotoxicidad (Gelband et al., 2015; Yustos et al., 2017). Otros medicamentos van dirigidos a inhibir la angiogénesis y son un buen adyuvante en casos de metástasis.

En general, todas las terapias para el cáncer de mama dañan las células sanas y en ocasiones conllevan al desarrollo de otras enfermedades afectando en gran medida la calidad de vida de los pacientes (Jhan & Andrechek, 2017; Waks & Winer, 2019). Así, son necesarias investigaciones orientadas al desarrollo de nuevas terapias efectivas e idealmente libres de efectos adversos para tratar el cáncer de mama. La mayoría de los estudios actuales van dirigidos al subtipo triple negativo, ya que estas células cancerígenas no expresan receptores y/o moléculas al que se pueda dirigir

alguna terapia ya establecida que no afecte células sanas, por ejemplo, la inhibición de moléculas que regulen negativamente la respuesta inmunológica antitumoral, como el anticuerpo anti CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen*) el cual ya ha sido aprobado por la FDA como posible tratamiento de melanoma metastático, actualmente ha sido utilizado en ensayos clínicos relacionados a cáncer de mama triple negativo. Otro ejemplo de molécula blanco estudiada es PD-1, un receptor transmembrana presente en células inmunes efectoras, una vez activado este receptor por sus ligandos PD-L2 y PD-L1 inhibe la actividad de células T favoreciéndose un ambiente protumoral. Así, bloquear al receptor o inducir la degradación de PD-L1 ha sido propuesto como una opción efectiva para el tratamiento de cáncer de mama (Jhan & Andrechek, 2017; Qi, Kong, Wang, & Fang, 2018; L.-Y. Yu et al., 2017). Aunque el cáncer de mama triple negativo responde mejor a la quimioterapia, la tasa de recurrencia y metástasis es mayor que los otros subtipos, por ello la importancia de buscar una alternativa que mejore el pronóstico de estos casos.

El avance de la biología molecular e inmunología ha permitido comprender la heterogeneidad de células, moléculas y condiciones involucradas en el proceso fisiopatológico de cáncer de mama, resaltando la presencia de células inmunológicas, las cuales han sido estudiadas como blanco para terapias anticancerígenas (Jiang & Shapiro, 2014; Van Dalen, Van Stevendaal, Fennemann, Verdoes, & Ilina, 2019). Este conjunto de componentes y productos celulares es conocido como microambiente tumoral.

B. Microambiente Tumoral

El microambiente tumoral se encuentra conformado por una matriz extracelular, fibroblastos, células neuroendocrinas, adipocitos, células involucradas en la respuesta inflamatoria, vasos sanguíneos y linfáticos (M. Wang et al., 2017). Estos componentes juegan un papel importante en la tumorigénesis: iniciación, progresión y metástasis. Particularmente, las células del sistema inmune pueden reconocer y eliminar clones de células transformadas y tumores ya formados conteniendo su crecimiento o promoviendo el desarrollo tumoral (O'Sullivan et al., 2012; M. Wang et al., 2017). La proliferación de células que contribuyen al desarrollo del tumor, como aquellas con DNA dañado o con mutaciones, es mayor en un ambiente inflamatorio crónico y en presencia de factores de crecimiento regulados por el sistema inmune (Abbas et al., 2015; Coussens & Werb, 2002).

La “iniciación” y la “promoción” son las etapas básicas del desarrollo del cáncer. La etapa de iniciación involucra un daño irreversible al ADN (ácido desoxirribonucleico) aunque el tejido puede conservarse normal hasta que pasa a la etapa de “promoción”. Esta segunda etapa engloba la expresión del DNA dañado y al crecimiento y desarrollo de las células bajo diferentes condiciones, tales como altas concentraciones hormonales e inflamación crónica, lo cual se ve reflejado en un crecimiento celular atípico (Coussens & Werb, 2002; Tamayo, 1997).

Un proceso inflamatorio normal se encuentra regulado por un balance en la producción de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias, pero cuando este balance se ve afectado la inflamación puede ser crónica ocasionando un desequilibrio tanto en la muerte celular como en los programas de reparación de DNA, lo cual conlleva al desarrollo de células tumorales (Coussens & Werb, 2002; DeNardo & Coussens,

2007). Durante el proceso inflamatorio crónico los leucocitos y otras células fagocíticas, entre las que se encuentran los macrófagos, inducen un daño en el DNA de las células en proliferación. Esto se ha atribuido a la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales son producidas normalmente por las células blancas inmunes cuando se encuentran activadas. Dichas especies reactivas forman peroxinitrato el cual es un agente mutagénico. Además, el factor inhibitorio de la migración de macrófagos también contribuye al daño del DNA a la vez que suprime la actividad transcripcional del gen supresor de tumores p53 (Coussens & Werb, 2002; Hudson et al., 1999).

Los macrófagos son componentes inflamatorios claves en el desarrollo del tumor y son atraídos por las células tumorales a través de la producción de una amplia gama de citocinas y quimiocinas que atraen leucocitos. A su vez, las células blancas producen citocinas, mediadores citotóxicos, proteasas, metaloproteasas y mediadores solubles de muerte celular (Kuper, Adami, & Trichopoulos, 2000). Particularmente, las quimiocinas, una familia de citocinas, son esenciales en el proceso de migración celular. Estas citocinas se dividen en cuatro subfamilias con base a la posición de los primeros dos residuos de cisteína amino terminal, CC, CX3C, XC y CXC. Estas últimas se subclasifican de acuerdo a la presencia de los aminoácidos glutamato, leucina y arginina (Glu-Leu-Arg/ELR) en el extremo amino-terminal del *motif* CXC (ELR+), por ejemplo CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8 considerándolas pro-angiogénicas y estimulan la quimiotaxis de células epiteliales, mientras que las quimiocinas CXC ELR-, como CXCL 4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL14, poseen

actividad angioestática (Vicari & Caux, 2002). El balance de citocinas y quimiocinas en cualquier tipo de tumor es crítico para la regulación del infiltrado inflamatorio que forma.

El microambiente tumoral reducido en quimiocinas induce una restricción en la vascularización y en el crecimiento tumoral, mientras que un gran número de quimiocinas proinflamatorias, por ejemplo, CXC ELR+, estimulan un crecimiento acelerado del tumor. Por otro lado, un desbalance entre las quimiocinas anti y proinflamatorias, como CXC ELR-, conduce a una inflamación excesiva, detención del proceso de angiogénesis y de la regresión tumoral. Alternativamente, altos niveles de monocitos y/o neutrófilos infiltrados, en respuesta al desbalance de quimiocinas, pueden estar asociados con citotoxicidad, baja actividad angiogénica y la eliminación del tumor (Bertos & Park, 2011).

Las células epiteliales en un microambiente inflamatorio son susceptibles de promover la progresión tumoral y metástasis. Durante este último proceso se produce un remodelado de la matriz extracelular o estroma, angiogénesis y linfangiogénesis, y se reclutan células inflamatorias. Además, las células tumorales expresan receptores de quimiocinas, como CXCR4. A su vez, la producción de ligandos específicos en otros órganos para dicho receptor permite la migración e invasión de células tumorales, produciendo metástasis (Coussens & Werb, 2002).

Células del sistema inmune innato como los monocitos y macrófagos participan activamente en la formación de tumores. Los monocitos se encuentran en sangre y los macrófagos en los sitios de infección e inflamación. Ambos tipos celulares llevan a cabo diversas tareas en el organismo. Por ejemplo; participan en la regulación de la homeóstasis, fagocitan patógenos, regulan respuestas inflamatorias, así como la

respuesta metabólica al estrés en los tejidos. Estas funciones las cumplen a través de un conjunto de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (Coussens & Werb, 2002; Jiang & Shapiro, 2014).

Además de su multifuncionalidad, los monocitos y macrófagos exhiben una considerable diversidad y plasticidad, es decir, tienen la capacidad de adquirir un fenotipo y características funcionales únicos. Estas características dependen de los estímulos que reciben en el microambiente donde se desarrollan, ya que dichos estímulos influyen de manera directa las vías de diferenciación y polarización. Esto implica que dichos tipos celulares se encuentren involucrados en los procesos patológicos de diabetes, aterosclerosis y cáncer (Maeß, Wittig, Cignarella, & Lorkowski, 2014).

Los monocitos reclutados por la proteína quimiotáctica de monocitos pueden diferenciarse a macrófagos asociados a tumores (TAMs), los cuales infiltran el tejido tumoral. Los TAMs pueden participar en la eliminación de las células tumorales o pueden promover el crecimiento de estas. Los TAMs son clasificados comúnmente como macrófagos M1 proinflamatorios o macrófagos M2 antiinflamatorios. De estos últimos se distinguen al menos tres fenotipos: M2a con funciones de inflamación, alergia, encapsulación y lisis de parásitos, M2c con funciones pro-tumorales inhibiendo la activación de linfocitos citotóxicos (inmunoregulación, deposición de la matriz extracelular y remodelación tisular), y el fenotipo M2b (intermedio, regulador) (Martinez & Gordon, 2014).

Un ambiente proinflamatorio conlleva a que los macrófagos adquieran un fenotipo M1 mientras que la presencia de estímulos y/o citocinas

reguladoras/antiinflamatorias específicos conduce a la diferenciación de poblaciones celulares que son colectivamente macrófagos M2 (Lund et al., 2016; Wahl & Kleinman, 1998). Otras de las diferencias entre los macrófagos M1 y M2 son las enzimas, moléculas, y citocinas que liberan al ser activados. Aunque los macrófagos M1 y M2 se adaptan a las señales presentes en el medio, este microambiente se puede alterar con las citocinas y moléculas provenientes de los macrófagos. Así, los macrófagos pueden regular la respuesta inmune ante un antígeno determinado favoreciendo el reconocimiento de estos y posteriormente la homeostasis (Maeß et al., 2014; Tamma et al., 2017).

Los macrófagos M1 expresan óxido nítrico sintasa (iNOS), especies reactivas de oxígeno (ROS) e IFN- α . Esta última citocina activa a células NK y estimula la diferenciación de linfocitos T al fenotipo Th1. Consecuentemente, se produce interleucina (IL)-12 lo cual favorece la eliminación de células tumorales. Contrariamente, los macrófagos M2 producen IL-10, IL1 β , factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) y metaloproteasas. Estos macrófagos polarizan hacia una respuesta tipo Th2 dando lugar a IL-4 y anticuerpos. Así, los macrófagos M2 favorecen el crecimiento de tumores, supresión inmune, angiogénesis, y metástasis (Wei et al., 2017). En cuanto a los factores pro-angiogénicos, un desbalance de estos podría ocasionar que los TAMs favorezcan la angiogénesis y metástasis linfática a través de la producción de VEGF. Así, el microambiente que estimula y atrae a los TAMs juega un rol muy importante en el crecimiento y desarrollo tumoral (Jonjić et al., 1992; Nowicki et al., 1996).

Lo anterior ha sido corroborado con estudios histolmacrófagos M2 y linfocitos T CD4+ (reguladores) infiltran el tumor. La presencia de estos tipos celulares se relaciona con un mal pronóstico debido a su capacidad de generar un ambiente regulador pro-tumoral que aumenta el tamaño del tumor, la vascularización e invasión. Contrariamente, cuando se encuentran macrófagos M1 y linfocitos T CD8+ (citotóxicos) hay un mejor pronóstico como consecuencia del ambiente antitumoral existente (Ruffell, Affara, & Coussens, 2012; Wong, Staren, Tereshkova, & Braun, 1998).

C. El cultivo de macrófagos, su polarización y uso en terapias

Los ensayos *in vitro* con líneas celulares para la elucidación de fenómenos biológicos es una práctica común. Esto es especialmente ventajoso cuando se pretende hacer evaluaciones en células difíciles de obtener de los tejidos y mantener en cultivos primarios, tal es el caso de los macrófagos humanos. Los macrófagos primarios pueden ser obtenidos a partir de monocitos aislados de sangre periférica, pero el número de células que se logran diferenciar es limitado y solo se pueden mantener en los cultivos por un tiempo corto. Alternativamente, se cuenta con líneas celulares de monocitos que nos permiten estudiar su comportamiento y diferenciación como las líneas U937, ML-2, HL-60, Mono Mac 6 y THP-1 (Chanput, Mes, & Wichers, 2014).

Estas líneas celulares son comúnmente diferenciadas de monocitos a macrófagos con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, por sus siglas en inglés). La reducción de la concentración de PMA, de 25 a 10 ng/ml, durante la diferenciación de macrófagos previene la polarización por la vía clásica y es suficiente para una

apropiada maduración de las células (Lund et al., 2016; Maeß et al., 2014). Para saber si la diferenciación fue exitosa, se debe evaluar la adherencia de las células, su capacidad fagocítica y la expresión de marcadores de superficie como CD14, CD36, TLR2 y CR3 (CD11b/CD18) (Chanput et al., 2014).

La polarización de macrófagos se ha estudiado utilizando diferentes estímulos y evaluándose una serie de marcadores de superficie así como la expresión de genes específicos (Poh & Ernst, 2018). Por ejemplo, el co-cultivo de células THP-1 con adipocitos condiciona a una polarización de macrófagos M2 y a un aumento en la secreción de factor de crecimiento tumoral (TGF) β , mientras que el co-cultivo de células THP-1 con células tumorales primarias conduce a una polarización mixta de fenotipo M1 y M2 (Spencer et al., 2010). Esto pone de manifiesto que las células THP-1 son un modelo simple para estudiar la polarización de macrófagos (Caras et al., 2011). Asimismo, la línea celular U937 ha sido utilizada en estudios de diferenciación y polarización de macrófagos mediante el estímulo con moléculas como lipopolisacárido (LPS), quitosano y PMA. Tradicionalmente se evalúan la expresión de marcadores de superficie y citocinas en particular quimiocinas (Fong, Ariganello, Girard-Lauziere, & Hoemann, 2015; Martin, Murnane, Chau, Brown, & Hutter, 2017; Taniguchi et al., 2015).

1. Polarización a macrófagos M1

La polarización *in vitro* a macrófagos M1 puede lograrse mediante el estímulo con IFN- γ y/o LPS siendo este último el mejor estudiado. LPS activa receptores de TLR-4, lo cual activa genes que regulan la producción de citocinas proinflamatorias como IFN- β , IL-12, IL-6, TNF, IL1 β , quimiocinas como CCL2, CXCL10, CXCL11 y moléculas

presentadoras de antígeno como complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II). En este proceso también participan otras proteínas como la proteína activadora 1 (AP-1), factores reguladores de interferón (IRFs), activadores de transcripción (STAT) 5 y factores de la respuesta de crecimiento temprano (Figura 1a). La expresión de estos marcadores de macrófagos también es incrementada por la transducción de señales de la cinasa Janus (JAK), la cual es mediada por IFN- γ y STAT (Hu & Ivashkiv, 2009; Kim, Lee, & Hahn, 2017; Martinez & Gordon, 2014). Los receptores del IFN- γ activados inducen la fosforilación de tirosina por adaptadores JAK1 y JAK2, lo cual provoca la dimerización de STAT1, IRF1 e IRF8. Estos tres últimos componentes se unen al elemento cis de la secuencia activada por IFN- γ en los promotores de diferentes genes (Figura 1b). Entre los principales genes se encuentran marcadores de activación celular (CD36, CD38, CD69 y CD97), receptores de citocinas (IL-15, IL-6, IL-2), moléculas de adhesión celular (integrinas, mucinas), iNOS2, transactivador de MHC-II (CIITA) e IL-12 (Lehtonen et al., 2007; Martinez & Gordon, 2014).

La polarización a macrófagos M1 también puede lograrse utilizando factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Una vez activado, el receptor de GM-CSF moviliza JAK2 y desencadena una transducción de señales que lleva a la expresión de IL-6, IL-8, G-CSF, M-CSF, TNF e IL1 β , y además regula marcadores de superficie como CD14, fragmento Fc de IgG, CD163, entre otros (Figura 1c). La expresión de todos estos genes se refleja en un aumento de la presentación de antígenos, fagocitosis mediada por anticuerpos y complemento,

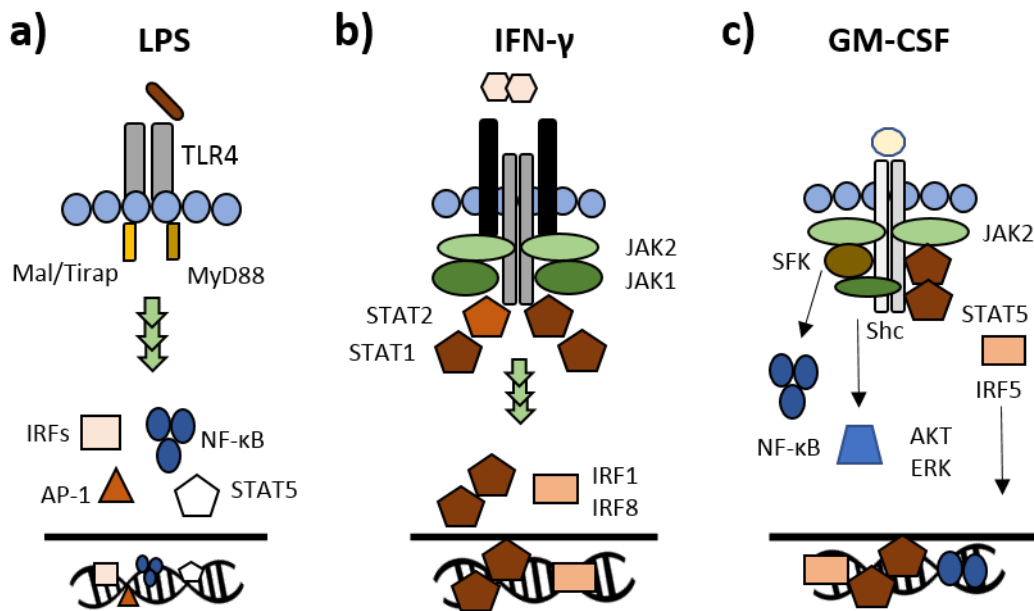


Figura 1. Mecanismo de acción de diferentes estímulos relacionados a macrófagos con fenotipo M1.

capacidad microbicida, quimiotaxis de leucocitos y la adhesión celular (Lehtonen et al., 2007; Martinez & Gordon, 2014).

2. Polarización a macrófagos M2

La estimulación con IL-4 y/o IL-13 en conjunto con antagonistas del receptor IL1 y citocinas reguladoras como IL-10, TGF- β y glucocorticoides puede lograr la polarización a macrófagos M2 *in vitro*. La citocina IL-4 puede ser reconocida por los receptores IL4R α 1 e IL13R α 1. Cuando el receptor IL4R α 1 se une al ligando, activa JAK1 y JAK3, que posteriormente activan a STAT6. Esta última molécula es traslocada al núcleo y regula a varios genes asociados a macrófagos M2 (Figura 2a) (Martinez & Gordon, 2014). Así, los macrófagos estimulados con IL4 e IL13 expresan genes relacionados al fenotipo M2, como transglutaminasa 2 (*TGM2*), prostaglandina-endoperoxidasa sintasa (*PTGS1*) receptor de manosa (*MRC1*), entre otros genes (Martinez et al., 2013).

En el caso del receptor de IL-10, este se autofosforila al reconocer a la IL-10 activando al factor de transcripción STAT3, el cual regula la inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias (Figura 2b). El transcriptoma de macrófagos obtenidos por IL-10 incluye receptores Fc, quimioatrayentes como CXCL13 y CXCL4, así como receptores de reconocimiento tales como el receptor de formil péptido 1 (FPR1), TLR1, TLR8, y receptor de macrófago con estructura colagenosa (MARCO) (Martinez & Gordon, 2014; Park-Min, Antoniv, & Ivashkiv, 2005).

