



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CITOCINAS EN  
EL MASTOCITO POR EFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS DE  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A :  
ALAN FABRICIO CANO MÉNDEZ

ASESORA: DRA. SAMIRA MUÑOZ CRUZ  
COASESORA: M. en C. ANA LAURA VÁZQUEZ  
MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de la expresión diferencial de citocinas en el mastocito por efecto de medios condicionados de células de cáncer de mama.

Que presenta el pasante: Alan Fabricio Cano Méndez  
Con número de cuenta: 413003470 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Febrero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
<b>VOCAL</b>	M en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Nydia Berenice González Angeles	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

El presente trabajo forma parte del proyecto “Estudio de la comunicación entre mastocitos y células tumorales de cáncer de mama”, a cargo de la Dra. Samira Muñoz Cruz, con clave de proyecto CONACYT **223678**, el cual inicio en el año 2015. La parte correspondiente a este trabajo experimental, se realizó durante el periodo Julio de 2016 – Diciembre de 2016, con No. de becario CONACYT **24502**, en el laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

## DEDICATORIAS

A mi mamá Liliana Méndez Gómez: mi mejor amiga, mi confidente, mi fortaleza y mi debilidad, gracias por estar ahí incondicionalmente.

A mi papá José Fabricio Cano Hernández por ser el pilar de la casa, esa fortaleza y sensatez que tantas veces he necesitado, por su carisma y amor.

A mi Negrita y a mi Pollito, con quien he pasado los mejores momentos de mi vida y porque me han hecho esforzarme enormemente para poder ser un buen ejemplo para ellas. Familia, nunca olviden que los amo para siempre y que esté logro es gracias a ustedes, somos la mejor familia que existe.

A mi Güare Estelita quien me ha demostrado ser la guerrera más fuerte que he conocido, a mi Yabu porque ha sido, es y será siempre mi ejemplo a seguir, a mi mamá Febe, la mejor abuela que se puede tener, a Kazu con quien cada día es una historia diferente, siempre con un nuevo aprendizaje y a mis abuelos Leo y papá Polo a quiénes llevo siempre en el corazón, estaré eternamente agradecido por su amor.

“La vida es una oportunidad, aprovéchala, es bella, admírala, es un sueño, alcánzalo, es desafío, enfréntalo, es juego, juégalo” **M.T.C**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar al lugar donde estoy.

A la Dra. Samira Muñoz Cruz, por confiar en mí, por su paciencia y todas las enseñanzas que me aportó, gracias por el espacio en su laboratorio, por su tiempo y por inculcarme la pasión por la investigación.

A la Mtra. Ana Laura por su apoyo incondicional para que se llevara a cabo éste proyecto y por creer en mí.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Parasitología del Hospital de Pediatría del CMNSXXI (Amparito, George, Don Chucho, Joel, a la M. en C. Angélica Aponte, a la Dra. Lilian Yépez y a sus estudiantes) por hacer de mi estancia un aprendizaje continuo, ameno y divertido.

A mi segunda casa la UNAM FES-Cuautitlán donde me formé, aprendí, crecí, reí con mis compañeros y donde tengo recuerdos que se quedarán para siempre en el corazón.

A la familia Cano-Hernández/Méndez-Gómez quienes han compartido conmigo este viaje y a quienes agradezco enormemente todo su apoyo para que esté sueño se concretará; no hago mención particular de cada uno porque me llevaría media tesis la lista, pero a cada uno de ustedes, GRACIAS.

A mi tía Cecy por ser una amiga y una segunda madre.

A mi BANDA (Andy, Cecy, Mich, Val, Alexis, Rafa y Roger), por haber sido una segunda familia para mí, los mejores momentos de la universidad fueron a su lado, los quiero mucho y agradezco a Dios haber cruzado nuestros caminos. Y a los mejores Roomies Paola y Rafa (los del 302), gracias por ser mis hermanos durante todo este tiempo, los quiero tanto.

A mis amigas Mitzy y Rosana, por su apoyo incondicional desde Morelia y porque a pesar de la distancia, siempre están ahí.

A Abraham, gracias hermanote por todo tú apoyo siempre, gracias por todos los buenos momentos que paso a tu lado, eres parte muy importante de éste logro, te quiero y te admiro demasiado.

A mis sinodales: Mtra. Ana, Mtra. Nydia, Mtra. Paola y a los Profes. Ángel y Alejandro. Por su tiempo y dedicación para realizar las correcciones necesarias a esté trabajo

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microambiente tumoral.....	6
<b>Figura 2.</b> Mastocito: receptores, ligandos y mediadores.....	9
<b>Figura 3.</b> Expresión genética de IL-4 en mastocitos HMC-1.....	29
<b>Figura 4.</b> Expresión genética de IL-5 en mastocitos HMC-1.....	30
<b>Figura 5.</b> Prueba de Tukey para IL-5.....	31
<b>Figura 6.</b> Expresión genética de TGF- $\beta$ en mastocitos HMC-1.....	32
<b>Figura 7.</b> Expresión genética de TNF- $\alpha$ en mastocitos HMC-1.....	33
<b>Figura 8.</b> Prueba de Tukey para TNF- $\alpha$ .....	34
<b>Figura 9.</b> Expresión genética de Triptasa en mastocitos HMC-1.....	35
<b>Figura 10.</b> Prueba de Tukey para Triptasa.....	36
<b>Figura 11.</b> Curvas de disociación correspondientes a cada gen analizado.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mediadores secretados por el mastocito: efecto y función en el desarrollo tumoral.....	12
<b>Tabla 2.</b> Relación entre la presencia de mastocitos en el microambiente tumoral mamario y el pronóstico en cáncer de mama.....	18
<b>Tabla 3.</b> Características de las líneas celulares de cáncer de mama.....	23
<b>Tabla 4.</b> Características de los iniciadores usados en la q-PCR.....	26

## ABREVIATURAS

<b>AhR</b>	Receptor de Aril hidrocarbano
<b>Ang-1</b>	Angiopoyetina 1
<b>bFGF</b>	Factor de Crecimiento Fibroblástico
<b>CCL11</b>	Proteína Quimiotáctica del Eosinófilo o Eotaxina
<b>CD</b>	Cumulo de Diferenciación
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>CDK</b>	Cinasas Dependientes de Ciclina
<b>COX</b>	Ciclooxigenasas
<b>CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias
<b>CTL</b>	Célula T Citotóxica
<b>DCIS</b>	Carcinoma Normal in Situ no invasivo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EMT</b>	Transición Epitelio Mesénquima
<b>FcεR1</b>	Receptor de alta Afinidad a Inmunoglobulina E
<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido-3-fosfato Deshidrogenasa
<b>GM-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
<b>HER-neu2</b>	Receptor para el Factor de Crecimiento Epidermal Humano
<b>HR</b>	Receptor para Histamina
<b>HMC-1</b>	Línea Celular de Mastocitos Humanos
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IFN-γ</b>	Interferón gamma
<b>IFNγR</b>	Receptor para Interferón gamma
<b>LTB4</b>	Leucotrieno B4
<b>LTC4</b>	Leucotrieno C4
<b>Mc</b>	Mastocito
<b>MPC</b>	Proteína Quimioatrayente de Monocitos
<b>MDSCs</b>	Células Supresoras de origen Mieloide
<b>MIP-α</b>	Proteína Inflamatoria de Macrófago α
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de Matriz
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
<b>NGF</b>	Factor de Crecimiento Nervioso
<b>NK</b>	Células Asesinas Naturales
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>PAF</b>	Factor Activador de Plaquetas
<b>PAMP</b>	Patrón Molecular Asociado a Patógeno
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PGD2</b>	Prostaglandina D2
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2 o Dinoprostona
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa o en tiempo real
<b>RE</b>	Receptor para Estrógeno
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>RP</b>	Receptor para Progesterona
<b>SCF</b>	Factor de Células Madre
<b>TAM</b>	Macrófago Asociado a Tumor
<b>TGF-β</b>	Factor de Crecimiento Transformante beta
<b>TNF-α</b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa

**TLR**  
**TME**  
**VEGF**

Receptor de Tipo Toll  
Microambiente Tumoral  
Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	2
2.1 Cáncer de mama.....	2
2.1.1 Epidemiología del cáncer de mama y situación actual en México.....	2
2.1.2 Clasificación del cáncer de mama.....	3
2.2 Cáncer e inflamación.....	4
2.3 Microambiente tumoral.....	5
2.4 Mastocito.....	7
2.4.1 Origen y distribución del mastocito.....	7
2.4.2 Receptores, activación y componentes de los granulos liberados por el mastocito.....	8
2.4.3 Factores solubles liberados por el mastocito y su relación con el cáncer.....	9
2.4.4 Triptasa.....	13
2.5 Citocinas y su relación con el cáncer.....	13
2.5.1 Interleucina 4 (IL-4).....	13
2.5.2 Interleucina 5 (IL-5).....	14
2.5.3 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	14
2.5.4 Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ).....	15
2.5.5 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).....	16
2.6 Papel de los mastocitos en el cáncer de mama.....	17
2.7 Importancia del estudio del papel del mastocito en el cáncer de mama.....	19
<b>3. Justificación</b> .....	20
<b>4. Objetivo general</b> .....	21
<b>5. Objetivos específicos</b> .....	21
<b>6. Hipótesis</b> .....	21
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	22
7.1 Cultivo de la línea células de mastocitos humanos HMC-1.....	22
7.2 Líneas celulares de cáncer de mama.....	22
7.3 Determinación de la viabilidad celular.....	23
7.4 Obtención de medios condicionados de las líneas celulares de cáncer de mama.....	24
7.5 Estimulación de la línea células de mastocitos humanos HMC-1 con los medios condicionados obtenidos de las células de cáncer de mama.....	24
7.6 Extracción y cuantificación de RNA.....	24
7.7 Síntesis de DNA complementario cDNA.....	25
7.8 Amplificación de DNA complementario por PCR tiempo real (qPCR).....	25
7.9 Análisis estadístico.....	27
<b>8. Diagrama de Trabajo</b> .....	28
<b>9. Resultados</b> .....	29
9.1 Expresión génica de IL-4.....	29
9.2 Expresión génica de IL-5.....	30
9.3 Expresión génica de TGF- $\beta$ .....	32
9.4 Expresión génica de TNF- $\alpha$ .....	33
9.5 Expresión génica de Triptasa.....	35
9.6 Expresión génica de IFN- $\gamma$ .....	36
9.7 Curvas de disociación.....	38
<b>10. Discusión</b> .....	39
<b>11. Conclusiones</b> .....	44
<b>12. Perspectivas</b> .....	45

**13. Referencias**..... 46  
**14. Anexos**..... 51  
    13.1 Anexo A..... 51

## 1. RESUMEN

Los mastocitos son células del sistema inmune que juegan un papel importante en el microambiente tumoral de diversos cánceres, pueden participar tanto en la promoción mediante la liberación de factores solubles pro-inflamatorios, pro-tumorales y pro-angiogénicos, como en la supresión del tumor a través de la inducción apoptótica de las células tumorales. Sin embargo este papel no está totalmente claro en el cáncer de mama, ya que, entre grupos de investigación, difieren en la relación que existe entre la presencia de infiltrados mastocitarios y el pronóstico del cáncer de mama para el paciente; por lo que es de suma importancia investigar más a fondo la comunicación que existe entre estas células en el microambiente tumoral. El objetivo de este proyecto fue determinar de manera *in vitro* la expresión a nivel de RNA mensajero, de factores importantes en el desarrollo del tumor, mediante la estimulación de la línea celular de mastocitos HMC-1 con medios condicionados obtenidos de 5 diferentes líneas celulares de cáncer de mama, que difieren en su grado de malignidad, mediante PCR en tiempo real. Lográndose observar un aumento significativo en la expresión de IL-5, TNF- $\alpha$  y triptasa, por otro lado la IL-4 disminuyó sus niveles de expresión en los mastocitos estimulados, sin ser un resultado significativo, esta citocina está involucrada en la inducción de la apoptosis de células tumorales, la expresión del TGF- $\beta$  no se vio alterada por los medios condicionados de las células de cáncer de mama; lo anterior sugiere que las células de cáncer de mama influyen en la respuesta del mastocito para su beneficio, favoreciendo su proliferación, perpetuidad y diseminación.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es una neoplasia maligna, la cual agrupa un número considerable de enfermedades en términos de presentación, morfología, características biológicas, patrón molecular, comportamiento clínico y respuesta a la terapia. Los tumores se caracterizan por presentar un curso variable de desarrollo y un ritmo no definido de crecimiento de sus células, con un intervalo de años desde la aparición de las primeras células malignas hasta el diagnóstico, o menos frecuentemente, un crecimiento rápido (Arango-Prado y Rodríguez-Padilla, 2016; Cortinas, 2011).

El cáncer es una enfermedad que se desencadena cuando existe una anomalía biológico-fisiológica en las células y éstas se dividen sin control (células transformadas o malignas). En el caso del cáncer de mama, las células del seno se dividen descontroladamente generando anomalías en el tejido (tumor o neoplasia) que puede derivar en cáncer. Si éstas células anormales poseen la capacidad de invadir los tejidos circundantes y propagarse, se les denomina como cancerígenas pues realizan metástasis, es decir, son capaces de generar tumores secundarios en otras áreas del organismo, empeorando el pronóstico del paciente (American Cancer Society, 2016).

El cáncer de mama es conocido y clasificado predominantemente como un padecimiento femenino pero también puede presentarse en pacientes masculinos. Según datos del INEGI, en 2015, por cada caso de nuevo de cáncer de mama en varones, se detectan 29 casos en mujeres (INEGI, 2016).

Aunque de la mayoría de los tumores o neoplasias que se detectan en seno, una gran proporción no tienen capacidad de invadir otros tejidos ni son potencialmente mortales (por lo que se clasifican como benignos) su diagnóstico temprano es muy importante pues incrementan el riesgo en el paciente de desarrollar malignidades posteriormente (American Cancer Society, 2016; INEGI, 2016).

#### **2.1.1 Epidemiología del cáncer de mama y situación actual en México**

Alrededor del mundo, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres con cerca de 500 mil decesos cada año, de las cuales el 70% ocurre en países en vías de desarrollo, de acuerdo a estadísticas del 2016, se espera que el cáncer de mama cubra el 29% de los nuevos diagnósticos de cáncer en mujeres (INEGI, 2015; Siegel y cols. 2016).

En México, el cáncer de mama ocupa en la actualidad el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres, representa 11.34% de todos los casos de cáncer, 3 de cada 10 mujeres con cáncer lo presentan en la mama.

Las tasas de mortalidad por este cáncer se incrementan conforme aumenta la edad. En 2013, 63 de cada 100 mil mujeres de 80 y más años fallecieron a causa de esta enfermedad. En el año 2015 la tasa estandarizada de mortalidad fue de 15.21 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49.5% en las últimas 2 décadas (Cárdenas y cols. 2015; INCAN, 2104; INEGI, 2016).

En nuestro país, el cáncer de mama se diagnostica en promedio a los 53 años de edad, lo que representa casi una década menor en comparación con los Estados Unidos de América, Canadá y algunos países de Europa, donde el promedio oscila alrededor de los 60 años (Cárdenas y cols. 2015).

### **2.1.2 Clasificación del cáncer de mama**

La identificación y clasificación del tumor en el cáncer de mama juega un papel muy importante en el diagnóstico y posterior tratamiento de los pacientes. Existen varias clasificaciones aprobadas por distintas instancias de salud especialistas en el tema, las cuales se basan en distintos criterios:

- 1) De acuerdo a su tipo histológico
- 2) Según el grado histológico
- 3) Sistema TNM (Tamaño y extensión del tumor, diseminación a Nódulos linfáticos, Metastásis), basado en la etapa clínica que cursa el cáncer
- 4) Con base en el perfil molecular (INCAN, 2014).

El grado histológico evalúa el nivel de diferenciación de la célula tumoral. Histológicamente un grado con un número menor indica un cáncer de crecimiento más lento y que es menos probable que se propague, mientras que un número mayor indica lo contrario. El grado del tumor es un factor que se toma en consideración al momento de decidir si es necesario administrar tratamiento adicional después de la cirugía.

- 1) Grado 1: bien diferenciado
- 2) Grado 2: moderadamente diferenciado
- 3) Grado 3: pobremente diferenciado

Los tipos de cáncer con grado 3 suelen crecer y propagarse más rápidamente (American Cancer Society, 2016).

