



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DURANTE LA INFLAMACIÓN  
ALÉRGICA PULMONAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE

MAMA

TESIS

Que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Presenta

Mariana Diosdado Contreras

Trabajo experimental realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

Director de Tesis: Dra. Sara Huerta Yopez

Asesora interna: Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez

México D.F. 26 de noviembre de 2014.

[Escriba aquí]



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **CONTENIDO**

I.	Abreviaturas utilizadas.....	3
II.	Resumen .....	4
III.	Introducción .....	6
IV.	Marco teórico.....	8
V.	Planteamiento del problema.....	18
VI.	Hipótesis de trabajo.....	19
VII.	Objetivos.....	20
VIII.	Material y métodos .....	21
IX.	Resultados .....	29
X.	Discusión de resultados.....	36
XI.	Conclusiones.....	41
XII.	Referencias.....	42

## I. ABREVIATURAS UTILIZADAS.

1. Alum. Hidróxido de aluminio en gel
2. CBA`s. Cytometric Bead Array Flex sets. Citometría de flujo.
3. ELISA. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, 'Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas')
4. H/E. Hematoxilina y eosina
5. IHQ. Inmunohistoquímica.
6. i.d. Intradérmica
7. i.t. Intratraqueal
8. MAPK. Mitogen-activated protein kinases. Proteínas quinasas activadas por mitógenos
9. OVA. Ovoalbúmina
10. PBS. Amortiguador salino de fosfatos
11. PCNA. Antígeno nuclear de células en proliferación
12. s.c. Subcutánea.
13. SNC. Suero normal de cerdo
14. SS. Solución salina isotónica
15. TGF- $\beta$ . Transforming growth factor beta. factor de crecimiento transformante beta.
16. TUNEL. Terminal-Desoxinuclotidyl-transferase mediated dUTP-digoxingenin Nick and labelling
17. VEGF. Vascular endothelial growth factor. Factor de crecimiento endotelial vascular

## II. RESUMEN

Antecedentes: Diversos grupos de investigación han explorado la posibilidad de que exista una relación biológica entre las alergias y el cáncer, sin embargo cuando algunos autores señalan que las enfermedades alérgicas protegen contra el cáncer, otros autores no encuentran asociación alguna. Por lo que no se ha llegado a un consenso. A pesar de la evidencia contradictoria, ningún estudio ha evaluado funcionalmente los efectos de la inflamación de las vías respiratorias alérgica que es característica del asma en el desarrollo del cáncer en modelos experimentales. Una de las moléculas que está involucrada tanto en asma como en cáncer es el TGF- $\beta$ .

Hipótesis: La respuesta inmunológica desarrollada durante la inflamación alérgica pulmonar, desencadenará un efecto protector contra el cáncer mediante un incremento en la apoptosis y una disminución de la proliferación de las células tumorales.

Métodos: Se implantaron células cancerosas en un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar y se midió el crecimiento tumoral semanalmente. Después de seis semanas los animales fueron sacrificados, se extrajo la sangre del animal, para obtener el suero y además el tumor fue extirpado e incluido en parafina. De los bloques parafinados se realizaron cortes en donde se evaluó la proliferación mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-PCNA y apoptosis mediante la técnica de TUNEL *in situ*. La cuantificación de la expresión de PCNA y el número de células TUNEL positivas fue evaluado mediante patología digital.

Además se realizó la expresión de TGF- $\beta$  en suero por medio de la técnica de ELISA, y también su expresión en el tumor por medio de IHQ.

Resultados: En los animales con inflamación alérgica pulmonar presentan una disminución significativa del volumen tumoral, lo cual correlaciona con una disminución de la proliferación celular y un aumento en la apoptosis de las células tumorales, lo anterior comparado con los animales no alérgicos. A estos dos procesos puede estar asociada la sobre expresión de TGF- $\beta$  tanto en suero como en tumor.

Conclusión: Por primera vez demostramos en un modelo de inflamación alérgica pulmonar que existe una relación inversa entre la alergia y la progresión tumoral. Estos debido por lo menos en parte a una disminución en la proliferación y un aumento de la apoptosis en las células tumorales. La sobreexpresión del TGF- $\beta$  generado durante la inflamación alérgica pulmonar sugiere tener un papel importante en el control del desarrollo del tumor.

### III. Introducción

Estudios epidemiológicos publicados por diversos grupos de investigación han reportado que existe una correlación entre el cáncer y las enfermedades inflamatorias alérgicas entre las que se encuentra el asma<sup>(1-5)</sup>. El asma es una enfermedad crónica de las vías respiratorias en la que los procesos inflamatorios y la hiperreactividad bronquial conducen a la obstrucción de la vía aérea pulmonar, que se caracteriza por la respuesta Th2<sup>(6,7)</sup>. El estudio de una posible relación biológica entre las alergias y el cáncer ha sido abordado por diversos grupos de investigación y profesionales de la salud, aunque hasta el momento no se ha llegado a un consenso acerca de este nexo.<sup>(4-12)</sup> La evidencia recabada hasta el momento es contradictoria y ningún estudio ha evaluado funcionalmente los efectos de la inflamación alérgica de las vías respiratorias, que es característica del asma en el desarrollo del cáncer en modelos experimentales.

Recientemente se reportó en un modelo murino de inflamación pulmonar inducida por la exposición a la ovoalbúmina (OVA), en donde se indujo también cáncer pulmonar utilizando uretano, donde la inflamación alérgica no tuvo influencia en el desarrollo del tumor<sup>(3-5)</sup>. Por otro lado, estudios recientes, en los que se utilizaron ratones que sobreexpresan la proteína Smad7 (inhibidor de la cascada de señalización de TGF- $\beta$ ) en células claras de pulmón, revelaron un aumento significativo en la progresión del cáncer de pulmón inducido por uretano<sup>(3)</sup>, el cual está asociada con la inhibición de la vía de señalización de TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) en este órgano. Esta observación muestra la importancia del TGF- $\beta$  en la supresión de la progresión tumoral, particularmente

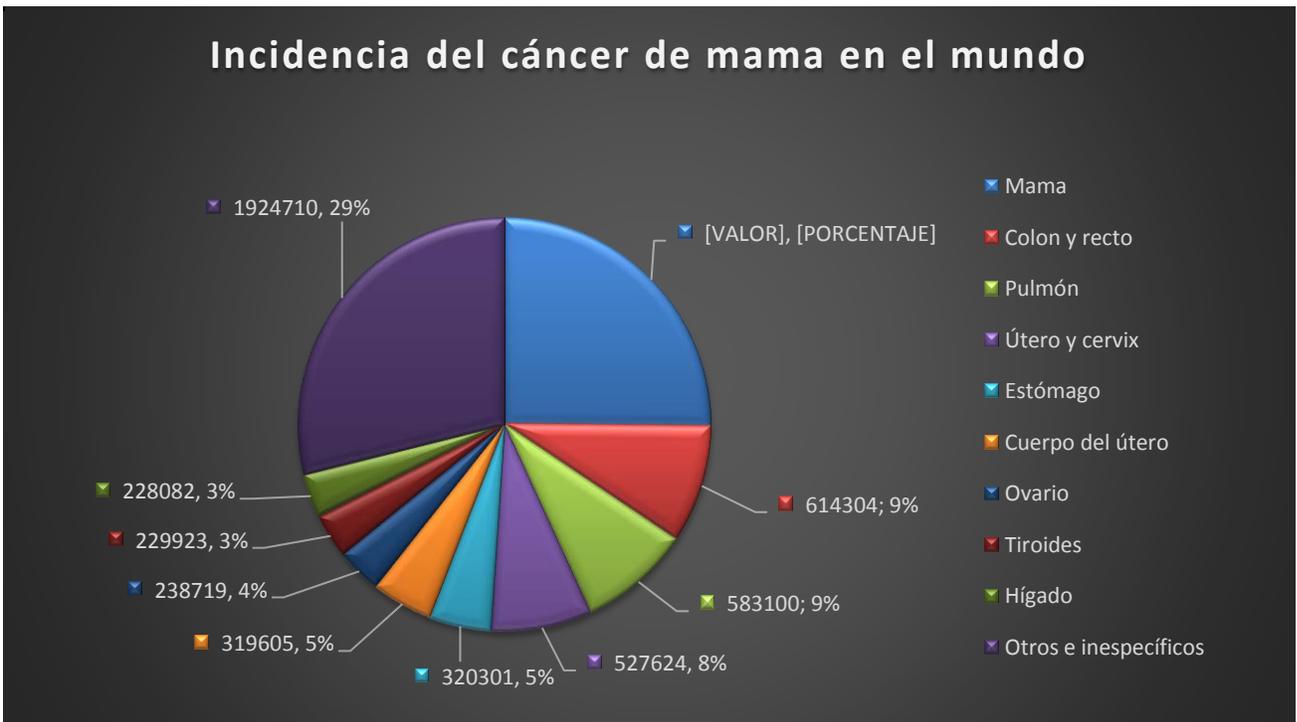
en el cáncer de pulmón provocada por un compuesto químico<sup>(5)</sup>. Esta evidencia es sumamente relevante ya que sugiere que el TGF- $\beta$  puede desempeñar un papel importante en la inhibición de la progresión del tumor, a diferencia de la mayoría de los estudios publicados que sugieren que esta citocina promueve la progresión de diferentes tipos de cáncer<sup>(11-13)</sup>.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la inflamación alérgica, en el desarrollo de cáncer usando un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar seguida de trasplante singénico de células de cáncer de mama. En el modelo que se empleó en este estudio, la inflamación de las vías respiratorias alérgicas inhibe la progresión del cáncer.