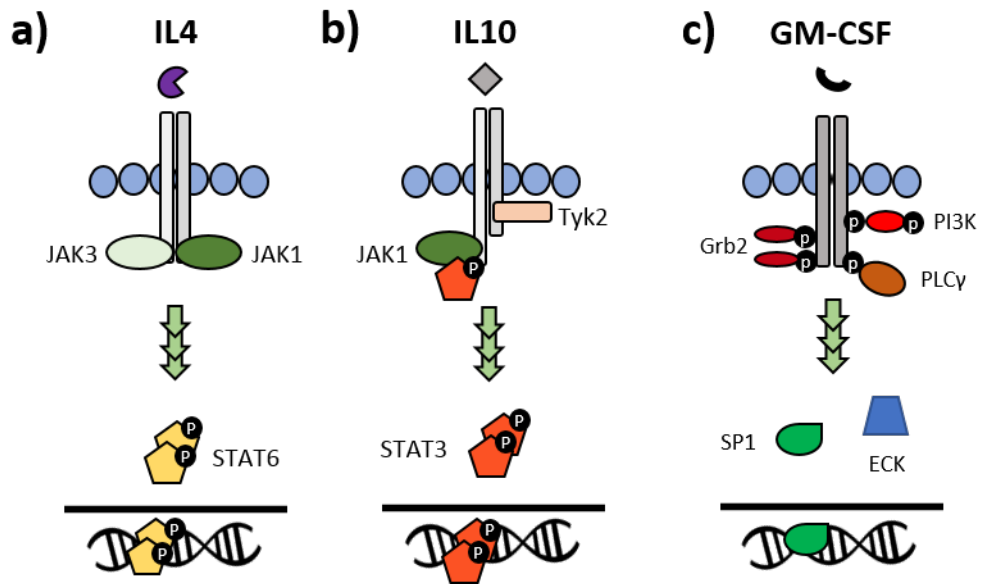


Figura 2. Mecanismo de acción de diferentes estímulos relacionados a macrófagos con fenotipo M2.

Por otra parte, el receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) se dimeriza y autofosforila cuando es activado. Esto activa a ERK, quinasa 2 fosfatidilinositol (PI3K), fosfolipasa C (PLC) y el factor de transcripción SP1 (Figura 2c). La respuesta al factor de transcripción SP1 es una sobreexpresión de genes relacionados al ciclo celular como ciclinas A2, B1, D1 y E1 y también se ha reportado una disminución en la expresión de antígeno leucocitario humano (HLA) (Martinez & Gordon, 2014; Martinez, Gordon, Locati, & Mantovani, 2006).

Por otro lado, la angiopoyetina-2 (Angptl2) juega un papel importante en la polarización a macrófagos M2. Esta molécula promueve la invasión de células tumorales al fomentar la entrada al sistema vascular y la extravasación celular por el incremento de la expresión y actividad de metaloproteasas 1 y 9 (Wei et al., 2017).

En el Cuadro 4 se muestran marcadores moleculares y de superficie que han sido utilizados para determinar el fenotipo de los macrófagos que inducen diferentes estímulos. En modelos murinos, los tumores estimulados con IL-27 muestran una infiltración incrementada de células supresoras monocíticas de origen mieloide y un porcentaje de macrófagos M1 mayor al de M2. IL-27 actúa sobre células de médula ósea con el fenotipo Lin-Csa-1+c-Kit+ (LSK) promoviendo la expansión y polarización a macrófagos M1 movilizándolos hacia el tumor (Chiba et al., 2018). Por otro lado, la expresión del gen interacción epitelial-estromal 1 (*EPSTI1*) muestra una sobre-regulación en monocitos y macrófagos, la cual es también inducida por LPS e IFN- γ al menos en macrófagos. Es bien conocido que la expresión de *EPSTI1* es sobre-regulada por IFN- α en células de cáncer de mama (Kim et al., 2017).

Cuadro 4. Marcadores de Macrófagos M1 y M2 (Poh & Ernst, 2018).

Características de Macrófagos						
	M1	M2				
		M2a	M2b	M2c	M2d	
Estímulo	IFN- γ LPS GM-CSF	IL-4 IL-13	IL-1R	IL10 TGF β	IL-6	
Marcadores	CD86 CD197 CD80 MHC II IL-1R SOCS3	CD163 CD206 MHC II	CD86 MHC II	CD163	VEGF	
Secreción de Citocinas	TNF- α IL-1 IL-6 IL-12	IL-10 TGF- β	IL-10 IL-1 IL-6	IL-10 TGF- β	IL-10 IL-12 TNF- α TGF- β	
Secreción de quimiocinas	CCL5 CXCL9 CXCL10	CCL22 CCL17 CCL24	CCL1	CCR2	CCL5 CXCL10 CXC16	
Funciones	Inflamación, daño tisular, eliminación de patógenos	Reparación y remodelación tisular y fibrosis	Antiinflamatorio, remodelación tisular y fibrosis	Antiinflamatorio	Angiogénesis, reparación tisular	

3. Polarización de macrófagos como terapia contra el cáncer de mama

Estudios *in vitro* con diferentes estímulos muestran que el fenotipo de los macrófagos se encuentra influenciado por el microambiente celular. En el microambiente tumoral, los macrófagos con fenotipo M2 pueden polarizarse a M1 debido a la plasticidad celular. Lo anterior se logra con estímulos que inhiben la expresión de genes antiinflamatorios y que potencian el ambiente proinflamatorio relacionado a la respuesta Th1.

Los TLRs son activados por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) así como por moléculas endógenas (Bhatelia, Singh, & Singh, 2014) y juegan un rol clave en los procesos inflamatorios. La modificación del microambiente tumoral con agonistas de TLRs, tales como TLR3, TLR9, y TLR7, podría fomentar el desarrollo de macrófagos M1 y disminuir en número de macrófagos M2.

El efecto de la estimulación directa con TLRs sobre células tumorales así como la polarización de macrófagos y la acción de estos fagocitos estimulados sobre células de cáncer es un área que ha sido objeto de investigaciones extensivas. Uno de los ejemplos más notables involucra el empleo de un agonista de TLR 7/8 con el cual fue posible desencadenar un efecto antitumoral así como una vascularización reducida del tumor e incluso apoptosis (Yin, He, & Wang, 2015). El agonista fue administrado a ratones balb/c con cáncer de mama. La administración del agonista fue intraperitoneal aplicándose diariamente durante 3 semanas una dosis de 3mg/kg. Aunque no se reportaron efectos secundarios, se observó un incremento en la expresión del gen HMGB-1 (*high mobility group box 1*, una proteína de señalización de daño endógeno que alerta al sistema

inmune), el cual se relaciona con desarrollo tumoral y metástasis en otros tipos de cáncer. Además, se debe considerar que la activación de TLR7 se asocia con procesos de carcinogénesis (Mittal et al., 2010; Ochi et al., 2012).

Estudios en células dendríticas de sangre periférica de humanos sanos muestran que la combinación de agonistas TLR7/8/9 reduce la activación de este tipo celular descartándose un efecto antitumoral. No obstante, las células tratadas solo con el agonista TLR9 limitaron el crecimiento del tumor y la metástasis. Lo anterior puede atribuirse a la inhibición de la vía NF- κ B, la cual se asocia con la expresión de citocinas proinflamatorias. (Ayala et al., 2017).

En cuanto a los agonistas de TLR4 como bacterias inactivadas o LPS, los resultados muestran una re-polarización de macrófagos M2 a M1 con el subsecuente efecto antitumoral. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos efectos no han sido ampliamente documentados en modelos *in vivo* de cancer de mama y que la citotoxicidad inducida por los microorganismos inactivados y LPS desencadenan efectos secundarios que van desde dolores de cabeza, náuseas hasta reacciones necróticas. (Fullerton, Segre, De Maeyer, Maini, & Gilroy, 2016; Goto et al., 1996; Shetab Boushehri, Abdel-Mottaleb, Béduneau, Pellequer, & Lamprecht, 2018; Vacchelli et al., 2012; Van Dalen et al., 2019).

Los agonistas de TLR3 podrían tener un efecto local sobre la polarización a macrófagos M1 e inducir directamente apoptosis en células cancerígenas humanas (Heusinkveld & van der Burg, 2011; Salaun, Coste, Rissoan, Lebecque, & Renno, 2006; Vidyarthi et al., 2018). Para este fin, se han diseñado nuevos agonistas de TLR3 con menos toxicidad que el tradicional ácido poliinosínico:policitidílico (Poly I:C), el cual ya

ha sido estudiado como un inmunoestimulador (Peine et al., 2013; Vidyarthi et al., 2018). Notablemente, estos agonistas ya se han utilizado en ensayos clínicos demostrando una buena tolerancia a la administración sistémica (Strayer et al., 2012).

El agonista de TLR3 una vez unido a su receptor homólogo desencadena una ruta de señalización que recluta IFN- β , el cual induce el dominio TIR (TRIF) y activa los factores de transcripción IRF3, NF- κ B y AP-1. A su vez, dichos factores de transcripción promueven la inducción de IFN tipo 1 y la producción de citocinas inflamatorias. El IFN tipo 1 potencia la respuesta de linfocitos T CD8+ y promueve la maduración de células dendríticas (Akazawa et al., 2007; Chin et al., 2010). Finalmente, la activación de TLR3 y TRIF inducen apoptosis a través de la vía de señalización de la proteína de dominio de muerte asociada a Fas. Específicamente, la activación de TLR3 por Poly I:C desencadena vías de apoptosis extrínsecas, caspasa-8 y caspasa-3, en células tumorales de cáncer de mama (Cheng & Xu, 2010; Guillot et al., 2005; Salaun et al., 2006).

Para potenciar los efectos antitumorales esperados de los TLRs se podrían utilizar anticuerpos dirigidos a inhibir citocinas antiinflamatorias como la IL-10. Este efecto sinérgico podría promover de mejor manera el incremento de la concentración sérica y local de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 (características de macrófagos M1) favoreciendo un ambiente citotóxico que ayudaría a controlar el cáncer de mama (Tamayo, 1997).

El uso de fármacos antagonistas de receptores y anticuerpos dirigidos principalmente a inhibir el reclutamiento de macrófagos y/o inducir un fenotipo M1 no ha sido evaluado ampliamente en cáncer de mama (Hao et al., 2012). Los estudios se limitan

a reportar el impacto sobre la proliferación celular tumoral y el tamaño del tumor quedando por evaluar la expresión del perfil de citocinas que podrían modificar nuevamente el microambiente o cambiar el comportamiento del tumor en un modelo *in vivo* (Heusinkveld & van der Burg, 2011; Martinez & Gordon, 2014; Vogel et al., 2014).

En general, los estímulos con Poly I:C y anti IL-10 podrían ser una alternativa para controlar *in situ* el microambiente tumoral en cáncer de mama y promover la polarización de macrófagos al fenotipo M1. Los estímulos con estas moléculas podrían ofrecer un mejor pronóstico de supervivencia a los pacientes con cáncer de mama o ser una alternativa terapéutica para este tipo de cáncer. Para evaluar los efectos de estos estímulos en ensayos clínicos, es deseable contrastar primero las hipótesis básicas mediante evaluaciones en líneas celulares seguido de evaluaciones en modelos de tumor *in vitro* si están disponibles y finalmente en un modelo murino de cáncer de mama.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor tasa de mortalidad entre mujeres y su prevalencia a nivel mundial y nacional ha ido en aumento en los últimos años. Aunque el número de detecciones en etapas tempranas ha aumentado, los tratamientos disponibles para esta enfermedad se asocian a efectos adversos que disminuyen la calidad de vida de los pacientes. Estos efectos incluyen problemas como el desarrollo de células malignas drogo-resistentes, biotransformación, bio-distribución inapropiada, poca eficiencia en la eliminación de la droga, incapacidad de direccionamiento de las drogas anti-cáncer a únicamente las células tumorales, entre otros. Es por ello que una terapia dirigida específicamente a las células que conforman el microambiente tumoral generaría un tratamiento más eficiente con un mejor pronóstico para los pacientes con cáncer de mama, a la vez que se podrían reducir los efectos adversos sistémicos asociados a las terapias actuales.

Así, modular el microambiente tumoral para incrementar la activación de poblaciones antitumorales, como macrófagos M1 y linfocitos Th1, y a la vez disminuir poblaciones pro-tumorales, como macrófagos M2 y linfocitos Th2, puede ser una alternativa de tratamiento dirigido que se asocie a un mejor pronóstico.

V. HIPÓTESIS

Los estímulos con los agonistas de TLR3 (Poly I:C) y TLR 2/6 (FSL-1) combinados con anti IL-10R α son capaces de polarizar macrófagos derivados de monocitos al fenotipo citotóxico M1 y con ello inhibir *in vitro* la proliferación de líneas de cáncer de mama.

VI. OBJETIVOS

A General

Evaluar *in vitro* el efecto de macrófagos estimulados con agonistas de TLR3, TLR 2/6 y anticuerpo anti IL-10R sobre la actividad tumoral de líneas celulares de cáncer de mama.

B Específicos

- 1 Estandarizar la línea celular monocítica, los estímulos y tiempo de estimulación para obtener *in vitro* macrófagos M1 y M2.
- 2 Obtener macrófagos M1 y M2 a partir de monocitos mediante la estimulación con IFN- γ /LPS e IL-4/IL-13, respectivamente.
- 3 Determinar los efectos de los estímulos con agonista TLR3 (Poly I:C) combinado con anti IL-10R α , TLR 2/4 (*Listeria monocytogenes* inactivada por calor) y TLR 2/6 (FSL-1) sobre la polarización de macrófagos.
- 4 Evaluar mediante la interacción célula-célula la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama co-cultivadas con macrófagos estimulados (Poly I:C/anti IL-10R, FSL-1 y FSL-1/anti IL-10R).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

El presente proyecto fue un diseño experimental no aleatorizado.

1. Líneas y cultivos celulares

Se utilizaron varias líneas celulares en el desarrollo del presente proyecto. Para la obtención de macrófagos se utilizaron células derivadas de leucemias monocíticas, las líneas celulares U937 y THP-1. Para los ensayos de actividad anti proliferativa se utilizó la línea celular T47-D derivada de un adenocarcinoma infiltrante de cáncer de mama, la cual se co-cultivó con macrófagos derivados de monocitos. Las líneas celulares fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (Caisson Labs) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, BioWest), 1-mM de piruvato de sodio, 0.1-mM L-glutamina, 100-U/mL penicilina y 100 ug/ml estreptomina. Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, a una confluencia de 1 a 3 millones de células (monocitos) o en su caso hasta formar una monocapa del 80-90% (T47D) o a distinta concentración en el desarrollo experimental.

B. METODOS

1. Diferenciación de monocitos a macrófagos

Para la obtención de macrófagos las líneas celulares monocíticas fueron diferenciadas utilizando forbol miristato acetato (PMA). En placas de 12 pozos se colocaron 0.5×10^6 células U937 ó THP-1 (por pozo) y fueron tratadas con 20 ng/mL de PMA durante 24 horas. Se determinaron cambios morfológicos por microscopía, los

cuales fueron documentados con una cámara fotográfica (ZEISS Axiocam ERc 5s). Posteriormente, se retiró el exceso de PMA mediante lavados con 1 mL de buffer de fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente y al final se agregó 1 mL de medio de cultivo fresco. Las células se mantuvieron en reposo durante 24 horas para eliminar el estímulo inducido por el PMA. Posteriormente, para la polarización de macrófagos M1 y M2 se probaron distintos estímulos que a continuación se mencionan.

2. Estímulos

En la polarización de macrófagos se emplearon estímulos reportados, que inducen cambios fenotípicos, moleculares y/o funcionales a las subpoblaciones M1 y M2, según reportes previos. Los macrófagos M1 fueron inducidos utilizando una combinación de IFN- γ a una concentración de 20 ng/ml, (BioLegend) y LPS a 10 ng/mL, (SIGMA). Mientras que los macrófagos M2 fueron inducidos utilizando IL-4 e IL-13 ambas a 20 ng/mL (BioLegend), durante 24 y 72 horas. (Jonjić et al., 1992; Martin et al., 2017; Martinez et al., 2013; Ruffell et al., 2012). Además, se probaron otros estímulos como inductores de la polarización a las subpoblaciones específicas como parte de esta propuesta, tal es el caso de los agonistas de receptores tipo Toll: TLR 3 (Poly I:C), TLR 2 (*Listeria monocytogenes* inactivada por calor: HKLM), TLR 4 (LPS proveniente de *E. Coli* K12), TLR 2/6 (FSL-1) (Invivogen) y el anticuerpo monoclonal anti subunidad α del receptor de IL-10 (anti- IL-10R α , BioLegend). Estos estímulos se emplearon a las siguientes concentraciones: a) la molécula Poly I:C en combinación con el anticuerpo monoclonal anti IL-10 R α , ambos en una concentración de 50 ng/mL, b) HKLM en una relación 1:50, bacterias:macrófagos en combinación con LPS (20 ng/ml) y c) FSL-1 a una concentración de 20 ng/ml. Los estímulos se mantuvieron 24 horas, y posteriormente los

sobrenadantes y/o las células fueron recolectadas y almacenadas para ensayos posteriores.

3. Determinación de la subpoblación de macrófagos

a. Amplificación de los genes *IRF4*, *IRF5*, *SOCS1*, *SOCS3*, *TNF- α* y *TGF- β* por la reacción en cadena de la polimerasa

Para determinar la subpoblación de macrófagos obtenida se analizó la expresión génica de las células. Para este propósito las células fueron lisadas y se extrajo RNA total mediante el método de TRIzol-Cloroformo (ThermoFisher Scientific) siguiendo la metodología de Rio et al. (2010). Esta metodología consiste en una serie de lavados y centrifugaciones a altas velocidades, lo cual permite separar las macromoléculas. Primeramente, las células se incubaron 5 minutos con 500 μ L de TRIzol a temperatura ambiente para ser lisadas, se homogeneizaron con pipeteo por 15 segundos. El material resultante fue recolectado en tubos cónicos de 2 mL y homogenizado en vortex por 15 segundos. Posteriormente, se agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó manualmente por 15 segundos y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos. Esto permitió obtener tres fases; una fase acuosa superior (contiene ADN y ARN), interfase (proteínas) y una fase orgánica (otros componentes celulares, como carbohidratos). Se recolectó cuidadosamente la fase acuosa, evitando recolectar la interfase o fase orgánica, y se purificó el ARN añadiendo 500 μ L de isopropanol, agitando con vortex por 10 segundos y se incubó por 3 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y descartó el sobrenadante. Después, se agregó 1 mL de etanol al 75%, se agitó con vortex

por 5 segundos, y centrifugó a 7,500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue decantado y se repitió el lavado con el etanol al 75%. Una vez realizado el segundo lavado con etanol, se decantó el sobrenadante y se dejó el tubo invertido sobre una toalla de papel absorbente por un máximo de 10 minutos, para que el etanol se volatilizara. Finalmente, el botón de RNA se resuspendió en agua libre de nucleasas para ser cuantificado en NanoDrop 2000 (Thermofisher Scientific) y analizar su integridad en geles de agarosa al 2%. Posteriormente, 1000 ng de RNA total fueron retrotranscritos (PCR-RT) utilizando el kit RevertAid Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermofisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA fue incubado a 65°C por 5 min con el primer Oligo (dT)₁₈ y a continuación se le añadió la enzima transcriptasa reversa, un inhibidor de Rnasa, y un buffer con los cofactores necesarios. La reacción se llevó a cabo en las siguientes condiciones de temperatura y tiempo: 42°C por 60 min y 70°C por 5 min. Posteriormente, utilizando 50 ng/μL del cDNA obtenido se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para amplificar los genes IRF4 e IRF5 usando el kit DreamTaq Green PCR Master Mix 2x (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación para dichos genes fueron como sigue: 94°C 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C (IRF4) y 58°C (IRF5) por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, finalmente un ciclo único de 72°C por 10 minutos. Tanto la PCR-RT y PCR convencional fueron llevadas a cabo en el equipo Proflex 3x32-Well PCR System (Thermofisher Scientific).

