



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ADIPOSOMAS  
DERIVADOS DE TEJIDO ADIPOSO ASOCIADO A TUMORES  
MAMARIOS PARA EL ESTUDIO DE SU EFECTO EN LA  
EXPANSIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Naray Alejandra Acevedo Domínguez**

**DIRECTORA DE TESIS**

**Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: ENRIQUE ORTEGA SOTO**  
**VOCAL: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**  
**SECRETARIO: MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO**  
**1° SUPLENTE: OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA**  
**2° SUPLENTE: EDGAR RICARDO VAZQUEZ MARTINEZ**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

LABORATORIO A019, DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

### **ASESORA**

---

Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

### **SUPERVISORA TÉCNICA**

---

Dra. Cynthia Paola López Pacheco

### **SUSTENTANTE**

---

Naray Alejandra Acevedo Domínguez

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por sus valiosas enseñanzas y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Cynthia Paola López Pacheco por su asesoría para el diseño de los experimentos y su apoyo en la obtención, procesamiento y análisis de las muestras.

Al Dr. Gregorio Quintero Beuló, el Dr. Azcary Vázquez Tinajero y el Dr. Fernando Lara González del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” por el apoyo brindado durante la etapa de adquisición de muestras quirúrgicas.

A la QFB Gisela DuPont y al M. en C. Óscar Hernández Campos por el apoyo técnico brindado para la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Arimelek Cortés Hernández y la M. en C. Estefanía Scarlett Ortega Chávez por su apoyo para el establecimiento de la metodología de expansión de linfocitos T reguladores.

A la Dra. Violeta Jiménez y las M. en C. Aleida Núñez Ruiz y Flor Trinidad Sánchez Brena por su apoyo en el establecimiento de la metodología de aislamiento de adiposomas.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LABNALCIT), especialmente al QFB Carlos Castellanos Barba, por su apoyo en la separación celular y adquisición de muestras para el establecimiento de las condiciones de expansión de linfocitos T reguladores.

A CONACYT, por el apoyo otorgado para el desarrollo del proyecto de Fronteras de la Ciencia #187 titulado *“Papel de los adiposomas y exosomas tumorales en la regulación del proceso inflamatorio asociado al cáncer de mama en obesidad”*.

Por último, pero no menos importante, agradezco a todas las pacientes que nos otorgaron su consentimiento y aceptaron participar en los estudios de este proyecto. Sin ellas, este trabajo no habría sido posible.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	1
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1. Cáncer de Mama.....	6
3.2. Distribución y Estadísticas en México y el Mundo.....	6
3.3. Clasificación del Cáncer de Mama.....	7
3.4. Factores de Riesgo.....	8
3.5. Obesidad.....	8
3.6. Tejido Adiposo y Cáncer de Mama.....	9
3.7. Tejido Adiposo y Sistema Inmunológico.....	10
3.8. Inmunoedición del cáncer.....	10
3.9. Linfocitos T reguladores.....	12
3.10. Tregs en Cáncer de Mama.....	15
3.11. Exosomas.....	17
3.12. Adiposomas.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVOS.....	23
6.1. Objetivo General.....	23
6.2. Objetivos Particulares.....	23
7. METODOLOGÍA.....	24
7.1. Obtención y purificación de adiposomas a partir de tejido adiposo mamario de pacientes con cáncer de mama.....	25
7.1.1. Digestión del tejido adiposo y cultivo de adipocitos.....	25
7.1.2. Purificación de adiposomas por ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño.....	25
7.2. Caracterización de los adiposomas.....	26
7.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	26
7.2.2. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).....	26
7.3. Establecimiento de las condiciones experimentales para la expansión de Tregs: Paquetes leucocitarios/muestras de sangre de sujetos sanos.....	27

7.3.1.	Aislamiento de CMNs de sangre periférica por gradiente de densidad.	27
7.3.2.	Criopreservación de CMNs.	27
7.3.3.	Descongelación de las CMNs.	28
7.3.4.	Tinción para FACS de CMNs.	28
7.3.5.	FACS.	29
7.3.6.	Tinción con CTV de Tregs separadas por FACS.	29
7.3.7.	Expansión ex vivo.	30
7.3.8.	Tinción del Tiempo 0	31
7.4.	Tinción para análisis por citometría de flujo	32
7.5.	Análisis estadístico	32
7.6.	Diagrama resumen del diseño experimental	33
8.	RESULTADOS	34
8.1.	Caracterización de adiposomas	34
8.2.	Establecimiento de las condiciones experimentales para la expansión de Tregs	36
8.2.1.	Curso temporal de la expansión de Tregs ex vivo	36
8.2.2.	Curva de cantidad de células con condiciones óptimas.	37
8.2.3.	Curva de dosis de estímulo anti-CD3/CD28 (Dynabeads).	39
9.	DISCUSIÓN	42
10.	CONCLUSIONES	49
11.	PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	49
12.	REFERENCIAS	50
13.	APÉNDICES	55
13.1.	APÉNDICE A	55
13.2.	APÉNDICE B	56
13.3.	APÉNDICE C	59