El sistema TNM evalúa varios aspectos del tumor como son: el tamaño, la evidencia de presencia de células tumorales en nódulos linfáticos y si existe o no metástasis, Los resultados se combinan para determinar el estadio del cáncer de cada persona. Existen cinco estadios: estadio 0 (cero), que es carcinoma *in situ* no invasivo y los estadios I a IV (uno a cuatro), que representan cáncer de mama invasivo. El estadio es una forma frecuente de describir el cáncer, de manera que se puedan planificar de forma conjunta los mejores tratamientos (American Cancer Society, 2016).

Además existe la clasificación basada en la expresión de receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP), del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano o HER2-neu 2 y otros marcadores como Ki67 y citoqueratinas 5 y 6. Esta clasificación comprende 4 subtipos principales de cáncer de mama:

- 1) Luminal A: inmunofenotipo RE (+) y/o RP (+), HER2/neu (-)
- 2) Luminal B: inmunofenotipo RE (+) y/o RP (+), HER2/neu (+)
- 3) Similar a basal o triple negativo: inmunofenotipo RE (-), RP (-), HER2/neu (-)
- 4) HER/Neu2: inmunofenotipo RE (-) y/o RP (-), HER2/neu (+)

Esta última clasificación permite a los especialistas abordar la enfermedad con quimioterapias dirigidas de acuerdo al tipo de receptores expresados en las células cancerígenas (American Cancer Society, 2016).

## **2.2 Cáncer e inflamación**

El proceso mediante el cual se desencadena el inicio del cáncer es hasta la fecha desconocido, pero existen varias hipótesis. Se ha observado que la inflamación juega un papel importante en dicho proceso, esta interacción fue observada por primera vez por Rudolf Virchow en el siglo XIX, quien descubrió la presencia de infiltrados leucocitarios en tejidos tumorales. El proceso inflamatorio se ha relacionado con la promoción del tumor, angiogénesis y metástasis dependiendo de la etapa en la que se encuentra el tumor; se ha descrito que en etapas tempranas del tumor, una respuesta inflamatoria contribuye al control del mismo. Este proceso es consecuencia de la atracción de células inflamatorias por cambios oncogénicos, hipoxia, citocinas y quimiocinas, entre otros factores (Esquivel-Velázquez y cols. 2015; Ribatti, 2013).

Una de las funciones más importantes de la defensa del hospedero contra el tumor y que se ha identificado como crítica en el control de la diseminación y crecimiento del cáncer es la respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+ (CTLs), seguida del reconocimiento de los antígenos de las células tumorales presentadas por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (HMC clase I), mientras que las células inflamatorias como los macrófagos, neutrófilos y mastocitos, pueden producir factores de crecimiento e interleucinas proinflamatorias que suprimen la respuesta inmune anti-tumoral (Thiago y cols, 2015; Ribatti, 2013).

Sin embargo, la perpetuación del cáncer en tejido mamario y sus mediadores, pueden originar cambios inflamatorios crónicos que favorecen al desarrollo del tumor, estos cambios se asocian a la presencia de células supresoras de origen mieloide o MDSC's, patrones de linfocitos CD4+ Th2 y células T reguladoras (T reg), las cuales inhiben la citotoxicidad de los CTL CD8+ y polarizan la respuesta, induciendo un cambio en las células inflamatorias como es el caso de macrófagos tipo 1 a macrófagos asociados a tumor (TAMs) o tipo 2, con la secreción de citocinas supresoras como IL-4, IL-13, IL-10, el factor de

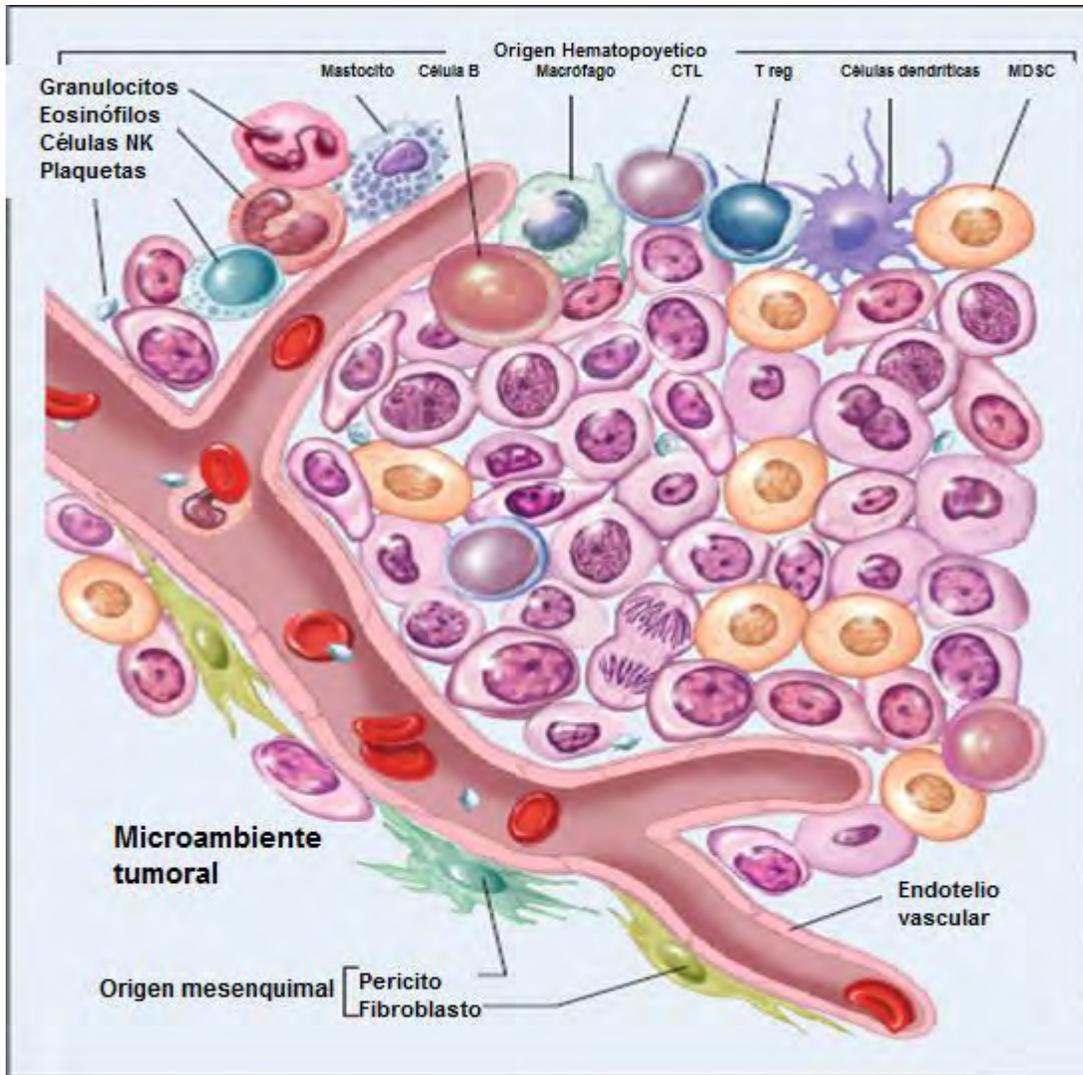
crecimiento transformante  $\beta$  y la secreción de factores angiogénicos (Arango-Prado y Rodríguez-Padilla, 2016).

### **2.3 Microambiente tumoral**

En el microambiente tumoral o TME, están interaccionando células del sistema inmune innato como: neutrófilos, macrófagos, mastocitos, células supresoras derivadas de línea mieloide (MDSCs), células NK, células dendríticas, así como células del sistema inmune adaptativo (Linfocitos T y B), células cancerígenas, células del estroma, entre otras moléculas solubles. Estas interacciones son múltiples y complejas; bajo ciertas circunstancias estos componentes pueden orquestar una respuesta del hospedero contra el tumor o contradictoriamente favorecer el crecimiento tumoral, la inmunosupresión local, progresión y metástasis (Luca y cols. 2015; Thiago y cols. 2015).

Las células del sistema inmune que se encuentran en el TME principalmente, son linfocitos de tipo 1 (Th1) y linfocitos T citotóxicos CD8+, que en condiciones particulares ejercen un efecto favorable anti-tumorigénico. En contraste otra de las poblaciones con basta presencia son los macrófagos asociados a tumores (TAMs) los cuales correlacionan con un mal pronóstico en la mayoría de los cánceres (Thiago y cols. 2015).

De igual manera se ha demostrado la presencia del mastocito en el microambiente tumoral. Muchos estudios *in vitro* han demostrado que los mastocitos tienen el potencial de influenciar muchos aspectos de la biología del tumor, incluyendo promoción o arresto del cáncer (Ribatti, 2013; Marichal y cols. 2013). Aún con los conocimientos actuales del papel del mastocito en el TME, el rol *in vivo* de estas células es controversial (Marichal y cols. 2013).



**Figura 1. Microambiente Tumoral.** El microambiente tumoral está formado por un gran número de células del sistema inmune que contribuyen al crecimiento y malignidad del cáncer. Los tumores poseen infiltrados celulares tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, tales como las MDSCs, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, células NK y linfocitos. Estas células están coordinadas por una compleja red reguladora que estimula el crecimiento del tumor creando un microambiente que permite al cáncer evadir el sistema inmune. Modificado de Kerkar S & Restifo N, 2012.

Desde la primera observación de infiltrados mastocitarios en el microambiente tumoral, el interés de la contribución de los mastocitos al crecimiento del tumor ha incrementado progresivamente; ya que estas células se acumulan alrededor de diversos tipos de tumores y generalmente son las primeras células inflamatorias en infiltrarse durante el desarrollo de tumores como el melanoma, el cáncer de mama y tumores colorectales (De Souza y cols. 2015).

## 2.4 Mastocitos

### 2.4.1 Origen y distribución del mastocito

Mastocito del alemán “Mastzellen” que significa células bien alimentadas (por lo que existen referencias donde se les nombra células cebadas), fueron descritas hace más de 135 años por Paul Ehrlich. Son células inmunes mononucleadas granulocíticas provenientes de medula ósea, circulan por torrente sanguíneo en forma de precursor inmaduro y las cuales adquieren un fenotipo maduro en su tejido blanco bajo el efecto de citocinas locales, como el Factor de Células Madre (SCF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y algunas interleucinas (IL-3, IL-4 e IL-9). Se han encontrado principalmente en epitelios expuestos al ambiente externo y pueden contribuir tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa. La migración de estas células es consecuencia de la actividad quimio atrayente del SCF expresado en la superficie de las células del estroma o encontrado en forma soluble en el microambiente, el cual se une al receptor tirosin cinasa c-kit, expresado en la superficie de los mastocitos (Rigoni y cols. 2014; Thiago y cols. 2015; Valdivia-Silva, 2012).

Los mastocitos (Mcs) son unas de las primeras células del sistema inmune en interaccionar con antígenos exógenos, alérgenos y cambios fisiológicos, convirtiéndolos en la célula central en el mantenimiento de la homeostasis de diversos tejidos (Rigoni y cols. 2014).

Los Mcs se pueden encontrar en dos diferentes subtipos principalmente, de acuerdo a su distribución en tejidos y su contenido liberados durante su activación, dentro de estos subtipos podemos encontrar los mastocitos triptasa positivos ( $MC_T$ ) encontrados principalmente en mucosas y mastocitos triptasa-quimasa positivos ( $MC_{TQ}$ ) los cuales se localizan generalmente en tejido conectivo. Adicionalmente se habla de una tercera sub población, los mastocitos quimasa positivos ( $MC_Q$ ) los cuales se han observado en técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a tejido intestinal, pero no se ha logrado decretar su existencia pues los experimentos carecen de reproducibilidad (Irani y cols. 1986; Marcelino da Silva y cols. 2014; Rigoni y cols. 2014). Los subtipos varían de acuerdo a los antecedentes genéticos del individuo, resultando en la denominada “*plasticidad de los mastocitos*”. Dada esta característica, los mastocitos pueden cambiar de un fenotipo a otro bajo la influencia de estímulos específicos y su capacidad selectiva para secretar un amplio espectro de sustancias biológicamente activas depende del sub tipo celular (Rigoni y cols. 2014). Aunque las células comparten características en común, no representan una población homogénea, de ahí deriva la importancia del estudio de sus funciones (Löber, 2008).

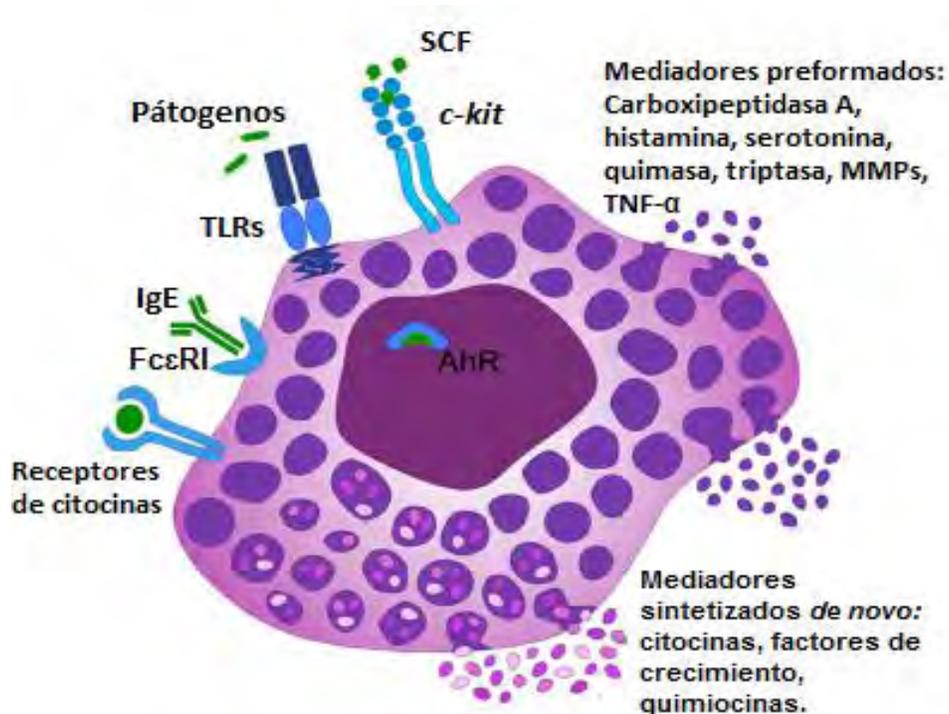
## 2.4.2 Receptores, activación y componentes de los gránulos liberados por el mastocito

Los mastocitos presentan diferentes receptores los cuales al interactuar con su respectivo ligando son capaces de activar la célula. Clásicamente se han descrito sus funciones relacionadas con la respuesta inmune tipo 2, activando sus vías de expresión y secreción de histamina, citocinas inflamatorias, proteasas y quimiocinas, liberadas al activarse su receptor de IgE (FcεRI), los cuales se relacionan con reacciones anafilácticas (Rigoni y cols. 2014; Thiago y cols. 2015; Valdivia-Silva, 2012).

Poseen también dentro de su repertorio, receptores del tipo TLR's los cuales reconocen PAMPs, receptores de citocinas, así como receptores de fracciones del complemento, y un receptor intracelular de aril hidrocarburo (AhR), el cual es capaz de responder a diversos componentes derivados de la digestión de comida, metabolismo del grupo hemo y del triptófano, así como toxinas provenientes del ambiente (Rigoni y cols. 2014; Thiago y cols. 2015).

De igual manera presentan un receptor denominado CD117 de tipo *c-kit* el cual es una proteína transmembranal (glicoproteína) de 145 kDa. Este receptor funciona con actividad tirosina-quinasa. CD117 es el epítipo localizado en el dominio extracelular del receptor; el ligando de este receptor es el Factor de Células Madre, el cual es producido por fibroblastos, células endoteliales, células provenientes de médula ósea y células del estroma (Simon y cols. 2014). El receptor *c-kit* se expresa fisiológicamente en células madre hematopoyéticas, mastocitos, células germinales, células intersticiales de Cajal y epitelio de la glándula mamaria (Fresno-Forcelledo, 2004).