## IV. Marco Teórico

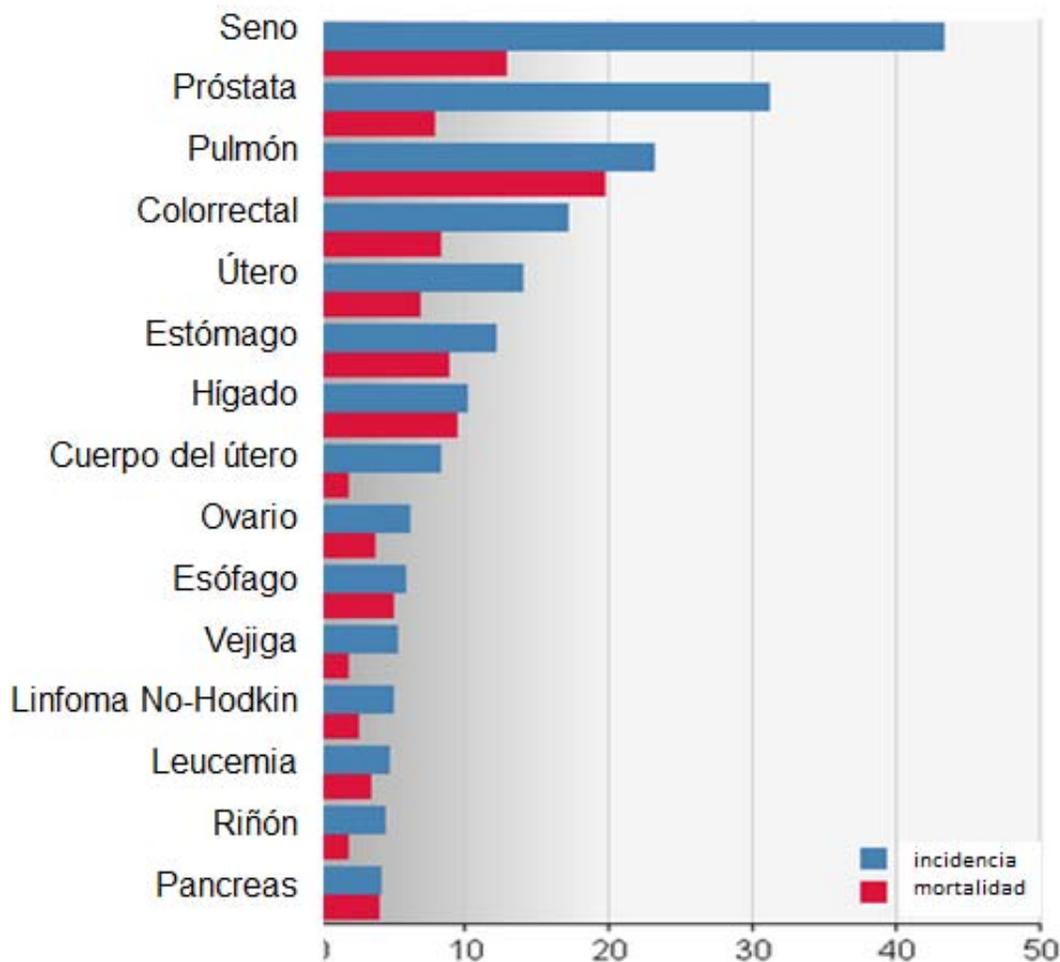
### Epidemiología del cáncer

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el más frecuente entre las mujeres, con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados en el año 2012 (25% de todos los cánceres). La incidencia de diferentes tipos de cáncer en la población mundial en el año 2012 se muestra a continuación. Figura 1. <sup>(14)</sup>.



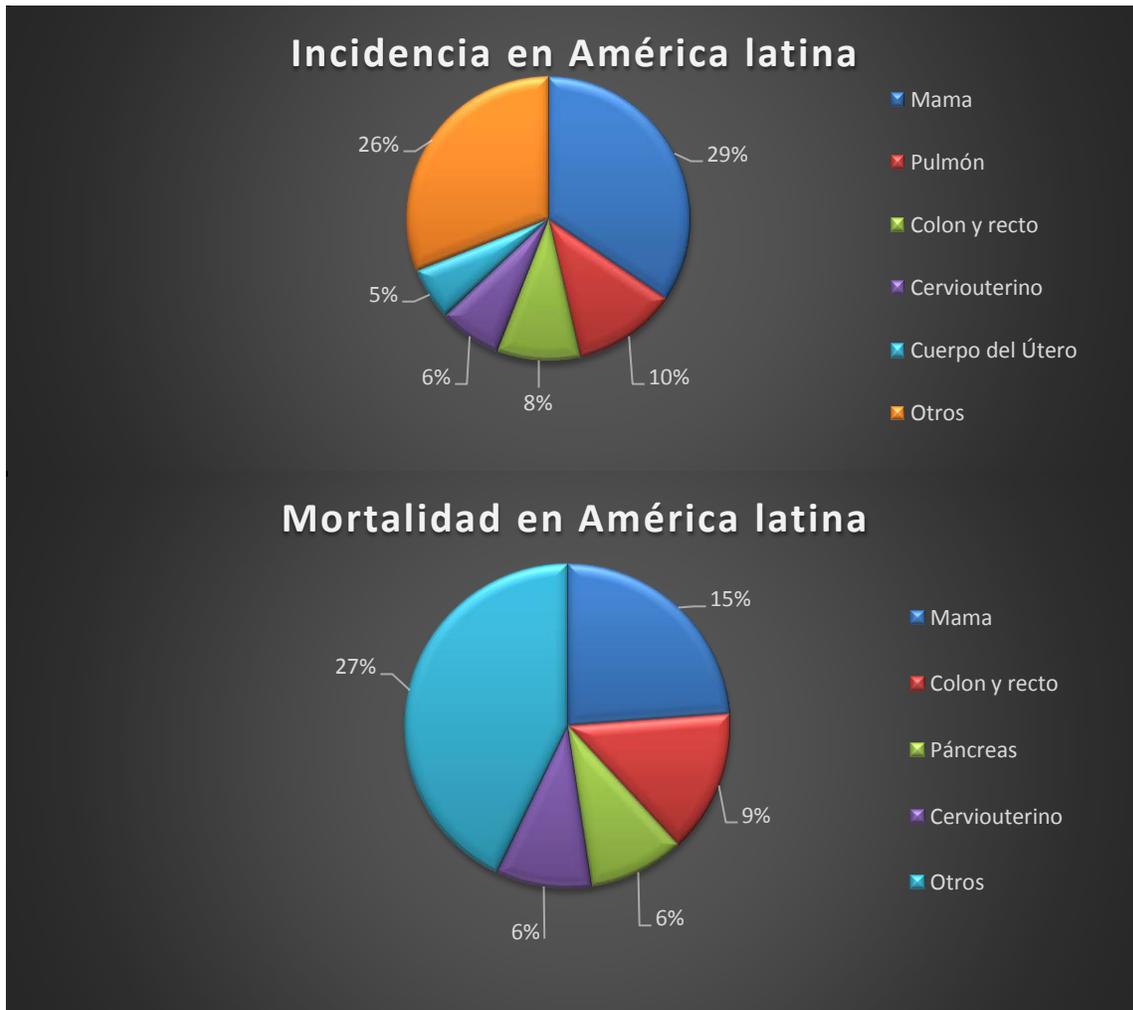
**Figura 1. Incidencia del cáncer de mama en el mundo. Tomado de: International Agency for Research in Cancer, 2012. <sup>(13)</sup>**

Así mismo es la segunda causa de muerte en el mundo, con 522.000 muertes en 2012 y es la primer causa de muerte entre las mujeres en los países menos desarrollados con 324.000 defunciones (14.3%) y la segunda en los países de primer mundo con 198.000 muertes (15.4%), después del cáncer de pulmón<sup>(14)</sup>. En la figura 2 se puede observar el fenómeno de la mortalidad provocado por cáncer de mama en el mundo.



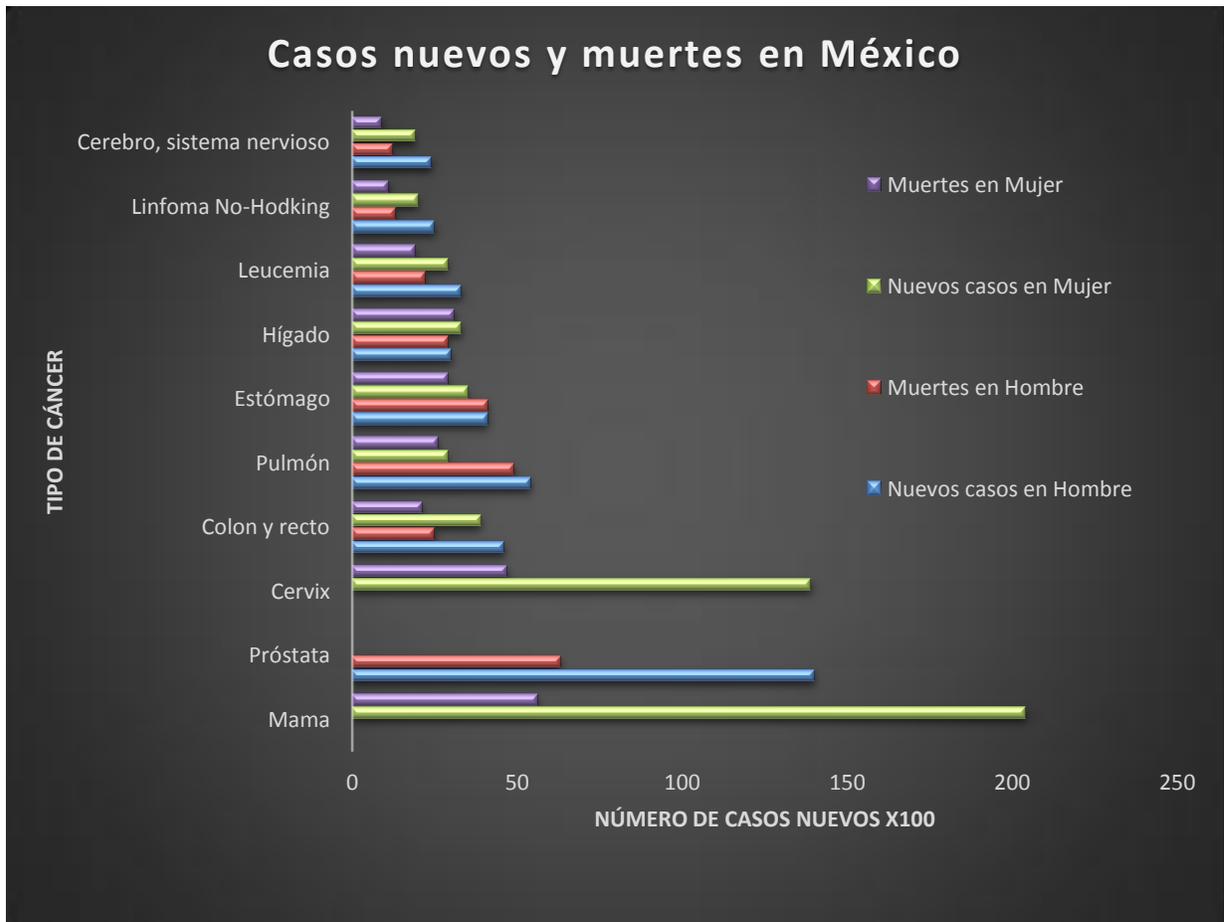
**Figura 2. Mortalidad debida a cáncer de mama a nivel mundial. Tomado de: International Agency for Research in Cancer, 2012. <sup>(13)</sup>**

En América Latina y el Caribe, el 29% de los nuevos casos de cáncer y el 15% de las muertes por cáncer son debido al cáncer de mama <sup>(15)</sup>. Lo cual se muestra en la figura 3.



**Figura 3. Organización Panamericana de la salud. Nota informativa 2014(14)**

En México durante el año 2011 el cáncer de mama representó la primera causa de morbilidad hospitalaria presentándose alrededor de 204.000 casos nuevos así como la primera causa de mortalidad con 56,000 casos al año <sup>(16)</sup>. Como se muestra en la figura siguiente.



**Figura 4. Morbilidad y mortalidad por cáncer en México en ambos sexos. International Agency for Research in Cancer, 2012<sup>(15)</sup>**

Al respecto para el estudio de este tipo de cáncer se han desarrollado modelos animales que simulan las condiciones neoplásicas de aparición, establecimiento y crecimiento del tumor de cáncer humano, y en diversos estudios se ha demostrado que existe una asociación con enfermedades inflamatorias y el desarrollo de cáncer <sup>(1-5)</sup>.