Para determinar el estado completo de polarización de macrófagos se analizó la expresión génica de SOCS1, SOCS3, TGF-β y TNF-α mediante PCR tiempo real (StepOne Real Time PCR System; Thermofisher Scientific), esto fue útil particularmente

cuando IRF4 e IRF5 se expresaban de manera conjunta. Para lo anterior, se utilizó el kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific). El análisis de expresión se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, brevemente, para cada estímulo se calculó el ΔCt (ΔCt del gen de interés - ΔCt del gen de referencia), posteriormente, el $\Delta\Delta Ct$ se calculó haciendo una resta del ΔCt de una muestra - ΔCt del estímulo basal (diferenciación con PMA), posteriormente este valor fue normalizado utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

La secuencia de los cebadores empleados se muestra en el Cuadro 5. La población de macrófagos M1 fue determinada por la expresión de IRF5, altos niveles de TNF- α y SOCS3, mientras que la población M2 fue determinada por la expresión de IRF4, y una alta expresión de SOCS1 y TGF- β . En ambos casos, los resultados se presentan respecto al estímulo inicial con PMA.

b. Determinación de marcadores de superficie por citometría de flujo

La determinación del fenotipo de las poblaciones M1 y M2 fue evaluada mediante la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo. Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos a las moléculas de superficie CD197 y CD206 ambos acoplados al fluorocromo 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BioLegend), CD163 y CD80 ambos acoplados al fluorocromo ficoeritrina (PE) (BioLegend) y CD14 acoplado al fluorocromo

Cuadro 5. Secuencias de los cebadores utilizados para la evaluación de la expresión génica por PCR punto final y tiempo real.

Cebadores	Secuencia	Tamaño del gen (pb)
HPRT <i>Fwd</i>	5' CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT GAT 3'	181
HPRT <i>Rvs</i>	5' CGA GCA AGA CGT TCA GTC CTG TC 3'	
IRF-4 <i>Fwd</i>	5' AGC GTC CAA TTG ACT GCC C 3'	647
IRF-4 <i>Rvs</i>	5' TGT CCC ATC CAA GAG TAG CG 3'	
IRF-5 <i>Fwd</i>	5' CTG TCT CTG GTC TGG TCA GC 3'	564
IRF-5 <i>Rvs</i>	5' GCC AGC CAG GTG AGT GTT TA 3'	
IL-10 <i>Fwd</i>	5' GAT GCC TTC AGC AGA GTG AA 3'	105
IL-10 <i>Rvs</i>	5' GCA ACC CAG GTA ACC CTT AAA 3'	
TNF- α <i>Fwd</i>	5' GAC AAG CCT GTA GCC CAT GT 3'	123
TNF- α <i>Rvs</i>	5' TCT CAG CTC CAC GCC ATT 3'	
TGF- β <i>Fwd</i>	5' TGA CCC CCT AGC AAC GTA GT 3'	78
TGF- β <i>Rvs</i>	5' GCC CAA GGG ATG TAA ACT TG 3'	
SOCS1 <i>Fwd</i>	5' CAC GCA CTT CCG CAC ATT CC 3'	300
SOCS1 <i>Rvs</i>	5' TCC AGC AGC TCG AAG AGG CA 3'	
SOCS3 <i>Fwd</i>	5' ACA ATC TGC CTC AAT CAC TCT G 3'	129
SOCS3 <i>Rvs</i>	5' TTG ACT TGG ATT GGG ATT TTG 3'	

Fwd: forward; Rvs: reverse; pb: pares de bases

allofocianina (APC) (BD Bioscience). Todos los anticuerpos fueron empleados a una concentración de 1 ug/mL. La determinación de las poblaciones positivas a cada una de las moléculas se realizó mediante la siguiente técnica de tinción: posterior al estímulo las células fueron colectadas y centrifugadas a 1700 rpm durante 5 minutos, el botón celular obtenido fue bloqueado utilizando PBS/SFB 50%, se hicieron dos lavados agregando 2 ml de PBS y centrifugando a 1200 rpm por 5 minutos, decantando el sobrenadante y se resuspendiendo las células en 50 µL de PBS. Posteriormente el botón celular se dividió en varios tubos de 1.5 mL, uno por cada anticuerpo que se probó. Se agregaron 5 µg de cada anticuerpo por separado y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Consecutivamente, se eliminó el exceso de anticuerpo con 2 lavados con PBS (como se mencionó anteriormente). Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% hasta su lectura. Para la lectura de fluorescencia se utilizó un citómetro de flujo FACS Canto II y el software de análisis FACS DIVA. Las células fueron consideradas macrófagos del fenotipo M1 si eran CD14⁻ CD197^{+ /high} CD80^{+ /high} CD163^{- /low} CD206^{- /low}, mientras que si presentaban un fenotipo CD14⁻ CD197^{- /low} CD80^{- /low} CD163^{+ /high} CD206^{+ /high} fueron clasificados como macrófagos M2.

c. Evaluación de citocinas y quimiocinas por ELISA

Para complementar el fenotipo de las células se evaluó la función de secreción de citocinas en los macrófagos estimulados. Se evaluaron los niveles de proteína de IP-10 (CXCL10), quimiocina característica de los macrófagos con fenotipo M1, e IL-10 citocina altamente secretada por macrófagos M2 con ensayos de ELISA (BioLegend), siguiendo las especificaciones del fabricante como se explica a continuación. Un día antes de realizar el ensayo ELISA, el anticuerpo de captura fue diluido de 200x a 1x, se añadieron

100 μ L de la solución del anticuerpo de captura a cada pocillo, la placa se cubrió y se incubó toda la noche a 4°C. Después, la placa fue lavada 4 veces con 250 μ l de PBS/0.05%TWEEN-20, agitando ligeramente y descartando la solución de lavado con un movimiento firme (la solución de lavado restante fue retirada golpeando ligeramente la placa bocabajo sobre una toalla de papel absorbente, todos los lavados se realizaron de la misma manera), Enseguida, los pocillos fueron bloqueados con 200 μ l del reactivo proporcionado por el kit (Assay diluent A 1X), incubándose por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante a 500 rpm con una órbita circular de 0.3 cm (las siguientes incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones). Mientras se bloqueaba la placa, se realizaron las diluciones seriadas 1:1 para la curva de valores conocidos, partiendo de 1,000 pg/ml hasta 15.6 pg/ml en el caso de IP-10 y de 250 pg/ml a 3.9 pg/ml con IL-10. Finalizado el tiempo de incubación se realizaron 4 lavados (descritos anteriormente), y posteriormente se añadieron las muestras; en el caso de la medición de IP-10 se utilizó una dilución 1:1, mientras que en la evaluación de IL-10 se colocó la muestra sin diluir, en ambos casos un volumen final fue de 100 μ L. Las muestras fueron incubadas por 2 horas, y después de nueva cuenta se realizaron 4 lavados. Luego, se incubó el anticuerpo de detección (volumen de 100 μ L, a una concentración 1X) por 1 hora, y el exceso fue retirado realizando 4 lavados. Posteriormente, 100 μ l de solución avidina-HRP fueron añadidos a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Una vez realizada la incubación se realizaron 5 lavados de 30 segundos cada uno. Finalmente, se añadieron 100 μ L de TMB y se incubó en oscuridad por 15 minutos en el caso de IP-10 y 25 minutos para IL-10.

La reacción fue detenida con 2N H₂SO₄ y la absorbancia evaluada a las longitudes de onda de 570 nm y 450 nm.

4. Co-cultivo de macrófagos con la línea celular de cáncer de mama T47D

Se realizó un co-cultivo de los macrófagos estimulados para determinar el efecto de estos y sus productos sobre las células tumorales. En primer lugar, se diferenciaron los monocitos a macrófagos utilizando únicamente la línea celular U-937, según las indicaciones descritas anteriormente. Los macrófagos se estimularon con Poly I:C/anti IL-10 R α , FSL-1 y FSL-1/anti IL-10 R α , a las concentraciones descritas anteriormente. Se utilizaron como controles de polarización de macrófagos los estímulos con IFN- γ /LPS, para la subpoblación M1, e IL-4/IL-13 para la subpoblación M2. Además, se utilizaron macrófagos diferenciados sin estímulo de polarización y células de cáncer sin macrófagos como controles de efectos anti proliferativos.

El co-cultivo de macrófagos y células tumorales se realizó en una relación 5:1, 7,500 células de cáncer de mama y 1500 macrófagos estimulados. Las células estuvieron en contacto directo en placas de 24 pozos y fueron incubadas durante 3 días. Al co-cultivo se le evaluó la actividad anti-proliferativa por el ensayo de MTT.

a. Actividad anti-proliferativa

Las células tumorales son capaces de proliferar de manera descontrolada debido a la desregularización de la proliferación celular. Es de gran importancia determinar si esta proliferación es inhibida por el contacto con macrófagos estimulados y sus productos solubles.

Para evaluar la proliferación se realizaron ensayos MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) al día 3 del co-cultivo. La capacidad para reducir al (MTT) constituye un indicador de integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de viabilidad celular. Para hacer las determinaciones de MTT se retiró el sobrenadante del co-cultivo (macrófagos: líneas celulares de cáncer) y se añadieron 225 μ l de medio de cultivo suplementado al 6% con SFB y adicionado con 25 μ l MTT (5 mg/ml), la placa se mantuvo en incubación 45 minutos a 37°C. Finalmente, se agregaron a cada pozo 250 μ l de isopropanol acídico y se homogenizó por pipeteo cada uno de los pozos para disolver los cristales. La densidad óptica (D.O.) se midió a 560 nm con previa agitación en el equipo Varioskan™ LUX (Thermo Scientific). Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al control de células de cáncer sin macrófagos, y al co-cultivo de células de cáncer con macrófagos sin estímulo.

5. Análisis Estadísticos

Los resultados fueron reportados como el promedio de los valores obtenidos en los ensayos realizados por duplicado o triplicado y se calcularon las desviaciones estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. En caso de presentarse diferencias estadísticamente significativas se realizó la prueba de comparación múltiple post hoc Kruskal-Wallis. Lo anterior, utilizando el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

VIII. RESULTADOS

1. Condiciones de diferenciación y polarización de macrófagos.

2. Evaluación de la diferenciación morfológica de monocitos a macrófagos

En el cumplimiento de los objetivos del trabajo, primeramente se estandarizaron las condiciones de diferenciación de monocitos a macrófagos con las dos líneas celulares monocíticas con las que se contaba THP-1 y U937. En cultivo, los monocitos THP-1 se caracterizan por ser células no adherentes, con morfología redondeada y formar racimos celulares. Por su parte, los monocitos U937 también son células no adherentes, redondeadas, sin formación de racimos. Para la diferenciación de monocitos a macrófagos de ambas líneas celulares se utilizó PMA a una concentración de 20 ng/mL durante 24 horas. Posterior al estímulo, más del 95% de las células, tanto THP-1 como U937, se diferenciaron exitosamente. Lo anterior fue determinado por su adherencia a la placa, el aumento del volumen citoplasmático (Ferreira Jr et al., 1991; Lund et al., 2016) y cambio de morfología, observándose tres tipos de morfologías celulares características: redondeadas, en forma de huso y con dendritas aunque la mayoría de los macrófagos conservaba una morfología redondeada (Figuras 3 y 4). Posterior al estímulo con PMA, las células se dejaron en reposo durante 24 horas, conservando su adherencia al plástico, morfología y con una viabilidad mayor al 95%.

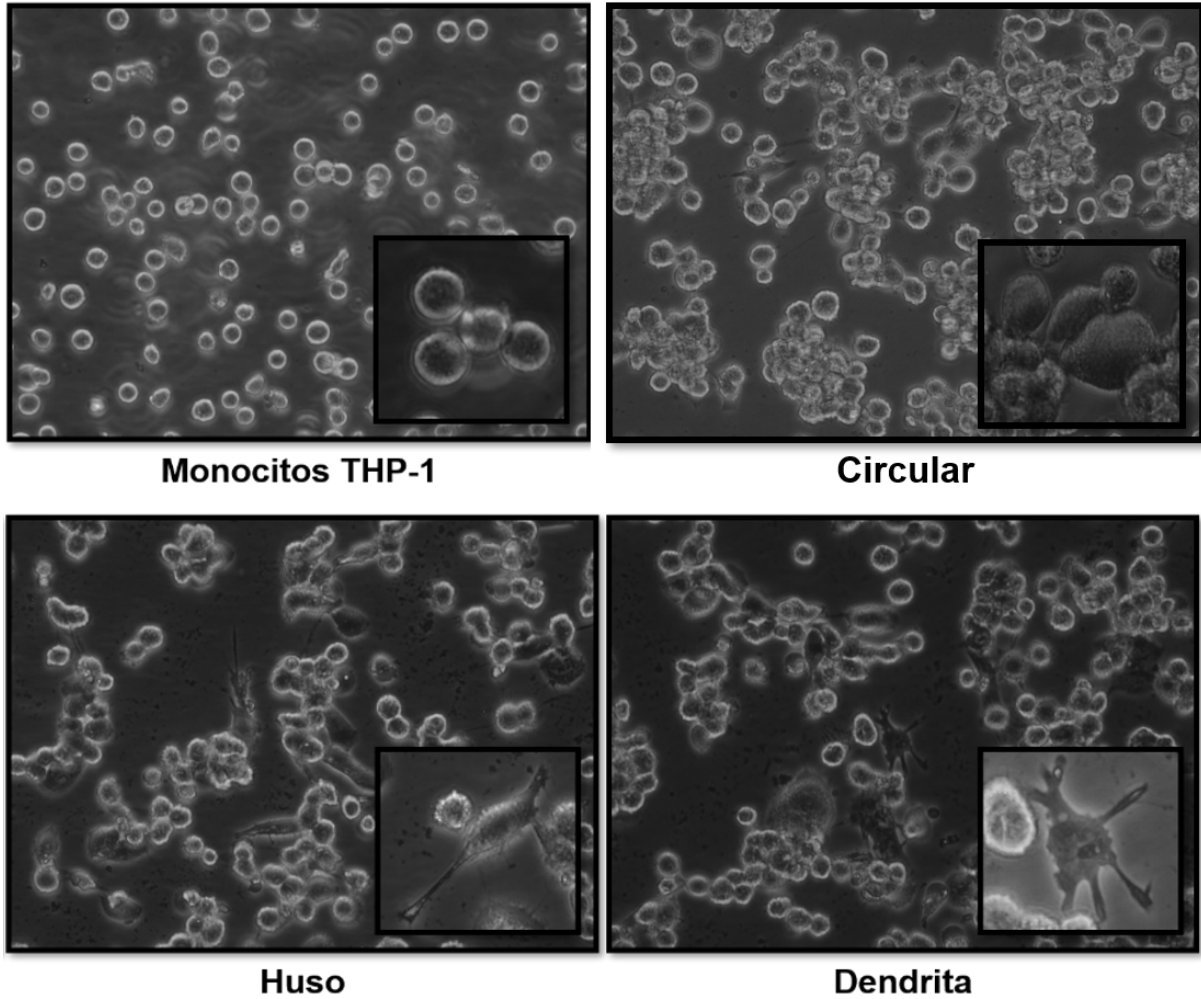


Figura 3. Morfología de monocitos y macrófagos THP-1 diferenciados con PMA y observados a 20X y 40X.

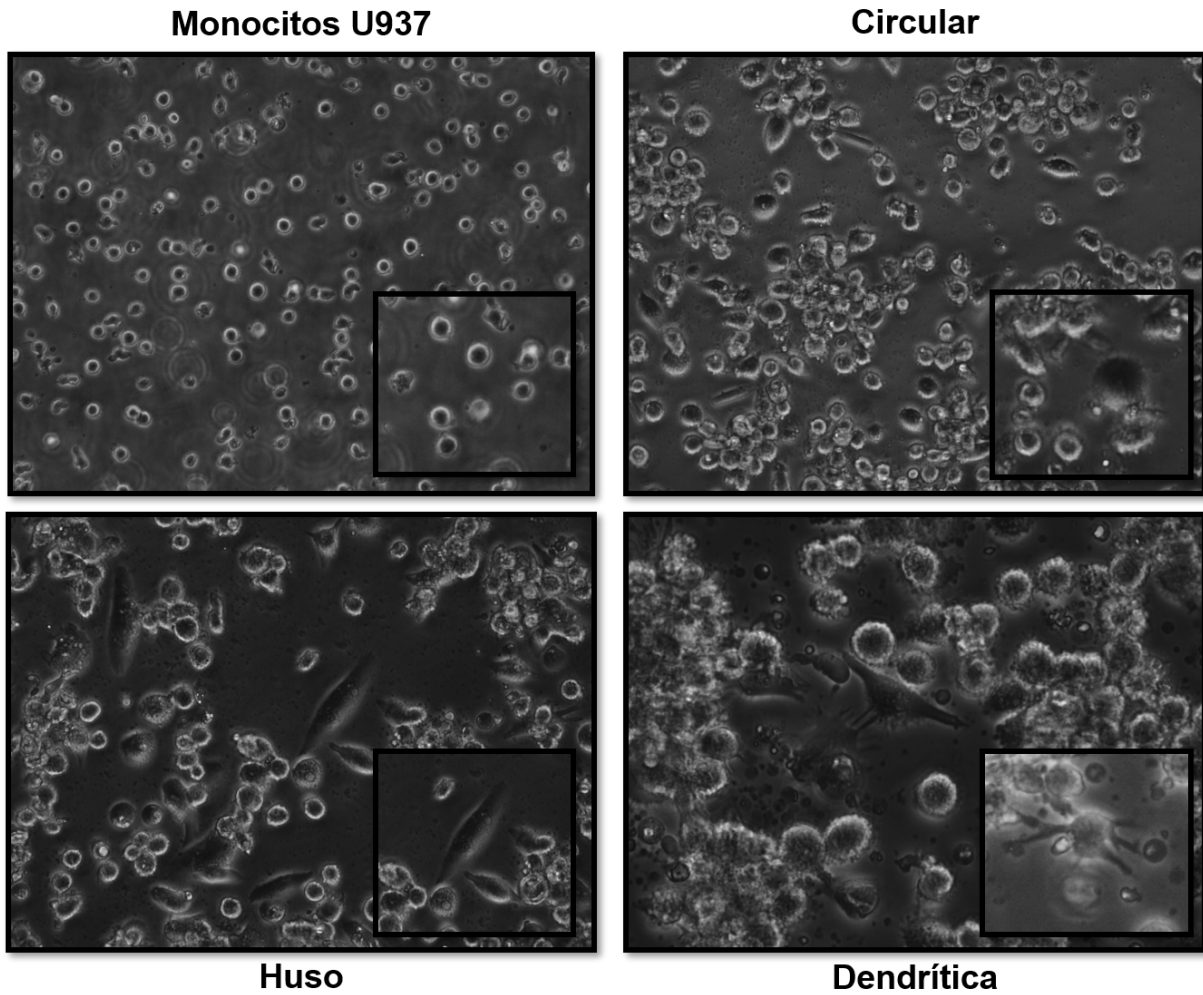


Figura 4. Morfología de monocitos y macrófagos U937 diferenciados con PMA y observados a 20X y 40X

3. Estandarización de la polarización de macrófagos THP-1 estimulados con LPS e IL-4

4. Expresión génica de los factores reguladores de interferón (IRFs) 4 y 5.

Con la finalidad de definir si los macrófagos diferenciados podrían ser polarizados a ambas subpoblaciones M1 y M2, estas células fueron sometidas a los estímulos con LPS o IL-4, para la polarización a las subpoblaciones M1 y M2, respectivamente. La determinación de las subpoblaciones fue realizada utilizando parámetros moleculares, principalmente.