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>1X</b>	Concentración de uso
<b>2X</b>	Doble de la concentración de uso
<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>α-MEM</b>	Medio Mínimo Esencial alfa
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>Anti-Anti</b>	Solución Antibiótica (Penicilina-Esterptomicina) y Antimicótica (Anfotericina)
<b>BA</b>	Amortiguador para Adipocitos
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina
<b>CaMa</b>	Cáncer de Mama
<b>CF</b>	Citometría de Flujo
<b>CMNs</b>	Células Mononucleares
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CTV</b>	Cell-Trace Violet
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>ER</b>	Receptor de Estrógeno
<b>F12</b>	Mezcla de Nutrientes F12
<b>FACS</b>	Separación Celular Asistida por Fluorescencia
<b>FoxP3</b>	Proteína Forkhead box P3
<b>h</b>	Hora
<b>HEPES</b>	Amortiguador
<b>HER2/neu</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano
<b>HGM</b>	Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>ISEV</b>	Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares, por sus siglas en inglés
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>MET</b>	Microscopía Electrónica de Transmisión
<b>MFI</b>	Intensidad Media de Fluorescencia
<b>miRNA</b>	Micro Ácidos Ribonucleicos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MRM</b>	Masctectomía radical modificada
<b>MT</b>	Mastectomía total
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno
<b>NEAA</b>	Aminoácidos no esenciales
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NTA</b>	Análisis por rastreo de nanopartículas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	Solución salina amortiguadora de fosfatos
<b>PHG</b>	Paciente de Hospital General
<b>PR</b>	Receptor de Progesterona
<b>PTA</b>	Ácido Fosfotúngstico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino

<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>TA</b>	Tejido Adiposo
<b>TN</b>	Triple Negativo
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante beta
<b>Treg</b>	Linfocitos T reguladores
<b>UF</b>	Ultrafiltración

## 1. RESUMEN

La creciente evidencia documentada sobre el papel de la obesidad en la iniciación y progresión del cáncer ha impulsado el interés de dilucidar los mecanismos a través de los cuales esta patología podría estar modulando el microambiente tumoral. Recientemente, los exosomas provenientes de células tumorales han cobrado gran relevancia, ya que se los ha relacionado con la progresión del cáncer debido a su capacidad de regular la respuesta inmunológica y promover fenómenos como la angiogénesis y la metástasis, entre otros. Por otro lado, existen apenas algunos reportes que describen el efecto de exosomas liberados por adipocitos (adiposomas) sobre las células tumorales y algunas poblaciones del sistema inmunológico. Sin embargo, poco se sabe mucho acerca del efecto que los adiposomas pudieran tener en la biología de los linfocitos T reguladores (Tregs), lo cual es de interés en cáncer debido a la capacidad que poseen estas células de suprimir la respuesta anti-tumoral. En el presente trabajo, se estableció una metodología para el aislamiento y caracterización de adiposomas provenientes de tejido adiposo asociado a tumores mamarios. Se compararon muestras obtenidas de pacientes de peso normal, con sobrepeso y con obesidad, no encontrándose diferencias entre los tres grupos en cuanto a su tamaño ni su concentración normalizada por gramo de tejido. Asimismo, se establecieron las condiciones subóptimas necesarias para poder evaluar el efecto de estas vesículas extracelulares en la expansión *ex vivo* de linfocitos T reguladores (Tregs). Los hallazgos de este trabajo permitirán realizar los ensayos funcionales para determinar el efecto de los adiposomas provenientes de tejido adiposo asociado a tumores mamarios en la expansión de Tregs.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) es una enfermedad de alta prevalencia entre la población femenina mexicana, constituyendo la principal causa de mortalidad por tumores malignos y siendo también el padecimiento con mayor índice de morbilidad en mujeres mayores de 20 años. El CaMa puede clasificarse clínicamente de acuerdo con el estadio en el que se encuentra la enfermedad, y molecularmente, en subtipos de acuerdo con la expresión de receptores hormonales, entre otras clasificaciones. Existen varios factores de riesgo que predisponen al padecimiento de esta enfermedad, entre los cuales destaca la obesidad. Los adipocitos de tejido adiposo obeso sufren cambios en la producción de citocinas y el reclutamiento de células del sistema inmunológico con respecto al tejido adiposo sano, lo cual modifica el microambiente tumoral, donde existe una gran cantidad de células que mantienen una estrecha comunicación. Uno de los mecanismos más investigados actualmente es la comunicación intercelular mediada por la liberación de vesículas extracelulares que transportan biomoléculas activas a células blanco en sitios lejanos induciendo efectos biológicos diversos. Los exosomas son vesículas extracelulares de 30-150 nm secretadas por varios tipos de células que de manera importante favorecen la progresión del cáncer, activando vías tumorigénicas a través de alteraciones en la regulación de células del sistema inmunológico, células endoteliales y células tumorales, contribuyendo también a la formación de un nicho tumoral en otros órganos para facilitar la metástasis del tumor primario. Por otro lado, se sabe que, en el contexto del CaMa, hay una correlación positiva entre el incremento de las Tregs intratumorales y mal pronóstico de las pacientes. Existen varios mecanismos que pueden mediar el aumento de las Tregs, siendo uno de ellos su expansión *in situ*. Hasta el momento, se desconoce si los adiposomas pudieran estar involucrados en este proceso por lo cual es de interés su estudio.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. *Cáncer de Mama***