### **Etiología del cáncer**

El cáncer de mama es considerado una enfermedad sistémica dado que las células cancerígenas adquieren la capacidad para proliferar de manera acelerada, desordenada y descontrolada. Estas células alteradas pueden formar parte de distintos tejidos de la glándula mamaria, con mayor frecuencia del epitelio de los conductos y lobulillos y en menor frecuencia del estroma; estas son capaces de formar un tumor invasivo en los tejidos vecinos y hacer metástasis a órganos distantes del cuerpo. Como otros tumores malignos, el cáncer de mama es consecuencia de alteraciones en la estructura y función de los genes <sup>(17,18)</sup>.

El cáncer de mama se clasifica en cinco estadios (0 a IV). En el estadio I, el tumor está localizado en el tejido mamario, mide menos de 2 centímetros y no se ha diseminado fuera de la misma. A partir del estadio II se ubica en los ganglios linfáticos axilares, siendo la localización es estos un factor de pronóstico relevante, ya que determinan la evolución y sobrevivencia de la paciente. La presencia de metástasis se relaciona con posibles recaídas y disminución de la sobrevida.

En México, durante 2012, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte entre las mujeres con cáncer de 20 años y más (15.38 de cada 100 mil mujeres de

esa edad). Este padecimiento no distingue edades, clases sociales, o sexo, pues aunque es prioritario de la mujer, existen casos reportados de hombres que han presentado cáncer de mama <sup>(19)</sup>.

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más conocidos debido a que es una de las neoplasias más frecuentes en las hembras de cualquier especie, no sólo en la humana. Por este motivo se han utilizado modelos *in vivo* que permiten estudiar y experimentar con estas células alteradas, extrapolando los resultados obtenidos a los carcinomas análogos presentes en las mujeres. Estos modelos son esenciales tanto para el avance de la investigación científica básica como para la mejora de las terapias curativas <sup>(20)</sup>

## **ASMA**

### **Epidemiología**

En México la prevalencia del asma es muy variable dependen en gran medida de la región geográfica, como ejemplo es posible encontrar una prevalencia del 5% en la ciudad de México y del 12% en Mérida, Yucatán. Esta variabilidad en la frecuencia de asma se correlaciona de forma inversa con la altitud de la región y de forma directa con su temperatura. De acuerdo a estadísticas oficiales, en México la incidencia anual de asma a nivel nacional fue de 80 914 casos en el año 2013. Durante las últimas décadas alrededor del mundo, hubo un aumento epidémico del asma que parece haberse estabilizado desde mediados de la década de los noventa. La frecuencia de asma aumenta en algunas épocas del año y en México se observa un aumento en las crisis asmáticas entre los meses

de octubre y enero. La mayor incidencia de asma ocurre en los niños, disminuye en la adolescencia y adultez temprana y aumenta ligeramente en etapas subsecuentes <sup>(21)</sup>. En la niñez el asma es más frecuente en varones, pero pasada la adolescencia se vuelve más común en mujeres. En México la mortalidad por asma ha tenido un descenso paulatino desde hace más de 15 años <sup>(22)</sup>.

## **Etiología**

El asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias. La inflamación crónica está asociada con hiperreactividad de la vía aérea (una respuesta exagerada del estrechamiento de la vía respiratoria debida a factores desencadenantes, como los alérgenos y ejercicio), que conduce a los síntomas recurrentes tales como respiración sibilante, disnea (dificultad para respirar), opresión en el pecho y tos. Los episodios de síntomas se asocian generalmente con una muy extendida, pero variable, obstrucción del flujo de aire dentro de los pulmones que suele ser reversible, ya sea espontáneamente o con un tratamiento apropiado para el asma <sup>(23)</sup>.

El asma se asocia con una respuesta Th2 que se define como la respuesta inmune desencadenada por el organismo, provocada por diversos factores como son los ácaros del polvo, restos de cucarachas, animales con pelo, moho, polen las infecciones, el humo del tabaco, el aire frío, el ejercicio, los cuales desencadenan una cascada de eventos inmunes que conducen a la inflamación crónica de las vías respiratorias. Los niveles elevados de células Th2 en las vías respiratorias liberan citocinas específicas, incluyendo la interleucinas como IL-5

(quimiotrayente de eosinófilos) <sup>(24,25)</sup>, IL-9, IL-13, e IL -4, esta última propuesta como esencial para el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias, ya que induce a las células B para sintetizar anticuerpos de tipo IgE. <sup>(24)</sup>. En conjunto estas interleucinas promueven la inflamación eosinofílica. La producción de IgE, producida por los mastocitos, provoca la liberación de mediadores de la inflamación como la histamina y los leucotrienos, que causa el broncoespasmo (contracción del músculo liso en de las vías respiratorias), edema (hinchazón) y aumento de la secreción mucosa (hipersecreción mucosa), que conducen a los síntomas característicos del asma<sup>(23)</sup>. Esto deriva en un proceso de remodelación, para el cual se ha postulado que deriva tanto de los procesos de reparación excesivos o la falta de resolución de alérgeno impulsado por la inflamación<sup>(25)</sup>.

Una de las principales enfermedades inflamatorias con las que se asocia el desarrollo del cáncer es el asma, que se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que participan diversas células y mediadores químicos; se acompañan de una mayor reactividad traqueobronquial (hiperreactividad de las vías aéreas), que provocan en forma recurrente tos, sibilancias, disnea y aumento de la resistencia aérea. Esto debido principalmente a una hiperreactividad bronquial y un componente inflamatorio eosinofílico y linfocítico con un patrón de citocinas tipo Th2 <sup>(26)</sup>.

Una de las citocinas más importantes que funge como mediadora en las reacciones alérgicas es el TGF- $\beta$ , que es un importante factor fibrogénico y modulador de la respuesta inmune que puede ser fundamental en la generación de los cambios estructurales de las vías respiratorias en pacientes con asma <sup>(27)</sup>.

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que TGF- $\beta$  tiene un papel dual ya que puede actuar como una citocina pro ó anti-inflamatoria, en la iniciación y la regulación de la respuesta inmune en el tejido pulmonar. También participa en la remodelación de las vías respiratorias, particularmente en el desarrollo de la fibrosis sub-epitelial. TGF- $\beta$  se produce en células inflamatorias de la mucosa bronquial y por las células de la pared bronquial, tales como fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y células musculares lisas. Se ha reportado que un aumento significativo de TGF- $\beta$  en lavados bronquialveolares de pacientes con asma, correlaciona directamente con la gravedad de la enfermedad <sup>(28-30)</sup>

Diversos trabajos han demostrado la relación que tienen distintas patologías (principalmente de tipo inflamatorias) y el cáncer<sup>(4)</sup>. Una de las principales enfermedades inflamatorias, con las que se ha relacionado el cáncer es el asma alérgica <sup>(23)</sup>.

Para explicar la relación entre el asma y cáncer se han establecido distintas hipótesis, una de ellas es la llamada hipótesis de la estimulación antigénica <sup>(31)</sup>. En esta se plantea que las condiciones inmuno-estimulantes, tales como alergias, aumentan el riesgo de cáncer a través de un mecanismo de estimulación crónico de células que se traduce en la aparición de mutaciones aleatorias durante la división celular, los síntomas de alergia aumentan directamente los riesgos del desarrollo de cáncer en cualquier tejido, órgano o sistema. En contraste, se han propuesto dos hipótesis para explicar las asociaciones inversas entre cáncer y alergia. La primera es la hipótesis de la inmunovigilancia que afirma que las enfermedades alérgicas confieren un efecto protector contra la aparición de cáncer

en un sistema inmunológico mejorado que puede detectar y destruir células neoplásicas<sup>(32)</sup>.

La segunda explicación para las asociaciones inversas entre cáncer y alergia es la hipótesis de la profilaxis. Esta hipótesis, que tiene una perspectiva darwiniana, propone que los mismos síntomas de la alergia evolucionaron por selección natural para servir a un propósito útil: la expulsión de toxinas, patógenos y partículas extrañas antes de que cualquier contenido o mutágeno que se adhiera y pueda iniciar la carcinogénesis. Bajo la hipótesis de la profilaxis, los síntomas de la alergia reducen la aparición de los cánceres de forma directa, por librar rápidamente los tejidos expuestos de toxinas mutagénicas, microorganismos y contaminantes ambientales, y fomentando la evasión de esos antígenos en el futuro. Por lo tanto, las asociaciones entre alergia y cáncer inversas indican relaciones causales y no sólo correlaciones<sup>(33)</sup>.

Diversos grupos de investigación han desarrollado modelos murinos de inflamación alérgica pulmonar donde intentan encontrar el papel que desempeña este proceso inmunológico en la aparición y progresión de diferentes neoplasias<sup>(16)</sup> mostrando de manera general que no existe una correlación entre la inflamación alérgica pulmonar y la inducción de diferentes tipos de cáncer.

## V. Planteamiento del problema

Existen evidencias contradictorias acerca de la asociación entre las enfermedades alérgicas y el Ca mama.

El aumento de expresión de TGF- $\beta$ RI/RII así como de las proteínas implicadas en la señalización de esta citocina (pSMAD2 y pSMAD4) correlación con la sobrevida de pacientes con Ca de mama.

La inhibición de la señalización de TGF- $\beta$  en un modelo experimental favorece la progresión tumoral.

Por lo tanto es razonable pensar que el TGF- $\beta$  generado durante la respuesta alérgica pulmonar puede tener un papel importante en la respuesta anti-tumoral.

En base a los antecedentes anteriores se planteó la siguiente pregunta de investigación.

¿Cuál es el efecto de la inflamación alérgica pulmonar durante la progresión del tumor de cáncer de mama en un modelo murino?

## VI. Hipótesis

La respuesta inmunológica desarrollada durante la inflamación alérgica pulmonar, desencadenará un efecto protector contra el cáncer mediante un incremento en la apoptosis y una disminución de la proliferación de las células tumorales.

## VII. Objetivos

### ➤ **General**

Evaluar el crecimiento tumoral durante la inflamación alérgica pulmonar en un modelo murino experimental

### ➤ **Específicos**

- Evaluar el crecimiento tumoral durante la inflamación alérgica pulmonar.
- Evaluar la apoptosis de las células tumorales durante el desarrollo del modelo experimental.
- Evaluar la proliferación de las células tumorales durante el desarrollo del modelo experimental.
- Evaluar la presencia de TGF- $\beta$  en suero y tejido tumoral generado durante el desarrollo del modelo experimental.

## VIII. Materiales y Métodos

### ➤ **Los animales y las células.**

Ratones Balb/c hembras (6-8 semanas de edad) se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el laboratorio de animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices éticas para el manejo de animales requerido por el INCMNSZ.

El tumor mamario de ratón (MMT) línea celular D2F2/E2 fue clonado a partir de un tumor mamario espontáneo que surgió en el BALB/c que proviene de un nódulo hiperplásico alveolar (HAN) línea D2.