Después de estimular a las células diferenciadas con LPS o IL-4 durante 24 horas, se evaluó la expresión génica de IRF4 y 5, característicos de las subpoblaciones M2 y M1, respectivamente. Los macrófagos diferenciados sin estímulo expresaron *IRF4* y *5*. La estimulación de macrófagos con LPS indujo una banda intensa del producto de *IRF5* y una banda tenue pero definida de *IRF4*. Contrariamente, bajo el estímulo con IL-4 se indujo una banda correspondiente a *IRF4* de mayor intensidad que la de *IRF5*. Con base en los resultados de la expresión de IRF4 e IRF5, la sola diferenciación con PMA pareciera producir mayoritariamente macrófagos M1 ya que la intensidad de la banda correspondiente a IRF5 es mucha más intensa que la correspondiente a IRF4 (M2). La banda tenue de IRF4 puede deberse a una expresión basal de este gen (Krausgruber, 2011). Aun así, la expresión de estos genes se ve afectada por los estímulos que se utilicen posterior a la diferenciación a macrófagos y son de utilidad para polarizar a una respuesta M1 o M2. Así, la estimulación con LPS induce un aumento en la población M1 mientras que el estímulo con IL-4 induce un aumento en la población M2. En general, los

resultados indican que los macrófagos diferenciados con PMA son capaces de ser polarizados a subpoblaciones M1 o M2 con los estímulos adecuados (Figura 5).

Para complementar la evaluación génica de algunos transcritos que son de ayuda en la definición de subpoblaciones de macrófagos, se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de *SOCS1*, *SOCS3*, *TNF- α* y *TGF- β* . La expresión de estas moléculas esta descrita en número de veces respecto a macrófagos diferenciados/sin estímulo (solo PMA). La expresión de *SOCS1* fue muy variable entre experimentos aunque fue mayor tras la estimulación con LPS ($p < 0.05$). La expresión de *SOCS3* en macrófagos fue mayor tras el estímulo con LPS que con IL-4, 0.78 ± 0.099 y 0.295 ± 0.092 , respectivamente ($p > 0.05$). Esto es congruente con el hecho de que *SOCS3* se relaciona con poblaciones M1. Un comportamiento similar fue observado en la expresión de *TNF- α* (citocina característica de poblaciones M1) donde LPS aumentó su expresión 1.565 ± 0.049 veces con respecto al estímulo con PMA, mientras que el estímulo con IL-4 solo 1.285 ± 0.15 veces, ($p > 0.05$). Sin embargo, LPS también sobreexpresó *TGF- β* (2.53 ± 0.71 veces más), el cual ha sido considerado un marcador de macrófagos M2 (Figura 6, $p > 0.05$ con respecto a IL-4).

Integrando estos resultados, el estímulo con LPS activa genes relacionados al desarrollo de un fenotipo M1, como *IRF-5*, *SOCS3* y *TNF- α* , mientras que la población de macrófagos M2 aumenta bajo el estímulo con IL-4 (*IRF4* aumentado y baja expresión de *SOCS3* y *TNF- α*) aunque la expresión de *TGF- β* fue moderada.

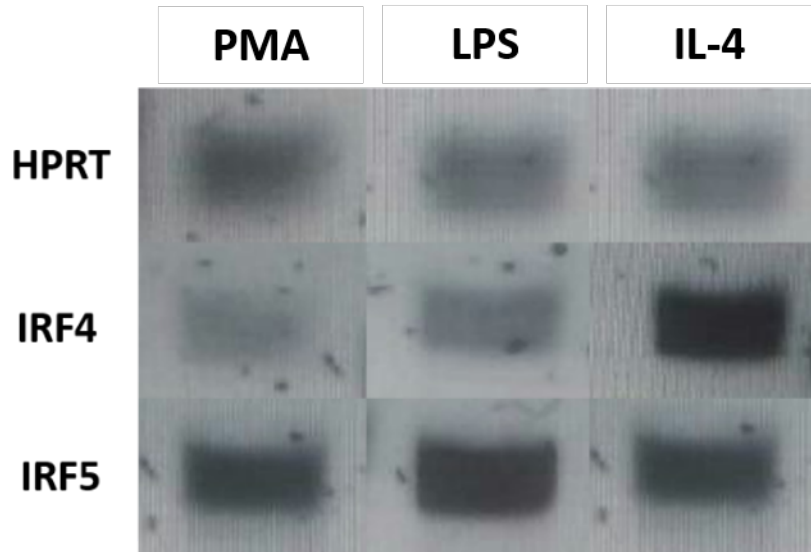


Figura 5. Expresión de *IRFs* en macrófagos THP-1 estimulados con PMA, LPS e IL-4.
HPRT: gen endógeno (constitutivo).

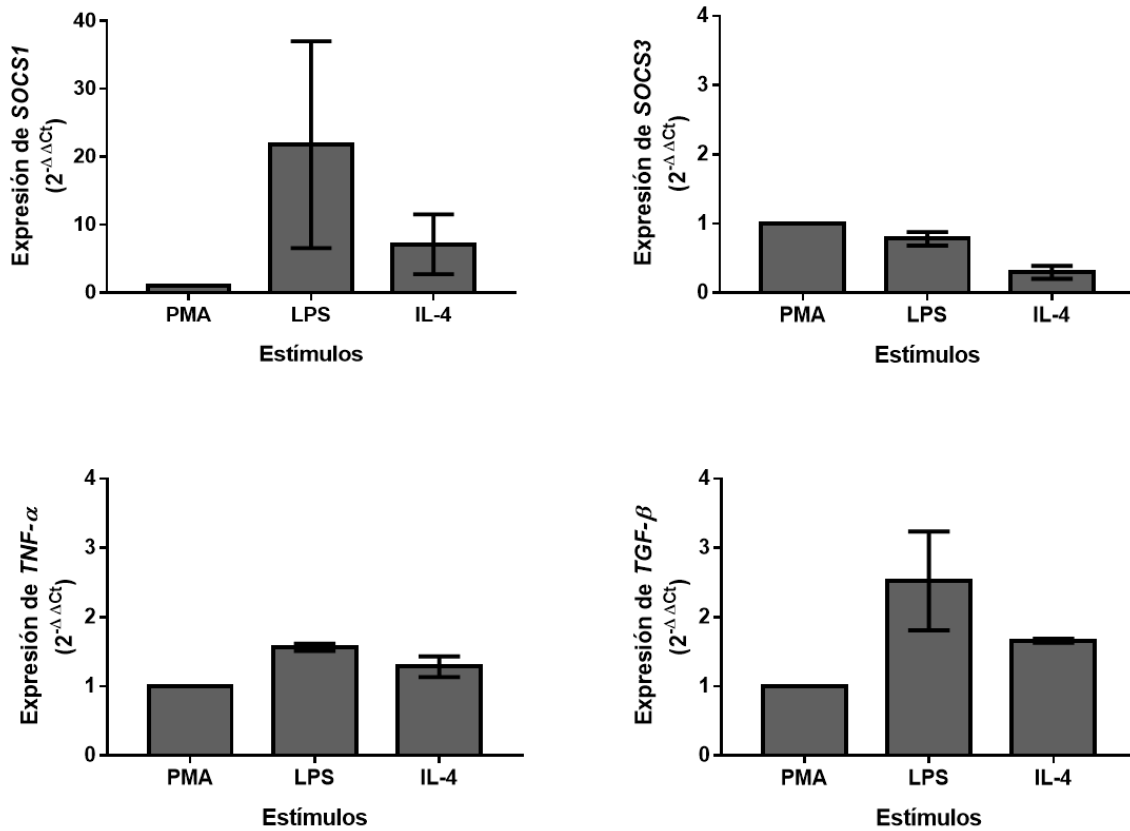


Figura 6. Expresión de marcadores en macrófagos THP-1 estiumulados con LPS e IL-4. a) expresión de *SOCS1*, b) expresión de *SOCS3*, c) expresión de *TNF- α* , d) expresión de *TGF- β* . LPS tiende a inducir una mayor expresión de *SOCS3* y *TNF- α* que IL-4 ($p > 0.05$).

De las moléculas anteriormente evaluados, la expresión de *SOCS3* y *TNF- α* fueron los mejores indicadores para diferenciar la población M1 y M2, lo cual coincide con reportes previos.

5. Expresión de proteínas (IL-10 y CXCL10) por macrófagos THP-1 estimulados con LPS e IL-4

Para complementar la evaluación del proceso de polarización de macrófagos bajo el estímulo con LPS e IL-4, se evaluó la secreción de IL-10 y la quimiocina CXCL10 (Figura 7). La producción de IL-10 (característica de la subpoblación M2) por macrófagos THP-1 únicamente diferenciados con PMA fue casi nula ($0.66 \text{ pg/mL} \pm 0.54$), pero al ser estimulados con LPS la concentración de IL-10 estuvo por debajo del límite de detección del ELISA utilizado para la cuantificación de esta interleucina (Figura 7a). Contrariamente, los macrófagos estimulados con IL-4 produjeron una concentración de $4.73 \text{ pg/mL} \pm 1.71$ ($p > 0.05$) (Figura 7a). Cabe mencionar que existió una alta variabilidad entre los resultados de esta citocina. Por otro lado, para los niveles de la quimiocina CXCL10 o IP-10, la estimulación con LPS indujo concentraciones mayores que el estímulo con IL-4 ($2019 \text{ pg/mL} \pm 573.5$ y $859 \text{ pg/mL} \pm 375.5$, respectivamente, $p > 0.05$) (Figura 7b). El estímulo inicial de diferenciación con PMA también indujo la producción

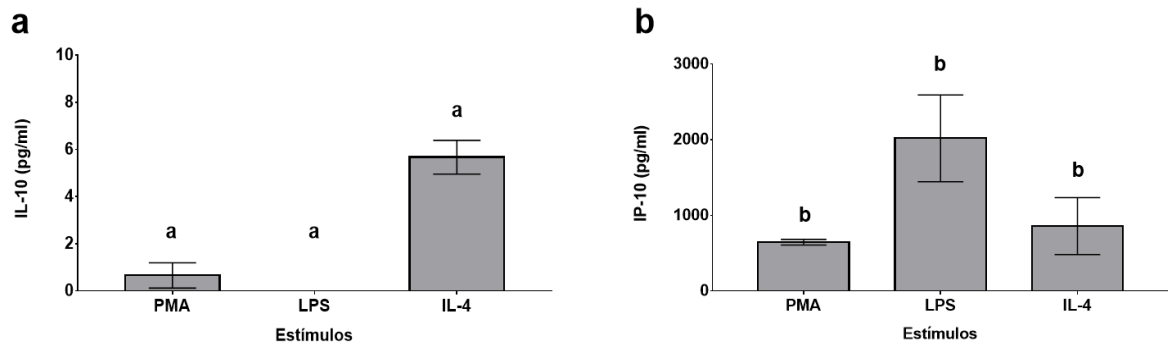


Figura 7. Concentración de IL-10 (a) e IP-10 (b) en macrófagos THP-1 estimulados con LPS e IL-4 utilizando como control de diferenciación PMA. El estímulo con IL-4 indujo una mayor expresión de IL-10 ($p < 0.05$) (a), mientras que LPS aumentó las concentraciones de IP-10 ($p > 0.05$) (b).

de esta quimiocina en niveles similares a los del estímulo con IL-4 (646.3 pg/mL \pm 36.77 vs 859 pg/mL \pm 375.5, respectivamente, $p > 0.05$) (Figura 7b).

Con los resultados obtenidos en las evaluaciones génicas y proteicas se consideró a *SOCS3*, *IRF-5*, altos niveles de CXCL-10 y bajos de IL-10 como marcadores que definen el fenotipo M1. Los macrófagos M2 fueron definidos con base en la expresión de IRF4, baja expresión de *SOCS3* y altos niveles de IL-10 y bajos de IP-10. El resto de los marcadores fueron considerados para establecer un perfil completo de los macrófagos estimulados, pero no contribuyen a definir de manera clara las poblaciones M1 o M2.

6. Polarización de macrófagos derivados de monocitos THP-1 y U937

El análisis de resultados de macrófagos estimulados con LPS e IL-4 muestra una polarización de macrófagos a poblaciones heterogéneas de M1 y M2 utilizando la línea THP-1. Por lo anterior y para generar poblaciones más homogéneas de macrófagos M1 y M2, al estímulo con LPS se le agregó IFN- γ , y al estímulo con IL-4 se adicionó IL-13, respectivamente (Genin, Clement, Fattaccioli, Raes, & Michiels, 2015). Estos estímulos fueron probados en ambas líneas celulares a 24 y 72 horas de estimulación. Posteriormente, se evaluó la polarización de macrófagos mediante los niveles de IL-10 y moléculas superficie por citometría de flujo.

Al evaluar los niveles de IL-10, se observó que los macrófagos diferenciados a partir de las células U937 produjeron una mayor concentración de IL-10 que aquellos obtenidos con células THP-1 ($p < 0.05$), tanto a las 24 como a las 72 horas de estimulación con IFN- γ /LPS (M1) e IL-4/IL-13 (M2) (Figuras 8 a y b). Al analizar el efecto del estímulo por 24 horas sobre la polarización de macrófagos observamos que las células U937

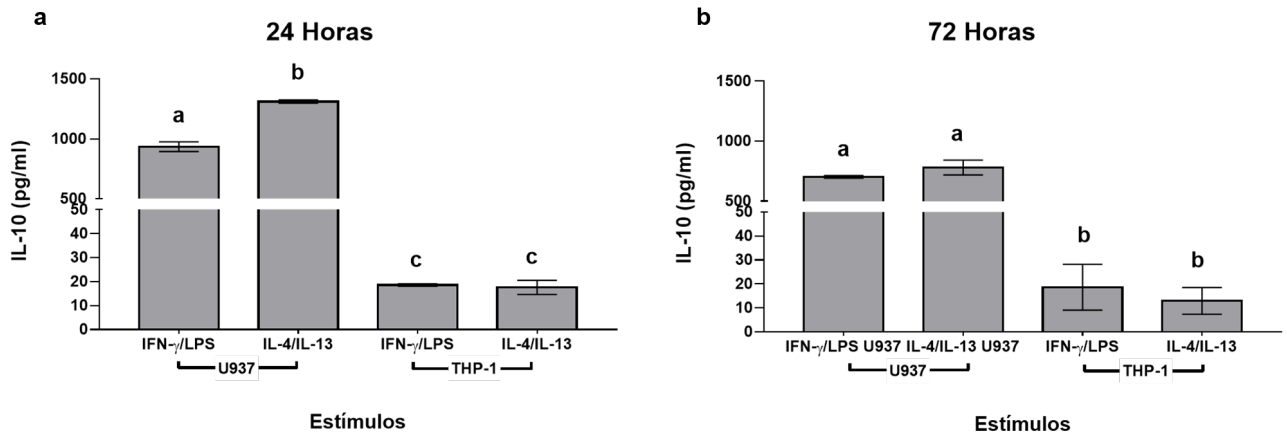


Figura 8. Secreción de IL-10 por macrófagos U937 y THP-1 después de 24 (a) y 72 (b) horas de estimulación.

estimuladas con IL-4/IL-13 producen una mayor concentración de IL-10 que aquellas bajo el estímulo con IFN- γ /LPS, $1311 \text{ pg/mL} \pm 14.25$ vs $935 \text{ pg/mL} \pm 40.06$, respectivamente; ($p < 0.05$). Mientras que para las células THP-1 la secreción de la citocina fue muy similar entre estímulos, $18.56 \pm 0.52 \text{ pg/mL}$ con IFN- γ /LPS y 17.58 ± 2.96 para IL-4/IL-13 ($p > 0.05$). A las 72 horas se observó la misma tendencia en ambas líneas celulares. (Figuras 8 a y b).

De manera complementaria se evaluó la expresión de moléculas de superficie CD197, CD80 y CD206 buscando encontrar diferencias que nos permitieran determinar la mejor condición de estimulación para inducir poblaciones de macrófagos M1 y M2. Los resultados que se muestran son la media de un experimento evaluado por duplicado. Las poblaciones M1 expresan las moléculas CD197 y CD80, mientras que las poblaciones M2 muestran en su superficie mayores niveles de la molécula CD206. Las células U937 mostraron una mayor expresión de CD197 al ser estimuladas con IFN- γ /LPS a las 24 y 48 horas, mientras que el estímulo con IL-4/IL-13 indujo mayor expresión de CD206 solo a las 24 horas. En esta línea celular la expresión de CD80 fue mayor al 90% en todos los estímulos. Por su parte, la línea celular THP-1 mostró una alta expresión de la molécula CD197 desde las 24 horas (mayor al 90%) para ambos estímulos IFN- γ /LPS e IL-4/IL-13. Dicha expresión bajó a 73.4 % y 65.5% a las 72 horas, respectivamente. La alta expresión de esta molécula podría deberse al estímulo inicial con PMA que induce una polarización a macrófagos M1 en esta línea celular. Por otro lado, la molécula CD80 se mantiene baja sin mostrar diferencias entre estímulos. Mientras que la expresión de la

Cuadro 6. Expresión de los diferentes cluster de diferenciación (CD) en células U937 y THP-1 estimuladas durante 24 horas y 72 horas con IFN- γ /LPS o IL-4/IL-13.

		U937				THP-1			
		24 horas		72 horas		24 horas		72 horas	
		IFN- γ / LPS	IL-4/ IL-13	IFN- γ / LPS	IL-4/ IL-13	IFN- γ / LPS	IL-4/ IL-13	IFN- γ / LPS	IL-4/ IL-13
M1	CD197⁺ (%)	46	34.3	52	44.3	94.5	91.3	73.4	65.5
	CD80⁺ (%)	90.3	93.2	99	99.6	1.7	2.3	39.7	34.1
M2	CD206⁺ (%)	2.5	4.1	5.1	2.8	34.2	28.5	5.6	3.4

molécula CD206 fue mayor para el estímulo con IFN- γ /LPS respecto a IL-4/IL-13 a las 24 y 48 horas. En general, la población CD14⁺ se mantuvo entre 1-2% (resultados no mostrados), por lo tanto, se puede decir que la estimulación con PMA logró diferenciar a los monocitos a macrófagos (Daigneault, Preston, Marriott, Whyte, & Dockrell, 2010). Los resultados de expresión de marcadores de superficie y secreción de IL-10 nos ayudaron a definir las condiciones de polarización de macrófagos para el desarrollo de las siguientes etapas experimentales. La línea celular con mayor efectividad para evaluar el proceso de polarización fue la U937 a las 24 horas de estimulación utilizando como controles de polarización la combinación de IFN- γ /LPS para la subpoblación M1 (control M1) e IL-4/IL-13 para la polarización a la subpoblación M2 (control M2). Lo anterior podría explicarse por la diferencia en IL-10, citocina efectora de macrófagos y que diferencia M1 de M2.

7. Efecto de agonistas de TLRs sobre la polarización de macrófagos U937

8. La maduración de monocitos U937 a macrófagos mediante estimulación con PMA genera macrófagos con diferentes morfologías.