El pecho en las mujeres adultas alberga a la glándula mamaria, la cual es una glándula especializada en la producción de leche durante la lactancia. Este tejido se encuentra principalmente formado por a) células epiteliales, las cuales conforman los lóbulos y lobulillos de la glándula, donde tiene lugar la producción de leche; b) células mioepiteliales, las cuales conforman los ductos que son los encargados de llevar la leche de los lóbulos al pezón y c) estroma, el cual está conformado en gran medida por el tejido adiposo que rodea la glándula y fibroblastos que participan en el desarrollo de la glándula.<sup>1,2</sup> El tejido mamario se caracteriza por su plasticidad, puesto que sufre una remodelación extensa durante la adultez, factor que incrementa su susceptibilidad a la carcinogénesis.<sup>1</sup>

El CaMa es la hiperplasia maligna que afecta a la glándula mamaria. Es ocasionada por la proliferación descontrolada y exacerbada de las células epiteliales y mioepiteliales que la conforman.<sup>3</sup> Aún no se conoce el mecanismo específico que desencadena el desarrollo tumoral en CaMa pero existen dos principales hipótesis a nivel celular que buscan explicar el mecanismo de iniciación de esta patología: el modelo de evolución clonal, que propone una acumulación de mutaciones y cambios epigenéticos en las células tumorales, donde las más aptas son seleccionadas para sobrevivir y proliferar, y el modelo de células troncales cancerosas, el cual propone que solo las células cancerígenas precursoras inician y sostienen la progresión del tumor.<sup>4</sup>

#### **3.2. *Distribución y Estadísticas en México y el Mundo***

El CaMa es un problema de salud mundial, el cual va en aumento año tras año. De acuerdo con las últimas estadísticas publicadas por GLOBOCAN en 2020, el CaMa se encuentra en el primer lugar de los cánceres con mayor incidencia y es el quinto con la mayor mortalidad en el mundo para ambos sexos. En mujeres, este

padecimiento presenta la mayor incidencia y mortalidad de todos los cánceres, superando al cáncer de pulmón.<sup>5</sup>

En México se estima que los tumores malignos son la 4ª causa de muerte en mujeres después de enfermedades cardiovasculares, diabetes, entre otras. Entre los tumores malignos, el cáncer de mama es el que presenta la mayor mortalidad con un 15.4%, donde el grupo de edad más afectado va desde los 40 a los 59 años.<sup>6</sup>

### **3.3. Clasificación del Cáncer de Mama**

El CaMa puede clasificarse de acuerdo con diferentes criterios, los cuales son útiles en la clínica para la asignación de regímenes terapéuticos adecuados para cada tipo de cáncer.<sup>4</sup> De forma general, este conjunto de patologías puede clasificarse de las siguientes formas:

- Clasificación Histopatológica: De forma general se clasifica el cáncer en pre-invasivo, cuando este se limita a la membrana basal e invasivo, cuando este sobrepasa la membrana basal. Además, puede subclasificarse de acuerdo con el sitio donde se origina en: carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular in situ y carcinoma lobular invasivo. Esta clasificación es descriptiva de acuerdo con la arquitectura y disposición espacial que presenta el tumor.
- Clasificación por subtipo molecular: El CaMa puede ser subclasificado de acuerdo con la sobreexpresión o ausencia de receptores hormonales en 4 subtipos principales. Luminal A (sobreexpresión del receptor de estrógenos ER y/o progesterona PR, Her2 negativo y con un Ki67 menor o igual al 10%); Luminal B (sobreexpresión de ER y/o PR, Her2 positivo o negativo y Ki67 mayor al 10%); Her2+ (ER/PR negativos, Her2 positivo); Triple Negativo (ER, PR y Her2 negativo).
- Clasificación por estadio clínico: Se basa en la clasificación TNM en la cual se monitorea el tamaño tumoral (T), el número de nódulos linfáticos invadidos por células tumorales (N) y metástasis (M). De acuerdo con estos

valores, el CaMa se clasifica en los estadios I, II, III y IV, los cuales a su vez presentan subclasificaciones.<sup>4,7</sup>