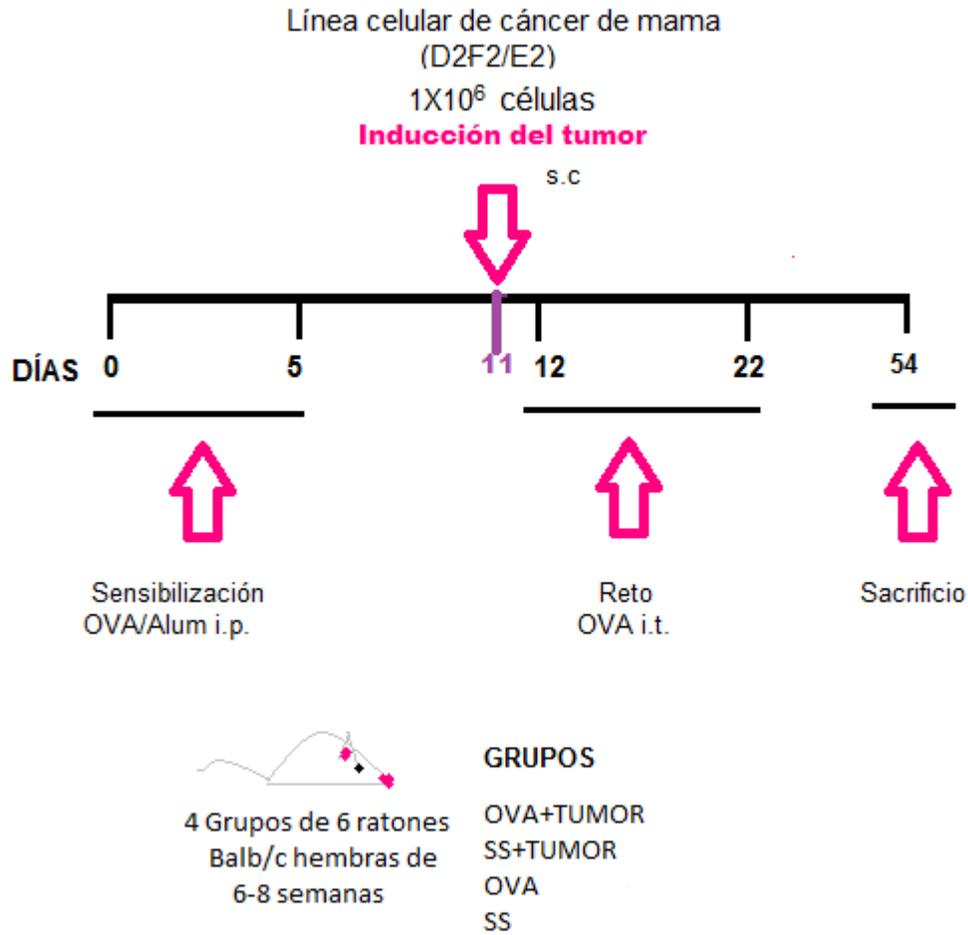
Los métodos utilizados se presentaran en forma de diagrama de flujo como se muestra a continuación en el diagrama 1.

### ➤ **Reactivos y anticuerpos.**

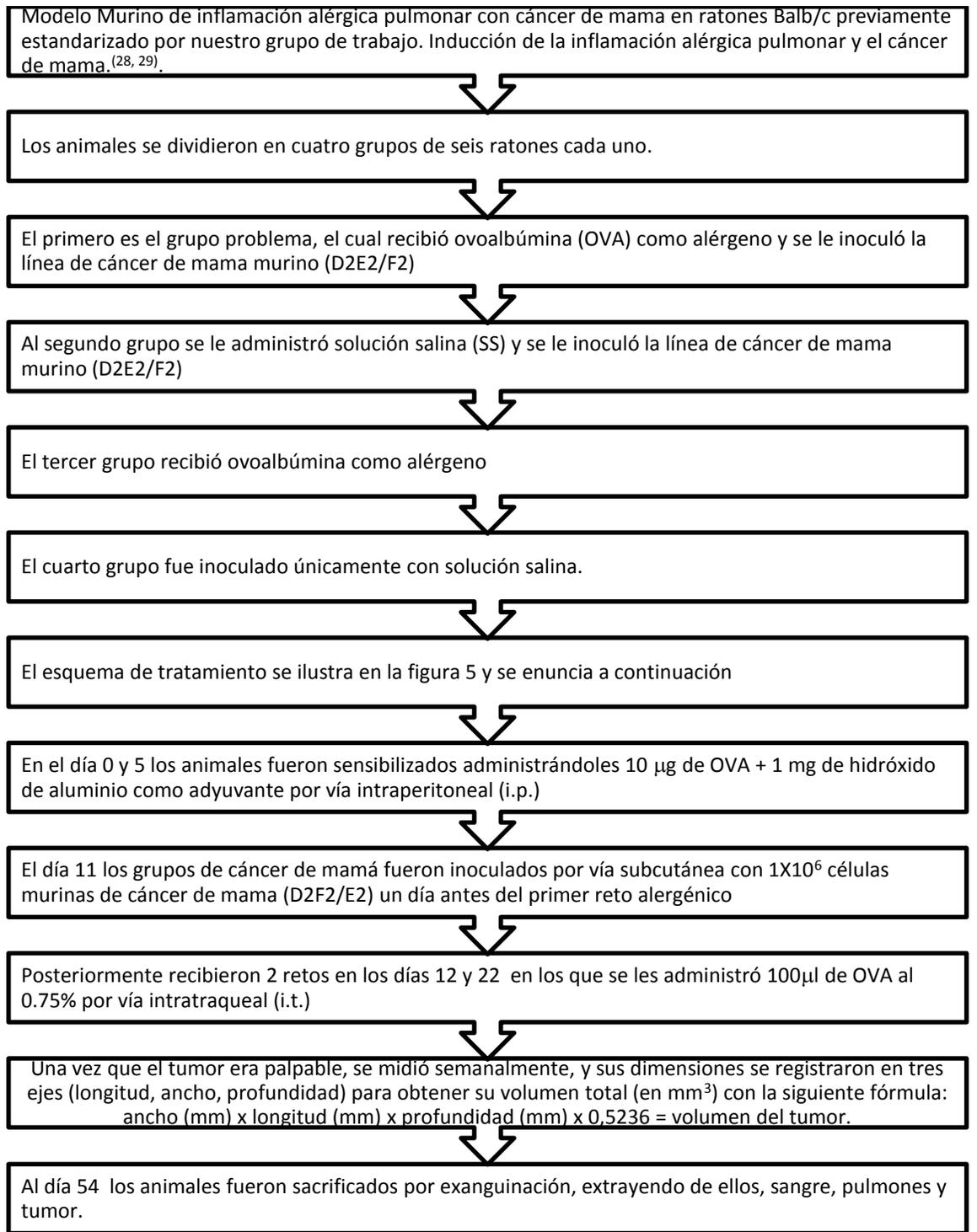
OVA (ovoalbúmina) grado V se adquirió de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) de hidróxido de aluminio (alumbre) se obtuvo de Biotecnología Pierce (Rockford, IL, EE.UU.) anti-PCNA y anti-TGF $\beta$  y anticuerpos anti-cabra conjugados con biotina se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.).

➤ Figura 5.

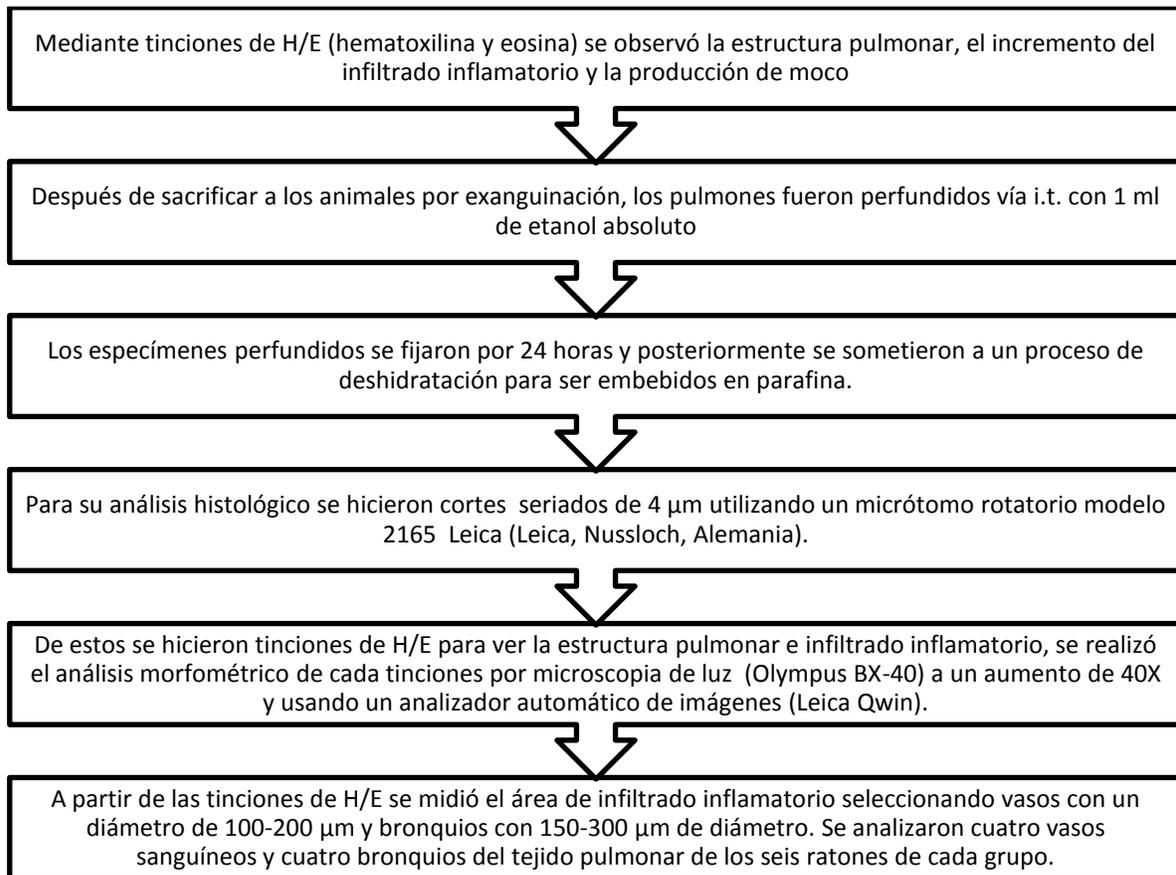
### Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar y cáncer