Posterior a la interacción ligando-receptor, los Mcs pueden secretar dos diferentes clases de moléculas: una de ellas, son las sustancias preformadas y almacenadas en los gránulos del mastocito como la histamina, la serotonina, la heparina, las proteasas triptasa y quimasa, y el TNF- $\alpha$ , los cuales se liberan mediante desgranulación; la otra clase requiere síntesis *de novo* y entre ellos se encuentran: mediadores lipídicos, prostaglandinas, citocinas pro- (IL-1, IL-6, IL-17) o anti- (IL-10, TGF- $\beta$ ) inflamatorias, los cuales se secretan mediante un proceso conocido como "desgranulación selectiva" por la cual se liberan las moléculas mediante vesículas que atraviesan el citoplasma hasta la membrana celular (Rigoni y cols. 2014).



**Figura 2. Mastocito: receptores, ligandos y mediadores.** La imagen muestra los diferentes receptores presentes en el mastocito, así como los ligandos que al interactuar con su receptor activarán a la célula generando la liberación de mediadores pre formados o sintetizados *de novo*. Modificado de: Rigoni A, Colombo P & Pucillo C, 2014.

### 2.4.3 Factores solubles producidos por el mastocito y su relación con el cáncer

La proliferación del tumor, supervivencia, angiogénesis, aspectos del remodelado tisular, metástasis, y la habilidad para evadir y modular la respuesta inmune, son procesos que pueden ser regulados de manera positiva o negativa por los mastocitos. Los Mcs son capaces de secretar un amplio repertorio de factores de crecimiento, citocinas, y quimiocinas, dentro de las cuales podemos identificar muchas implicadas en la biología del tumor, como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar, el TGF- $\beta$ , las interleucinas 1, 6, 10 y TNF- $\alpha$ , los cuales además pueden movilizar y modular la actividad de otras células encontradas en el microambiente tumoral (Marichal y cols. 2013; Rigoni y cols. 2014).

Dentro de estos mediadores podemos encontrar a la histamina, una amina clásicamente secretada en reacciones alérgicas. La síntesis de esta amina se lleva a cabo en el aparato de Golgi de los mastocitos a partir del amino ácido L-histidina por la histidina descarboxilasa. Esta amina ejerce su efecto al unirse a receptores acoplados a proteínas G y puede influir directa e indirectamente en la función de los linfocitos T, promoviendo la respuesta de tipo Th1 a través del receptor de histamina tipo 1 (H1R), mientras que inhibe ambas respuestas (Th1 y Th2) mediante su unión al receptor de histamina tipo 2 (H2R); una excesiva

producción de histamina puede resultar en un cambio de respuesta Th1 a respuesta Th2, lo que favorece el desarrollo del tumor, puesto que en etapas tempranas la respuesta citotóxica es la encargada de controlar la promoción de las células tumorales. La histamina se ha asociado a proliferación *in vitro* de células tumorales, al unirse a su receptor H2R el cual lo presentan el 75% de las células en cáncer de mama. Se ha descrito que el uso de antagonistas del H1R disminuye significativamente el crecimiento tumoral y la expresión del VEGF mediante la inhibición de HIF-1 en ratones (Löber, 2008; Marichal y cols. 2013; Rigoni y cols. 2014).

Otra de las proteasas presentes en los mastocitos es la quimasa, la cual se ha encontrado principalmente en Mcs de la piel y de la submucosa del intestino. Esta enzima tiene una variedad de funciones biológicas; De Souza Junior y cols. 2015, sugieren que la quimasa interviene de manera indirecta en la angiogénesis del tumor, mediante la activación del pro-MMP-9, la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) está directamente relacionada con la angiogénesis tumoral; además demostraron la relación entre el proceso angiogénico y la angiotensina II, la cual proviene de la conversión de la angiotensina I por parte de la quimasa; lo demostraron usando la quimostatina (inhibidor de la quimasa) y TCV-116 (un agonista del receptor tipo 1 de la angiotensina II) con los cuales se inhibió completamente la angiogénesis inducida por bFGF (De Souza Junior y cols. 2015).

Otra de las funciones conocidas de esta proteasa es la conversión de angiotensina I y II, estimular la secreción de mucus, y una de las más relevantes en el cáncer de mama es convertir el precursor de IL-1 $\beta$  en su forma activa, citocina involucrada junto a la IL-1 $\alpha$  y la IL-8 en el proceso pro-inflamatorio, crecimiento y metástasis del tumor (Kurtzman y cols. 1999; Löber K, 2008).

Los Mcs humanos son capaces de producir una variedad de citocinas en respuesta a su estimulación, entre las más abundantes se encuentran: IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ . La IL-4 se encuentra principalmente en las células del tipo MC $\tau$ C, mientras que IL-5 e IL-6 generalmente están presentes en las MC $\tau$  (Löber K, 2008).

La interleucina 6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y el TNF- $\alpha$  están presentes en el microambiente tumoral, de igual manera son secretados por los Mcs, los cuales elevan la expresión de COX-2, que finalmente incrementa la expresión del VEGF en el tumor, promoviendo la angiogénesis; en estados de hipoxia aumenta la expresión de VEGF favoreciendo el desarrollo del tumor al aumentar la vascularización del tejido y contribuyendo a la metástasis del cáncer (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

El sulfato de condroitina, producido por los mastocitos, tiene la capacidad de inhibir la diseminación de las células tumorales (Rigoni y cols. 2014). Por otra parte los Mcs también pueden ejercer inmunosupresión, favorable para el cáncer, mediante la expresión de TGF- $\beta$  e IL-10, generando un estado de tolerancia

inmunológica mediada por células T reguladoras (Ribatti, 2013; Rigoni y cols. 2014; Thiago y cols. 2015).

La interleucina 8 (IL-8) es una quimiocina con un rol autocrino y/o paracrino en la promoción del tumor y un valor significativo como biomarcador de pronóstico en cáncer de mama. Esta interleucina es en parte secretada por los mastocitos y está altamente expresada en cáncer de mama negativo al receptor de estrógeno, sin embargo está relacionada con el incremento de la invasividad y la metástasis en células que expresan el receptor para estrógeno (ER+) (Todorović-Raković y Milovanović, 2013).

Se han detectado que algunas líneas celulares provenientes de cáncer de mama son productoras de interleucina 6 (IL-6), de las cuales las células que no expresan el receptor a estrógeno (ER-) secretan una mayor concentración de está. La IL-6 induce proliferación y un fenotipo más agresivo en células que expresan el receptor para estrógeno; es importante el papel de esta citocina pues en el microambiente tumoral, la IL-6 es producida además por los fibroblastos y mastocitos (Studebaker y cols. 2008). Una sobreexpresión de esta citocina en células MCF-7 induce un proceso de transición epitelio mesénquima (EMT), incrementando su invasividad; su capacidad tumorigénica está ligada con la activación de la vía NF- $\kappa$ B y el proceso inflamatorio consecuente (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

Como parte de éste proyecto se determinó previamente la expresión diferencial de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8 y de los factores pro-tumorales VEGF y Triptasa (Cortes, 2016); observándose un aumento en la expresión de los estos al estimularse con los medios condicionados de cáncer de mama, sugiriendo la modulación de su expresión en los mastocitos para beneficio del cáncer.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los mediadores secretados por los mastocitos, sus efectos y la función que ejercen durante la progresión de un tumor.

**Tabla 1. Mediadores secretados por el mastocito: efecto y función en el desarrollo tumoral.**

Mediadores	Efectos y funciones
<b>Papel Pro-tumorigénico</b>	
Histamina	Incrementa la permeabilidad vascular, angiogénesis e inmunosupresión
Heparina	Incrementa la permeabilidad vascular, angiogénesis y reorganización de la matriz extracelular
Triptasa	Remodelación tisular, neovascularización y facilitador de metástasis
Quimasa	Promotor de metástasis, daño y remodelación tisular
NGF, SCF	Promotores del crecimiento tumoral, quimioatrayentes de mastocitos
PDGF, CSF	Promotores del crecimiento tumoral
VEGF	Angiogénesis, mitogénesis de células endoteliales
FGF	Promotor del crecimiento tumoral, neovascularización, reorganización y degradación de la matriz extracelular
TGF- $\beta$	Promotor del crecimiento tumoral, mitogénesis de células endoteliales y angiogénesis
CCL2, CCL5	Quimioatrayentes de mastocitos y otras células del sistema inmune
CXCL8	Neovascularización, reorganización y degradación de la matriz extracelular
TNF- $\alpha$	Inmunosupresión y neovascularización
IL-3, IL-4	Reorganización y degradación de la matriz extracelular
Ang-1	Angiogénesis y formación de vasos sanguíneos
<b>Papel Anti-tumorigénico</b>	
IL-1, IL-6, IL-9, IL-10	Inflamación y migración leucocitaria
IL-3	Proliferación de mastocitos y activación de eosinófilos
IL-4	Apoptosis de células tumorales y diferenciación de células Th2
IL-5	Migración leucocitaria y activación de eosinófilos
TNF- $\alpha$	Inflamación y muerte de células tumorales
IFN- $\gamma$	Inflamación, proliferación y activación de leucocitos
GM-CSF	Proliferación de células inflamatorias y activación de eosinófilos
TGF- $\beta$	Proliferación de células inflamatorias
PAF	Activación plaquetaria y quimiotaxis leucocitaria
PGD2, PGE2	Vasodilatación y quimiotaxis de neutrófilos
LTB4, LTC4	Quimiotaxis de leucocitos e incremento de la permeabilidad vascular
MIP- $\alpha$	Quimioatrayente de monocitos, macrófagos y neutrófilos
MCP-3/4	Quimioatrayente de leucocitos
Triptasa	Inflamación
NO	Vasodilatación

**Tabla 1. Mediadores secretados por el mastocito: efecto y función en el desarrollo tumoral.** En la tabla 1, se muestran los factores solubles secretados por el mastocito y la función conocida de estos en el desarrollo y progresión de los tumores. Modificado de: The role of mast cells in the microenvironment of tumors. Rabenhorst A y Hartmann K.

#### **2.4.4 Triptasa**

La triptasa es una proteasa que se concentra selectivamente en los gránulos secretores de los mastocitos. Los niveles plasmáticos de triptasa se correlacionan directamente con la severidad clínica de un estado de anafilaxia; esta enzima juega un papel de suma importancia en el microambiente tumoral ya que estimula la proliferación de células endoteliales, promueve la formación de terminaciones vasculares *in vitro*, degrada la matriz del tejido conectivo y genera la activación de MMPs, proteínas que generan proteólisis, las cuales pueden descomponer colágeno y que son importantes en procesos como la curación de heridas, la angiogénesis y la metástasis de células tumorales (Marichal y cols. 2013; Kankkunen y cols. 1997).

En ensayos de inmunohistoquímica de tejido tumoral mamario, Xiang y cols. 2009, detectaron la presencia de mastocitos en la periferia y los correlacionan con un aumento del fenotipo MC<sub>T</sub>, que se asocia a progresión del tumor activando la metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2) (Xiang y cols. 2009). Por su parte Kankkunen y cols. 1997, observaron mastocitos triptasa positivos en lesiones malignas de tejido mamario, asociando la densidad de Mcs con la malignidad del tumor (Kankkunen y cols. 1997).

Se ha descrito que la triptasa causa disrupción y promueve la inflamación a través de la activación de receptores de proteasa activados (PAR-1, PAR-2), en etapas tempranas del tumor (Ribatti, 2009; Thiago y cols. 2015).

El proceso angiogénico es de gran importancia en el crecimiento del tumor y su progresión, este proceso está regulado clásicamente por el VEGF; la triptasa se ha identificado como un nuevo factor angiogénico al ser un agonista activador del receptor de metaloproteasa 2 (PAR-2), que participa en la proliferación celular y la angiogénesis. La triptasa de igual manera puede incrementar el crecimiento capilar y la proliferación de células endoteliales (Ammendola y cols. 2009).

La triptasa secretada por los mastocitos contribuye a la progresión del cáncer mediante la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos o fibroblastos asociados a carcinoma, los cuales participan en el complejo proceso de la interacción estroma-tumor, algunas evidencias sugieren que estas células participan en la tumorigénesis, progresión neoplásica, angiogénesis y metástasis (Mangia y cols. 2011).

### **2.5 Citocinas y su relación con el cáncer**

#### **2.5.1 Interleucina 4 (IL-4)**

La interleucina 4 (IL-4) es secretada por los Mcs y las células T, es una citocina cuyo papel principal en las neoplasias es suprimir al crecimiento del tumor, (Nagai y Toi, 2000). Los mastocitos expresan el receptor para la IL-4 y está citocina favorece la expresión del receptor FC $\epsilon$  en los mismos, promoviendo la

supervivencia, proliferación e induciendo la quimiotaxis de estas células (Nagai y Toi, 2000).

Aunado a lo anterior Gooch y cols. 1998, demostraron que la IL-4 inhibe el crecimiento de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, considerándola como un potente inductor de la apoptosis celular mediante procesos como la fragmentación del DNA; de igual manera Tepper y cols. 1989, trabajando con líneas celulares tumorales transfectadas con IL-4, encontraron que la IL-4 juega un papel antitumoral importante, primeramente mediado por eosinófilos y la eliminación cooperativa con los macrófagos.

### **2.5.2 Interleucina 5 (IL-5)**

La IL-5 es una citocina que se produce en linfocitos T, NK y mastocitos, en estos últimos posee función autócrina induciendo la activación celular. También actúa sobre los eosinófilos, estimulando su producción, supervivencia, activación y tráfico de las mismas, aunque inicialmente se le caracterizó como una citocina implicada en la proliferación y activación de linfocitos B. (Gilfillan y Tkaczyk. 2006; Simson y cols. 2007).

Simson y cols. 2007 demostraron en ratones transgénicos para IL-5, que el número de eosinófilos circulantes en estos, aumenta considerablemente, además observaron que cuando estos son reclutados al microambiente tumoral, pueden eliminar efectivamente tumores transplantados; lo anterior fue comprobado al usar modelos murinos *Knock out* para IL-5, CCL11 y deficientes de eosinófilos, donde la incidencia del tumor se vio severamente incrementada en la ausencia total de eosinófilos.

Por otro lado Lee y cols. 2013, observaron que la expresión de IL-5 y de su receptor se eleva en pacientes con cáncer muscular invasivo de vejiga y en líneas celulares de cáncer de vejiga como la 5637 y T-24. La IL-5 incrementa la migración y la expresión de la MMP-9, mediante la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1, e induciendo la activación de la vía de señalización ERK1/2 y Jak-Stat en ambas células.

### **2.5.3 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  es una citocina proinflamatoria que se encuentra altamente expresada en carcinomas de seno (Esquivel-Velázquez y cols. 2015). Se ha reportado que esta citocina estimula la proliferación de la línea celular T-47D a través de un proceso que incrementa la ciclina D1 promotora del ciclo celular, dependiente de NF- $\kappa$ B (Baumgarten & Frasor, 2012). Adicionalmente, la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B, así como la de TNF- $\alpha$ , resultan protectoras contra la tumorigénesis inducida químicamente (Connelly y cols. 2011). Una activación *in vitro* de la vía TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B induce un comportamiento maligno e invasivo en células de tejido mamario (Esquivel-Velázquez y cols. 2015). La expresión crónica de esta citocina en tumores de mama favorecen el crecimiento del tumor, pero

este efecto difiere entre líneas celulares de cáncer de mama (Esquivel-Velázquez y cols. 2015), ya que en células T-47D se ve favorecida la proliferación celular; en contraste, este factor soluble, el cual puede ser producido por los mastocitos, es capaz de inducir apoptosis e inhibir proliferación; promover migración, invasión, y resistencia a tratamientos quimioterapéuticos en células MCF-7, mediante la regulación de genes y enzimas que son mediadores del metabolismo del estrógeno (Esquivel-Velázquez y cols. 2015; Goldberg y Schwertfeger, 2010).

En el microambiente tumoral, esta citocina es un factor promotor del tumor, ya que aumenta la proliferación celular y su migración, además de ser un factor necrótico (Esquivel-Velázquez y cols. 2015). Sin embargo, también se ha observado que la administración local de altas dosis de TNF- $\alpha$  poseen efectos antiangiogénicos y antitumorales (Hamed y cols. 2012).