### **3.4. Factores de Riesgo**

Los factores de riesgo son diversos, incluyendo aquellos no modificables como la raza, el género, la edad, mutaciones en los genes *BRCA1/2* y/o *TP53*, alta densidad de tejido mamario, menopausia, antecedentes familiares, entre otros. Existen otros que pueden ser modificables como el sobrepeso y la obesidad, sedentarismo, exposición a carcinógenos, radiación, tratamientos hormonales, uso de anticonceptivos orales, consumo de alcohol, no haber tenido hijos y/o no haber lactado, entre muchos otros relacionados con el historial ginecológico de las mujeres.<sup>4,7,8</sup>

### **3.5. Obesidad**

Como ya se había mencionado antes, la obesidad es uno de los factores predisponentes para el padecimiento de CaMa. La OMS define a la obesidad como la acumulación anormal y excesiva de grasa que representa un riesgo para la salud.<sup>9</sup> Esta enfermedad puede ser evidenciada mediante la determinación del índice de masa corporal (IMC). De acuerdo con esto, un individuo tiene sobrepeso si su IMC se encuentra entre 25 y 30 kg/m<sup>2</sup> y obeso si este es igual o mayor a 30 kg/m<sup>2</sup>.<sup>9</sup>

Recientemente, se ha reconocido que el IMC no es la mejor forma de clasificar a los pacientes, ya que este está sujeto al peso del individuo, el cual está influenciado por la composición corporal (grasa vs. músculo). Existen otros parámetros que nos dan un mejor acercamiento sobre la acumulación de grasa visceral, como lo son la medición de la circunferencia de la cintura, el índice cintura-cadera, la determinación de la composición corporal a través de pruebas de impedanciometría o la determinación de la masa del tejido adiposo, siendo este último el menos utilizado

por la baja practicidad que implica su determinación debido a la necesidad del uso de equipos de imagenología avanzados.<sup>10,11</sup>

A pesar de que hasta hace algunos años sólo se consideraba a la obesidad como un problema de salud que afectaba a los habitantes de países con altos ingresos per cápita, hoy en día se ha identificado que también afecta a los individuos que habitan en países de medianos y bajos recursos, por lo que su erradicación es de gran importancia debido al riesgo que representa para el desencadenamiento y desarrollo de distintos padecimientos, incluido el cáncer.<sup>9</sup>

En CaMa, se sabe que la obesidad es un factor de riesgo especialmente en mujeres post-menopáusicas, así como un factor de mal pronóstico comparado con pacientes de peso normal.<sup>8,12,13</sup> Se propone que la obesidad influencia la aparición, desarrollo y desenlace del cáncer de mama debido a la desregulación de la señalización de insulina e IGF, altos niveles de estrógenos circulantes, inflamación local y sistémica, alteración del perfil y cantidad de adipocinas secretadas (principalmente leptina y adiponectina) y modificaciones en el microbioma de la glándula mamaria.<sup>14,15,16</sup>

### **3.6. Tejido Adiposo y Cáncer de Mama**

Los adipocitos y las células tumorales interactúan a través de diversos factores secretados. Por un lado, los adipocitos secretan lípidos bioactivos, adipocinas, citocinas, hormonas e inhibidores de proteasas que activan a las células de cáncer de mama hacia un fenotipo mucho más agresivo, aumentando su capacidad proliferativa, migratoria e invasiva a otros tejidos, así como un metabolismo más dirigido hacia la  $\beta$ -oxidación. Por su parte, las células tumorales inducen la lipólisis de los adipocitos dando lugar a la transformación de estos en adipocitos asociados a tumor, los cuales se caracterizan por sufrir un proceso de deslipidación, desdiferenciación y una autofagia incrementada. Los adipocitos asociados a tumor producen un aumento de ácidos grasos libres, citocinas proinflamatorias y proteasas en el microambiente tumoral, promoviendo la progresión de la

enfermedad. En obesidad, este efecto se encuentra incrementado, volviendo a las células tumorales más agresivas que en condiciones de no obesidad.<sup>14,15</sup>