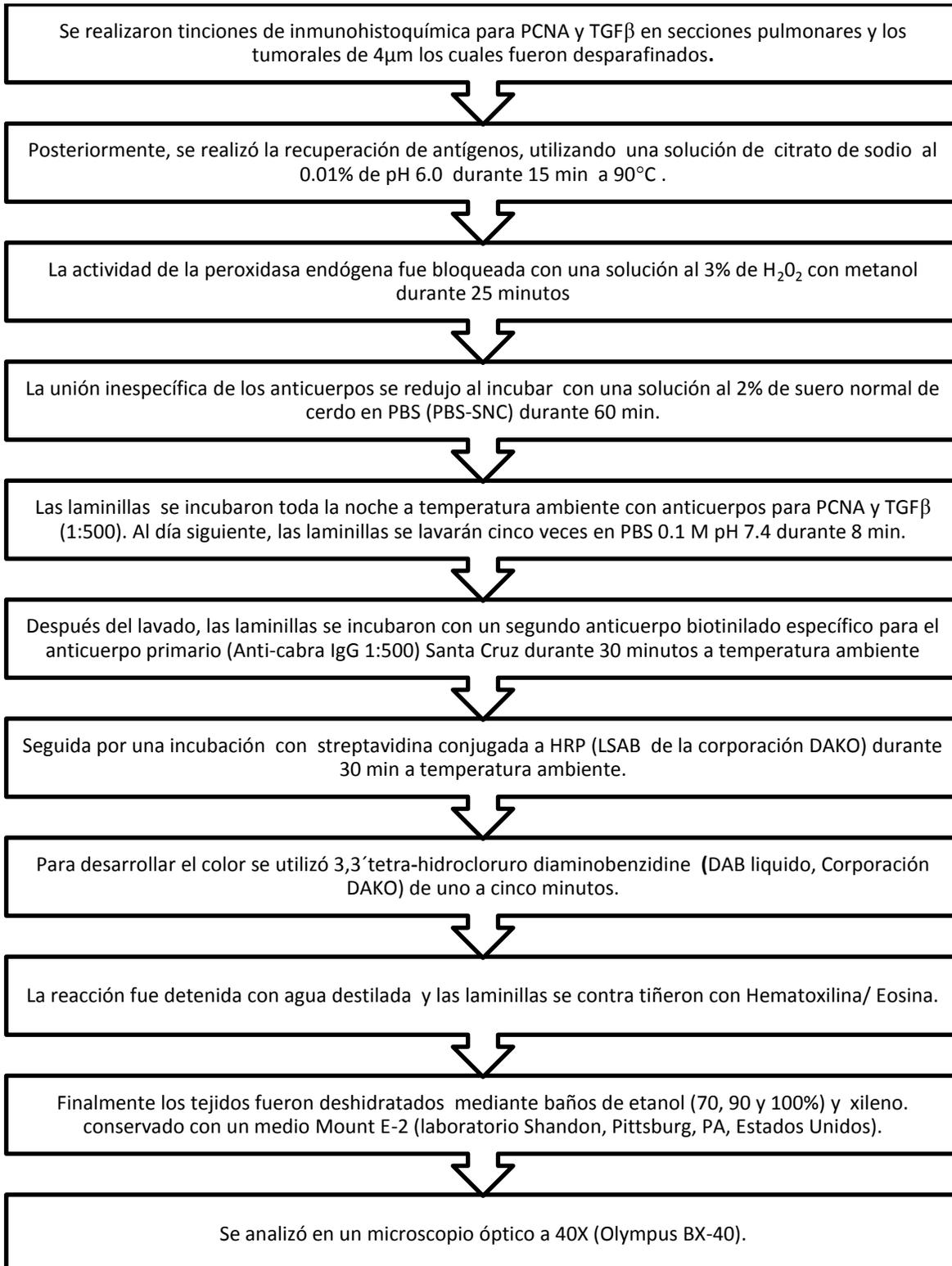
➤ **Diagrama 1. Modelo experimental de la inflamación pulmonar alérgica y el cáncer de mama en ratones Balb/c**



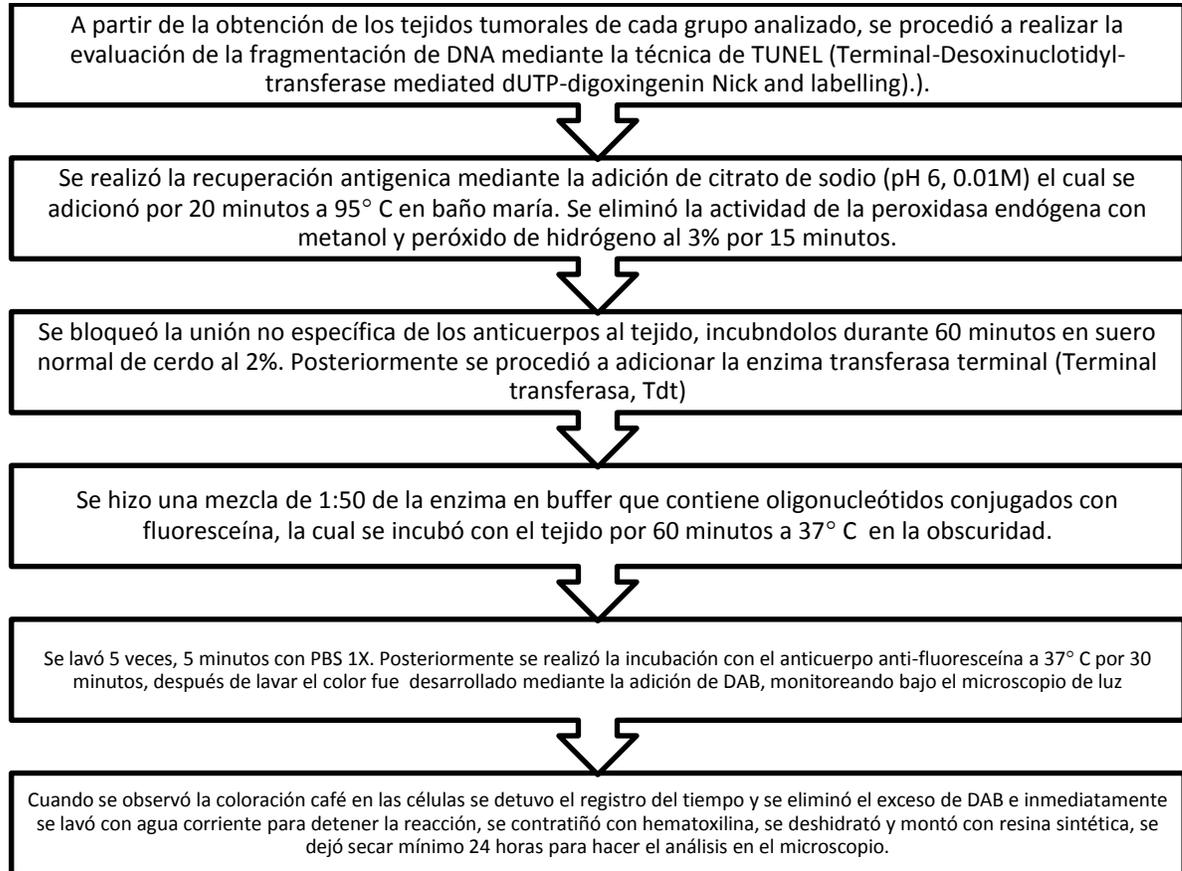
➤ **Diagrama 2. Histología del tejido tumoral**



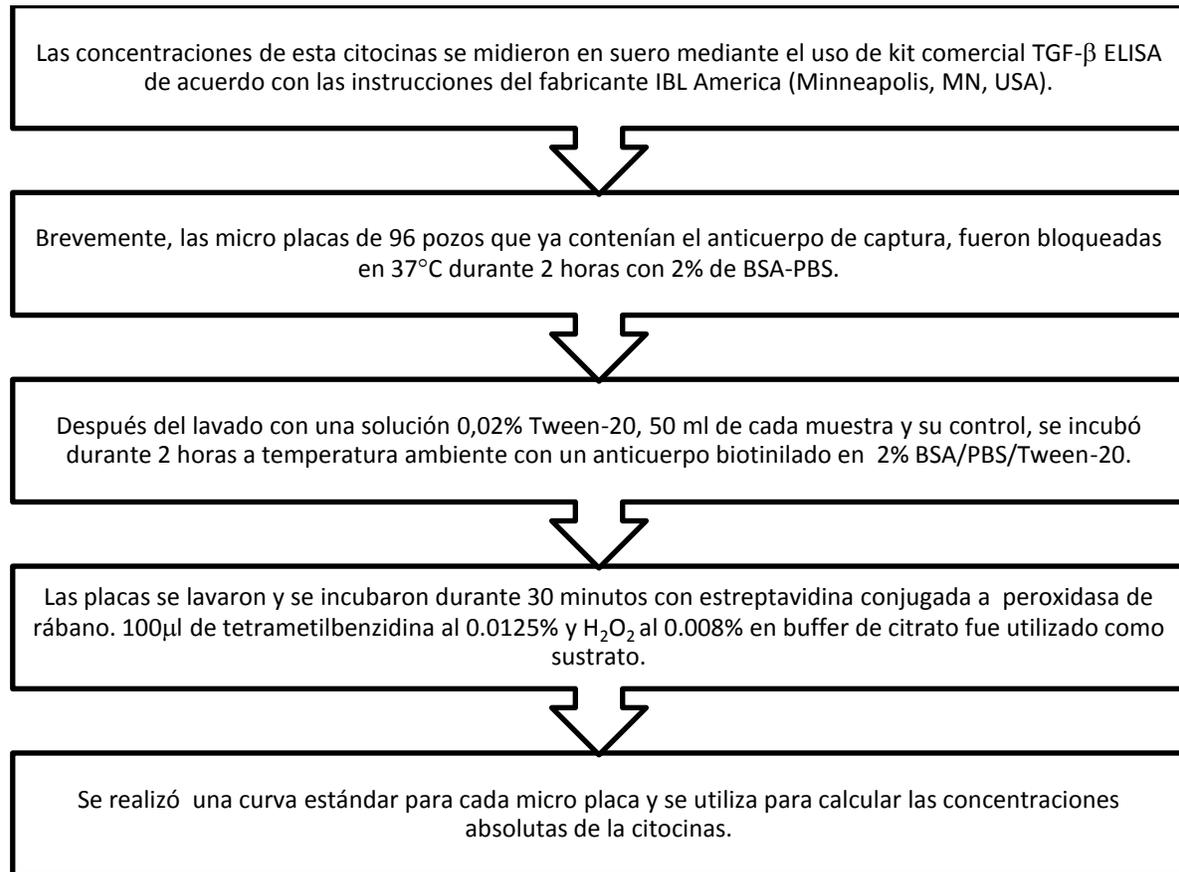
➤ **Diagrama 3. Inmunohistoquímica**



➤ **Diagrama 4. TUNEL para determinación de apoptosis en células tumorales.**



➤ **Diagrama 5. ELISA para determinación de TGF- $\beta$**



➤ **El análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el paquete Prisma® y se expresan como valores promedio  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante ANOVA para determinar diferencias entre los grupos. Las diferencias significativas entre ambos grupos se determinaron mediante la prueba t de Student, y las diferencias significativas entre tres o más grupos se determinaron con ANOVA y pos hoc Tukey o post-test de Bonferroni y U de Mann-Whitney. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