#### **2.5.4 Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ )**

El factor de crecimiento transformante beta es una de las citocinas más estudiadas en cáncer. Este factor está involucrado en muchos procesos, incluidos la proliferación celular, diferenciación, migración, inmunidad y apoptosis (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

El TGF- $\beta$  tiene funciones duales en la progresión del tumor, en etapas tempranas, tiene un efecto anti proliferativo, sin embargo en etapas avanzadas de la enfermedad, las células evaden este efecto y progresan en respuesta a esta citocina (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

En etapas tempranas del cáncer, el TGF- $\beta$  causa arresto del ciclo celular, particularmente en células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas, inhibiendo cinasas dependientes de ciclina, disminuyendo la expresión de c-Myc y de ID1 (protooncogenes) y aumentando la expresión de inhibidores de CDK, entre los que se encuentran p15 y p21, que se encargan de regular el ciclo celular (Esquivel-Velázquez y cols. 2015). Este factor inhibe la proliferación celular mediada por receptores de estrógeno; sin embargo muchas líneas celulares triples negativas, como la MDA-MB-231 y la Hs578T, son resistentes a la actividad inhibitoria de esta citocina, resistencia que algunos autores relacionan con un mutaciones de la vía de activación de TGF- $\beta$  (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

En contraste a la función descrita anteriormente, el TGF- $\beta$  ejerce en etapas tardías del cáncer un papel promotor, al estimular la expresión de c-Myc y desestabilizando a p53; aunado a esto, se ha identificado al factor de crecimiento transformante beta, junto a la interleucina 6 (IL-6), como un mediador de la transición epitelio mesénquima de tipo 3 (transición carcinogénica), favoreciendo la polarización de las células endoteliales, desregulando genes involucrados en la expresión de proteínas involucradas en las uniones estrechas celulares, el citoesqueleto y el fenotipo mesenquimal (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

El TGF- $\beta$  acelera el proceso de vascularización del tumor, mediante la regulación de la expresión de catepsina G, el VEGF, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 y promoviendo la evasión inmune y la degradación de la matriz extracelular (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

### **2.5.5 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

Los interferones (IFNs) son un grupo de citocinas pleiotropicas que juegan un papel importante en la comunicación intracelular durante la respuesta del hospedero contra infecciones virales, bacterianas y durante los procesos de supervivencia tumoral. El IFN- $\gamma$  es el único miembro de la sub-familia de interferones del tipo II y su expresión es más restringida que los interferones pertenecientes a la sub-familia I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) (Raza Zaidi y Merlino, 2011).

La función mejor caracterizada de esta citocina la regulación de la sobre expresión de moléculas del MHC de clase I para favorecer la presentación de antígenos endógenos en las células presentadoras de antígenos profesionales; está íntimamente relacionada con la respuesta celular de tipo Th1, regulando la diferenciación, activación y homeostasis de las células T, inhibe el desarrollo de células Th2 (Raza Zaidi y Merlino, 2011).

El IFN- $\gamma$  se ha asociado con funciones anti-tumorales citostáticas y citotóxicas. Líneas celulares de fibrosarcoma que no expresan el receptor INF $\gamma$ R1 mostraron un mejor crecimiento, sugiriendo que el IFN- $\gamma$  juega un papel importante en la detección y eliminación de células tumorales (Dighe y cols.1994).

De igual manera diversos estudios sugieren que esta citocina favorece la inmunogenicidad de la célula tumoral, influyendo en las funciones de vigilancia del tumor, a lo anterior se suma que aproximadamente un tercio de las líneas celulares de melanoma y carcinoma de pulmón presentan mutaciones que inactivan componentes de la vía de señalización del IFN- $\gamma$ , lo que indica que la insensibilidad al IFN- $\gamma$  por parte del tumor podría ser un mecanismo usado por el cáncer para evadir la vigilancia inmunológica (Raza Zaidi y Merlino, 2011).

El uso de interferón gamma recombinante ha demostrado estar involucrado en efectos anti-proliferativos, anti-angiogénicos, y pro-apopticos contra el cáncer (Raza Zaidi y Merlino, 2011).

De manera contraria una baja dosis de tratamiento con IFN- $\gamma$ , en células B16 de melanoma, incrementa la resistencia a células NK. Los linfocitos humanos que expresan bajos niveles de IFN $\gamma$ R2 muestran respuestas anti-apoptóticas y proliferativas, de manera contraria los que sobre-expresan IFN $\gamma$ R2 demuestran un fenotipo pro-apoptótico. La expresión intratumoral de esta citocina está asociada con la expresión de moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y con un fenotipo más agresivo en melanomas humanos (Raza Zaidi y Merlino, 2011).

## **2.6 Papel de los mastocitos en el cáncer de mama**

La presencia de mastocitos en infiltrados de tumores cancerígenos se ha descrito desde varios años atrás y se ha asociado tanto a un buen pronóstico como a uno malo, dependiendo de la localización del tumor y la etapa en que se encuentra el mismo, pero no se ha logrado establecer el papel preciso que juegan en el microambiente del mismo (Thiago y cols. 2015). Sin embargo las interacciones entre los mastocitos, otras células del sistema inmune, células endoteliales y las células tumorales podrían ser un potencial objetivo para la quimioterapia en los pacientes afectados (Rigoni y cols. 2014; Valdivia-Silva, 2012).

Un gran número de científicos se han dado a la tarea de investigar la relación existente entre los infiltrados de mastocitos en el microambiente tumoral y la evolución del cáncer de mama desde diferentes puntos de abordaje. A continuación se muestra una tabla en donde se recopilan algunas investigaciones en las que se ha estudiado la relación mastocito-cáncer de mama, la conclusión del trabajo y en algunos casos el pronóstico que los autores sugieren al analizar sus resultados.

**Tabla 2. Relación entre la presencia de mastocitos en el microambiente tumoral mamario y el pronóstico en cáncer de mama.**

Cáncer de mama	Pronóstico	Breve descripción de la actividad de los Mcs	Referencia
	Bueno	Mastocitos infiltrados en el microambiente tumoral aún en pequeñas cantidades es de buen pronóstico en cáncer de mama.	Rajput y cols. 2008
	Malo	La acumulación de Mcs en el área tumoral, correlaciona con el incremento de la vascularización del tumor y su agresividad.	Hartveit, 1981
	Bueno	El número de mastocitos incrementa con el desarrollo del cáncer, se cree que en las primeras etapas de desarrollo del cáncer, el reconocimiento de los cambios primarios ocasionados por el tumor, podría ser de buen pronóstico.	Fakhjou y cols. 2016
	Malo	La triptasa liberada por los mastocitos triptasa positivos (MC <sub>T</sub> ), se asocia a la promoción de la invasión y migración del cáncer de mama mediante la activación de la MMP2.	Xiang y cols. 2010
	Bueno	Los mastocitos representan un factor protector del hospedero hacia las células de cáncer de mama. Las células cancerígenas son fagocitadas por Mcs y destruidas por quimiolisis cariocitoplasmica.	Della-Rovere y cols. 2009
	Malo	La relación entre el número de MC <sub>T</sub> , el área que ocupan, la densidad vascular y el área endotelial, sugiere la participación de estos mastocitos en el proceso angiogénico en cáncer de mama.	Ranieri y cols. 2009
	Bueno	Un conteo elevado de mastocitos (alrededor de 10g/mm <sup>2</sup> en el estroma tumoral) está relacionado con un buen pronóstico.	Aaltomaa y cols. 2003
	Malo	La triptasa puede favorecer el crecimiento capilar y la proliferación de células endoteliales, induciendo angiogénesis mediante la activación de PAR-2 en células endoteliales vasculares y células de líneas de cáncer de mama.	Ammendola y cols. 2010
	Malo	La presencia de infiltrados mastocitarios en el cáncer de mama sugiere que estas células juegan un papel importante en la progresión del cáncer de mama.	Samoszuk y cols. 2003
	Malo	La cantidad de mastocitos y macrófagos en cáncer invasivo de mama es elevada, lo que sugiere participación en la angiogénesis del tumor.	Kwon y cols. 2005

**Tabla 2. Relación entre la presencia de mastocitos en el microambiente tumoral mamario y el pronóstico en cáncer de mama.** La tabla 2 recopila las conclusiones de diversas investigaciones que relacionan la presencia de infiltrados mastocitarios y el desarrollo del cáncer de mama.

## **2.7 Importancia del estudio del papel del mastocitos en el cáncer de mama.**

Basados en los conocimientos que se tienen del papel que juegan las citocinas en el desarrollo del cáncer de mama, éstas han adquirido relevancia significativa como blancos terapéuticos en las nuevas quimioterapias contra esta enfermedad (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

La inhibición de la activación de mastocitos o de los factores solubles que secretan al ser activados, recientemente ha adquirido gran relevancia en el tratamiento del cáncer en general (Rigoni y cols. 2014).

Se ha demostrado que TNF- $\alpha$  por ejemplo, promueve la resistencia quimioterapéutica en células MCF-7, a través de la regulación de ABCG2, un casete transportador de unión a ATP que favorece la eliminación de drogas quimioterapéuticas en células cancerígenas; por su parte TGF- $\beta$  afecta la resistencia de las células contra agentes que van dirigidos al DNA de las células tumorales (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

En la actualidad se han usado anticuerpos dirigidos a diferentes citocinas como la IL-1, IL-20, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , entre otros (Esquivel-Velázquez y cols. 2015), por lo que es de suma importancia conocer más a fondo la comunicación que existe entre estos factores solubles, las células que los secretan y su interacción con el cáncer de mama. El objetivo principal de este trabajo es aportar conocimiento sobre la respuesta que tienen los mastocitos al estar en contacto con un medio proveniente de diferentes líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama, con diferentes grados de agresividad y cómo esto modifica la expresión de factores que participan en el desarrollo del tumor.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama se ha convertido en las últimas décadas en un problema de salud pública para México y el resto del mundo. Aunado a esto, es el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres mexicanas y una de las principales causas de muerte. Las células de cáncer están rodeadas por células del estroma no tumorales y por células de la respuesta inmune innata y adaptativa, que interactúan de manera compleja influenciando el desarrollo y la progresión tumoral; razón por la que, en los últimos años se ha dejado de estudiar solo a las células cancerígenas y los estudios se comenzaron a enfocar en las interacciones entre estas células.

Los mastocitos son células centinela del sistema inmune que juegan un papel importante en el microambiente tumoral, ya que al ser activados estas células son capaces de secretar sustancias preformadas o sintetizadas *de novo* las cuales pueden tener funciones anti o pro-tumorales. Sin embargo, el papel del mastocito en el cáncer de mama de acuerdo a diversos autores es controversial, ya que mientras algunos reportan que su presencia se asocia a buen pronóstico, otros reportan lo contrario; de ahí la relevancia del estudio de la interacción entre las células cancerígenas y los mastocitos. Este proyecto tiene como finalidad contribuir en el entendimiento de la relación mastocito-célula cancerígena, analizando la influencia que existe entre el grado de agresividad de las células tumorales de cáncer de mama sobre la respuesta del mastocito, evaluando la expresión de factores solubles que son importantes en el desarrollo tumoral. De igual manera conocer más a fondo los mecanismos moleculares mediante los cuales los mastocitos influyen en el microambiente tumoral y por ende en el curso del cáncer de mama.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de medios condicionados de células de cáncer de mama, con diferentes grados de agresividad, en la expresión de citocinas por el mastocito.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar la estimulación de línea celular de mastocitos HMC-1 con los medios condicionados de las líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7, MCF-12A, T-47D, MDA-MB-231, Hs578T.
- Determinar la expresión de IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , mediante q-PCR.
- Correlacionar la agresividad de la línea celular con su influencia en la expresión de citocinas por el mastocito.

#### **6. HIPÓTESIS**

Los medios condicionados provenientes de las líneas celulares de cáncer de mama, dependiendo de su grado agresividad, ejercerán un cambio en la respuesta del mastocito, induciendo la expresión de citocinas importantes en el cáncer de mama.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio realizado se llevó a cabo en un modelo experimental *in vitro*. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes, los cuales se realizaron por triplicado usando la línea celular de mastocitos humanos (HMC-1) estimuladas con los medios condicionados obtenidos de cada una de las líneas celulares de cáncer de mama, para la posterior extracción de RNA, síntesis de cDNA y un análisis cuantitativo de la expresión de los genes que codifican para IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  mediante PCR en tiempo real, finalizando con un análisis estadístico que evaluará la significancia de los resultados.

### 7.1 Cultivo de la línea celular de mastocitos HMC-1

La línea celular de mastocitos humanos HMC-1 fue donada por el Dr. Stephen E. Ullrich (Universidad de Texas MD. Anderson Cancer Center). Esta línea fue establecida a partir de un paciente con leucemia mastocítica, se trata de células que presentan una mutación en el receptor *c-kit* lo que hace su maduración independiente de la acción del Factor de Células Madre (SCF) y tienen un tiempo de duplicación de 24 horas aproximadamente; debido a que presentan características bastante similares a los mastocitos tisulares humanos pueden ser utilizados como un modelo biológico para estudiar la biología y participación de los mastocitos en el TME.

La línea celular fue mantenida a 37°C en medio RPMI-1640 (Invitrogen®) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), L-glutamina al 1% y Antibiótico-antimicótico al 1%.

### 7.2 Líneas celulares de cáncer de mama.

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en este estudio son 5 (MCF-12A, MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, Hs578T), las cuales difieren en sus características y grado de agresividad. La tabla 3 resume la información de estas líneas celulares. Todas las líneas celulares fueron adquiridas de la colección ATCC (American Type Culture Collection), se cultivaron de acuerdo a las recomendaciones de la ATCC y la información descrita en la tabla 3 se tomó de los reportes de las hojas que ATCC tiene para cada línea (American Type Cultured Collection, 2016).

**Tabla 3. Características de las líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama**

<b>Línea celular</b>	<b>Características</b>
MCF-12A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No tumorigénico</li> </ul>
MCF-7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luminal A: RE (+), RP (+), HER/neu 2 (-)</li> <li>• No invasiva y no metastásica</li> </ul>
T-47D	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luminal A: RE (+), RP(+), HER/neu 2 (-)</li> <li>• No invasiva y no metastásica</li> </ul>
MDA-MB-231	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triple negativa: RE (-), RP(-), HER/neu 2 (-)</li> <li>• Altamente invasiva y metastásica</li> </ul>
Hs578T	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triple negativa: RE (-), RP (-), HER/neu 2 (-)</li> <li>• Altamente invasiva y metastásica</li> </ul>

**Tabla 3. Características de las líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama.** En la tabla 3 se observan las características de agresividad y el perfil molecular de las líneas celulares que se trabajaron para estimular los mastocitos de la línea celular HMC-1 en este proyecto.

### **7.3 Determinación de la viabilidad celular**

Para determinar la viabilidad de las células utilizadas durante los experimentos de este proyecto, se utilizó una tinción por exclusión con azul de tripano 0.4 % de Gibco<sup>®</sup>, la viabilidad de las células debe ser mayor a 95%. Este colorante se utiliza generalmente para el conteo de células en cámara de Neubauer, el fundamento de esta técnica yace en la permeabilidad que pierden las células muertas (no viables) lo que permite que el colorante penetre la célula y sean refringentes al microscopio; mientras que las células vivas no permiten la entrada del azul de tripano.

#### **7.4 Obtención de medios condicionados de las líneas celulares de cáncer de mama.**

Se conoce como medio condicionado al medio que contiene los productos secretados por un cultivo celular durante un tiempo de incubación dado. Estos medios han sido utilizados en la investigación para estudiar la respuesta de un tipo celular ante un microambiente particular.

Se cultivaron las diferentes líneas celulares de epitelio mamario (MCF-12A, MCF-7, T-47D, Hs578T, MDA-MB-231) hasta un 80 % de confluencia en cajas de cultivo T75, con sus respectivos medios como indica la ATCC, posteriormente se les realizó un lavado con PBS 1X estéril y se les adicionó medio Stem-Pro suplementado completo, sin SCF, se cultivaron con este medio durante 48 horas. Después se recuperaron los medios de cada línea celular, se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 1500 rpm/10min y se hicieron alícuotas de 1.5 mL las cuales se conservaron a -20 °C para su posterior uso.