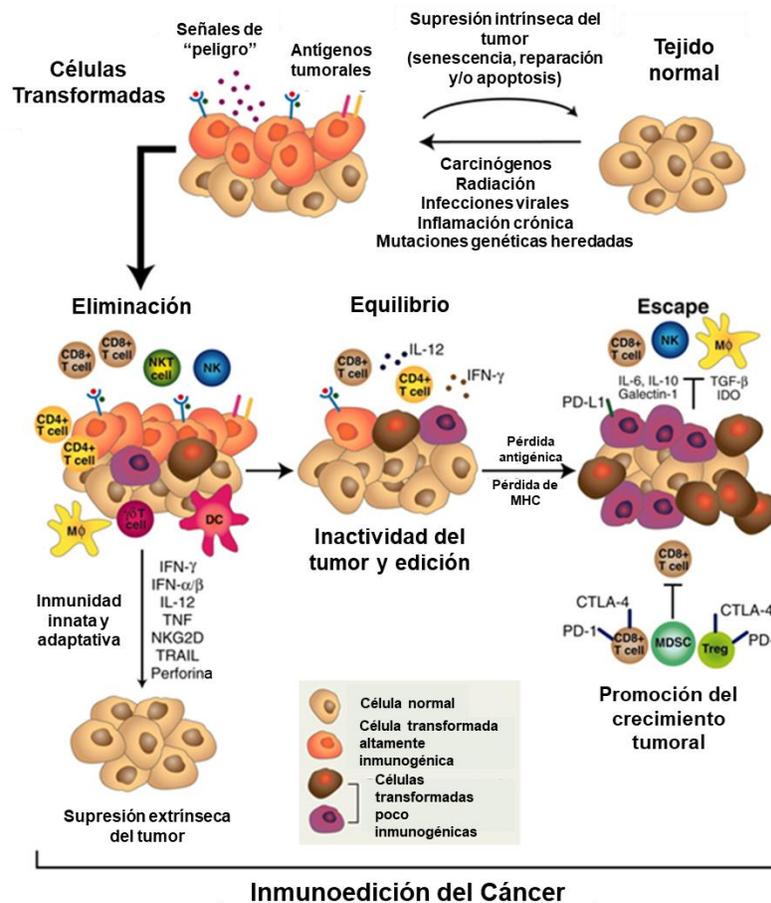
### **3.7. *Tejido Adiposo y Sistema Inmunológico***

El tejido adiposo mantiene una estrecha relación con el sistema inmunológico. En condiciones normales, el TA se encuentra principalmente infiltrado por células con un perfil antiinflamatorio como lo son los linfocitos Th2, macrófagos M2, linfocitos T reguladores (Tregs), eosinófilos, entre otras, las cuales secretan citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13, IL-10, etc.) que mantienen tanto la homeostasis del tejido adiposo como la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, cuando el TA pasa de un estado de homeostasis a uno de obesidad, las células inmunes que residen en este cambian, adquiriendo un perfil pro-inflamatorio. Entre ellas destacan los linfocitos Th1 y Th17, linfocitos T citotóxicos CD8+, macrófagos M1, neutrófilos y células NK, las cuales secretan citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL-2, entre otras) y producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que dan lugar a un estado de inflamación crónica sistémica de bajo grado que no puede resolverse.<sup>16,17,18</sup>

### **3.8. *Inmunoedición del cáncer***

Las células del sistema inmunológico participan en la actividad anti-tumoral como mecanismo extrínseco de supresión tumoral, muchas veces eliminando células que se han transformado mucho antes de que estas proliferen y den lugar a un tumor cuando los mecanismos intrínsecos de supresión tumoral han fallado (reparación del DNA, senescencia y/o apoptosis). Sin embargo, si estas no son identificadas de forma oportuna, tiene lugar el desarrollo tumoral. Dentro del tumor ya establecido, las diferentes células del sistema inmune participan en tres procesos que en conjunto son conocidos como la inmunoedición del cáncer.<sup>19,20</sup>