## IX. Resultados

### **La Inflamación alérgica pulmonar inhibe la progresión de cáncer en el modelo experimental de cáncer de mama**

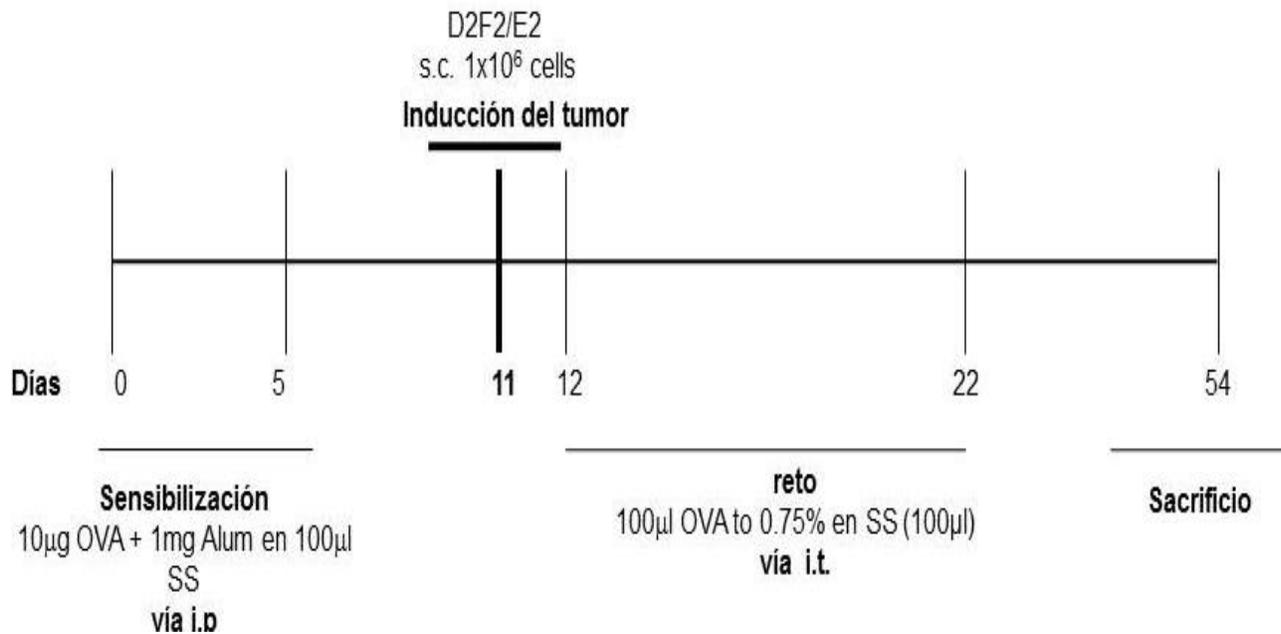
Para evaluar si el ambiente inmunológico de la inflamación alérgica puede afectar a la progresión del tumor, se utilizó un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar previamente establecido por nuestro grupo de investigación (18-20).

Posteriormente se implantaron las células de cáncer de mama murino (D2F2/E2) en los ratones Balb/ c, como se describe en el esquema mostrado en la Figura 6.

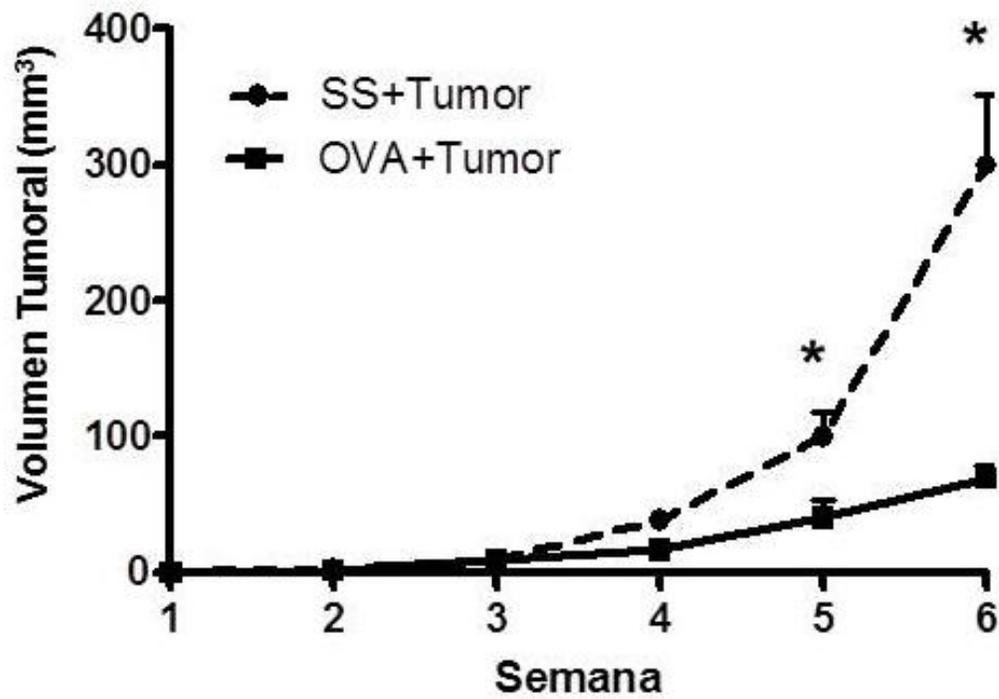
La Figura 7 muestra una disminución significativa ( $p= 0.001$ ) de aproximadamente 350 veces en el volumen tumoral medido en el grupo con la alergia (OVA+tumor) en comparación con el grupo no alérgico con tumor (SS+tumor).

Un análisis de la proliferación celular por tinción inmunohistoquímica del antígeno nuclear de células en proliferación (por sus siglas en inglés "PCNA") Figura 8a mostró un número significativamente menor de células en división (50% aproximadamente) en el grupo de OVA+tumor en comparación con lo observado en el grupo del SS+tumor ( $p=0,05$ ). En contraste, en el análisis de TUNEL *in situ* se demostró que la proporción de células apoptóticas en el grupo de OVA+tumor fue significativamente mayor ( $p=0.04$ ) que en el grupo de SS+tumor (25% aproximadamente) (Figura 8b).

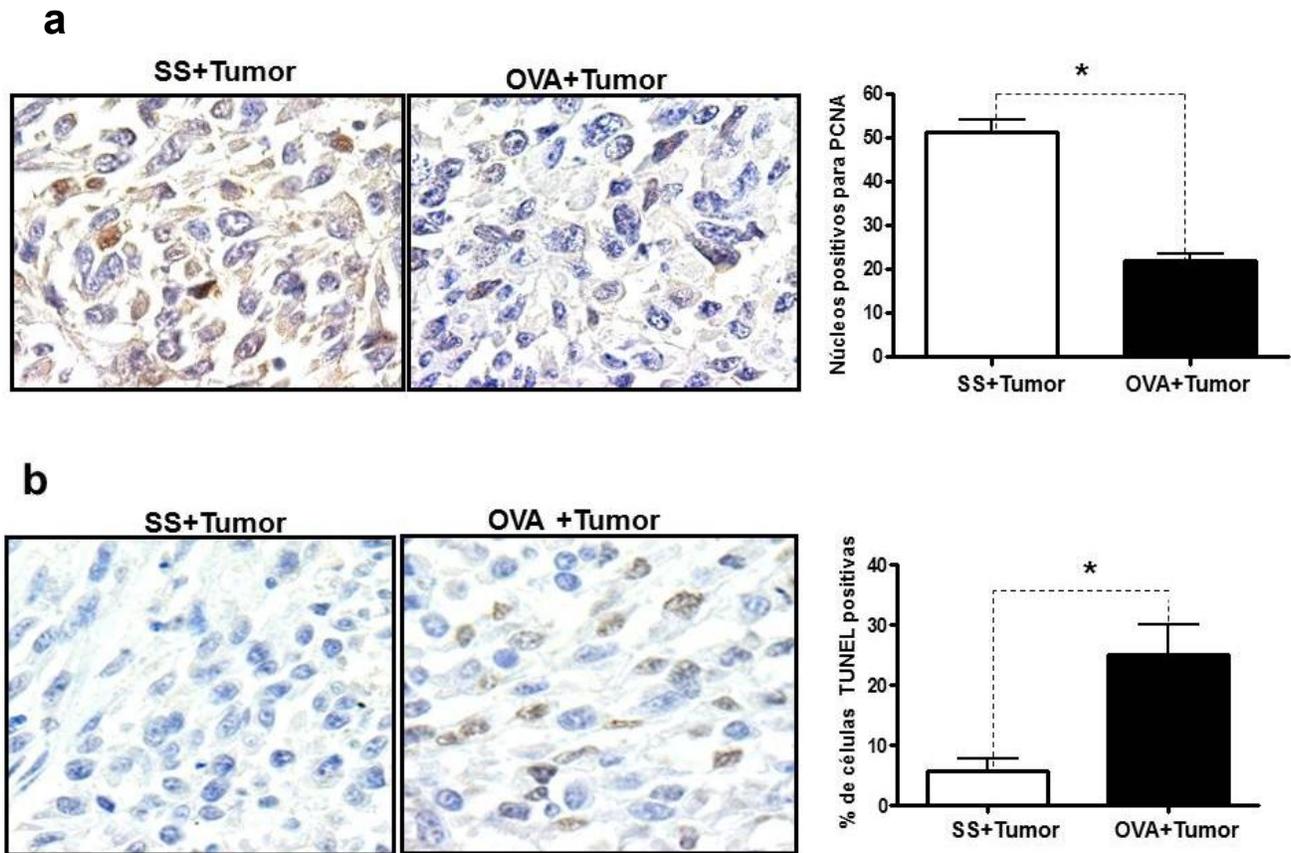
Los resultados obtenidos sugieren que el ambiente inflamatorio en los ratones alérgicos reduce el crecimiento del tumor mediante la inhibición de la proliferación y la inducción de la muerte celular por apoptosis.



**Figura 6.** La inflamación de las vías respiratorias alérgicas inhibe el crecimiento del tumor. A) Modelo murino de inflamación alérgica pulmonar e inducción del tumor. Ratones BALB/c hembras fueron sensibilizados y retados con las concentraciones indicadas de ovoalbúmina (OVA) en los puntos de tiempo indicados. El crecimiento tumoral de cáncer de mama fue inducido por la inoculación de la línea celular D2F2/E2 en el punto de tiempo indicado. Al final del experimento, los ratones fueron sacrificados por exanguinación. Alum, hidróxido de aluminio, SS, solución salina; s.c.; subcutánea, i.p.; intraperitoneal, i.t., intratraqueal. Los diferentes grupos incluidos SS, OVA, SS+tumor y OVA+tumor.



**Figura 7. La inflamación alérgica pulmonar inhibe el crecimiento tumoral.** El crecimiento del tumor se evaluó semanalmente en los grupos de OVA+tumor y SS+tumor. Los resultados se expresan como las medias de tres experimentos independientes y desviación estándar. \* $p=0.001$  (t de Student).