#### **7.5 Estimulación de la línea celular de mastocitos humanos HMC-1 con los medios condicionados obtenidos de las células de cáncer de mama**

Con la finalidad de conocer la respuesta de los mastocitos de la línea celular HMC-1 ante un medio que contenía los factores solubles secretados por las líneas celulares de cáncer de mama, se llevó a cabo una estimulación de los mastocitos con los medios condicionados de las 5 líneas celulares de epitelio mamario, obtenidos previamente.

Se utilizó una placa de cultivo de 6 pozos, en la cual se colocaron  $2 \times 10^6$  células HMC-1 resuspendidas en 0.5 mL de Stem-Pro completo en cada pozo, adicionalmente se agregó 1.5 mL de medio condicionado (una condición por cada pozo), así como un control basal, el cual era solo medio Stem-Pro sin haber estado en contacto con células previamente. Se incubó la placa por 24 horas a 37°C y a una concentración de 5% CO<sub>2</sub>. Al finalizar la estimulación las células fueron colectadas y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se conservó a -70°C, para la posterior extracción de RNA.

#### **7.6 Extracción y cuantificación de RNA**

La expresión de genes es la base del metabolismo celular, y por esta se entiende que el DNA se transcribe en RNA, que a su vez se traduce en proteínas. El RNA mensajero (mRNA), que se sintetiza durante la transcripción gracias a la RNA polimerasa, está conformado por codones, que son secuencias de tres pares que codifican un aminoácido específico. Los estudios contemporáneos de biología molecular se han esforzado en entender las funciones metabólicas de los organismos mediante el uso y aplicación de técnicas moleculares basadas en la amplificación de diversas regiones de DNA y RNA (Madigan y cols. 2000).

La extracción de RNA de los mastocitos HMC-1 estimulados con los medios condicionados se realizó con el Kit FavorPrep (FAVORGEN Biotech Corp<sup>®</sup>), el cual tiene su fundamento en la unión selectiva del ácido ribonucleico (ARN o RNA) a una membrana de sílice contenida en una columna. El procedimiento inicia con la homogenización del botón celular obtenido de la estimulación con un buffer de lisis, el cual generalmente está compuesto por fenol-isotiocianato de guanidina, donde este último se encarga de conservar la integridad del RNA inhibiendo RNAsas, mientras rompen las células y disuelven sus componentes, la homogeneización de la muestra permite el rompimiento de moléculas de alto peso molecular como el DNA genómico y entre otros compuestos celulares; la adición posterior de cloroformo separa la solución en una fase acuosa y una orgánica, el RNA se encuentra en la primera, la cual se trata con un buffer de lavado 2 que contiene etanol y sirve para precipitar el RNA; finalmente el RNA es eluido en agua libre de RNAsas para su posterior cuantificación. La cuantificación de RNA se llevó a cabo con el uso del NanoDrop<sup>®</sup> el cual es un espectrofotómetro de espectro total (220-750 nm) que mide concentraciones con 1 uL de muestra, con gran exactitud y reproducibilidad.

### **7.7 Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

La transcripción reversa es una técnica que permite sintetizar DNA complementario a partir de moléculas de RNA usando la enzima transcriptasa reversa. El cDNA es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA.

La síntesis de cDNA a partir de RNA extraído se realizó usando el Kit RevertAid first strand de Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup> el cual usa una retrotranscriptasa (RT) y un M-MuLV RT recombinante que mantiene la actividad de la enzima a 42-50°C y es adecuado para la síntesis de cDNA de hasta 13 Kb. RiboLock RNase Inhibitor protege eficazmente las plantillas de RNA de la degradación, los oligo dT se alinea selectivamente a la cola poli (A) del mRNA. La reacción se lleva a cabo a 40°C por 60 minutos y se termina a 70°C por 5 minutos para inactivar la enzima retrotranscriptasa; una vez finalizada la reacción los productos de la síntesis se conservaron a -20°C para su uso en el análisis de expresión génica mediante la q-PCR (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, 2015).

### **7.8 Amplificación de cDNA por PCR tiempo real (q-PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa PCR (Polimerase Chain Reaction) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos que se llevan a cabo en el termociclador, en los que la secuencia blanco es copiada. Para llevar a cabo esta reacción se aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente DNA en las células. La q-PCR o PCR tiempo real es la variante más específica de esta reacción, el objetivo de este tipo de PCR es detectar y cuantificar las secuencias específicas de los ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes. El término tiempo real se refiere a

que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción, por otra parte el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra (Tamay de Dios y cols. 2013).

La amplificación del DNA se logra usando secuencias cortas de DNA complementarios al gen de interés, conocidos como iniciadores o *primers* y la DNA polimerasa. Los iniciadores usados en este proyecto fueron diseñados por la Dra. Samira Muñoz, las secuencias y sus respectivas características se muestran a continuación.

**Tabla 4. Características de los iniciadores usados en la q-PCR**

Gen	Secuencia Sentido	Secuencia Anti-sentido
h GAPDH	5'- CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC -3' Tm: 58.1°C GC: 57.1%	5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG -3' Tm: 58.1°C GC: 57.1%
h Triptasa	5'- CAG TGG GTG CTG ACC -3' Tm: 59.5°C GC: 70.6%	5'- GCA GTT GCA CCC TGA GGG - 3' Tm: 59.1°C GC: 66.7%
h IL-4	5'- CTC CAA GAA CAC AAC TGA GAA -3' Tm: 56.4°C GC: 42.9%	5'- ACT CTG GTT GGC TTC CTT CA-3' Tm: 56.3°C GC: 50%
h IL-5	5'- CGT TTC AGA GCC ATG AGG ATG C - 3' Tm: 58.4 °C GC: 54.5%	5'- GCC AAG GTC TCT TTC ACC AAT GC -3' Tm: 58.8°C GC: 52.2%
h TNF-α	5'- CAG CCT CTT CTC CTT CCT GAT -3' Tm: 56.1°C GC: 52.4%	5'- GCC AGA GGG CTG ATT AGA GA -3' Tm: 56.2°C GC: 55%
h TGF-β	5'- GGC CTT TCC TGC TTC TCA TGG -3' Tm: 58.4°C GC: 57.1%	5'- CCT TGC TGT ACT GCG TGT CC-3' Tm: 58.5°C GC: 60%
h IFN-γ	5'- TCT CTC GGA AAC GAT GAA ATA -3' Tm: 51.0°C GC: 38.1%	5'- ACT CTC CTC TTT CCA ATT CTT -3' Tm: 51.1°C GC: 38.1%

**Tm:** Temperatura de fusión

**GC:** Contenido de Guanina-Citosina

Para realizar esta amplificación se utilizó el kit Light cycler 480-SYBR Green Master, de Roche®, que utiliza el colorante SYBR Green, compuesto orgánico que se asocia a la molécula de DNA interactuando con la hendidura menor del DNA, se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos de esta manera se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente, durante la q-PCR el SYBR Green se une a cada nueva copia de DNA de doble cadena, por lo que el resultado es un aumento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto producido, la intensidad es calculada por un software para su posterior

análisis estadístico. El termociclador que se usó para la reacción fue el LightCycler 480 de Roche®.

Para corroborar la especificidad de los iniciadores utilizados, se incluyó una curva de disociación en el programa de q-PCR para cada juego de iniciadores. Esta curva consiste en aumentar gradualmente la temperatura de la reacción hasta los 95°C, con la finalidad de desnaturalizar la doble cadena de los productos obtenidos durante la PCR en cadenas sencillas, favoreciendo la liberación del agente intercalante (SYBR Green) generando una señal de fluorescencia; posteriormente, la temperatura desciende radicalmente hasta 60°C con la finalidad de renaturalizar las cadenas de DNA y observar cuantos picos de disociación existen para cada par de oligos específicos para un gen, idealmente se debe observar solo un pico de disociación, lo que indicaría la presencia de un solo producto específico.

### 7.9 Análisis estadístico

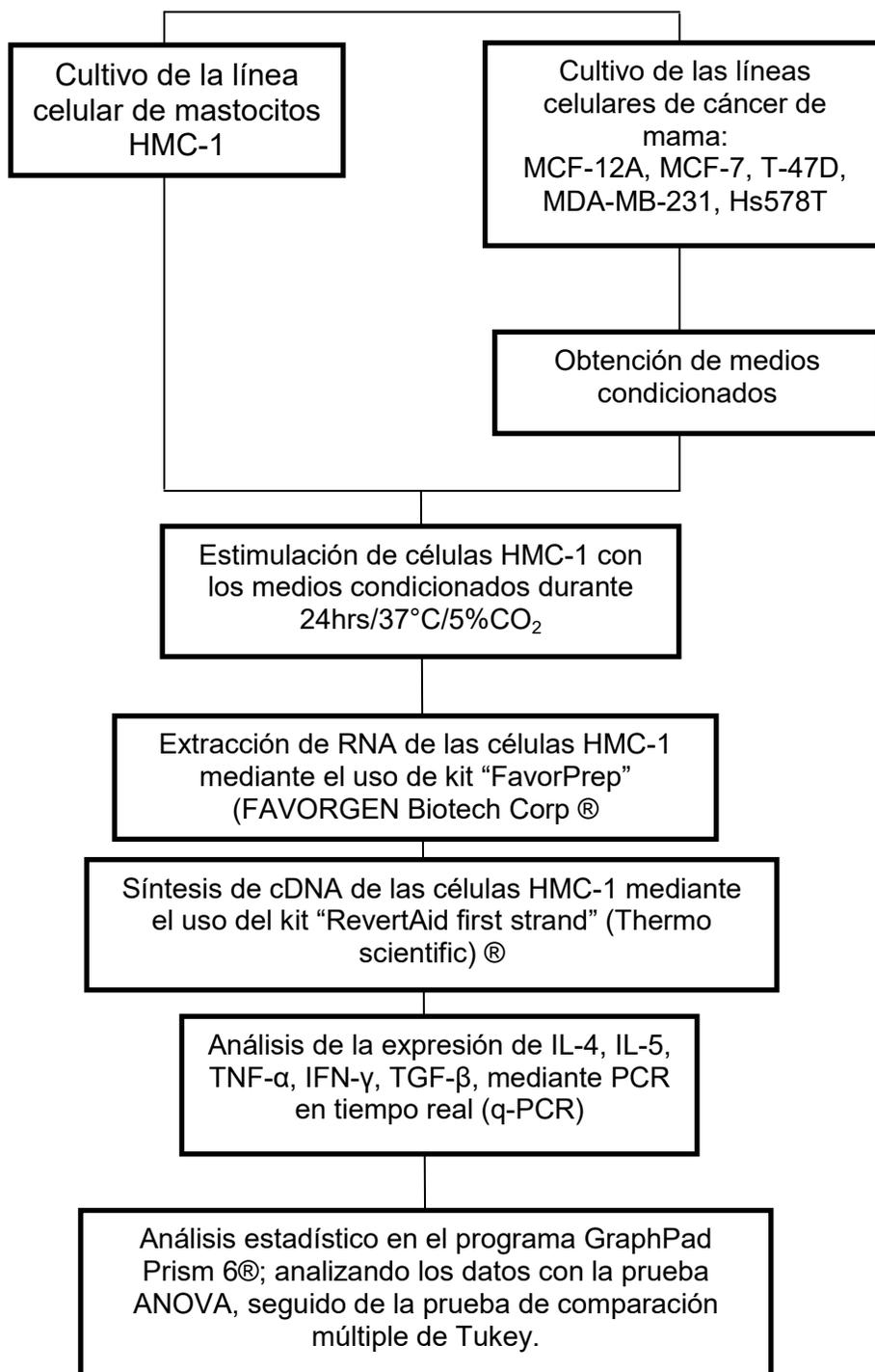
Los datos obtenidos de la cuantificación fueron exportados a una hoja de cálculo diseñada por la Dra. Muñoz. Estos datos fueron analizados de acuerdo al método comparativo  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

La expresión de los genes de interés fue normalizada respecto a la expresión constitutiva del gen GAPDH. La expresión relativa de los genes de interés se llevó a cabo comparando su expresión en los diferentes estímulos con las 5 líneas celulares de cáncer de mama utilizadas. Dichas comparaciones se llevaron a cabo utilizando el método  $\Delta\Delta C_T$ .

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T_{problema}} - C_{T_{GAPDH}})$$

Los resultados obtenidos se analizaron por la prueba de análisis de varianza ANOVA (Analysis of Variance) la cual permite determinar si diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario puede suponerse que sus medias no difieren, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, la cual permite crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores, mientras controla la tasa de error por familia que se especifique. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 6®. Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## 8. DIAGRAMA DE TRABAJO.

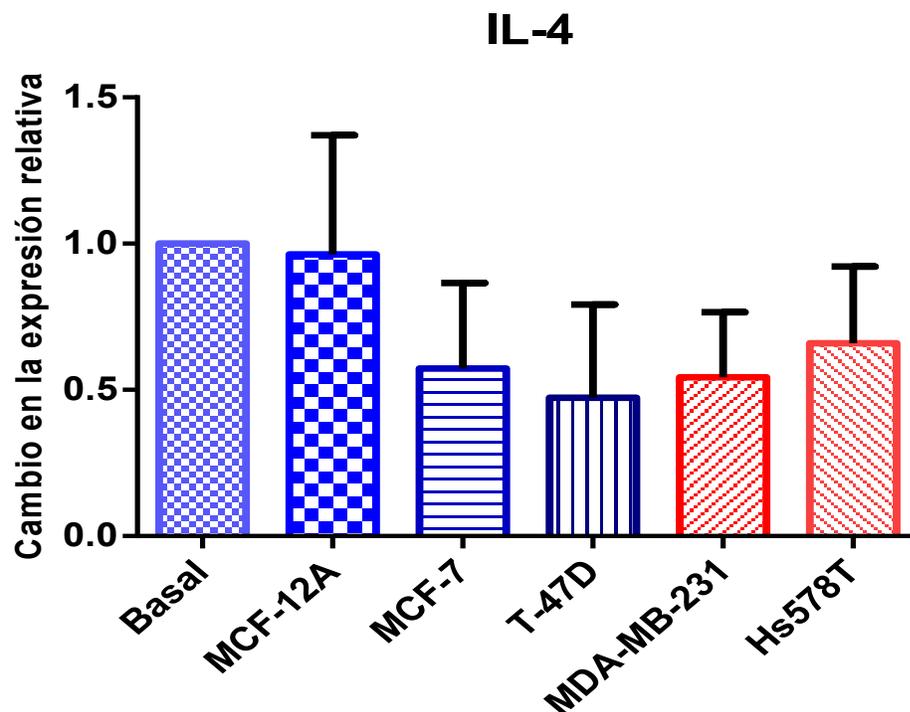


## 9. RESULTADOS

Se realizó la cuantificación relativa de los niveles de expresión de genes importantes en el desarrollo del cáncer de mama, entre los que se encuentran IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y Triptasa, para evaluar si los mastocitos modifican los niveles de expresión de estas moléculas, al ser estimulados con medios condicionados de 5 líneas celulares de cáncer de mama con diferente grado de agresividad; obteniéndose los siguientes resultados:

### 9.1 Expresión génica de IL-4

La expresión del gen que codifica para IL-4 en células HMC-1, posterior al estímulo con los medios condicionados de las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, mostró una disminución en su expresión al ser tratada con los medios condicionados de las células de cáncer de mama, en comparación con las células sin estímulo (basal) o estimuladas con el medio proveniente de células no cancerosas (MCF-12A); sin embargo, no se encontró diferencia significativa en los resultados ( $P < 0.05$ ) (Figura 3).