Este concepto engloba una primera etapa de *eliminación* o de vigilancia inmunológica, que consiste en la actividad anti-tumoral que ejercen células de la respuesta inmune innata y adaptativa, como macrófagos M1, células NK y NKT, células dendríticas, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos T  $\gamma\delta$ , las cuales, a través de diversos mecanismos, eliminan a las células tumorales. Cuando la totalidad de las células transformadas no puede ser eliminada por la actividad anti-tumoral de las células del sistema inmunológico, se progresa a una etapa de *equilibrio*, en donde las células tumorales entran en un estado de latencia proliferativa mantenida principalmente por la actividad de células de la respuesta inmune adaptativa por largos periodos. Esta presión ejercida por el sistema inmunológico promueve la acumulación de mutaciones en las células tumorales residuales, las cuales se caracterizan por ser menos inmunogénicas y resistentes a mecanismos que pudieran provocar su muerte, edición que les permite evadir la respuesta inmune. Finalmente, en la etapa de *escape*, las células transformadas seleccionadas reinician su proliferación exacerbada, dando lugar a la formación de un tumor. Además, debido a la producción tumoral de citocinas anti-inflamatorias, la clase de células del sistema inmunológico que infiltran el tumor cambia, desplazando el equilibrio a una mayor proporción de células con propiedades reguladoras. Entre estas, se encuentran principalmente las células mieloides supresoras (MDSC) y Tregs. Estas poblaciones suprimen la actividad anti-tumoral ejercida por otras células del sistema inmunológico, permitiendo que el tumor progrese. En la **Figura 1** se muestra un resumen de lo descrito anteriormente.<sup>19,20</sup>



**Figura 1. Inmunoección del Cáncer.** Modificado de Schreiber, et. al., *Science*, 2011.

Las Tregs han sido ampliamente estudiadas en el contexto del cáncer debido a su importancia en la etapa de *escape* de la inmunoección del cáncer y es por esto que, en este trabajo, nos centraremos en describirlas más a fondo, así como su relevancia biológica en esta patología.

### 3.9. Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores son una subpoblación de células T CD4+ que participan en la tolerancia inmunológica. Su principal función es la de suprimir a otras células

del sistema inmunológico a través de diversos mecanismos, regulando así la respuesta inmune.<sup>21</sup>

Las Tregs pueden ser caracterizadas por la expresión del factor de transcripción maestro FoxP3, el cual regula el desarrollo y función de estas células.<sup>22</sup> Este factor de transcripción regula positivamente la expresión de varios genes, de entre los cuales destacan CD25, CTLA-4 y GITR, moléculas importantes tanto en la función como en la sobrevivencia y estabilidad de estas células, mientras que reprime la expresión de moléculas como IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, entre otras.<sup>21,23</sup>

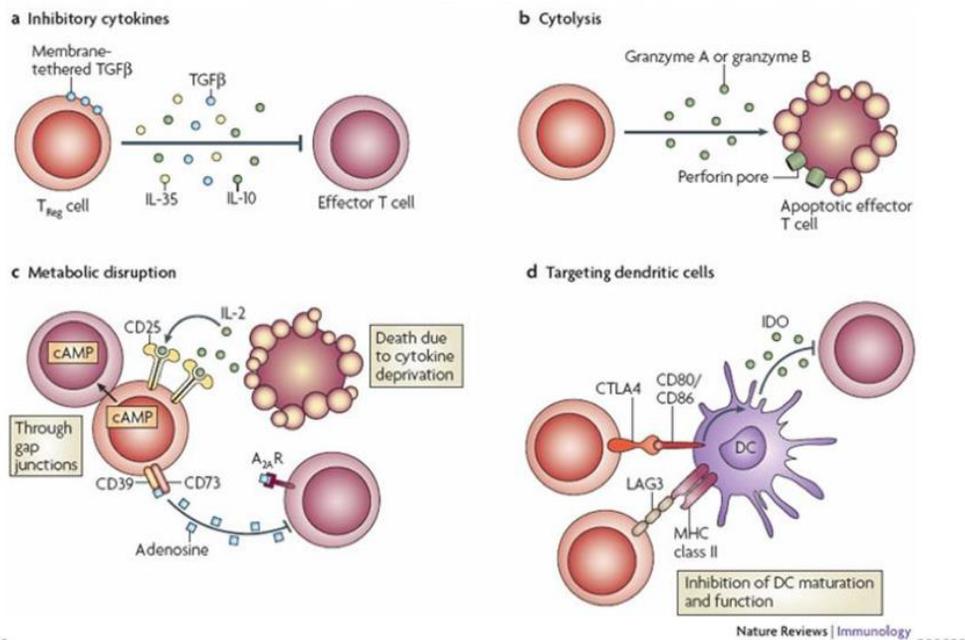
Existen dos tipos principales de Tregs FoxP3+ de acuerdo con su origen: Tregs tímicas, las cuales se originan en el timo, producto de la selección positiva de timocitos bajo condiciones de alta avidéz por su ligando específico y en presencia de co-estimulación a través de la molécula CD28 y la señalización mediada por IL-2. Por otro lado, se encuentran las Tregs periféricas, las cuales se originan fuera del timo a partir de células T vírgenes, en las cuales se induce la expresión de FoxP3 tras su estimulación con citocinas como TGF- $\beta$  e IL-2, metabolitos como el ácido retinoico y la activación a través de su TCR mediada por interacciones de baja avidéz con sus ligandos, señales bajas de co-estimulación y/o en presencia de señales co-inhibitorias. Ambos subtipos son necesarios para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.<sup>21,24-26</sup>