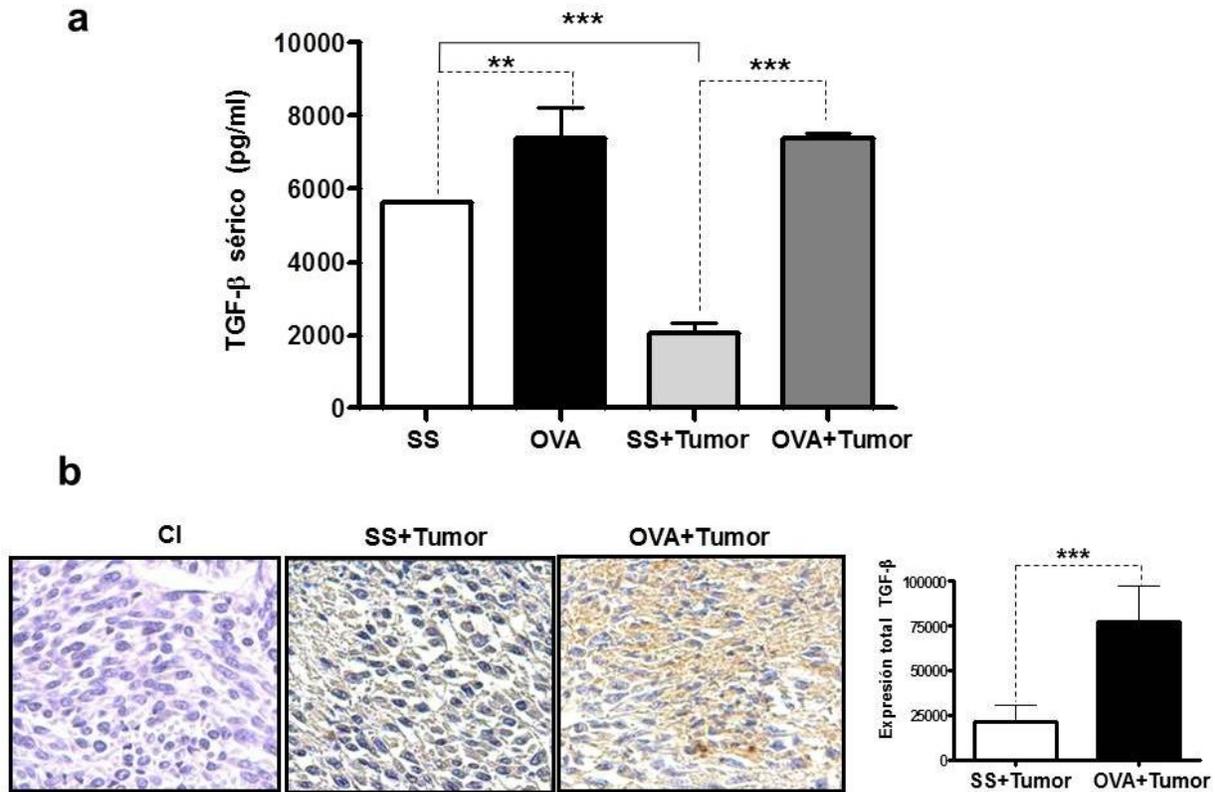
**Figura 8. La inflamación alérgica pulmonar induce disminución de la proliferación y aumento de la apoptosis en tejido tumoral.** Se analizaron muestras de los grupos de tumores de la OVA+tumor y SS+tumor para determinar la expresión de PCNA por inmunohistoquímica (PCNA), y la apoptosis se examinó mediante un ensayo de TUNEL *in situ*. Aumento=40X. PCNA \* $p=0.05$  (prueba de t de Student). TUNEL \* $p=0,05$ (U de Mann-Whitney).

## **La inflamación alérgica pulmonar induce la sobreexpresión de TGF- $\beta$ en suero y en el tejido tumoral**

La evaluación del mecanismo por el cual se observa una disminución del volumen tumoral se llevó a cabo mediante la técnica de detección de múltiples citocinas solubles por citometría de flujo (por sus siglas en inglés CBA`s), utilizando un arreglo para citocinas de perfil Th1/Th2/Th17 y además ensayos por ELISA, tanto en suero de los animales de los diferentes grupos, así como en sobrenadante de células provenientes de tejido tumorales y cultivadas por 24 h (datos no mostrados). Entre todas las citocinas evaluadas, nos llamó la atención el TGF- $\beta$  por los niveles de expresión tan elevados, sobre todo en el grupo de ratones alérgicos con tumor (OVA+tumor). Por lo que en el presente trabajo nos enfocamos en determinar su posible participación en la disminución del crecimiento tumoral en los ratones alérgicos. La Figura 9a muestra la concentración de TGF- $\beta$  en suero de los ratones. En donde se observa un claro aumento significativo en la concentración de TGF- $\beta$  en el grupo de OVA+Tumor en comparación con los animales SS+tumor ( $p=0.0001$ ). El grupo de ratones que sólo recibieron OVA también mostraron expresión elevada del TGF- $\beta$  en comparación con el grupo de control (SS) ( $p=0.001$ ), lo cual era de esperarse debido al proceso alérgico. De manera interesante, también se encontró un aumento de los niveles de TGF- $\beta$  en el tejido tumoral mediante análisis de inmunohistoquímica. Figura 9b (panel izquierdo) muestra la tinción de TGF- $\beta$  más intensa en el grupo OVA+tumor en comparación con el grupo del SS+tumor. Por otra parte, la cuantificación de la expresión intracelular de TGF- $\beta$  por patología digital mostró un aumento

significativo en la expresión en ratones alérgicos (Figura 9b, panel derecho) ( $p=0.01$ ).

En conjunto estos resultados muestran que hay una sobreexpresión de TGF- $\beta$  a nivel sistémico y tumoral, por lo que esta citocina puede estar implicada en la inhibición del crecimiento tumoral.



**Figura 9. La Inflamación alérgica de las vías aéreas induce la sobreexpresión de TGF- $\beta$ .** a. Expresión de TGF- $\beta$  El nivel de TGF -  $\beta$  sistémico se evaluó en el suero de los grupos de SS, OVA, SS+tumor y OVA+tumor por ELISA cuantitativa. Las determinaciones se realizaron por triplicado usando una mezcla de sueros de los animales de cada grupo. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican el error estándar de la media (\*\* $p=0.001$ ) SS frente a OVA, (\*\* $p=0.0001$ ) SS+tumor frente a OVA+tumor (prueba t de Student con la corrección de Bonferroni). b) La expresión intracelular de TGF- $\beta$  se evaluó en muestras tumorales de SS+tumor y los ratones OVA+tumor mediante inmunohistoquímica. La especificidad del anticuerpo se verificó utilizando un anticuerpo control de isotipo (CI). La densidad de la expresión se evaluó por la patología digital usando el sistema de Aperio CS (panel derecho) (\* $p=0.01$ ). Las micrografías son representativas de tres experimentos independientes. Aumento = 40X.

## X. Discusión

Desde hace mucho tiempo se ha tratado de asociar a las enfermedades alérgicas con el desarrollo del cáncer. La mayoría de los datos existentes muestran evidencias epidemiológicas, los resultados obtenidos de estos trabajos no han llegado a un consenso en donde se aclare si la alergia protege o favorece el desarrollo del cáncer <sup>(22-25)</sup>; por lo que es aceptado hasta el momento que existen datos contradictorios con respecto a la asociación de la enfermedad alérgica y el cáncer. Aunque estos dos procesos se han estudiado juntos en un único modelo experimental, ningún estudio ha evaluado funcionalmente los efectos de la inflamación alérgica pulmonar, que es característica del asma, en el desarrollo del cáncer de mama.

Un estudio reciente presentó un modelo de inflamación alérgica pulmonar inducido por OVA y cáncer de pulmón provocado por uretano, en donde encontraron que el proceso alérgico no tenía ninguna influencia en el desarrollo de la neoplasia <sup>(3)</sup>. Sin embargo, es muy importante enfatizar que el modelo anterior evalúa la carcinogénesis, la cual es inducida por el uretano. Por otro lado, como ya se mencionó, recientemente se ha demostrado que el bloqueo de la expresión de TGF- $\beta$  en animales con cáncer de pulmón inducida uretano (el mismo modelo de carcinogénesis ya mencionado) conduce a un aumento significativo en la progresión tumoral <sup>(28)</sup>. Este hallazgo pone en evidencia la importancia del TGF- $\beta$  en la supresión de la progresión del tumor, al menos en el caso de cáncer de pulmón inducido por productos químicos; aunque los estudios antes mencionados

no proporcionan información acerca de la progresión de los tumores durante una respuesta alérgica.

Los hallazgos anteriores demuestran que durante el proceso inflamatorio alérgico pulmonar no se encontró que la inflamación protegiera o aumentara la carcinogénesis. Por otro lado se observó que este mismo modelo de carcinogénesis la progresión tumoral dependía de manera importante de la actividad de TGF- $\beta$ .

En este estudio, se utilizó un modelo murino de inflamación alérgica pulmonar ya bien establecido por nuestro grupo de trabajo <sup>(34)</sup> para demostrar la influencia de este tipo de respuesta, que se caracteriza por un incremento en el TGF- $\beta$ , en la progresión del cáncer de mama. Inicialmente se compararon los volúmenes tumorales en animales alérgicos con los de los animales no alérgicos. Nuestros resultados demuestran por primera vez que el proceso inflamatorio alérgico inhibe significativamente el crecimiento del tumor. Este es el primer estudio que asocia directamente la relación inversa entre una enfermedad inflamatoria alérgica y el cáncer en un modelo experimental concomitante. Lo cual es muy relevante ya que antes de este estudio solo se habían hecho asociaciones entre las enfermedades alérgicas y el cáncer a partir de datos epidemiológicos <sup>(22-25)</sup>

Con el propósito de dilucidar el mecanismo mediante el cual ocurre la inhibición del crecimiento del tumor, realizamos una búsqueda de citocinas Th1/Th2/Th17 reguladoras mediante la técnica de detección de múltiples citocinas solubles utilizando citometría de flujo (CBA`s), y además ensayos de ELISA, tanto en suero de los animales de los diferentes grupos, así como en sobrenadante de células

provenientes de tejido tumoral y cultivadas por 24 h (datos no mostrados), lo cual evidenció que las citocinas más abundantemente expresadas fueron IL-17, IL-4 y TGF- $\beta$ . En este proyecto nos enfocamos en el estudio de los mecanismos (apoptosis y proliferación) que pueden estar participando en la inhibición de la progresión del tumor en nuestro modelo experimental. Nuestro interés se enfocó en TGF- $\beta$  pues es una de las citocinas más abundantemente expresada en inflamación alérgica pulmonar, además ha sido asociada con la severidad de la enfermedad pues se encontró altamente expresada en sangre periférica y líquido de lavado bronquioalveolar en pacientes con asma grave o con crisis asmática en comparación con pacientes con asma leve, moderada o controlada <sup>(26)</sup>. Nuestros resultados demostraron que TGF- $\beta$  se encuentra significativamente aumentado en el grupo de ratones alérgicos con tumor (OVA+Tumor) en comparación con los que solo presentaban tumor (SS+Tumor) (Figura 9). Por esta razón decidimos analizar de primera instancia el papel que TGF- $\beta$  pudiera tener en la inhibición del crecimiento tumoral. Lo anterior fue apoyado por evidencias ya publicadas en donde se demostró en este el TGF- $\beta$  está implicado de manera importante en la supresión de la progresión tumoral en un modelo experimental de cáncer de pulmón <sup>(27)</sup>. Nuestros resultados mostraron que la expresión de esta citocina aumentó en el suero y en el tejido del tumor en el grupo con OVA+tumor. Como ya se mencionó, se sabe que TGF- $\beta$  se encuentra sobre expresado en las enfermedades alérgicas, y esta sobreexpresión se correlaciona con la gravedad de la enfermedad <sup>(27, 28)</sup>, lo que explica la alta concentración de TGF- $\beta$  en ratones alérgicos. Sin embargo, el hecho de que el TGF- $\beta$  sólo aumentó en el grupo de

animales alérgicos con tumores (OVA+tumor) y no en los animales no alérgicos con tumor (SS+tumor) es muy interesante porque sugiere que el TGF- $\beta$  podría funcionar como un inhibidor del crecimiento tumoral en nuestro modelo experimental. Esta posibilidad es consistente con los datos reportados por Novitskiy S *et al.* <sup>(38)</sup>, estudio que incluyó más de 300 muestras de pacientes con cáncer de mama con diferentes grados de severidad incluidas en un microarreglo de tejido, analizado por medio de ensayos de inmunohistoquímica donde se demostró que la pérdida de los receptores de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI y T $\beta$ RII) y algunas de las proteínas que intervienen en la señalización de esta citocina (Smad4) en tejido tumoral está relacionada de manera directa con una mayor recurrencia y pobre sobrevida en pacientes con cáncer de mama.