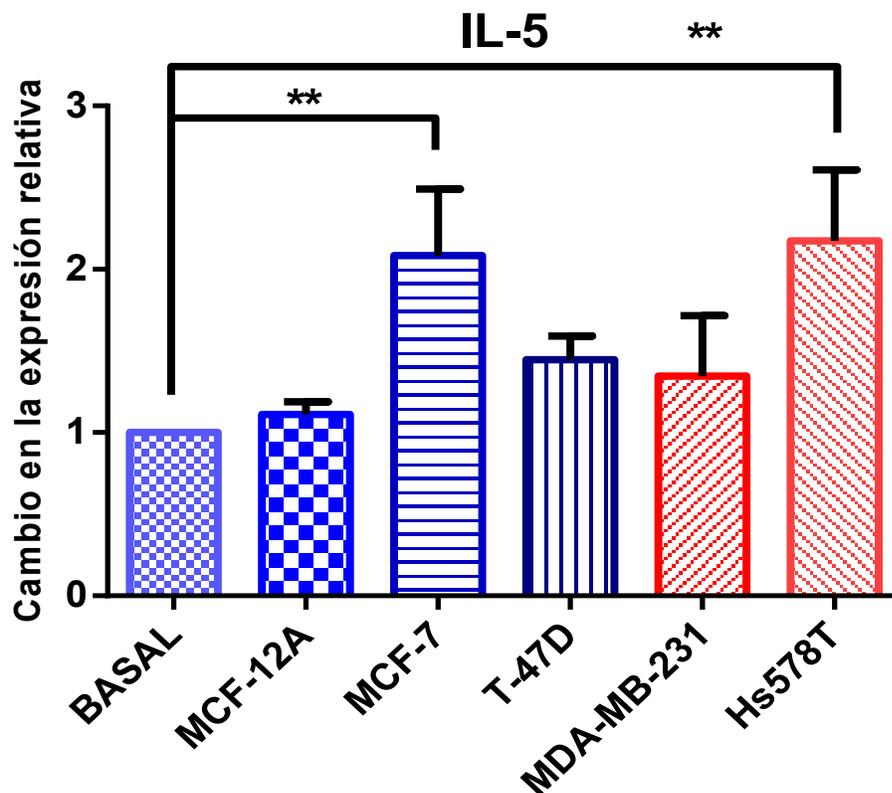


**Figura 3: Expresión génica de IL-4 en mastocitos HMC-1, por efecto de medios condicionados de líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama.** Los niveles de expresión fueron comparados con las células sin ningún estímulo. Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La prueba de ANOVA no fue significativa por lo que no se realizó el método de TUKEY para comparaciones múltiples.

## 9.2 Expresión génica de IL-5

La expresión del gen que codifica para IL-5 en células HMC-1 posterior al estímulo con los medios condicionados de las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, evaluado por q-PCR, mostró un aumento en la expresión cuando fueron tratadas con los medios condicionados de células cancerosas, en comparación con las células sin estímulo (basal) o estimuladas con el medio proveniente de células no cancerosas (MCF-12A); de manera interesante se observó un aumento significativo  $**P<0.01$  en los estímulos realizados con la líneas celulares MCF-7 y la Hs578T (Figura 4).



**Figura 4: Expresión génica de IL-5 en mastocitos HMC-1, por efecto de medios condicionados de líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama.** Los niveles de expresión fueron comparados con las células sin ningún estímulo.  $**P<0.01$ . Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

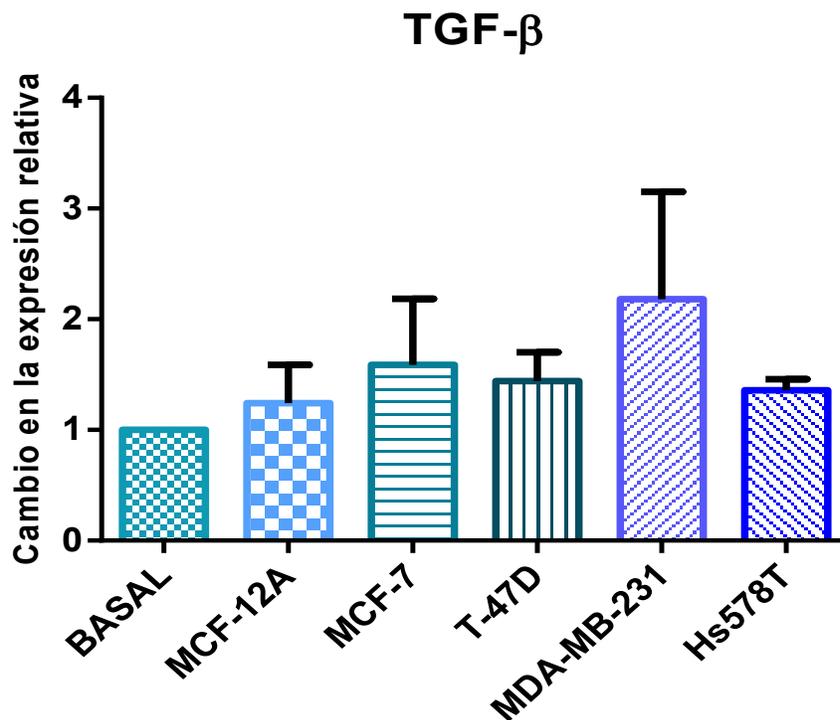
La prueba de ANOVA fue significativa por lo que se realizó el método de TUKEY para comparaciones múltiples, mediante el cual se observa que existe significancia en el aumento en la expresión de la IL-5 en las células estimuladas con los medios condicionados de las líneas celulares MCF-7 y Hs578T (figura 5).

Prueba de Tukey de comparaciones múltiples	Promedio de diferencia	95% CI de diferencia	Significancia	Resumen	Valor de P ajustado
BASAL vs. MCF-12	-0.1100	-0.9169 to 0.6969	No	ns	0.9968
BASAL vs. MCF-7	-1.083	-1.890 to -0.2765	Si	**	0.0072
BASAL vs. T-47D	-0.4467	-1.254 to 0.3602	No	ns	0.4678
BASAL vs. MDA-MB-231	-0.3467	-1.154 to 0.4602	No	ns	0.7028
BASAL vs. Hs578T	-1.173	-1.980 to -0.3665	Si	**	0.0039
MCF-12 vs. MCF-7	-0.9733	-1.780 to -0.1665	Si	*	0.0155
MCF-12 vs. T-47D	-0.3367	-1.144 to 0.4702	No	ns	0.7259
MCF-12 vs. MDA-MB-231	-0.2367	-1.044 to 0.5702	No	ns	0.9141
MCF-12 vs. Hs578T	-1.063	-1.870 to -0.2565	Si	**	0.0083
MCF-7 vs. T-47D	0.6367	-0.1702 to 1.444	No	ns	0.1579
MCF-7 vs. MDA-MB-231	0.7367	-0.07020 to 1.544	No	ns	0.0812
MCF-7 vs. Hs578T	-0.0900	-0.8969 to 0.7169	No	ns	0.9988
T-47D vs. MDA-MB-231	0.1000	-0.7069 to 0.9069	No	ns	0.9980
T-47D vs. Hs578T	-0.7267	-1.534 to 0.08020	No	ns	0.0869
MDA-MB-231 vs. Hs578T	-0.8267	-1.634 to -0.01980	Si	*	0.0435

**Figura 5:** Comparaciones múltiples de los diferentes estímulos respecto al basal y entre los diferentes estímulos, mediante el método de Tukey, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

### 9.3 Expresión génica de TGF- $\beta$

La expresión del gen que codifica para TGF- $\beta$  en células HMC-1 posterior al estímulo con los medios condicionados de las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, mostró un aumento en la expresión en los 5 tratamientos con los medios condicionados en comparación con las células sin estímulo (basal), el aumento mayor se observa en las células tratadas con el medio condicionado de la línea células MDA-MB-231, sin embargo no existe significancia en los resultados ( $P < 0.05$ ) (Figura 6).

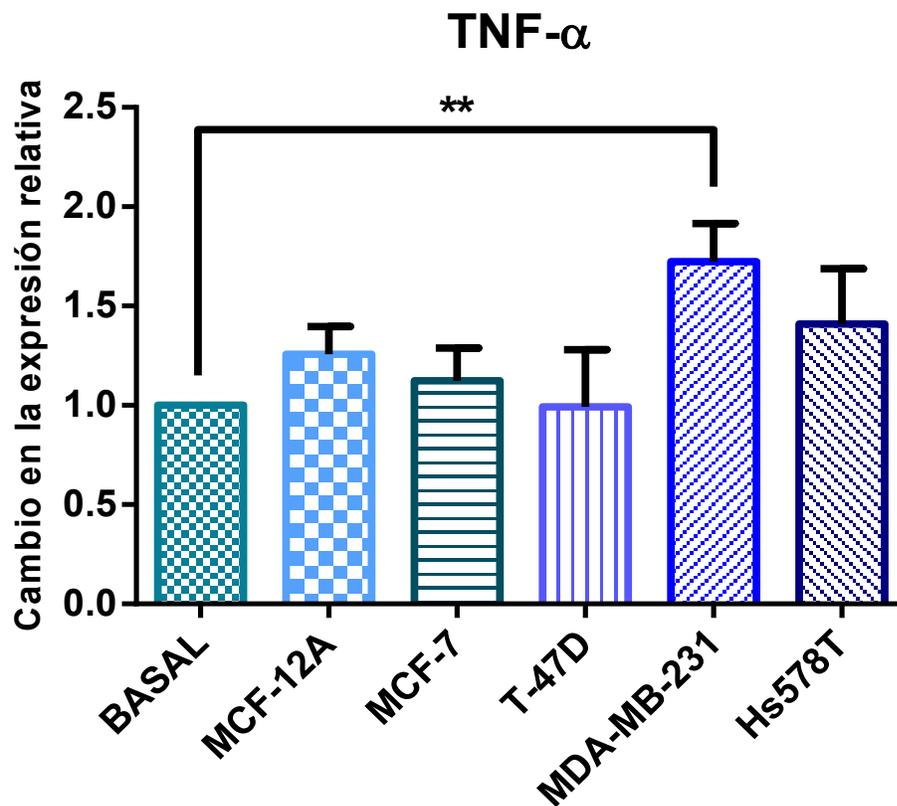


**Figura 6: Expresión génica de TGF- $\beta$  en mastocitos HMC-1**, por efecto de medios condicionados de líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama. Los niveles de expresión fueron comparados con las células sin ningún estímulo. Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La prueba de ANOVA no fue significativa por lo que no se realizó el método de TUKEY para comparaciones múltiples.

#### 9.4 Expresión génica de TNF- $\alpha$

La expresión del gen que codifica para TNF- $\alpha$  en células HMC-1 posterior al estímulo con los medios condicionados de las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, mostró un aumento en la expresión en 4 de los 5 tratamientos con los medios condicionados en comparación con las células sin estímulo (basal), ya que el estímulo con el medio condicionado de la línea celular T-47D se mantuvo igual respecto al basal; se observó un aumento significativo  $**P<0.01$  en el estímulo realizado con la línea celular MDA-MB-231 comparado con la expresión basal y con las líneas MCF-7 y T47D (Figura 7).



**Figura 7:** Expresión génica de TNF- $\alpha$  en mastocitos HMC-1, por efecto de medios condicionados de líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama. Los niveles de expresión fueron comparados con las células sin ningún estímulo.  $**P<0.01$ . Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

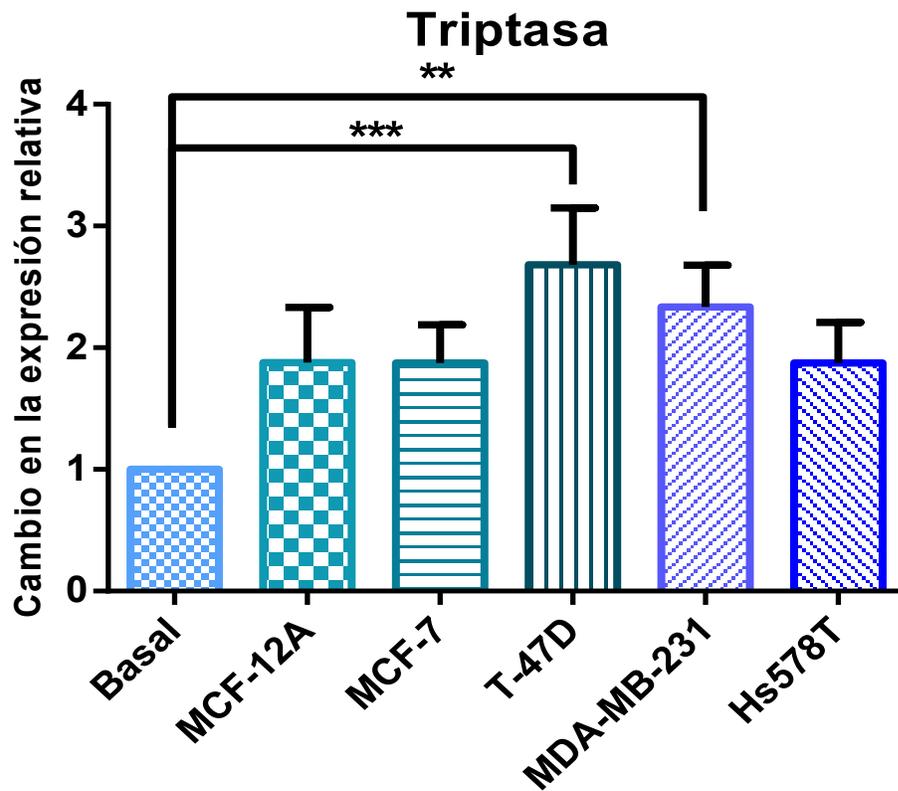
La prueba de ANOVA fue significativa por lo que se realizó el método de TUKEY para comparaciones múltiples, mediante la cual se observó que existe significancia en el aumento en la expresión del TNF $\alpha$  en las células estimuladas con el medio condicionado proveniente de la línea celular MDA-MB-231 (figura 8).

Prueba de Tukey de comparaciones múltiples	Promedio de diferencia	95% CI de diferencia	Significancia	Resumen	Valor de P ajustado
BASAL vs. MCF-12	-0.2567	-0.8093 to 0.2960	No	ns	0.6364
BASAL vs. MCF-7	-0.1233	-0.6760 to 0.4293	No	ns	0.9711
BASAL vs. T-47D	0.006667	-0.5460 to 0.5593	No	ns	> 0.9999
BASAL vs. MDA-MB-231	-0.7233	-1.276 to -0.1707	Si	**	0.0087
BASAL vs. Hs578T	-0.4100	-0.9626 to 0.1426	No	ns	0.2009
MCF-12 vs. MCF-7	0.1333	-0.4193 to 0.6860	No	ns	0.9600
MCF-12 vs. T-47D	0.2633	-0.2893 to 0.8160	No	ns	0.6131
MCF-12 vs. MDA-MB-231	-0.4667	-1.019 to 0.08598	No	ns	0.1179
MCF-12 vs. Hs578T	-0.1533	-0.7060 to 0.3993	No	ns	0.9304
MCF-7 vs. T-47D	0.1300	-0.4226 to 0.6826	No	ns	0.9640
MCF-7 vs. MDA-MB-231	-0.6000	-1.153 to -0.04735	Si	*	0.0308
MCF-7 vs. Hs578T	-0.2867	-0.8393 to 0.2660	No	ns	0.5322
T-47D vs. MDA-MB-231	-0.7300	-1.283 to -0.1774	Si	**	0.0081
T-47D vs. Hs578T	-0.4167	-0.9693 to 0.1360	No	ns	0.1890
MDA-MB-231 vs. Hs578T	0.3133	-0.2393 to 0.8660	No	ns	0.4440

**Figura 8:** Comparaciones múltiples de los diferentes estímulos respecto al basal y entre los diferentes estímulos, mediante el método de Tukey, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

## 9.5 Expresión génica de Triptasa

La expresión de genes de Triptasa en las células HMC-1 mostró un aumento de la expresión, cuando los mastocitos fueron estimulados con cada uno de los 5 tratamientos, con respecto a las células sin estímulo (basal). Interesantemente se puede observar una expresión significativamente mayor en 2 de las líneas con mayor grado de agresividad, en la estimulación con el medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231 (\*\*P<0.01) y con el de la línea celular T-47D (\*\*P<0.001) (figura 9).



**Figura 9: Expresión génica de Triptasa en mastocitos HMC-1**, por efecto de medios condicionados de líneas celulares de fibroadenoma y cáncer de mama. Los niveles de expresión fueron comparados con las células sin ningún estímulo. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. Los valores mostrados son el promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La prueba de ANOVA fue significativa por lo que se realizó el método de TUKEY para comparaciones múltiples, mediante la cual es posible observar que existe significancia en el aumento en la expresión de la enzima Triptasa en las células estimuladas tanto con los medios condicionados de la línea celular MDA-MB-231 y la T-47D (figura 10).