Estas células ejercen su actividad supresora a través de diferentes mecanismos, los cuales, a grandes rasgos, se pueden dividir en 4 grupos (**Figura 2**):

- a) Citocinas inhibitorias: Las Tregs producen citocinas anti-inflamatorias como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35, las cuales inhiben la actividad de linfocitos T efectores.
- b) Citólisis: Sintetizan moléculas citolíticas como granzimas A/B y perforinas que inducen apoptosis en linfocitos T efectores.
- c) Disrupción metabólica: Debido a que estas células son incapaces de producir IL-2, un factor esencial para su supervivencia, aprovechan la IL-2 producida por los linfocitos T efectores, disminuyendo su abundancia en el ambiente y de esta forma evitan que estos últimos la utilicen para su proliferación.

Además, poseen las ectoenzimas CD39 y CD73 que convierten el ATP del medio a adenosina, la cual tiene propiedades anti-inflamatorias.

- d) Modificación de células dendríticas (DCs): Las células dendríticas participan en la presentación antigénica activando la respuesta inmune adaptativa. Las Tregs pueden inhibir la maduración y función de las DCs a través de las moléculas CTLA-4 y LAG-3. Además, la interacción de CTLA-4 con las moléculas CD80/86 induce la producción de la enzimaIDO, la cual cataliza la conversión del triptófano del ambiente en quinurenina, metabolito que ya no puede ser utilizado por los linfocitos T efectores.<sup>27,28</sup>



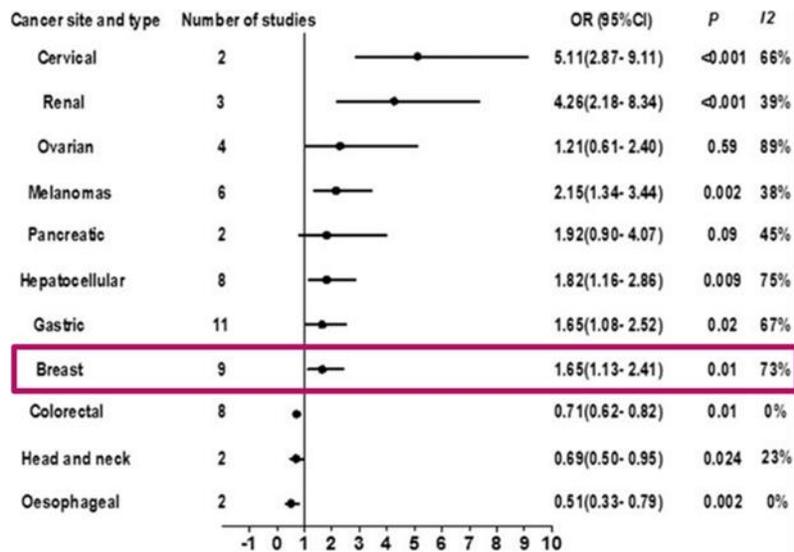
**Figura 2. Principales mecanismos de supresión de las Tregs.** Tomado de Vignali, D., et. al., *Nature Reviews Immunology*, 2008.

Debido a su importancia biológica, se han diseñado numerosos modelos y ensayos para caracterizar a la población de linfocitos T reguladores con el objetivo de estudiar los mecanismos que regulan su generación, mantenimiento y función en el cuerpo. Entre ellos, se encuentran la inducción de Tregs a partir de linfocitos T

vírgenes, la expansión de Tregs y el análisis de su función supresora *in vitro* o *in vivo*.