Se sabe que el TGF- $\beta$  induce la apoptosis *in vitro* en células tumorales de linfoma No-Hodgkin a través la proteína anti-apoptótica Bcl-2 la cual es una de las proteínas más estudiadas en resistencia a la apoptosis en cáncer <sup>(39,40)</sup>. Nuestros resultados demostraron que el nivel de TGF- $\beta$  en el suero y el tumor de tejido se incrementaron en ratones alérgicos. Estudios recientes han señalado que el TGF- $\beta$ 1 induce la apoptosis en células epiteliales mediante la promoción de un cambio en la señalización a través de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)

A su vez, este cambio promueve la supervivencia a través de MAPK p38, lo que fomenta la apoptosis mediada por p38 <sup>(39)</sup>. Este hallazgo es interesante porque VEGF es otra citocina que se sabe que contribuyen a la patogénesis de la inflamación alérgica pulmonar <sup>(40,41)</sup>. Por lo que consideramos pertinente evaluar el

papel de esta vía en la inducción de apoptosis en nuestro modelo y determinar si también podría ser una de las causas de la inhibición de la progresión del tumor. Los resultados obtenidos en este estudio, son consistentes con los de Pinto *et al.* <sup>(42)</sup> en donde se sugiere que una condición concomitante de tumor con alergia (a los alimentos) reduce la progresión del tumor a través de un aumento en la apoptosis de células tumorales acompañado por el aumento de las zonas de necrosis en el sitio del tumor.

Como ya se comentó el TGF- $\beta$  presenta una actividad dual, es decir que puede inducir el crecimiento tumoral, pero también puede inhibirlo, todo dependiendo del microambiente tumoral y el grado de progresión del mismo. Nosotros consideramos que en etapas avanzadas, es decir cuando la progresión del tumor ya se llevó a cabo esta citocina puede inducir por diferentes mecanismos, entre ellos los que se describieron en este trabajo, tal como la inhibición de la proliferación tumoral y la inducción de apoptosis de células tumorales. Lo cual conlleva a una menor progresión del tumor.

## XI. Conclusiones

En conclusión, nuestros resultados muestran por primera vez en un modelo experimental que existe una relación inversa entre la inflamación alérgica pulmonar y la progresión tumoral causada, probablemente, por el ambiente inflamatorio generado durante la inflamación alérgica pulmonar que induce una disminución en el crecimiento tumoral, un aumento en la apoptosis y la disminución de la proliferación de las células tumorales, debida, por lo menos en parte, al aumento de la expresión de TGF- $\beta$  durante la inflamación alérgica pulmonar.

## XII. Referencias

1. Linabery AM, Erhardt EB, Fonstad RK, Ambinder RF, Bunin GR, Ross JA, et al. Infectious, autoimmune and allergic diseases and risk of Hodgkin lymphoma in children and adolescents: *Int J Cancer* 2014; 135(6):1454-69.
2. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer I* 2007; 99(20):1544-50.
3. Doris K, Karabela SP, Kairi CA, Simoes DC, Roussos C, Zakynthinos SG, et al. Allergic inflammation does not impact chemical-induced carcinogenesis in the lungs of mice. *Respir Res* 2010;11:118.
4. Karagiannis SN, Bracher MG, Hunt J, McCloskey N, Beavil RL, Beavil AJ, et al. IgE-antibody-dependent immunotherapy of solid tumors: cytotoxic and phagocytic mechanisms of eradication of ovarian cancer cells. *J Immunol* 2007;179(5):2832-43.
5. Luo X, Ding Q, Wang M, Li Z, Mao K, Sun B, et al. In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 in airway epithelium alleviates allergic asthma but aggravates lung carcinogenesis in mouse. *PLoS one*. 2010;5(4):e10149.
6. Elias JA. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Resp Crit Care* 2000;161:168-71.
7. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immuno*. 2008;8(3):205-17.
8. Jensen-Jarolim E, Pawelec G. The nascent field of AllergoOncology: *Cancer Immunol Immun* 2012;61(9):1355-7.
9. Josephs DH, Spicer JF, Corrigan CJ, Gould HJ, Karagiannis SN. Epidemiological associations of allergy, IgE and cancer. *Clin Exp Allergy* 2013;43(10):1110-23.
10. Sherman PW, Holland E, Sherman JS. Allergies: their role in cancer prevention. *Q Rev Biol* 2008;83(4):339-62.
11. Capietto AH, Martinet L, Fournie JJ. Stimulated gammadelta T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *J Immunol*. 2011;187(2):1031-8.
12. Richardsen E, Uglehus RD, Johnsen SH, Busund LT. Immunohistochemical expression of epithelial and stromal immunomodulatory signalling molecules is a prognostic indicator in breast cancer. *BMC research notes*. 2012;5:110.

13. Vojtechova P, Martin R. The association of atopic diseases with breast, prostate, and colorectal cancers: a meta-analysis *Cancer Cause Control*. 2009 20:1091–1105
14. International Agency for Research in Cancer WHO. GLOBOCAN 2012; Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012.
15. Organización Panamericana de la Salud. Nota informativa 2014
16. Brandan ME, Villaseñor NY. Detección del cancer de mama. Estado de la mamografía en México. *Rev Inst Nal Cancerol, México DF*. 2006;1(3):201-10.
17. Elias Sonia CA, Llanque C. Cancer o carcinoma de mama. *Rev Paceaña Med Fam*. 2008;5(7):14-23.
18. Martinez-Tlahuel J D-GA, Mertinez-Cedillo A, Rivera-Rubí L Boletín de Práctica Médica Efectiva, Cáncer de mama. Secretaría de Salud, INSP2007. p.1-6.
19. Instituto Nacional de Estadística y Geografía IA, México. “Estadísticas a Propósito del Día Internacional contra el Cáncer de mama” Datos Nacionales. . Octubre 2013.
20. Rasero JF. Sobre animales y cáncer de mama. Reportaje investigación en la Universidad de Córdoba. 2003.
21. Bastida Segura DL, Lopez Velasquez B, Castrejon Vazquez MI, Galicia Tapia J, Cano Altamirano S, Miranda Feria AJ. Allergic asthma and interleukins 2, 4, 5, 6 and 12 and gamma interferon levels. *Rev Alergia Mex*. 2004;51(3):107-15.
22. Prasad Kerlin M. In the clinic. Asthma. *Ann Intern Med*. 2014;160(5):2-15;6-9.
23. Lowcock EC, Cotterchio M, Ahmad N. Association between allergies, asthma, and breast cancer risk among women in Ontario, Canada. *Cancer Cause Control* 2013;24(5):1053-6.
24. Kim H, Mazza J. Asthma. Allergy, asthma, and clinical immunology: *Allergy Asthma Clin Immunol* 2011;7 Suppl 1:S2.
25. Van Hemelrijck M, Garmo H, Binda E, Hayday A, Karagiannis SN, Hammar N, et al. Immunoglobulin E and cancer: a meta-analysis and a large Swedish cohort study. *Cancer Cause Control*. 2010;21(10):1657-67.
26. El-Zein M, Parent ME, Siemiatycki J, Rousseau MC. History of allergic diseases and lung cancer risk. *Ann Allerg Asthma Im*. 2014;112(3):230-6.

27. Salib RJ, Howarth PH. Transforming growth factor-beta in allergic inflammatory disease of the upper airways: friend or foe? *Clin Exp Allergy* 2009 August;39(8):1128-35.
28. Shi HZ, Qin XJ. CD4 CD25 regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. *Allergy*. 2005;60(8):986-95.
29. Tandon A, Tovey JC, Sharma A, Gupta R, Mohan RR. Role of transforming growth factor beta in corneal function,biology and pathology. *Curr Mol Med*. 565-678.1-8-2010.
30. De CG, Hinck CS, Shu Z, Zuniga J, Yang J, Tang Y, Baardsnes J, Mendoza V, Sun L, Lopez-Casillas F, O'Connor-McCourt M, Hinck AP. Three key residues underlie the differential affinity of the TGFbeta isoforms for the TGFbeta type II receptor. *J Mol Biol*. 2006.6;355(1):47-62
31. Kruijf E. M, Dekker L, Hawinkels, et al. The prognostic role of TGF-b signaling pathway in breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2012 1–7.
32. Heron MI, Rakusan K. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) detection of cellular proliferation in hypothyroid and hyperthyroid rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(7):1393-403.
33. Simoes DC, Xanthou G, Petrochilou K, Panoutsakopoulou V, Roussos C, Gratziou C. Osteopontin deficiency protects against airway remodeling and hyperresponsiveness in chronic asthma. *Am J Resp Crit Care*. 2009;179(10):894-902.
34. Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Zeidler M, Hernandez-Pando R, Vega MI, Garcia-Zepeda EA, et al. HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation. *Resp res*. 2012;13:60.
35. Baay-Guzman GJ, Huerta-Yepez S, Vega MI, Aguilar-Leon D, Campillos M, Blake J, et al. Role of CXCL13 in asthma: novel therapeutic target. *Chest*. 2012;141(4):886-94.
36. Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Bebenek IG, Hernandez-Pando R, Vega MI, Chi L, et al. Hypoxia inducible factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy*. 2011;66(7):909-18.
37. Huerta-Yepez S, Baay-Guzman GJ, Garcia-Zepeda R, Hernandez-Pando R, Vega MI, Gonzalez-Bonilla C, et al. 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clinical immunology*: *Clin Immunol* (2008;129(2):313-24.

38. Novitskiy SV, Pickup MW, Gorska AE, Owens P, Chytil A, Aakre M, et al. TGF-beta receptor II loss promotes mammary carcinoma progression by Th17 dependent mechanisms. *Cancer discovery*. 2011;1(5):430-41.
39. Saltzman A, Munro R, Searfoss G, Franks C, Jaye M, Ivashchenko Y. Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-XL downregulation: *Exp Cell Res* 1998;242(1):244-54.
40. Spender LC, O'Brien DI, Simpson D, Dutt D, Gregory CD, Allday MJ, et al. TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL. *Cell death and differentiation: Cell Death Differ*. 2009;16(4):593-602.
41. Ferrari G, Terushkin V, Wolff MJ, Zhang X, Valacca C, Poggio P, et al. TGF-beta1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38beta to proapoptotic p38alpha. *Mol Cancer RES*. 2012;10(5):605-14.
42. Matsuda A, Fukuda S, Matsumoto K, Saito H. Th1/Th2 cytokines reciprocally regulate in vitro pulmonary angiogenesis via CXC chemokine synthesis. *Am J Resp Cell Mol*. 2008;38(2):168-75.
43. Meyer N, Akdis CA. Vascular endothelial growth factor as a key inducer of angiogenesis in the asthmatic airways. *Curr Allergy Asthm R*. 2013;13(1):1-9.
44. Pinto FC, Menezes GB, Moura SA, Cassali GD, Teixeira MM, Cara DC. Induction of apoptosis in tumor cells as a mechanism of tumor growth reduction in allergic mice. *Pathol Res Pract*. 2009;205(8):559-67.