A pesar de que la morfología no es indicativa de la polarización, lo es para la diferenciación y es importante monitorearla con los estímulos analizados en el presente trabajo para reconocer similitudes y diferencias respecto a los controles de polarización M1 (IFN- γ /LPS) y M2 (IL-4/IL-13). De acuerdo con Vogel et al., (2014) los macrófagos diferenciados se observan con forma redondeada y de huso. Adicionalmente, nosotros

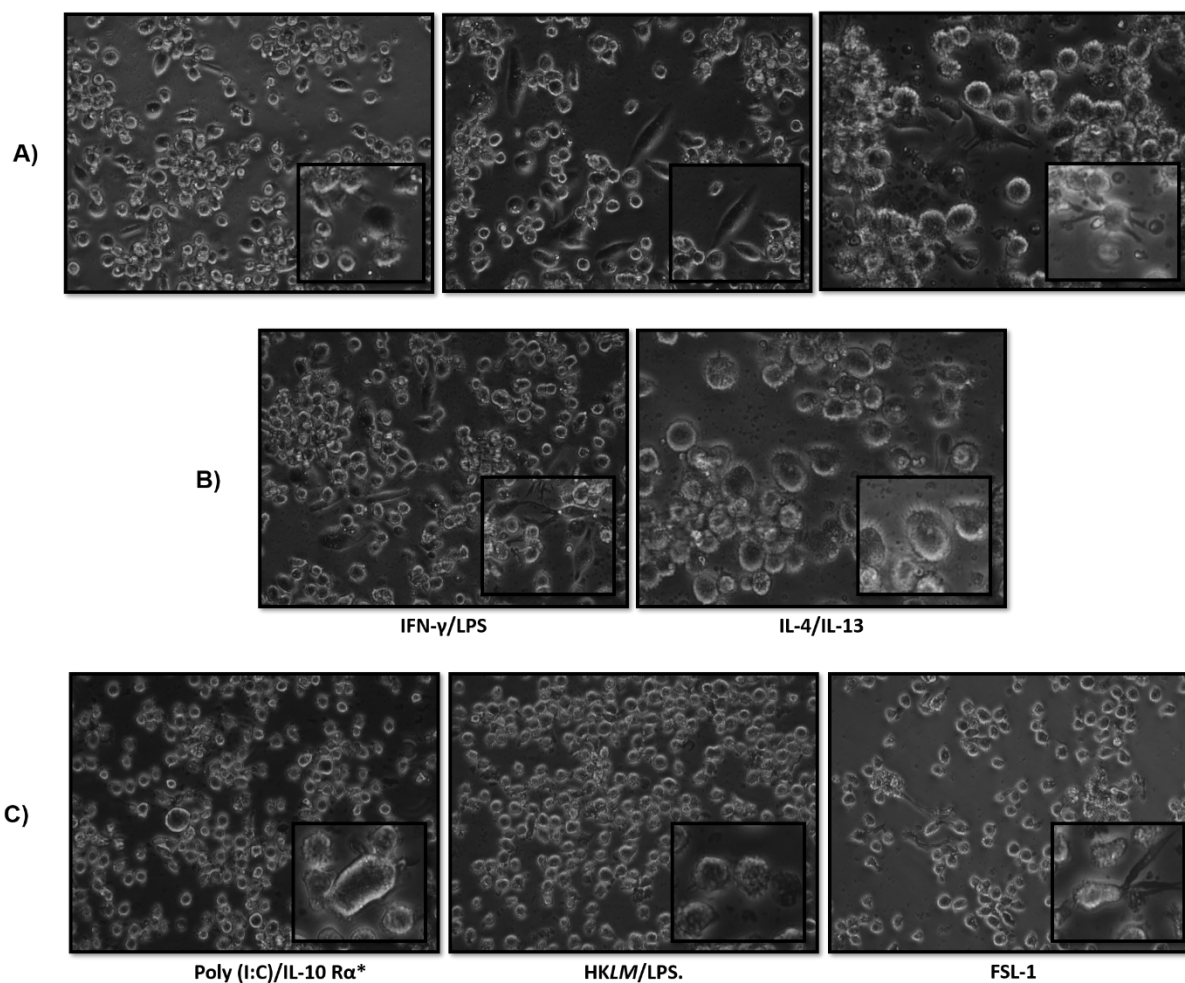


Figura 9. Morfología de macrófagos U937 estimulados con los controles de polarización M1 (IFN- γ /LPS) y M2 (IL-4/L-13). Observados a 20X y 40X. A) Macrófagos diferenciados con PMA. B) Macrófagos estimulados con el control de polarización de macrófagos M1 (IFN- γ /LPS) y M2 (IL-4/L-13). C) Principales características de macrófagos estimulados con agonistas de TLRs; Poly (I:C) (TLR3), HKLM (TLR2), LPS (TLR4) y FSL-1 (TLR 2/6).

encontramos células con morfología dendrítica aunque la mayoría de los macrófagos conservaron una forma redondeada (Figure 9A) (Vogel et al., 2014).

Posterior a la estimulación con los controles de polarización M1, M2 y los agonistas de TLRs, se documentó la morfología de los macrófagos. Las células estimuladas con el control de polarización M1 (IFN- γ /LPS) (además de mostrar células con forma redondeada); una gran cantidad de macrófagos (aproximadamente el 40%) presentó morfología de huso, distinto a los macrófagos estimulados con el control de polarización M2 (IL-4/IL-13), los cuales mantenían la forma redondeada y otros presentaban una gran cantidad de pequeñas proyecciones (Figura 9B). Por su parte, la estimulación con Poly I:C/anti IL-10 R α mantuvo la forma redonda de las células, pero con un incremento de tamaño considerable. Los macrófagos estimulados con HKLM/LPS presentaron la misma forma del estímulo inicial pero con una gran cantidad de gránulos intracelulares. El estímulo con FSL-1 mantuvo la misma morfología después de la diferenciación, pero con presencia de proyecciones de conexión entre células (Figura 9C).

9. La estimulación con INF- γ /LPS suprime la expresión de *IRF4* e induce una mayor expresión de *SOCS3*

Se analizó la expresión de los factores de transcripción *IRF-4*, *IRF-5* y *SOCS3* como parte del análisis de polarización de los agonistas de TLR y los controles de polarización. Los resultados mostraron que *IRF4* se expresa en todos los estímulos excepto en el estímulo con INF- γ /LPS. Por su parte, *IRF5* se expresó bajo todas las condiciones de estimulación probablemente debido a que los macrófagos lo expresan de

manera constitutiva o es un vestigio de la estimulación de diferenciación con PMA, donde se observó una banda de amplificación intensa (Figura 10A).

Es importante destacar que la intensidad de las bandas obtenidas como producto de PCR varió entre estímulos, lo que indica que algunos estímulos incrementan la expresión de IRF5, tal es el caso de FSL-1, muy similar a los macrófagos sin estímulo posterior al PMA (Figure 10A). El análisis de expresión de SOCS3 mostró que el estímulo con INF- γ /LPS indujo la máxima expresión (3.01 ± 0.58 veces más con respecto al control de diferenciación con PMA), la cual fue significativamente mayor ($p > 0.05$) que la promovida por los estímulos IL-4/IL-13 y agonistas de TLRs Poly I:C/IL-10R α , HKLM/LPS y FSL-1 ($p < 0.05$, en todos los casos). El estímulo con HKLM/LPS aumentó ligeramente la expresión respecto al control de diferenciación (PMA) (1.72 ± 0.08 veces) ($p > 0.05$). Mientras que FSL-1 mantuvo la expresión como el control, 0.98 ± 0.29 ; ($p > 0.05$). Cabe destacar que los niveles de expresión más bajos de SOCS3 fueron inducidos por los estímulos con IL-4/IL-13 y Poly I:C/anti IL-10 R α (0.37 ± 0.09 y 0.38 ± 0.22 , respectivamente), siendo significativamente menores respecto al control M1 (INF- γ /LPS) y HKLM/LPS (Figure 10B).

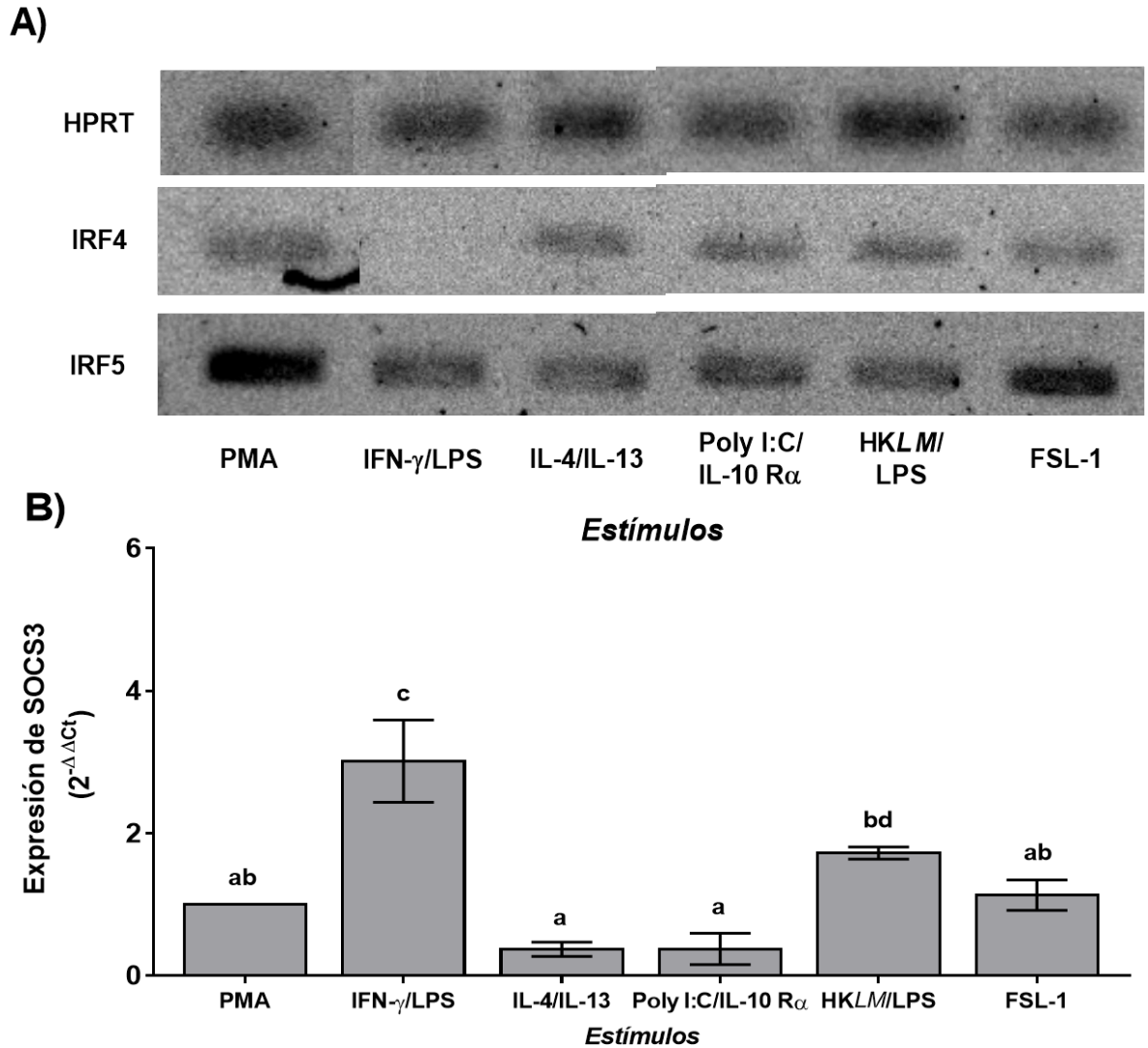


Figura 10. Expresión génica de macrófagos U937 expuestos a diferentes estímulos. A) Expresión de *IRFs*. *IRF4*: subpoblación M2. *IRF5*: subpoblación M1. *HPRT*: gen endógeno. B) Expresión de *SOCS3*. El estímulo con IFN- γ /LPS incrementó la expresión de *SOCS3* ($p < 0.01$). Macrófagos estimulados con Poly I:C/anti IL-10 R α expresaron *SOCS3* similar a macrófagos estimulados con IL-4/-IL-13, en cambio el estímulo con HKLM/LPS y FSL-1 incrementó la expresión (HKLM/LPS; $p < 0.05$). Letras diferentes: $p < 0.05$.

La expresión de los genes *SOCS1*, *TGF- β* , *IL-6* e *IL-12* fue evaluada. Los resultados mostraron tendencias muy interesantes, acordes con los resultados de *SOCS3*, *IRF4* e *IRF5*. Una sobreexpresión de *SOCS1* y *TGF- β* han sido asociados con macrófagos M2. Una sobreexpresión de *SOCS1* y *TGF- β* han sido asociados con macrófagos M2. En el caso de *SOCS1*, los macrófagos estimulados con IL-4/IL-3 mostraron un aumento significativo en la expresión (3.48 ± 0.88) a diferencia de los estimulados con Poly I:C/anti IL-10 R α y FSL-1 (0.59 ± 0.33 y 0.29 ± 0.04 , respectivamente, $p < 0.05$, Figura 11a). De igual manera, en el caso de *TGF- β* , aquellos macrófagos estimulados con IL-4/IL-13 mostraron una expresión significativamente mayor (2.41 ± 0.23) respecto a aquellos con los estímulos de los agonistas de TLRs (Poly I:c/anti IL-10 R α : 0.39 ± 0.25 , HKLM/LPS: 0.39 ± 0.16 y FSL-1: 0.23 ± 0.08 ; Figura 11b). Por otro lado, la expresión de *IL-6* e *IL-12* se asocia con macrófagos M1. En el caso de *IL-6*, no se observaron diferencias significativas entre los estímulos (Figura 11c). La expresión de *IL-12* fue mayor cuando los macrófagos se estimularon con HKLM/LPS que los estimulados con Poly I:C/anti IL-10 R α (3.82 ± 0.76 y 0.96 ± 0.12 , $p < 0.05$) (Figura 11d).

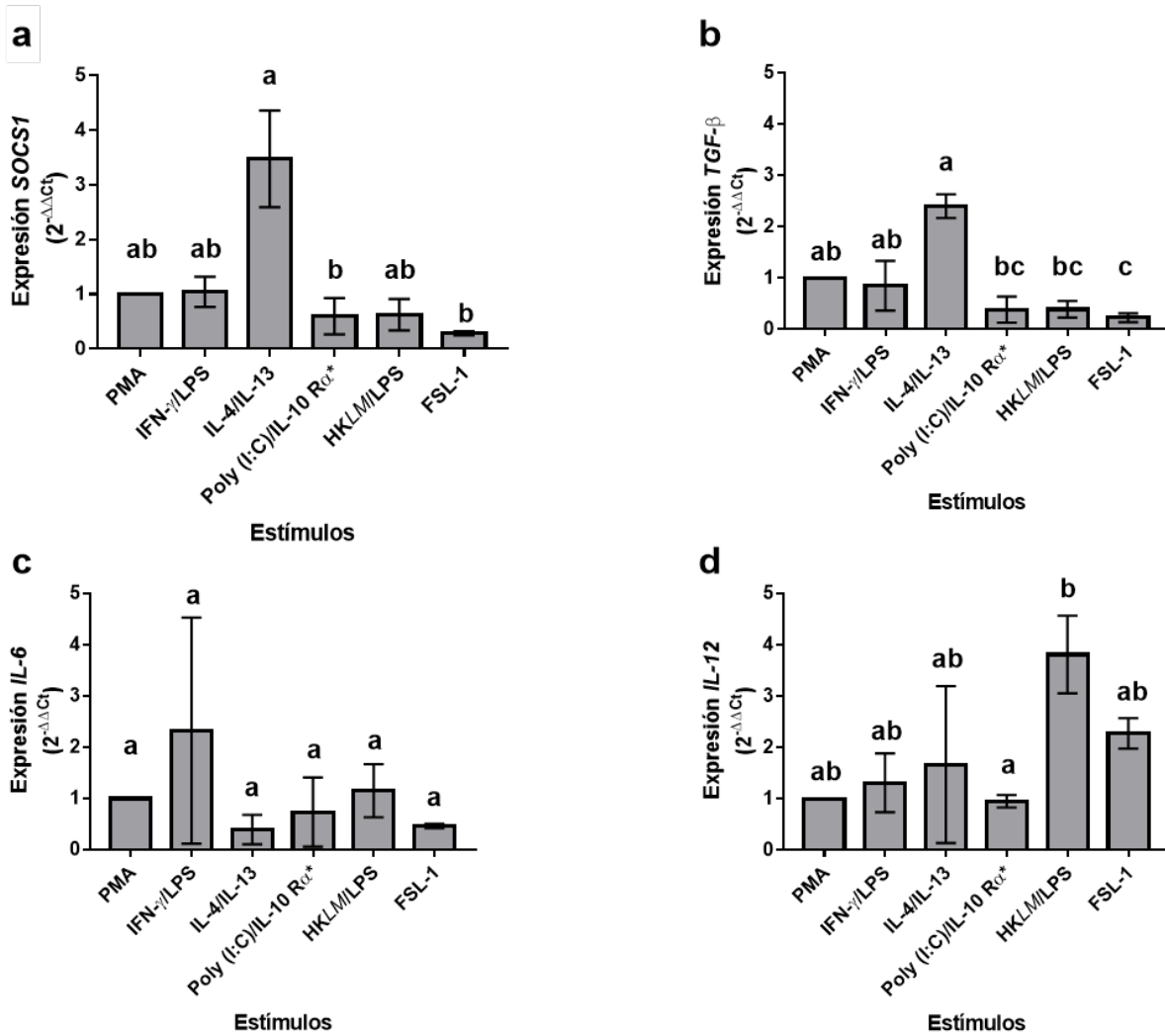


Figura 11. Expresión de marcadores en macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs. a) Expresión de *SOCS1*, b) expresión de *TGF- β* , c) expresión de *IL-6*, d) expresión de *IL-12*

Integrando estos resultados y con base en el comportamiento de los controles de polarización, podemos asumir que los estímulos con HKLM/LPS y FSL-1 inducen una polarización a macrófagos M1 debido a los niveles de expresión de *SOCS3* e *IL-12*. A diferencia de lo observado con el estímulo con Poly I:C/anti IL-10 R α que mostró resultados similares a la vía de activación de macrófagos M2, mediada por IL-4/IL-13. Sin embargo, no se puede definir la población de macrófagos solo con la expresión génica, por lo que fue necesario evaluar la presencia de diferentes marcadores de superficie y niveles de citocinas que distinguen a cada fenotipo.