Prueba de Tukey de comparaciones múltiples	Promedio de diferencia	95% CI de diferencia	Significancia	Resumen	Valor de P ajustado
Basal vs. MCF-12	-0.8800	-1.849 to 0.08899	No	ns	0.0834
Basal vs. MCF-7	-0.8767	-1.846 to 0.09232	No	ns	0.0850
Basal vs. T-47D	-1.680	-2.649 to -0.7110	Si	***	0.0009
Basal vs. MDA-MB-231	-1.337	-2.306 to -0.3677	Si	**	0.0059
Basal vs. Hs578T	-0.8767	-1.846 to 0.09232	No	ns	0.0850
MCF-12 vs. MCF-7	0.003333	-0.9657 to 0.9723	No	ns	> 0.9999
MCF-12 vs. T-47D	-0.8000	-1.769 to 0.1690	No	ns	0.1304
MCF-12 vs. MDA-MB-231	-0.4567	-1.426 to 0.5123	No	ns	0.6232
MCF-12 vs. Hs578T	0.003333	-0.9657 to 0.9723	No	ns	> 0.9999
MCF-7 vs. T-47D	-0.8033	-1.772 to 0.1657	No	ns	0.1280
MCF-7 vs. MDA-MB-231	-0.4600	-1.429 to 0.5090	No	ns	0.6166
MCF-7 vs. Hs578T	0.0	-0.9690 to 0.9690	No	ns	> 0.9999
T-47D vs. MDA-MB-231	0.3433	-0.6257 to 1.312	No	ns	0.8334
T-47D vs. Hs578T	0.8033	-0.1657 to 1.772	No	ns	0.1280
MDA-MB-231 vs. Hs578T	0.4600	-0.5090 to 1.429	No	ns	0.6166

**Figura 10:** Comparaciones múltiples de los diferentes estímulos respecto al basal y entre los diferentes estímulos, mediante el método de Tukey, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

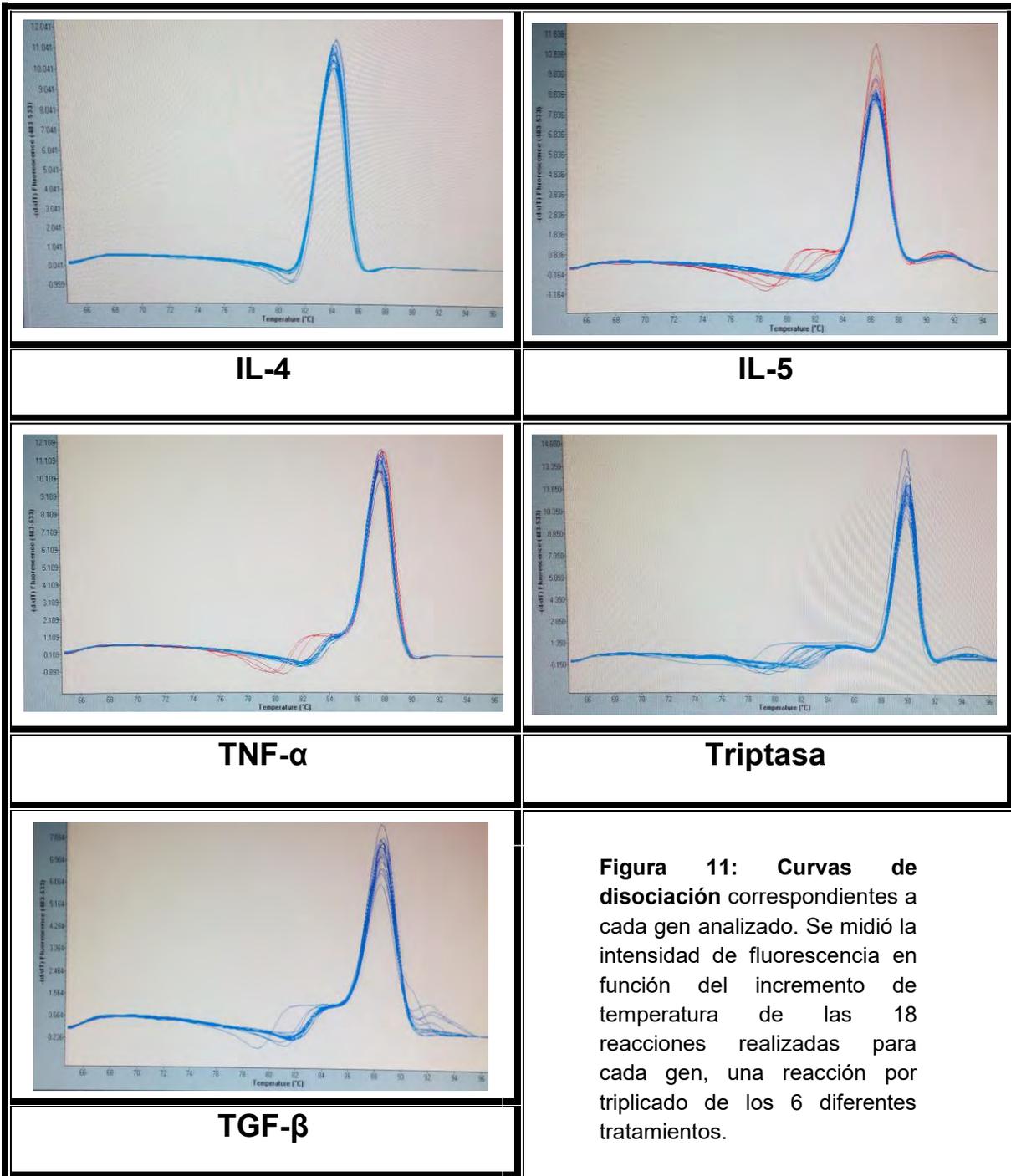
## 9.6 Expresión génica de IFN- $\gamma$

La expresión del interferón gamma no pudo ser determinada, debido a que al realizar la q-PCR para la evaluación de esta citocina no encontrábamos ningún producto de amplificación (datos no mostrados). El correcto diseño de los iniciadores se corroboró realizando el “BLAST” correspondiente; además se probó otra secuencia. Sin embargo, aunque los iniciadores estaban correctos, no se encontró amplificado después de 3 experimentos realizados. La posible explicación de este resultado, es la relativa inmadurez de la línea celular que se trabajó (HMC-1), ya que al tratarse de mastocitos cuya madurez es independiente del SCF, está no llega a ser igual a la de un mastocito *in vivo* y el número de

copias de expresión del IFN- $\gamma$  puede ser tan baja que no es detectable mediante la q-PCR realizada o que dicha expresión sea nula.

## 9.7 Curvas de disociación

Se corroboró la especificidad de cada uno de los iniciadores utilizados en la q-PCR, al observar un solo pico de disociación en las curvas realizadas para cada gen estudiado, lo que corresponde a un único producto amplificado (Figura 11).



**Figura 11: Curvas de disociación** correspondientes a cada gen analizado. Se midió la intensidad de fluorescencia en función del incremento de temperatura de las 18 reacciones realizadas para cada gen, una reacción por triplicado de los 6 diferentes tratamientos.

## 10. DISCUSIÓN

El microambiente celular de un tumor incluye además de células cancerosas, células del estroma y células del sistema inmune. El sistema inmunitario tiene la capacidad natural para detectar y destruir células anormales, previniendo de esta forma el desarrollo de cáncer. Sin embargo, en contraste con la respuesta inmune contra un patógeno, las células del sistema inmune que residen en tumores están desreguladas y funcionalmente dañadas (Kerker y Restifo, 2012). Las complejas interacciones entre los diferentes tipos celulares que residen en el microambiente tumoral comienzan a ser entendidas de una mejor manera, lo cual ha contribuido al diseño de nuevas quimioterapias específicamente dirigidas (Hanahan y Weinberg, 2011).

Los mastocitos son células del sistema inmune que juegan un papel dual y controversial en la respuesta del hospedero hacia el desarrollo de un tumor, donde intervienen factores como el tipo de cáncer, la agresividad del mismo, la genética, entre otros. En el presente estudio se lograron determinar los niveles de expresión de algunos factores solubles secretados por los mastocitos involucrados en el desarrollo de tumores malignos de mama, posterior a una estimulación con medios condicionados de líneas celulares de cáncer de mama que difieren en su grado de malignidad.

Posterior a la estimulación de los mastocitos con los medios condicionados provenientes de las líneas celulares de cáncer de mama, fue posible observar cambios en la morfología celular con respecto a mastocitos sin ningún estímulo (Anexo A); Al incubar a los mastocitos con el medio condicionado de la línea celular MCF-12A, estos cambios no se presentaron, lo anterior puede deberse a que se trata de una línea celular proveniente de un tumor benigno y el microambiente generado es diferente al presente en el cáncer, por lo que no fue capaz de inducir modificaciones morfológicas en el mastocito, ni cambios significativos en la expresión de las citocinas determinadas. Lo anterior es posible observarlo en las diferentes graficas de expresión genética, donde la expresión de la IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  es bastante similar respecto a la expresión en los mastocitos sin estímulo o en estado basal, por otro lado, los cambios morfológicos del mastocito inducidos por los medios condicionados de las líneas celulares MCF-7 y T-47D fueron muy similares, con el medio condicionado de la línea MFC-7 es posible observar un ligero aumento en el tamaño de las células, lo cual también se observó en los mastocitos estimulados con el medio condicionado de la línea celular T-47D, donde además se observaron pequeñas formaciones de “cúmulos” celulares, lo que podría indicar una activación de los mastocitos por los factores solubles presentes en los medios condicionados. La similitud de los cambios

inducidos con ambas líneas, puede deberse a que se trata de líneas celulares con características similares. De manera interesante, las diferencias morfológicas observadas en los mastocitos después de la estimulación con las líneas celulares de mayor agresividad (MDA-MB-231 y Hs578T) fueron más notorias, fue posible observar a los mastocitos HMC-1, que no son adherentes, adheridos al sustrato y mostrando variaciones en su tamaño, esto puede deberse a que al tratarse de líneas celulares cancerígenas de alto grado de agresividad, los factores solubles presentes en sus medios condicionados, pueden estar causando una activación más significativa de los mastocitos o de manera contraria un estrés celular, teniendo como consecuencia modificaciones más drásticas en el fenotipo del mastocito.

En la expresión de la IL-4 después de la estimulación no se observaron cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos respecto al basal, sin embargo es posible observar una tendencia a la baja en la expresión de esta citocina, la cual tiene características anti-tumorigénicas y anti-inflamatorias, lo que podría sugerir que las células cancerígenas están modulando la respuesta del mastocito a su favor para poder desarrollarse, ya que esta citocina ha sido reportada como un potente agente inductor de la apoptosis en células malignas mediante procesos como la fragmentación del DNA y la eliminación cooperativa con los macrófagos (Gooch y cols. 1998; Tepper y cols, 1989).

La IL-5 aumento su expresión de manera significativa ( $P < 0.05$ ) en los mastocitos estimulados con las líneas cancerígenas, los medios condicionados de las líneas MCF-7 y Hs578T indujeron un aumento significativo en la expresión de esta citocina ( $P < 0.01$ ), con respecto al basal y a la línea celular MCF-12A. Diversos autores han observado que niveles elevados de IL-5, considerada una citocina característica de la respuesta Th2, en pacientes con cáncer de mama se asocia a un peor pronóstico (Espinoza y cols. 2016); El-Ghonaimy y cols. en 2015 observaron un incremento, entre otras citocinas, de la secreción de IL-5 en leucocitos asociados a tumor provenientes de infiltrados del microambiente tumoral en pacientes con cáncer de mama y metástasis en ganglio linfático, el cual se caracteriza por una sobreexpresión de la vía de señalización NF- $\kappa$ B/p65; observaron también que estas citocinas aumentan el fenotipo invasivo de la línea celular MCF-7. Por otro lado, se ha reportado que los niveles circulantes de IL-5 son mayores en pacientes con cáncer de mama RE (-) o triple negativos, como la línea celular Hs578T, sin determinar el origen de la producción de la citocina (Hong y cols. 2013). La diferencia en la expresión de la IL-5 entre Hs578T y MDA-MB231, las cuales comparten características en su agresividad y expresión de receptores, demuestra la plasticidad de los mastocitos. El aumento en la secreción de esta citocina por los mastocitos, indica que los tumores cancerígenos están

modulando la respuesta del hospedero a su favor, favoreciendo la producción de citocinas que facilitan su desarrollo y su capacidad invasiva.

La disminución en la expresión de la IL-4, podría estar relacionada con el subtipo de mastocitos que se ha localizado clásicamente en los infiltrados de cáncer de mama, ya que los mastocitos triptasa-quimasa positivos están asociados con la producción de IL-4 y estos no se han encontrado en gran número, comparado con la densidad de mastocitos triptasa positivos observados en tejidos de cáncer de mama, los cuales se caracterizan por la expresión de IL-5 e IL-6, lo cual correlaciona con los aumentos en la expresión de IL-5 observados en el proyecto (Löber K, 2008).

El TNF- $\alpha$  es un factor soluble pro-inflamatorio asociado, la gran mayoría de veces, a favorecer la agresividad y migración del cáncer. En el presente estudio, después de la estimulación de los mastocitos, fue posible observar un aumento significativo en la expresión de ésta citocina cuando se estimuló con el medio condicionado de una de las líneas más agresivas comparado con mastocitos sin estímulo, indicando que este factor tiene un papel que beneficia a las células tumorales; de manera particular, es posible observar un aumento significativo ( $P < 0.01$ ) en la expresión de este factor en la línea celular MDA-MB-231, y un aumento visible, más no significativo con la línea celular Hs578T, en comparación al estado basal, lo cual indica, que la agresividad de estas líneas celulares es capaz de inducir en los mastocitos la expresión diferencial de esta citocina. Se ha observado que el TNF- $\alpha$ , junto a la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , son capaces de inducir muerte e inhibición de la proliferación de las células de cáncer de mama que presentan el receptor para estrógeno y progesterona como las líneas celulares MCF-7 y T-47D, al bloquear del receptor del IGF-1 (IGF-1R), el cual es un potente mitógeno de células transformadas, promoviendo la síntesis de DNA. La disminución en la expresión de este factor por parte de los mastocitos al ser estimulados con los medios condicionados provenientes de éstas dos líneas celulares, sugieren que la célula tumoral está modulando la respuesta del mastocito a su favor; éste efecto no aplica en las líneas celulares triple negativas (Sheng y cols. 2002).

Otro de los factores con características pro-tumorales determinado en este estudio fue la triptasa, su expresión aumento significativamente ( $P < 0.05$ ), aunque este aumento no se correlaciono con el grado de malignidad de las líneas celulares, se observa un aumento significativo ( $P < 0.001$ ) en los mastocitos tratados con el medio condicionado de la línea T-47D y un aumento igual significativo ( $P < 0.01$ ) en las células estimuladas con el medio condicionado obtenido de la línea celular MDA-MB-231, las cuales son 2 de las líneas con mayor grado de agresividad estudiadas en este proyecto, la razón por la cual la

línea Hs578T no muestra un aumento significativo en la expresión de la enzima, demuestra una vez más la capacidad de plasticidad que poseen estas células y que puede ser usada por las células cancerígenas a su favor. El aumento significativo en la expresión de la triptasa al comparar el efecto de las diferentes líneas celulares respecto al basal, indica que esta regulación a la alta beneficia a la célula tumoral.

Por último, la expresión de TGF- $\beta$  no se vio influenciada por el grado de malignidad de las líneas celulares tumorales, siendo no significativa, indicando que las células tumorales podrían no estar favorecidas con la expresión de esta citocina, la cual interviene en procesos como la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis, y que se reporta juega un papel modulador en el cáncer de mama, dependiendo de la etapa en la que se encuentra el proceso (Esquivel-Velázquez y cols. 2015).

Al comparar la expresión en los mastocitos HMC-1 de las citocinas y la proteasa evaluadas al ser estimulados con los medios condicionados, es posible observar que la agresividad de las líneas celulares, si influye, ya que las líneas de cáncer de mama, generaron un aumento significativo en por lo menos uno de los factores solubles determinados.