10. La estimulación con Poly I:C/anti IL-10R α aumenta la expresión de marcadores de superficie M2.

Se determinó el porcentaje de células positivas a las moléculas CD197 y CD80 para establecer la proporción de macrófagos M1 y la combinación CD163/ CD206 para determinar la proporción de macrófagos M2. Aunque los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas, consistente con la evaluación de la expresión génica, la diferenciación con PMA genera una población mixta de macrófagos M1 y M2, es decir, se observó una población CD197⁺ y CD163⁺. Los marcadores de superficie característicos de macrófagos CD80 y CD197 se mantuvieron constantes en todos los estímulos ($p > 0.05$). Sin embargo, la evaluación de los marcadores característicos de los macrófagos M2 mostró que los porcentajes de poblaciones positivas a la molécula CD163 fue mayor con los estímulos con IL-4/IL-13 y Poly I:C/anti IL-10R α , ($74.06 \pm 16.17\%$ y $77.52 \pm 16.45\%$, respectivamente). Mientras que los demás estímulos mostraron un porcentaje de población CD163⁺ menor, el control de polarización M1 fue de $56 \pm 16.8\%$ y los estímulos con agonistas de TLRs fueron menores a este control (53

$\pm 16.18\%$ y $50.57 \pm 12.91\%$, respectivamente) ($p > 0.05$). Los porcentajes de expresión de poblaciones positivas a la molécula CD206 presentaron un comportamiento de tendencias similar al de CD163 ($p > 0.05$). El estímulo utilizado como control de polarización M2 presentó el mayor porcentaje de población positiva ($2.4 \pm 0.6\%$), mostrando un aumento respecto al control de diferenciación con PMA ($2.16 \pm 0.70\%$). El estímulo con Poly I:C/anti IL-10R α no mostró cambios en el porcentaje de población CD206⁺ respecto al control de diferenciación ($2.16 \pm 0.50\%$). Mientras que los estímulos HKLM/LPS y FSL-1 mostraron una disminución en el porcentaje de CD206⁺ respecto al control de diferenciación PMA, similar al control de macrófagos M1 ($1.90 \pm 0.75\%$ y $1.90 \pm 0.5\%$, respectivamente (Cuadro 7).

Adicionalmente, un análisis posterior mostró que una vez diferenciada la población CD197⁺ y CD163⁺ esta cambiaba en su mayoría al fenotipo CD197⁻ CD163⁺ ($43.95\% \pm 3.1$), seguido de la población doble positiva ($35.28\% \pm 1.33$) y por último células CD197⁺ CD163⁻ ($20.77\% \pm 4.39$). Notablemente, IL-4/IL-13 y Poly I:C/anti IL-10 R α redujeron la población de células CD197⁺ CD163⁻ e incrementaron la población CD197⁺ CD163⁺, mientras que IFN- γ /LPS, HKLM/LPS y FSL-1 incrementaron ligeramente a la población con características M1 (CD197⁺ D163⁻). Sin embargo, ningún resultado fue estadísticamente significativo (Anexo 1).

Cuadro 7. Expresión de marcadores de superficie en macrófagos U937 estimulados con agonistas TLRs.

	M1				M2			
	CD80		CD197		CD163		CD206	
	Promedio (%)	DE	Promedio (%)	DE	Promedio (%)	DE	Promedio (%)	DE
Control (PMA)	23.0	± 3.92	53.67	± 2.10	64.6	± 6.33	2.16	± 0.70
IFN-γ/LPS	22.87	± 9.15	48.92	± 8.62	56	± 16.8	1.86	± 0.51
IL-4/IL-13	23.43	± 10.33	44.44	± 8.74	74.06	± 16.17	2.4	± 0.60
Poly (I:C)/ Anti IL-10 Rα	24.83	± 9.55	47.45	± 9.26	77.52	± 16.45	2.16	± 0.50
HKLM/LPS	10.93	± 6.92	51.73	± 5.50	53.0	± 16.18	1.9	± 0.75
FSL-1	31.03	± 5.08	40.53	± 5.78	50.57	± 12.91	1.9	± 0.55

11. Poblaciones heterogéneas de macrófagos M1 y M2 en estímulos de agonistas de TLRs a nivel funcional

Gran parte de las funciones de los macrófagos es ejercida a través de las citocinas que liberan al medio. La IL-10 es una de las principales citocinas secretada por macrófagos M2, la cual se ha relacionado con un ambiente pro-tumoral, es decir, tiene efectos funcionales sobre macrófagos, linfocitos y otras células controlando el microambiente tumoral, por lo que fue importante monitorearla. Nuestros resultados muestran que los macrófagos diferenciados con PMA producen niveles de IL-10 de 123.8 ± 1.1 pg/mL, es decir, se confirma que están induciendo poblaciones heterogéneas de macrófagos. Los estímulos de polarización tuvieron el comportamiento predicho por la literatura. Macrófagos estimulados con IL-4/IL-13 produjeron altas concentraciones de IL-10 (318.4 pg/mL ± 5.03 ; $p < 0.001$ con respecto a todos los estímulos probados). De manera contraria, los macrófagos estimulados con INF- γ /LPS bajaron los niveles de esa citocina en 106.4 ± 9.3 pg/ml con respecto al control. Por su parte, los estímulos con agonistas de TLRs tuvieron un comportamiento similar entre ellos. Poly I:C/ anti IL-10R α redujeron significativamente la secreción de IL-10 a 89.24 ± 10.94 pg/mL ($p < 0.05$ con respecto al control de diferenciación (PMA)) con un comportamiento similar a el control de polarización M1. Por su parte, HKLM/LPS y FSL-1 no indujeron cambios en la concentración de IL-10, manteniéndose a niveles similares al control de diferenciación PMA con concentraciones de 125.5 ± 5.84 pg/mL y 123.8 ± 1.1 pg/mL, respectivamente (Figura 12).

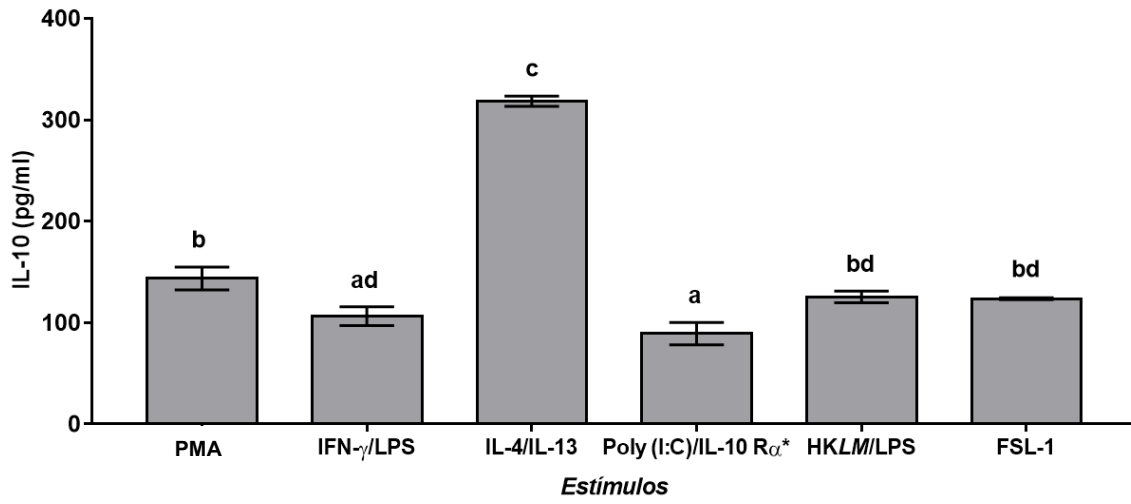


Figura 12. Secreción de IL-10 por macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs.

Diferentes literales: $p < 0.05$.

Existen varias proteínas importantes en la función anti tumoral de macrófagos M1, una de las que destaca es la quimiocina CXCL-10 o IP-10. Respecto a la producción de esta quimiocina, los estímulos Poly I:C/anti IL-10 R α , HKLM/LPS y FSL-1 mantuvieron la secreción de esta quimiocina tanto como el control de células diferenciadas (alrededor de 3000 pg/mL). Por otro lado, el estímulo con IL-4/IL-13 mostró una tendencia a disminuir respecto al control de diferenciación a 1894 pg/mL \pm 766 (Figura 13). No obstante, la variabilidad en los resultados no permitió que hubiera diferencia significativa entre los estímulos.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que el estímulo de diferenciación de monocitos a macrófagos con PMA induce una polarización inicial. Esta polarización genera una población heterogénea de macrófagos M1/M2, pero con mayores características de M1. Los agonistas de TLR 2/4 (HKLM/LPS) y TLR2/6 (FSL-1) inducen macrófagos con características moleculares y funcionales similares a la población M1. Esto queda evidenciado con un aumento de la expresión génica de *SOCS3*, *IL-12* e *IL-6*, aumento de la producción de IP-10 y producción de IL-10 a niveles de los inducidos por el control M1 (IFN- γ /LPS). Además, los agonistas de TLR 2/4 (HKLM/LPS) y TLR2/6 (FSL-1) promueven un fenotipo con tendencia a M1. Finalmente, el estímulo con agonista de TLR 3 (Poly I:C)/ anti IL-10 R α , indujo macrófagos que mostraron características moleculares y fenotípicas de la subpoblación M2, pero a nivel funcional su comportamiento fue de M1, con una disminución en la secreción de IL-10 y aumento de IP-10. Esto puede deberse a la regulación mediada por otros factores de transcripción como IRF1, el cual puede ser activado directamente por TLR3 incrementando los niveles de IL12p35 y consecuentemente modulando los niveles de IL-10 (Martinez et al., 2006).

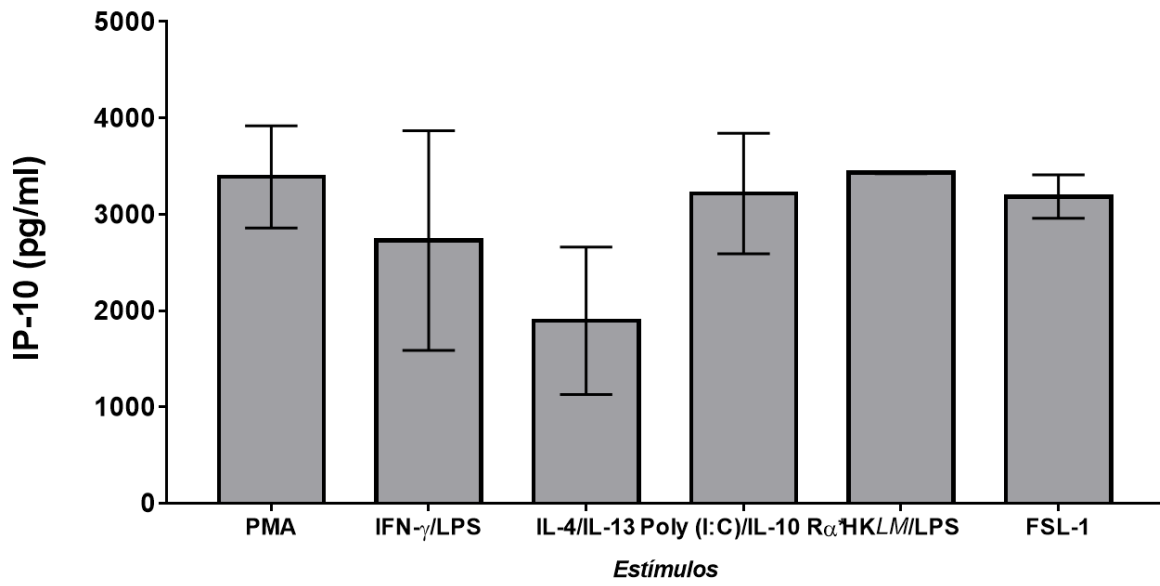


Figura 13. Secreción de IP-10 por macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs.

El bloqueo del receptor de IL-10 utilizado en el estímulo antes mencionado (TLR 3 (Poly I:C)/ anti IL-10 R α) también podría tener un impacto importante al prevenir todos los mecanismos de regulación generados por esta vía tales como la reducción del procesamiento y presentación de antígenos así como de los genes antiinflamatorios inducidos tras la unión de esta citocina a su ligando específico. Es de esperarse que lo anterior tendría mayor impacto en el co-cultivo de macrófagos polarizados con líneas celulares de cáncer de mama.

Con base en los resultados anteriores, se decidió utilizar los estímulos Poly I:C/anti IL-10 R α , FSL-1 y FSL-1/anti IL-10 R α para los ensayos de co-cultivos.

12. Estandarización de Co-cultivo

El ensayo MTT es un método colorimétrico cuantitativo para el cual existen diferentes protocolos para llevarse a cabo. La diferencia entre los diferentes protocolos radica esencialmente en el tiempo de incubación del MTT. Por ser una reacción enzimática, el tiempo de reacción juega un papel importante en el resultado, en caso de saturación no es posible evaluar diferencias mínimas en la viabilidad celular. Por ello, se realizó una curva de calibración con los tiempos de incubación (Figura 14) y se determinó un tiempo óptimo de lectura del ensayo de 45 minutos, posterior a los 60 minutos la reacción se satura y las lecturas de absorbancia por la reducción enzimática del MTT no son confiables para detectar diferencias mínimas, como se muestra en la Figura 14.

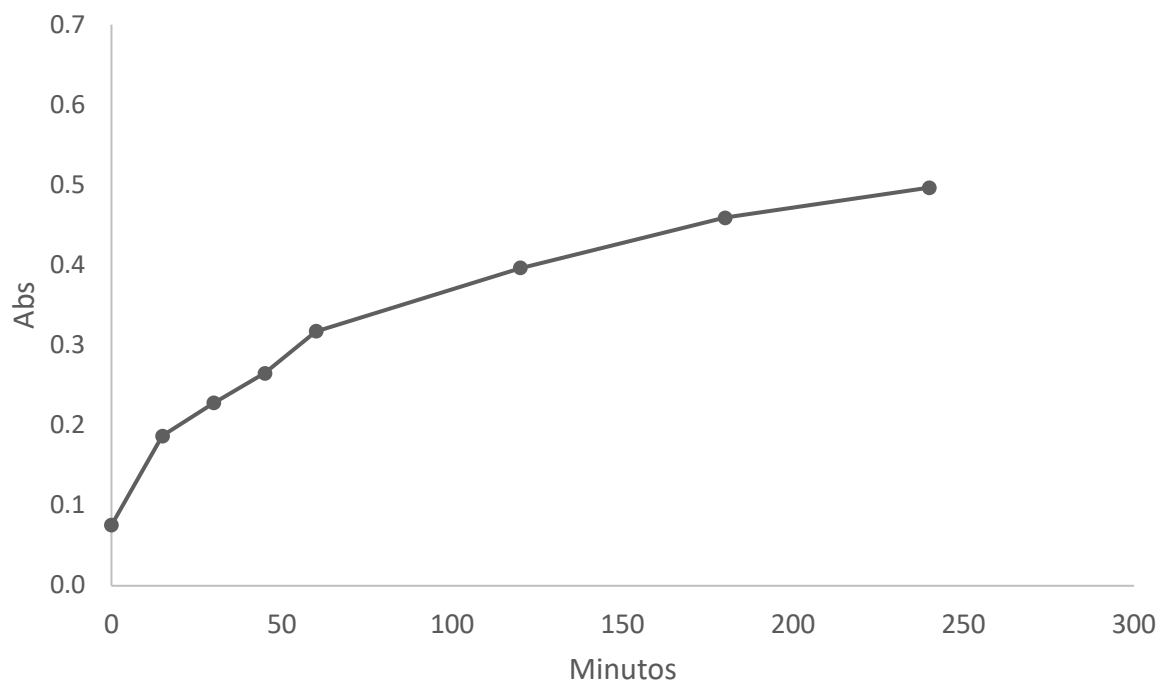


Figura 14. Curva del tiempo de incubación del MTT.

13. Co-cultivo de macrófagos con células de cáncer de mama T47-D. Actividad Anti-proliferativa.

Una vez conocida la polarización de macrófagos con los estímulos se buscó su efecto sobre líneas celulares de cáncer de mama. Para lo anterior, los macrófagos estimulados a las condiciones mencionadas anteriormente se recolectaron y co-cultivaron con las células de cáncer de mama T47-D. En experimentos preliminares se realizaron evaluaciones del tiempo de co-cultivo, determinando 72 horas como el óptimo para realizar el ensayo MTT. Se muestran los resultados de un experimento evaluado al menos por duplicado.

Los resultados se muestran normalizados respecto a las células de cáncer de mama cultivadas sin macrófagos (Figura 15). En este caso, se observó que los macrófagos estimulados con PMA, control M1 (IFN- γ /LPS), Poly (I:C)/anti IL-10 R α , y FSL-1/ anti IL-10 R α disminuyeron la proliferación de las células de cáncer (-17.44 ± 4.13 , -19.49 ± 1.04 y -14.91 ± 2.79 , y $-12.68 \pm 5.26\%$ respectivamente, $p > 0.05$). Cabe destacar que el control de diferenciación de macrófagos (PMA) también tuvo la misma tendencia al disminuir $-17.44 \pm 4.13 \%$ la proliferación ($p > 0.05$). Por lo tanto, la población M1 obtenida con el estímulo con PMA tiene un efecto sobre las células T47-D. Por otro lado, los macrófagos bajo el estímulo con IL-4/IL-13 aumentaron la tasa de proliferación celular, $27.22 \pm 9.95 \%$ ($p > 0.05$). Entonces, la mayor reducción de la proliferación se muestra con el estímulo control de polarización M1, seguido de macrófagos estimulados con PMA, Poly I:C/anti IL-10 R α y FSL-1/anti IL-10 R α .

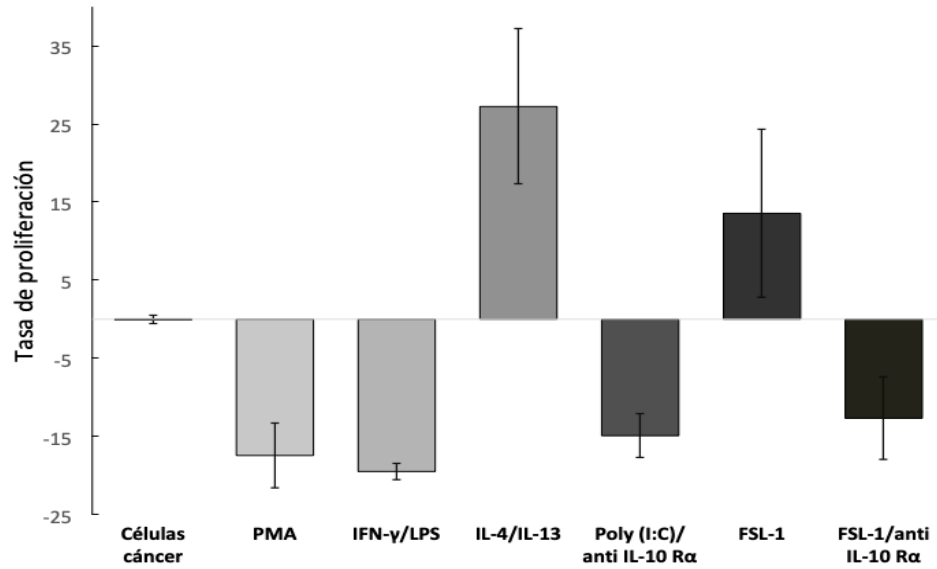


Figura 15. Proliferación de las células T47-D co-cultivadas con macrófagos estimulados. Valores normalizados respecto a las células de cáncer sin macrófagos. PMA: co-cultivo con macrófagos sin estímulos, solo diferenciados con PMA. Células cáncer: Células de cáncer sin macrófagos.

Al analizar los resultados respecto al control de macrófagos diferenciados con PMA en co-cultivo, no se observó inhibición de la proliferación para la mayoría de los tratamientos. Solo las células cancerígenas co-cultivadas con macrófagos estimulados con el control de polarización M1 presentó una disminución leve de la proliferación ($-1.87 \pm 1.09 \%$, ($p > 0.05$)) (Figura 16). En el caso de los macrófagos estimulados con FSL-1 o IL-4/IL-13, la proliferación fue mayor que la desarrollada con el control PMA (15.98 ± 20.08 y $37.95 \pm 12.00 \%$, respectivamente, $p > 0.05$). Particularmente, el estímulo con IL-4/IL-13 favoreció la proliferación de las células de cancer U937. Esto se refleja con el mayor porcentaje de proliferación tras el estímulo con IL-4/IL-13 con respecto al control de solo células de cancer en cultivo ($37.95 \pm 12.00 \%$ vs 14.72 ± 0.68 , respectivamente).