Al analizar y comparar los resultados obtenidos en este trabajo con estudios previos los cuales relacionan la presencia de infiltrados mastocitarios con un efecto protector y un buen pronóstico (Aaltomaa y cols. 2003; Della-Rovere y cols. 2009; Fakhjou y cols. 2016; Rajput y cols. 2008), el aumento significativo en la expresión de TNF- $\alpha$ , la IL-5 y la triptasa, nos sugieren una correlación entre la presencia de estas células y un mal pronóstico para el cáncer de mama; ya que se trata de factores solubles que se encuentran estimulando una respuesta protumoral. Es materia de investigación conocer cuáles son los factores que se encuentran en los medios condicionados de las líneas tumorales, que están estimulando la expresión de estas moléculas en el mastocito. Importantemente, podemos observar que la modulación en la expresión de citocinas o la triptasa en el mastocito, no se indujo, de manera significativa, cuando los mastocitos fueron estimulados con los medios condicionados de las células no transformadas y que el aumento en la producción de estos factores no es correlativo al aumento en el grado de agresividad de la línea tumoral, esto puede ser consecuencia de las diferencias en la secreción de factores solubles por las diferentes células tumorales, los cuales pueden estar estimulando a los mastocitos de la línea celular HMC-1 de manera diferencial. Debido a lo anterior, el estudio de la comunicación entre los mastocitos y las células de cáncer de mama debe ser investigado más a fondo y ese es el propósito de este proyecto, el cual tiene la finalidad de conocer

las vías por las cuales estas células interactúan en el microambiente tumoral, lo que daría como consecuencia potenciales blancos terapéuticos en el tratamiento de esta enfermedad.

## 11. CONCLUSIONES

- Se logró estimular la línea de mastocitos HMC-1 con los medios condicionados de las líneas celulares: MCF-12<sup>a</sup>, MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 y Hs578T.
- La expresión de IL-5, TNF- $\alpha$  y triptasa en los mastocitos se ve influenciada por la agresividad de las líneas tumorales de cáncer de mama.
- La expresión de IL-4 y TGF- $\beta$  en el mastocito no se ve afectada por la agresividad de las células tumorales.
- La expresión de IFN- $\gamma$  no pudo ser determinada en los mastocitos de la línea celular HMC-1.
- El aumento en la expresión de factores solubles como: IL-5, TNF- $\alpha$  y triptasa, sugieren que la presencia de mastocitos en el microambiente tumoral, es modulada por las células de cáncer de mama para favorecer su desarrollo, ya que se trata de moléculas involucradas en procesos pro-tumorales.

## 12. PERSPECTIVAS

- Determinar la expresión de IFN- $\gamma$  con líneas celulares maduras de mastocitos como la LAD-2, y con células productoras de esta citocina, para corroborar los resultados obtenidos con los mastocitos HMC-1.
- Llevar a cabo una cinética de reacción, evaluando la expresión diferencial de las citocinas a diferentes tiempos de estimulación con los medios condicionados de las células de fibroadenoma y cáncer de mama, para observar si existen modificaciones en la producción de estas a tiempos de estimulación más cortos.

### 13. REFERENCIAS

1. Aaltomaa S, Lipponen P, Papinaho S, & Kosma VM. (1993). Mast cells in breast cancer. *Anticancer Res*; 13:785–8.
2. American Cancer Society. (2016). Breast cancer. Georgia, USA: American Cancer Society.
3. Arango-Prado MC & Rodríguez-Padilla C. (2016). Role of the immune system in the microenvironment of malignant tumors of breast. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*; 32(2), 190-202.
4. Ammendola M, Patruno R, Di Lecce V, Tilde M, Valerio P, Misino A, Gadaleta CD & Ranieri G. (2010). Mast cells positive to tryptase correlates with protease-activated receptor-2 expression and microvascular density in breast cancer patients. *BMC Geriatrics*; 10(Suppl 1): A114.
5. American Type Culture Collection (ATCC). (2016). Cell lines [En línea]. consultado el día 2 de noviembre de 2016, disponible en: [https://www.atcc.org/en/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines.aspx](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx).
6. Baumgarten SC & Frasor J. (2012). Minireview: Inflammation: As instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Mol Endocrinol*; 26(3): 360-371
7. Bowrey PF, King J, Magarey C, Schwartz P, Marr P, Bolton E. & Morris DL. (2000). Histamine, mast cells and tumour cell proliferation in breast cancer: does preoperative cimetidine administration have an effect?. *Br J Cancer*; 82:167–70.
8. Cárdenas J, Bargalló J, Erazo A, Poitevin A, Valero V & Pérez V. (2015). Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y tratamiento para el cáncer mamario. México: Masson Doyma México S.A.
9. Conelly L, Barham W, Onishko HM, Sherrill T, Chodosh LA, Blackwell TS & Yull FE. (2011). Inhibition of NF-kappaB activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden. *Oncogene*; 30(12): 1402-1412.
10. Cortes Muñoz D. (2016). Influencia del Grado de Malignidad de la Célula Tumoral de Cáncer de Mama en la Respuesta del Mastocito. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Veracruz, Veracruz.
11. Cortinas C. (2011). Cáncer: herencia y ambiente. México: Fondo de cultura económica.
12. Della-Rovere F, Granata A, Familiari D, D'arrigo G, Mondello B & Basile G. (2007). Mast cells in invasive ductal breast cancer: different behavior in high and minimum hormone-receptive cancers. *Anticancer research*; 27:2465-2472.

13. De Souza Junior DA, Santana AC, Marcelino da Silva EZ, Oliver C & Jamur MC. (2015). The role of mast cell specific chymases and tryptases in tumor angiogenesis. *BioMed Research Internaional*.
14. Dighe AS, Richards E, Old LJ & Schreiber RD. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*; 1(6): 447–56.
15. El-Ghonaimy EA, El-Shinawi M, Ibrahim SA, El-Ghazaly H, Abd-El-Tawab R, Nouh MA, El-Mamlouk T & Mohamed MM. (2015). Positive lymph-node breast cancer patients – activation of NF-kB in tumor-associated leukocytes stimulates cytokine secretion that promotes metastasis via C-C chemokine receptor CCR7. *FEBSjournal*; 282(2):271-82.
16. Espinoza JS, Jabeen S, Batra R, Papaleo E, Haakensen V, Timmermans V, Moller ML, Brunner N, Borresen-Dale AL, Gromov P, Helland A, Kristensen VN & Gromova I. (2016). Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics. *Oncoimmunology*; 5(12).
17. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola M, Nava-Castro K, Castro J & Morales-Montor J. (2015). The role of cytokines in breast cancer development and progression. *Journal of interferon and cytokine research*; 35(1).
18. Fakhjou A, Naghavi-Behzad M, Vahid M, Karkon-Shayan F, Norouzi-Panahi L & Piri R. (2016). The relationship between histologic grades of invasive carcinoma of breast ducts and mast cell infiltration. *South Asian Journal of Cancer*. 5(1): 5-7.
19. Fresno-Forcelledo MF. (2004). Determinación inmunohistoquímica de CD117 *c-kit* en el GIST (tumor estromal gastrointestinal). *Oncología*; 27(4): 242-245.
20. Gilfillan AM & Tkaczyk C. (2006). Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunology*; 6: 218-230.
21. Goldberg JE & Schwertfeger KL. (2010). Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Curr Drug Targets*; 11(9):1133–1146.
22. Gooch JL, Lee AV & Yee D. (1998). Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer research*; 58, 4199-4205.
23. Hamed EA, Zakhary MM & Maximous DW. (2012). Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*; 138(6):999–1009.
24. Hanahan D & Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144:646-74.

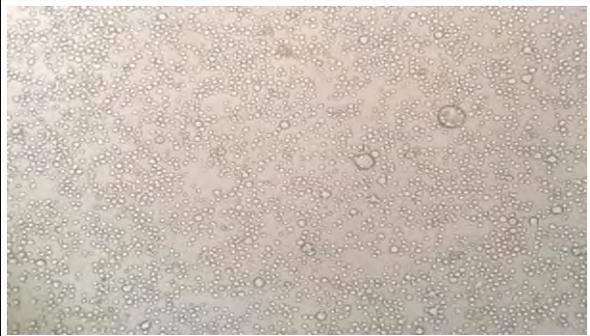
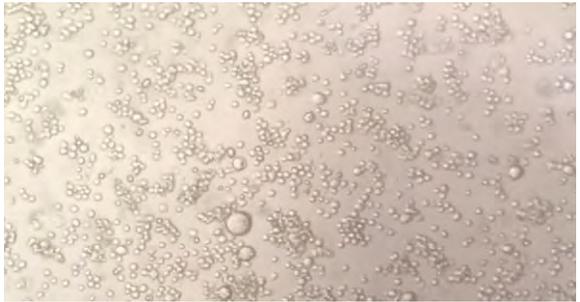
25. Hong CC, Yao S, McCann SE, Dolnick RY, Wallace PK, Gong Z, Quan L, Lee KP, Evans SS, Repasky EA, Edge SB & Ambrosone CB. 2013. Pretreatment levels of circulating Th1 and Th2 cytokines, and their ratios, are associated with ER-negative and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*;139(2):477-88
26. Huang B, Lei Z, Zhang GM, Li D, Song C, Li B, Liu Y, Yuan Y, Unkeless J, Xiong H & Feng ZH. (2008) SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood* 112(4):1269–1279.
27. Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). (2014). Onco guía. México: INCAN.
28. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2016). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. Aguascalientes: INEGI.
29. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G & Schwartz LB. (1986) Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12):4464–4468
30. Kamel M, Shouman S, El-Merzebany M, Kilic G, Veenstra T, Saeed M & Salama S. (2012). Effect of tumour necrosis factor alpha on estrogen metabolic pathways in breast cancer cells. *J Cancer*; 3:310–321.
31. Kankkunen JP, Harvima IT & Naukkarinen A. (1997). Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int. J. Cancer*; 72, 385-388.
32. Kashiwase Y, Morioka J, Inamura H, Yoshizawa Y, Usui R & Kurosawa M. (2004). Quantitative analysis of mast cells in benign and malignant breast lesions. Immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Int. Arch Allergy Immunol.* 134(3): 199-205.
33. Kerkar SP & Restifo NP. (2012). Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res*; 72(13); 3125-30.
34. Kurtzman SH, Anderson KH, Wang Y, Miller LJ, Renna M, Stankus M, Lindquist RR, Barrows G & Kreutzer DL. (1999). Cytokines in human breast cancer: IL-1alpha and IL-1beta expression. *Oncology reports*; 6(1); 65-135.
35. Lee EJ, Lee SJ, Kim S, Cho SC, Choi YH, Kim WJ & Moon SK. 2013. Interleukin-5 enhances the migration and invasion of bladder cancer cells via ERK1/2-mediated MMP-9/NF- $\kappa$ B/AP-1 pathway: involvement of the p21WAF1 expression. *Cellular signalling*; 25(10):2025-38.
36. Löber K. (2008). Caracterización y comparación de las señales de transducción implicadas en la activación de las células HMC-I<sub>560</sub> y HMC-I<sub>560,816</sub>. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. A Coruña, España.

37. Luca D, Frossi B, Giorgia G, Mion F, Guarnotta C, Boniovanni L, Tripodo C, Mariuzzi L, Marzinotto S, Rigoni A, Blank U, Colombo M & Pucillo C. (2015). Mast cells boost myeloid-derived suppressor cell activity and contribute to the development of tumor-favoring microenvironment. *Cancer immunology research*; 3(1).
38. Madigan MT, Martinko JM & J Parker. (2000). Brock biology of microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 991 pp.
39. Mangia A, Malfettone A, Rossi R, Paradiso A, Ranieri G, Simone G & Resta L. (2011). Tissue remodeling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. *Histopathology* 58, 1096-1106
40. Marcelino da Silva E, Jamur MC & Constance O. (2014). Mast Cell Function: A new Vision of an Old Cell. *J Histochem Cytochem*.
41. Marichal T, Tsai M & Galli S. (2013). Mast cells: potential and negative roles in tumor biology. *Cancer immunology research*; 1(5); 269-79.
42. Meng X, Gu Y, Zhao F, Lu H, Cheng S & Yin L. (2010). Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion. *Oncology reports*; 23: 615-619.
43. Nagai S & Toi M. (2000). Interleukin-4 and breast cancer. *Breast cancer*; 7(3): 181-6.
44. Rabenhorst A & Hartmann K. The role of mast cells in the microenvironment of tumors. Department of Dermatology, University of Cologne. 50937 Cologne Germany.
45. Rajput AB, Turbin DA, Cheang MC, Voduc DK, Leung S, Gelmon KA, Gilks CB & Huntsman DG. (2008). Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res Treat*; 107(2):249–257.
46. Ranieri G, Ammendola M, Patruno R, Celano G, Zito FA, Montemurro S, Rella A, Di Lecce V, Gadaleta CD, Battista de sarro G & Ribatti D. (2009). Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. *International journal of oncology*; 35: 115-120.
47. Raza Zaidi M & Merlino G. (2011). The two faces of interferon- $\gamma$  in cancer. *Clin Cancer Res*; 17 (19): 6118-6124.
48. Reynolds JL, Akhter JA, Magarey CJ, Schwartz P, Adams WJ. & Morris DL. (1998). Histamine in human breast cancer. *British Journal of Surgery*; 85, 538-541.
49. Ribatti D. (2013). Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. *Immunol Letters*; 152, 83-88.
50. Rigoni A, Colombo P & Pucillo C. (2014). The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment. *Springer Science Business Media Dordrecht*.

51. Shen WH, Zhou JH, Broussard S, Freund G, Dantzer R & Kelley K. (2002). Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor. *Cancer Research*. 62, 4746-4756.
52. Siegel RL, Miller KD & Jemal A. (2016). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*; 66:7–30.
53. Simon R, Panussis S, Maurer R, Spichtin H, Glatz K, Tapia C, *et al.* (2004). Kit (CD117) positive breast cancers are infrequent and lack Kit gene mutations. *Clinical Cancer Research*. 204; 10: 178-183.
54. Simson L, Ellyard J, Dent L, Matthaei K, Rotheberg M, Foster P, Smyth M & Parish C. (2007). Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *Journal of Immunology*; 178:4222-4229.
55. Tamay de Dios L, Ibarra C & Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*; 2(2): 70-78.
56. Tepper, R. P, Pattengale K & Leder P. (1989). Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 57: 503–512.
57. Theoharides TC, Valent P & Akin C. (2015). Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N. Engl. Journal of Medicine*; 373: 163-172.
58. Theoharis TC, Konstantinos D, Asimenia A & Bodi Z. (2010). Mast Cells and Tumor Microenvironment. R.G. Bagley (ed.). *The Tumor Microenvironment, Cancer Drug Discovery and Development*. 353-370.
59. Thermo Fisher Scientific. (2015). RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. [En línea] consultado el 2 de noviembre de 2016, disponible en <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1621>
60. Thiago M, Moura I & Hermine O. (2015). The role of mast cells in cancers. *F1000Prime Reports*; 7(9).
61. Todorović-Raković N & Milovanović J. (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. *Journal of interferon and cytokine research*; 33(10).
62. Valdivia-Silva J. (2012). Mast cells and basophils: its new functions in immunity. *Dermatol Peru*; 23(2).
63. Von Mach-Szczypinski J, Stanosz S, Sieja K & Stanosz M. (2009). Metabolism of histamine in tissues of primary ductal breast cancer. *Metabolism clinical and experimental*; 58: 867-870.
64. Xian X. (2014). Three-Dimensional In Vitro Tumor Models for Cancer Research and Drug Evaluation. *Biotechnology Advances*: 32(7).
65. Xiang M, Gu Y, Zhao F, Lu H, Chen S. & Yin L. (2009). Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion. *Oncol Rep*; 23: 615–9.

## 14. ANEXOS

### 14.1 Anexo A: Morfología de la línea celular HMC-1 posterior a la incubación con los medios condicionados.

	
<b>HMC-1/Stem-Pro Suplementado Completo sin SFB. 40X</b>	<b>HMC-1/ Medio condicionado de la línea celular MCF-12A. 40X</b>
	
<b>HMC-1/ Medio condicionado de la línea celular MCF-7. 40X</b>	<b>HMC-1/ Medio condicionado de la línea celular T-47D. 40X</b>
	
<b>HMC-1/ Medio condicionado de la línea celular MDA-MB-231. 40X</b>	<b>HMC-1/ Medio condicionado de la línea celular Hs578T. 40X</b>

**ANEXO A:** Cambios morfológicos de la línea celular HMC-1 posterior a la incubación con los medios condicionados de las 5 líneas celulares de cáncer de mama respecto a las células que se mantuvieron con medio Stem-Pro suplementado completo sin Suero Fetal Bovino, las condiciones de incubación fueron: 24 hrs/ CO<sub>2</sub> 5% / 37°C.