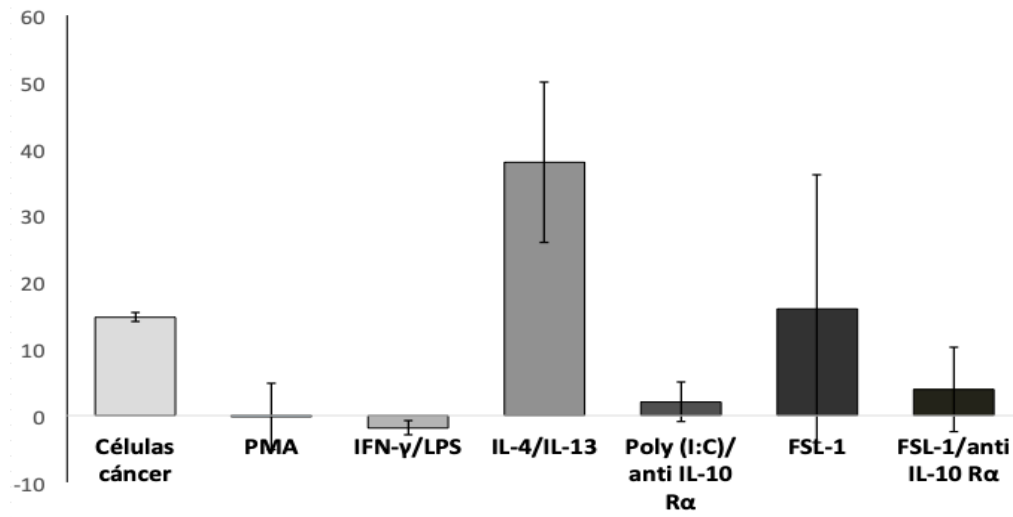


Figura 16. Proliferación de las células T47-D co-cultivadas con macrófagos estimulados. Valores normalizados respecto a las células de cáncer en co-cultivo con macrófagos sin estímulos (PMA)

IX. DISCUSIÓN

Los macrófagos constituyen una población heterogénea de células inmune de origen mieloide, las cuales participan en procesos fisiológicos y patológicos. Los macrófagos se caracterizan por mostrar gran plasticidad en respuesta a las condiciones de su microambiente. Estos fagocitos se han descrito como células adherentes que presentan diferentes morfologías en cultivo celular. Bajo las condiciones de cultivo y diferenciación de monocitos a macrófagos utilizadas en el presente estudio, se observaron células ovoides, en forma de huso y con dendritas. Estas características morfológicas han sido reportadas por otros tras la diferenciación *in vitro* (Vogel et al., 2014). Adicionalmente, observamos que con los estímulos con agonistas de receptores de TLRs las células adquirirían otras características no reportadas anteriormente como aumento en el tamaño (Poly I:C/anti IL-10 R α), granularidad (HKLM/LPS) y presencia de pequeñas dendritas. Estas diferencias en la morfología se han relacionado con la migración y capacidad fagocítica de los macrófagos (Vereyken et al., 2011).

Existe un amplio espectro de estados funcionales que pueden adquirir los macrófagos después de ser estimulados (Mantovani et al., 2004). Los dos principales estados de polarización para los macrófagos son el tipo 1 y el 2, los cuales son activados por la vía clásica (M1) y por vías alternas (M2), respectivamente. Estos estados funcionales y sus características han sido evaluados en estudios *in vitro* utilizando macrófagos derivados de monocitos. Aunque el PMA es la molécula de elección para la diferenciación de monocitos a macrófagos, algunos autores señalan que en altas concentraciones tienden a generar una respuesta proinflamatoria en lugar de mantener a los macrófagos en un estado inactivo (M0) (Lund et al., 2016; Martin et al., 2017;

Orekhov et al., 2019). Esto es relevante ya que una respuesta inflamatoria dominada por IFN- γ , IP-10 y TNF- α favorecería la diferenciación de monocitos a macrófagos M1. Esto es congruente con nuestros resultados ya que los macrófagos diferenciados mostraron en su mayoría los marcadores de superficie CD197 y CD163 (53.67% \pm 2.10 y 64.6% \pm 6.33, respectivamente) característicos del tipo M1. Incluso al utilizar una concentración de 20 ng/mL de PMA se obtuvo una población mixta de macrófagos M1 y M2, pero dominada por las características de tipo M1. Esto puede deberse a que la expresión y liberación de algunas moléculas al microambiente por uno de los fenotipos de macrófagos pueden actuar de forma autócrina o paracrina y de esta forma promover una repolarización a un fenotipo distinto (Y. Wang, Smith, Hao, He, & Kong, 2019). Por ejemplo, cuando es sobrepresada la citocina proinflamatoria IL-6 en macrófagos M1, ésta puede polarizar al subtipo M2d (Poh & Ernst, 2018). Así, resulta complicado diferenciar *in vitro* de monocitos a macrófagos de un solo fenotipo (Chimal-Ramírez, Espinoza-Sánchez, Chávez-Sánchez, Arriaga-Pizano, & Fuentes-Pananá, 2016; Edwards, Zhang, Frauwirth, & Mosser, 2006; Murray & Wynn, 2011). En estudios futuros, se recomienda el uso de un citómetro de flujo con capacidad para separar células de distinto fenotipo (Sorting) y de esta manera poder evaluar de forma aislada la respuesta de macrófagos M1 o M2 a distintos estímulos con análogos de TLRs.

Debido a la falta de consenso sobre las moléculas de superficie que deben ser evaluadas para determinar la población de macrófagos, se ha sugerido una guía para la nomenclatura y caracterización de estos (Murray & Wynn, 2011). Dicha falta de consenso se debe fundamentalmente, al gran número de variables que intervienen en la activación y polarización. Esto incluye factores tales como el origen y estado de maduración de los

macrófagos, las condiciones de activación de monocitos a macrófagos, las concentraciones y origen de los estímulos, el número de células inicial y procesamiento de las células para su análisis (Xue, 2014; Chanput, 2014; Gautier, 2012). La forma de complementar los análisis de marcadores de superficie es evaluar el proceso de polarización a nivel de regulación transcripcional. Los factores de transcripción STAT1, IRF1/3/5/8, y SOCS3 juegan un papel importante en la polarización de macrófagos M1. Mientras que moléculas como STAT6, el receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR)- γ , e IRF4 participan en la polarización de macrófagos M2 (Orekhov et al., 2019; Tugal, Liao, & Jain, 2013; C.-F. Yu et al., 2018).

La expresión de los factores de transcripción IRF4 e IRF5 fueron evaluadas en el presente estudio. Los IRFs constan de 9 miembros hasta el momento [IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 (ICSBP) e IRF9 (ISGF3 γ /p48)], son inducidos por diferentes estímulos, y son pieza clave en la defensa antiviral y en la supresión de tumores (Jensen & Niewold, 2015). IRF1, 5 y 8 regulan la polarización de macrófagos M1, e IRF4 se relaciona con la polarización de M2 (Negishi et al., 2005; Quero, Hanser, Manigold, Tiaden, & Kyburz, 2017; Y. Wang et al., 2019; Wilson, 2014; C.-F. Yu et al., 2018). IRF4 e IRF5 son moléculas que compiten por la unión del adaptador MyD88 activándolo y promoviendo su fosforilación. IRF4 es considerado un marcador de macrófagos M2 debido a que promueve la secreción de IL-10 e IL-4 y regula la producción de citocinas proinflamatorias inhibiendo al factor IRF5. Contrariamente, IRF 5 es capaz de traslocarse al núcleo y unirse a promotores de respuesta a interferón (Interferon-Stimulated Response Elements, ISRE) activando la producción de citocinas proinflamatorias, principalmente IL-12p35 (Günthner & Anders, 2013; Satoh et al., 2010). Nuestros

resultados muestran que la estimulación con IFN- γ /LPS indujo macrófagos M1 probablemente a través de la vía de IRF5. Este factor de transcripción es sobreexpresado en respuesta a la estimulación con TLRs y otros PRRs (Ryzhakov, Eames, & Udalova, 2015). Aunque la expresión de IRF5 fue baja, la expresión de IRF4 fue prácticamente nula. Esto puede deberse a que el estímulo con IFN- γ /LPS indujo tanto la activación de IRF5 como de IRF1; incluso el IFN- γ por si solo sobregula la expresión la IRF1. Notablemente, tanto IRF1 como IRF5 son factores de transcripción que contribuyen a la polarización de macrófagos M1 (Martinez et al., 2006; Negishi et al., 2006).

En línea con estudios previos, TLR3 no indujo una sobreexpresión de IRF5 en el presente estudio. Sin embargo, se conoce que TLR3 es capaz de activar IRF1 y de promover la polarización de macrófagos M1 (Negishi et al., 2006; Vidyarthi et al., 2018; Xie & Xi, 2016). En cuanto al estímulo con el agonista de TLR2/6 (FSL-1), no existe información sobre la activación relacionada a los factores de transcripción IRFs. No obstante, se ha demostrado su habilidad para inducir la producción de MMP-9 (proteína M2) a través de las vías NF- κ B y AP-1 en monocitos THP-1 (Ahmad, Shihab, Jasem, & Behbehani, 2014). Otros agonistas de TLR2, como Pam3, han mostrado capacidad para inducir macrófagos M1 ya sea solo o combinado con un agonista de TLR4 (LPS). Este tipo de estímulos desencadena la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 (Quero et al., 2017). En cambio, el agonista de TLR2 HKLM puede inducir la expresión de IRF4 e IRF5 generando poblaciones de macrófagos M1 y M2 simultáneamente (Quero, 2017; Radstake, 2004). Finalmente, es de destacarse que el estímulo con PMA, para diferenciar de monocitos a macrófagos, indujo la más marcada

expresión de IRF5, la cual se acompañó de una baja expresión de IRF4, mostrando así su potencial para generar macrófagos M1.

Las citocinas IL-4/IL-13 desencadenan una cascada de señalización que involucra a IRF4 y *myd88* (Sato et al., 2010). Así, los macrófagos diferenciados con PMA y estimulados con IL-4/IL-13 podrían polarizarse al fenotipo M2. Sin embargo, nuestros resultados además de revelar la expresión de IRF4 también muestran una baja expresión de IRF5 en macrófagos estimulados con IL-4/IL-13. La expresión de este factor de transcripción en macrófagos estimulados con dichas citocinas no ha sido reportada anteriormente y en nuestro caso particular la expresión puede deberse a que partimos de un cultivo heterogéneo de macrófagos (M1 y M2) y/o al hecho de que IRF5 es expresado ubicuamente en macrófagos, incluso en macrófagos con características M2 (Takaoka et al., 2005).

Moléculas como SOCS1 y SOCS3 se han relacionado con el proceso de polarización de la respuesta inmune aunque el aumento de la expresión de estas proteínas depende del organismo (Arnold et al., 2014; Rottenberg & Carow, 2014). SOCS3 reprime la respuesta inflamatoria y en consecuencia el fenotipo M1 al menos en macrófagos murinos (Qin et al., 2012; Yan et al., 2013), pero en el humano y en el modelo de la rata es fundamental para inducir la polarización a macrófagos M1 (Gordon, Okai, Hoare, Erwig, & Wilson, 2016; Liu & Modlin, 2008). Nuestros resultados mostraron que solo HKLM/LPS indujo un aumento de la expresión de SOCS3 similar a la promovida por IFN- γ /LPS, mientras que el estímulo con Poly I:C/anti IL-10 R α mostró un nivel similar a la estimulación con IL-4/IL-13 (M2). No obstante, la expresión génica de SOCS1 y TGF- β , marcadores de M2, aumentó solo bajo la estimulación con IL-4/IL-13. Por otro lado, la

expresión de SOCS1 y *TGF-β* fue incluso menor en los macrófagos estimulados con Poly I:C/anti IL-10 R α que con el control M1 (IFN- γ /LPS). Contrariamente, la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-12 se mantuvo a niveles similares a los mostrados por los macrófagos solo diferenciados con PMA. Este perfil de expresión génica de macrófagos M1 y M2 ha sido reportado por otros (Genin et al., 2015; Vidyarthi et al., 2018).

La estimulación con agonistas de TLRs tendió a limitar la secreción de IL-10 favoreciendo un ambiente inflamatorio. Particularmente, Poly I:C/anti IL-10 R α redujo los niveles de IL-10 a niveles incluso menor que los promovidos por el estímulo con el control M1 (IFN- γ /LPS). Notablemente, Poly I:C puede promover la polarización a macrófagos M1 en macrófagos primarios humanos y estos pueden presentar actividad citotóxica contra células cancerígenas (Maeda, Digifico, Andon, Mantovani, & Allavena, 2019). Nuestros resultados proveen evidencia sobre el uso de Poly I:C en conjunto con anti IL-10 R α para exacerbar sustancialmente la capacidad de macrófagos para reducir los niveles de IL-10. Esta citocina es uno de los inmunomoduladores más potentes asociados a la actividad protumoral (Ruffell et al., 2014; Zhang et al., 2018) por lo que nuestros hallazgos representa una estrategia potencial para modular el microambiente tumoral y repolarizar macrófagos con la finalidad de que presenten actividad antitumoral. A pesar de que todos los estímulos probados generaron una población heterogénea de macrófagos M1/M2, las determinaciones de citocinas en sobrenadentes y evaluaciones de la expresión de factores de transcripción clave indican que se logró modificar el microambiente de los cultivos tras los estímulos practicados y en consecuencia también en los co-cultivos con las células de cáncer de mama. Los resultados mostraron una

disminución de la proliferación de células tumorales cuando estuvieron en contacto con macrófagos estimulados con INF- γ /LPS, Poly I:C/anti IL-10 R α , FSL-1/anti IL-10 R α e incluso con los macrófagos solamente diferenciados con PMA. El hecho de que los macrófagos obtenidos con PMA presentaran actividad antitumoral era esperado ya que estos cultivos presentaron una expresión alta de IRF5 y moderada de IRF4 y SOCS 1 (marcadores de M1). Los efectos antiproliferativos observados podrían mejorarse mediante el re-estímulo con INF- γ /LPS, Poly I:C/anti IL-10 R α o FSL-1/anti IL-10. Los re-estímulos con PMA no serían de utilidad en la práctica clínica ya que éste podría comportarse como un compuesto promotor de tumores (De Tata V et al., 1993) y no se cuenta hasta el momento con un análogo que reduzca al mínimo los efectos adversos potenciales y pueda ser administrado. Contrariamente, nuevos análogos de TLR3 con menor toxicidad que Poly I:C se encuentran en ensayos clínicos y han mostrado ser bien tolerados después de la administración sistémica (Strayer DR. et al, 2012). Además, moléculas no tóxicas como el inmunomodulador AS101 o anticuerpos monoclonales podrían ser utilizados para limitar la disponibilidad de IL-10 *in vivo* (Kalechman Y, et al., .2002). Así, nuestros hallazgos *in vitro* sobre la capacidad del estímulo de macrófagos con Poly I:C/anti IL-10 R α para modificar el microambiente tumoral y promover la polarización a macrófagos M1 podrían cobrar mayor relevancia *in vivo*.

X. CONCLUSIÓN

La diferenciación de monocitos a macrófagos con PMA afecta el fenotipo obtenido generando una población heterogénea M1/M2. Los estímulos con INF- γ /LPS o IL-4/IL-13 inducen macrófagos con características moleculares y funcionales mayormente M1 o M2 respectivamente. Los agonistas de TLR 2/4 (HKLM/LPS) y TLR 2/6 (FSL-1) inducen macrófagos con características moleculares y funcionales de una población heterogénea M1/M2, pero con tendencia a M1. El estímulo de macrófagos con Poly I:C/Anti IL-10 R α limita la producción de IL-10 aún cuando hay niveles bajos de SOCS3. En cuanto a las células en co-cultivo, los macrófagos diferenciados con PMA tienden a disminuir la proliferación de las células cancerígenas y este efecto no mejora tras el estímulo con agonistas de TLRs y Anti IL-10 R α , pero si se ve afectado tras el estímulo con IL-4/IL-13. En su conjunto, los resultados indican que la modificación *in vitro* del microambiente tumoral con Poly I:C/Anti IL-10 R α favorece el ambiente antitumoral al limitar la disponibilidad de IL-10 sin afectar la actividad antitumoral de los macrófagos ya existentes. Esto último cobraría una gran relevancia en el diseño de ensayos clínicos futuros. Finalmente, debemos reconocer que estudios posteriores *in vitro* e *in vivo* utilizando análogos de TLR3 con toxicidad reducida y moléculas no tóxicas, como el inmunomodulador AS101, para limitar la disponibilidad de IL-10 son indispensables para corroborar los hallazgos que se muestran en la presente tesis.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular+ StudentConsult*: Elsevier España.
- Ahmad, R., Shihab, P. K., Jasem, S., & Behbehani, K. (2014). FSL-1 induces MMP-9 production through TLR-2 and NF- κ B/AP-1 signaling pathways in monocytic THP-1 cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(3), 929-942.
- Akazawa, T., Shingai, M., Sasai, M., Ebihara, T., Inoue, N., Matsumoto, M., & Seya, T. (2007). Tumor immunotherapy using bone marrow-derived dendritic cells overexpressing Toll-like receptor adaptors. *FEBS letters*, 581(18), 3334-3340.
- Arnold, C. E., Whyte, C. S., Gordon, P., Barker, R. N., Rees, A. J., & Wilson, H. M. (2014). A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M 1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology*, 141(1), 96-110.
- Ayala, M. A. M., Gottardo, M. F., Gori, M. S., Candia, A. J. N., Caruso, C., De Laurentiis, A., . . . Salamone, G. (2017). Dual activation of Toll-like receptors 7 and 9 impairs the efficacy of antitumor vaccines in murine models of metastatic breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(9), 1713-1732.
- Barnard, M. E., Boeke, C. E., & Tamimi, R. M. (2015). Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1856(1), 73-85.
- Bertos, N. R., & Park, M. (2011). Breast cancer—one term, many entities? *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3789-3796.
- Bhatelia, K., Singh, K., & Singh, R. (2014). TLRs: linking inflammation and breast cancer. *Cellular Signalling*, 26(11), 2350-2357.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Caras, L., Tucureanu, C., Lerescu, L., Pitica, R., Melinceanu, L., Neagu, S., & Salageanu, A. (2011). Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: in vitro models of macrophage-tumor environment interaction. *Tumori*, 97(5), 647.
- Cárdenas-Sánchez, J., Erazo-Valle, A., Maafs-Molina, E., & Poitevin-Chacón, A. (2011). Consenso Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. Cuarta revisión, Colima, México. Enero 2011. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 10(supl 5), 1-58.
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860.
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, 23(1), 37-45.
- Cheng, Y.-s., & Xu, F. (2010). Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biology & Therapy*, 10(12), 1219-1223.
- Chiba, Y., Mizoguchi, I., Furusawa, J., Hasegawa, H., Ohashi, M., Xu, M., . . . Yoshimoto, T. (2018). Interleukin-27 exerts its antitumor effects by promoting differentiation of hematopoietic stem cells to M1 macrophages. *Cancer Research*, 78(1), 182-194.
- Chimal-Ramírez, G. K., Espinoza-Sánchez, N. A., Chávez-Sánchez, L., Arriaga-Pizano, L., & Fuentes-Pananá, E. M. (2016). Monocyte differentiation towards protumor

- activity does not correlate with M1 or M2 phenotypes. *Journal of Immunology Research*, 2016.
- Chin, A. I., Miyahira, A. K., Covarrubias, A., Teague, J., Guo, B., Dempsey, P. W., & Cheng, G. (2010). Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Research*, 70(7), 2595-2603.
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 5(1), e8668.
- DeNardo, D. G., & Coussens, L. M. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 9(4), 212.
- DeTata V., Ptasznik A., Cristofalo V. J. (1993). Effect of the tumor promoter phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on proliferation of young and senescent W1-38 human diploid fibroblast. *Experimental Cell Research*. 205(2), 261-269.
- Dossus, L., & Benusiglio, P. R. (2015). Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Research*, 17(1), 37.
- Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A., & Mosser, D. M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(6), 1298-1307.
- Fabian, C. J., Kimler, B. F., & Hursting, S. D. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research*, 17(1), 62.
- Ferreira Jr, O. C., Valinsky, J. E., Sheridan, K., Wayner, E. A., Bianco, C., & Garcia-Pardo, A. (1991). Phorbol ester-induced differentiation of U937 cells enhances attachment to fibronectin and distinctly modulates the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ fibronectin receptors. *Experimental Cell Research*, 193(1), 20-26.
- Fong, D., Ariganello, M. B., Girard-Lauziere, J., & Hoemann, C. D. (2015). Biodegradable chitosan microparticles induce delayed STAT-1 activation and lead to distinct cytokine responses in differentially polarized human macrophages in vitro. *Acta Biomaterialia*, 12, 183-194.
- Fullerton, J. N., Segre, E., De Maeyer, R. P., Maini, A. A., & Gilroy, D. W. (2016). Intravenous endotoxin challenge in healthy humans: An experimental platform to investigate and modulate systemic inflammation. *Journal of Visualized Experiments* (111), e53913.
- Gelband, H., Jha, P., Sankaranarayanan, R., & Horton, S. (2015). *Disease Control Priorities, (Volume 3): Cancer*. World Bank Publications.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., & Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15(1), 577.
- Gordon, P., Okai, B., Hoare, J. I., Erwig, L. P., & Wilson, H. M. (2016). SOCS3 is a modulator of human macrophage phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(4), 771-780.
- Goto, S., Sakai, S., Kera, J., Suma, Y., Soma, G.-I., & Takeuchi, S. (1996). Intradermal administration of lipopolysaccharide in treatment of human cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 42(4), 255-261.

- Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M., & Si-Tahar, M. (2005). Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5571-5580.
- Günthner, R., & Anders, H.-J. (2013). Interferon-regulatory factors determine macrophage phenotype polarization. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Guzmán-Santos, K., Morales-Cordero, K. V., Torres, E. G., & SánchezRodríguez, S. H. (2012). Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común. *Archivos de Medicina*, 8(1).
- Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., & Yang, S.-M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- Heusinkveld, M., & van der Burg, S. H. (2011). Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 216.
- Hu, X., & Ivashkiv, L. B. (2009). Cross-regulation of signaling pathways by interferon- γ : implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity*, 31(4), 539-550.
- Hudson, J. D., Shoaibi, M. A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G. J., & Beach, D. H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *Journal of Experimental Medicine*, 190(10), 1375-1382.
- Informática, I. N. d. E. G. e. (2007). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer: INEGI México.
- Jensen, M. A., & Niewold, T. B. (2015). Interferon regulatory factors: critical mediators of human lupus. *Translational Research*, 165(2), 283-295.
- Jhan, J.-R., & Andrechek, E. R. (2017). Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*, 18(17), 1595-1609.
- Jiang, X., & Shapiro, D. J. (2014). The immune system and inflammation in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 673-682.
- Jonjić, N., Peri, G., Bernasconi, S., Sciacca, F. L., Colotta, F., Pelicci, P., . . . Mantovani, A. (1992). Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *Journal of Experimental Medicine*, 176(4), 1165-1174.
- Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M, et al. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *The Journal of Immunology*. 2002;169(1):384-92.
- Kim, Y.-H., Lee, J.-R., & Hahn, M.-J. (2017). Regulation of inflammatory gene expression in macrophages by epithelial-stromal interaction 1 (Epsti1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., . . . Udalova, I. A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and T H 1-T H 17 responses. *Nature immunology*, 12(3), 231.
- Kuper, H., Adami, H. O., & Trichopoulos, D. (2000). Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of Internal Medicine*, 248(3), 171-183.

- Lehtonen, A., Ahlfors, H., Veckman, V., Miettinen, M., Lahesmaa, R., & Julkunen, I. (2007). Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(3), 710-720.
- Liu, P. T., & Modlin, R. L. (2008). Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Immunology*, 20(4), 371-376.
- Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, 430, 64-70.
- Maeda, A., Digifico, E., Andon, F. T., Mantovani, A., & Allavena, P. (2019). Poly (I: C) stimulation is superior than Imiquimod to induce the antitumoral functional profile of tumor-conditioned macrophages. *European Journal of Immunology*, 49(5), 801-811.
- Maeß, M. B., Wittig, B., Cignarella, A., & Lorkowski, S. (2014). Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *Journal of Immunological Methods*, 402(1-2), 76-81.
- Manni, A., Richie Jr, J. P., Xu, H., Washington, S., Aliaga, C., Bruggeman, R., . . . Calcagnotto, A. (2014). Influence of omega-3 fatty acids on Tamoxifen-induced suppression of rat mammary carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 134(7), 1549-1557.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677-686.
- Martin, A., Murnane, D., Chau, D., Brown, M., & Hutter, V. (2017). *Optimisation of phorbol myristate acetate (PMA) mediated differentiation of U937 human lung monocytes to alveolar like macrophages*. Paper presented at the Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery.
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports*, 6.
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *The Journal of Immunology*, 177(10), 7303-7311.
- Martinez, F. O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B. N., Draijer, C., . . . Ho, L. P. (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood*, 121(9), e57-e69.
- Mittal, D., Saccheri, F., Vénéreau, E., Pusterla, T., Bianchi, M. E., & Rescigno, M. (2010). TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. *The EMBO Journal*, 29(13), 2242-2252.
- Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 740-748.
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of leukocyte Biology*, 89(4), 557-563.

- Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., . . . Honda, K. (2006). Evidence for licensing of IFN- γ -induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(41), 15136-15141.
- Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., . . . Honda, K. (2005). Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(44), 15989-15994.
- Neville, M. C., & Morton, J. (2001). Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *The Journal of Nutrition*, *131*(11), 3005S-3008S.
- Nowicki, A., Szenajch, J., Ostrowska, G., Wojtowicz, A., Wojtowicz, K., Kruszewski, A. A., . . . Wiktor-Jedrzejczak, W. (1996). Impaired tumor growth in colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-deficient, macrophage-deficient op/op mouse: Evidence for a role of CSF-1-dependent macrophages in formation of tumor stroma. *International Journal of Cancer*, *65*(1), 112-119.
- O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., . . . Teng, M. W. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(10), 1869-1882.
- Ochi, A., Graffeo, C. S., Zambirinis, C. P., Rehman, A., Hackman, M., Fallon, N., . . . Rao, R. (2012). Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(11), 4118-4129.
- Orekhov, A. N., Orekhova, V. A., Nikiforov, N. G., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., Romanenko, E. B., . . . Chistiakov, D. A. (2019). Monocyte differentiation and macrophage polarization.
- Park-Min, K.-H., Antoniv, T. T., & Ivashkiv, L. B. (2005). Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology*, *210*(2-4), 77-86.
- Peine, K. J., Bachelder, E. M., Vangundy, Z., Papenfuss, T., Brackman, D. J., Gallovic, M. D., . . . Ainslie, K. M. (2013). Efficient delivery of the toll-like receptor agonists polyinosinic: polycytidylic acid and CpG to macrophages by acetalated dextran microparticles. *Molecular Pharmaceutics*, *10*(8), 2849-2857.
- Poh, A. R., & Ernst, M. (2018). Targeting macrophages in cancer: from bench to bedside. *Frontiers in Oncology*, *8*, 49.
- Qi, Y., Kong, X., Wang, J., & Fang, Y. (2018). Recent Advances in the Research of Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, *8*, 478.
- Qin, H., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Reynolds, S. L., Yanagisawa, L. L., & Benveniste, E. N. (2012). SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *The Journal of Immunology*, *189*(7), 3439-3448.
- Quero, L., Hanser, E., Manigold, T., Tiaden, A. N., & Kyburz, D. (2017). TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Research & Therapy*, *19*(1), 245.
- Radstake, T. R., Roelofs, M. F., Jenniskens, Y. M., Oppers-Walgreen, B., van Riel, P. L., Barrera, P., . . . van den Berg, W. B. (2004). Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon- γ . *Arthritis & Rheumatism*, *50*(12), 3856-3865.

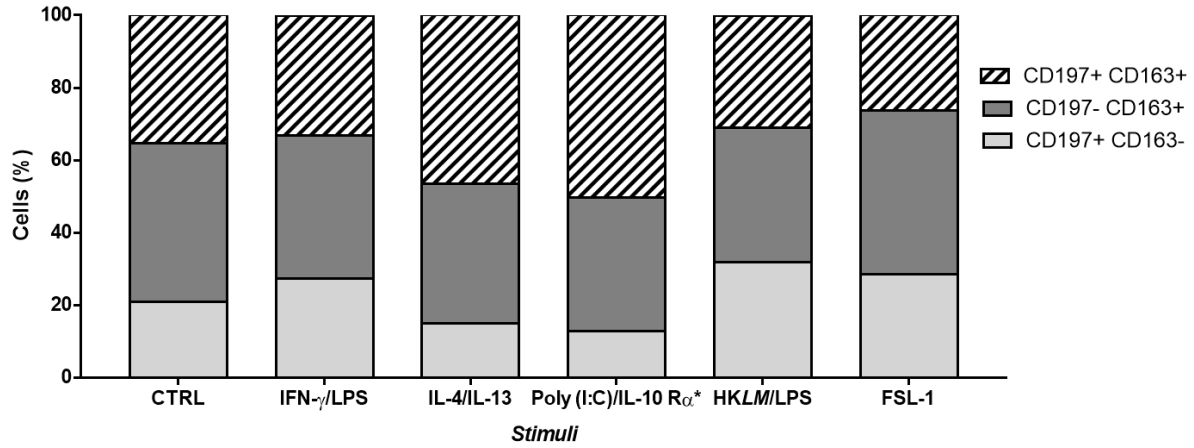
- Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 651-672.
- Romieu, I., Biessy, C., Carayol, M., His, M., Torres-Mejía, G., Ángeles-Llerenas, A., . . . Porras, C. (2018). Reproductive factors and molecular subtypes of breast cancer among premenopausal women in Latin America: the PRECAMA study. *Scientific Reports*, 8(1), 13109.
- Rottenberg, M. E., & Carow, B. (2014). SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5, 58.
- Ruffell, B., Affara, N. I., & Coussens, L. M. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in Immunology*, 33(3), 119-126.
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, C. M., Pryer, N., . . . Coussens, L. M. (2014). Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*, 26(5), 623-637.
- Ryzhakov, G., Eames, H. L., & Udalova, I. A. (2015). Activation and function of interferon regulatory factor 5. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 35(2), 71-78.
- Salaun, B., Coste, I., Rissoan, M.-C., Lebecque, S. J., & Renno, T. (2006). TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *The Journal of Immunology*, 176(8), 4894-4901.
- Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., . . . Saitoh, T. (2010). The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nature Immunology*, 11(10), 936.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101.
- Schwertfeger, K. L., Rosen, J. M., & Cohen, D. A. (2006). Mammary gland macrophages: pleiotropic functions in mammary development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 11(3-4), 229-238.
- Shetab Boushehri, M. A., Abdel-Mottaleb, M. M., Béduneau, A., Pellequer, Y., & Lamprecht, A. (2018). A nanoparticle-based approach to improve the outcome of cancer active immunotherapy with lipopolysaccharides. *Drug Delivery*, 25(1), 1414-1425.
- SOCIAL, Y. A. GUIA TECNICA DE PREVENCIÓN Y CONTROL DEL CÁNCER DE MAMA.
- Spencer, M., Yao-Borengasser, A., Unal, R., Rasouli, N., Gurley, C. M., Zhu, B., . . . Kern, P. A. (2010). Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(6), E1016-E1027.
- Strayer, D. R., Carter, W. A., Stouch, B. C., Stevens, S. R., Bateman, L., Cimoch, P. J., . . . Group, C. F. S. A.-S. (2012). A double-blind, placebo-controlled, randomized, clinical trial of the TLR-3 agonist rintatolimod in severe cases of chronic fatigue syndrome. *PLoS One*, 7(3), e31334.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., . . . Mak, T. W. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434(7030), 243.
- Tamayo, F. G. (1997). *Fundamentos de Inmunobiología*: UNAM.

- Tamma, R., Guidolin, D., Annese, T., Tortorella, C., Ruggieri, S., Rega, S., . . . Ribatti, D. (2017). Spatial distribution of mast cells and macrophages around tumor glands in human breast ductal carcinoma. *Experimental Cell Research*, 359(1), 179-184.
- Taniguchi, K., Hikiji, H., Okinaga, T., Hashidate-Yoshida, T., Shindou, H., Ariyoshi, W., . . . Nishihara, T. (2015). Essential role of lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in the induction of macrophage polarization in PMA-treated U937 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(12), 2840-2848.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108.
- Tugal, D., Liao, X., & Jain, M. K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(6), 1135-1144.
- Vacchelli, E., Galluzzi, L., Eggermont, A., Fridman, W. H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., . . . Kroemer, G. (2012). Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*, 1(6), 894-907.
- Van Dalen, F. J., Van Stevendaal, M. H., Fennemann, F. L., Verdoes, M., & IJina, O. (2019). Molecular repolarisation of tumour-associated macrophages. *Molecules*, 24(1), 9.
- Vereyken, E. J., Heijnen, P. D., Baron, W., de Vries, E. H., Dijkstra, C. D., & Teunissen, C. E. (2011). Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 58.
- Vicari, A. P., & Caux, C. (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), 143-154.
- Vidyardhi, A., Khan, N., Agnihotri, T., Negi, S., Das, D. K., Colegio, O. R., . . . Agrewala, J. N. (2018). TLR-3 stimulation skews M2 macrophages to M1 through IFN- $\alpha\beta$ signaling and restricts tumor progression. *Frontiers in immunology*, 9, 1650.
- Vogel, D. Y., Glim, J. E., Stavenuiter, A. W., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., . . . Beelen, R. H. (2014). Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 219(9), 695-703.
- Wahl, L. M., & Kleinman, H. K. (1998). Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy: Oxford University Press.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., . . . Cao, K. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761.
- Wang, Y., Smith, W., Hao, D., He, B., & Kong, L. (2019). M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *International Immunopharmacology*, 70, 459-466.
- Wei, X., Nie, S., Liu, H., Sun, J., Liu, J., Li, J., . . . Wang, J. (2017). Angiopoietin-like protein 2 facilitates non-small cell lung cancer progression by promoting the polarization of M2 tumor-associated macrophages. *American journal of cancer research*, 7(11), 2220.
- Wilson, H. M. (2014). SOCS proteins in macrophage polarization and function. *Frontiers in Immunology*, 5, 357.

- Wong, P. Y., Staren, E. D., Tereshkova, N., & Braun, D. P. (1998). Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *Journal of Surgical Research*, 76(1), 95-103.
- Xie, C.-y., & Xi, Y.-b. (2016). Macrophage migration inhibitory factor enhances lipopolysaccharide-induced fibroblast proliferation by inducing toll-like receptor 4. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 43.
- Yager, J. D., & Davidson, N. E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(3), 270-282.
- Yan, Y., Gause, K. T., Kamphuis, M. M., Ang, C.-S., O'Brien-Simpson, N. M., Lenzo, J. C., . . . Caruso, F. (2013). Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. *ACS nano*, 7(12), 10960-10970.
- Yin, T., He, S., & Wang, Y. (2015). Toll-like receptor 7/8 agonist, R848, exhibits antitumoral effects in a breast cancer model. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 3515-3520.
- Yu, C.-F., Peng, W.-M., Schlee, M., Barchet, W., Eis-Hübinger, A. M., Kolanus, W., . . . Oldenburg, J. (2018). SOCS1 and SOCS3 target IRF7 degradation to suppress TLR7-mediated type I IFN production of human plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 200(12), 4024-4035.
- Yu, L.-Y., Tang, J., Zhang, C.-M., Zeng, W.-J., Yan, H., Li, M.-P., & Chen, X.-P. (2017). New immunotherapy strategies in breast cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(1), 68.
- Yustos, M. A., Angulo, M. M., & Soto, M. Á.-M. (2017). Cáncer de mama. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(34), 2011-2023.
- Zhang, Z., Xue, Y., Wang, G., Cheng, Y., Pan, Y., Zhao, S., & Hou, Y. (2018). Anti-tumor macrophages activated by ferumoxytol combined or surface-functionalized with the TLR3 agonist poly (I: C) promote melanoma regression. *Theranostics*, 8(22), 6307.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Expresión de CD197 y CD163 en macrófagos U937 estimulados con agonistas de TLRs y anti IL-10 R α



Anexo 2. Constancias de Estancia en CIBIOR y UNISON



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

Delegación Estatal en Puebla
Jefatura de Prestaciones Médicas
Coordinación de Planeación y Enlace Institucional
Centro de Investigación Biomédica de Oriente



Oficio No. 223301/280903/016/2019

Meteppec, Pue. 14 de enero de 2019

Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez
Coordinadora
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Universidad Autónoma de Sinaloa

P R E S E N T E.

A través del presente documento hago constar que, de acuerdo con nuestros registros, la C. Anna Patricia Islas Zamorano, estudiante del Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, culminó exitosamente con su estancia en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), comprendida desde el 1 de Julio al 31 de Diciembre de 2018. Durante este periodo, Anna Patricia llevó a cabo actividades relacionadas al proyecto: *Efecto de macrófagos estimulados con agonistas del receptor TLR γ ; anticuerpo anti IL-10 e inhibidores de la enzima arginasa 1 sobre líneas celulares de cáncer de mama*, con las cuales dio cumplimiento con los objetivos establecidos.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Sirva la presente para los fines que a ella sean convenientes.

Atentamente

Dr. Julio Roberto Reyes Leyva
Director del CIBIOR

Km 4.5 Carretera Atlisco-Meteppec, CP 74360 Meteppec Puebla.
Tel/Fax: (244) 444 01 22



El Saber De Mis Hijos
Hace Mi Grandeza

UNIVERSIDAD DE SONORA UNIDAD REGIONAL SUR

Depto. De Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

Sonora., febrero 08 del 2018

Asunto: carta de conformidad para incorporación a proyecto y dirección de Tesis

Dr. Cuauhtemoc Reyes Moreno
Coordinador del Programa de Maestría en Biotecnología
Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Presente:

Estimado Dr. Reyes:

Por medio de la presente me dirijo a usted para expresarle que para mí es un gusto aceptar dentro del proyecto "Modificación del Microambiente en Cáncer de Mama en Tumores Inducidos en un Modelo Murino para su Uso en Terapias" a la estudiante del Programa de Maestría en Biotecnología que usted coordina la L.N. Anna Patricia Islas Zamorano. Dicho proyecto cuenta con financiamiento de la convocatoria PRODEP-2017 (ejercicio 2017-2018; USO513003457) y se dispone de la infraestructura necesaria para su desarrollo. La Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez, miembro del Núcleo Base del Programa de Maestría en Biotecnología, y un servidor dirigiremos el trabajo experimental y escrito de la Tesis de Maestría de Anna Patricia.

Sin otro particular se extiende la presente a la vez que agradezco la fineza de su atención y me es grato enviarle un saludo cordial.

ATENTAMENTE

"El saber de mis hijos hará mi grandeza"

Dr. Noé Ontiveros Apódaca
Sistema Nacional de Investigadores-Nivel I
PITC Universidad de Sonora, URS

C.c.p. Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez; Archivo personal