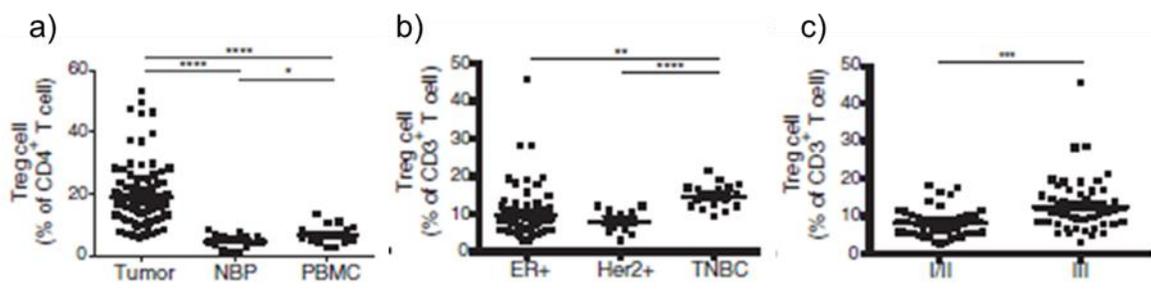
### 3.10. Tregs en Cáncer de Mama

Las células T reguladoras han sido ampliamente estudiadas en muchas patologías, incluido el cáncer. Se han hecho varios estudios para determinar su importancia en la progresión de esta patología. De acuerdo con un metaanálisis, una alta expresión de FoxP3 intratumoral correlaciona con mal pronóstico en los pacientes con diferentes tipos de cáncer, siendo el CaMa uno de ellos (**Figura 3**).<sup>29</sup> Además, otro metaanálisis identificó una menor supervivencia general en pacientes con cáncer de mama que presentaban un mayor porcentaje de linfocitos infiltrantes que expresan FoxP3.<sup>30</sup> Por su importancia como células supresoras de la actividad anti-tumoral que ejercen diversos tipos celulares del sistema inmunológico, se las ha estudiado más a fondo con el propósito de diseñar nuevas terapias para el tratamiento del cáncer.<sup>31</sup>



**Figura 3. El incremento de Foxp3 intratumoral correlaciona con mal pronóstico de los pacientes con diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama.** Modificado de Shang, et. al., *Scientific Reports*, 2015.

En el caso específico del CaMa, recientemente se publicó un artículo que caracteriza a las Tregs infiltrantes de tumores mamarios. Se encontró una mayor proporción de Tregs infiltrantes de tumor en etapas avanzadas de la enfermedad y en cánceres con subtipo molecular más agresivo, como lo es el triple negativo, en comparación con etapas más tempranas y subtipos menos agresivos de la enfermedad (**Figura 4**).<sup>32</sup> Las Tregs infiltrantes de tumores mamarios expresan el receptor de quimiocinas CCR8, lo cual las diferencia de las Tregs residentes de tejido mamario sano y sangre periférica, y esta expresión es promovida por el microambiente tumoral. Además, el grado de expresión de CCR8 en Tregs intratumorales parece ser un mejor marcador pronóstico que el nivel de expresión de FoxP3.<sup>32,33</sup>



**Figura 4. Tregs en tumores de cáncer de mama.** En este estudio, se identificó que a) el porcentaje de Tregs infiltrantes de tumor era mayor al porcentaje en tejido mamario sano (NBP) y mayor al presente en sangre periférica, b) que esta infiltración era mayor en subtipos más agresivos de la enfermedad, como lo es el triple negativo (TNBC) y c) que de igual forma su número es mayor en estadios más avanzados de la enfermedad. Tomado de Plitas, et. al., *Immunity*, **2016**.

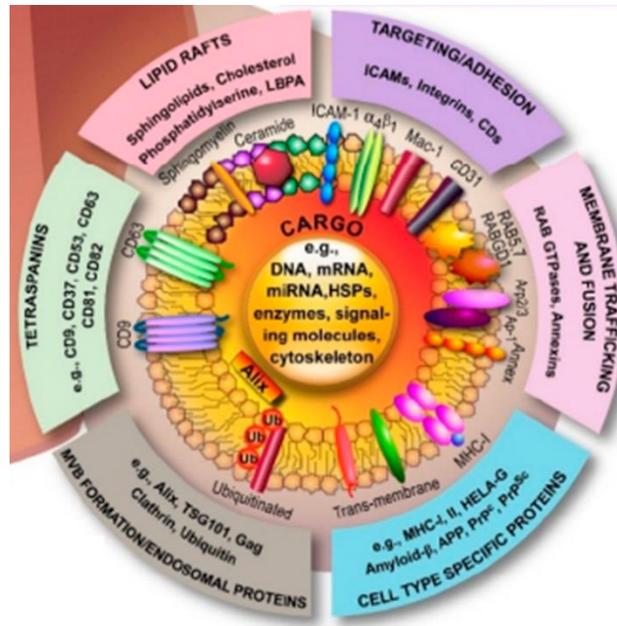
El aumento de Tregs intratumorales puede ser producto de uno o varios mecanismos, entre los cuales se encuentran: su reclutamiento desde la periferia para infiltrar el tumor, su inducción *in situ* a partir de células T CD4+ vírgenes y/o su expansión *in situ* a partir de las Tregs ya presentes en el microambiente tumoral. En cáncer de mama, aún no se ha llegado a un consenso sobre el mecanismo involucrado en el incremento de esta población intratumoral, siendo el reclutamiento

incrementado de Tregs tímicas (tTregs) desde la periferia y la inducción intratumoral, las dos principales hipótesis.<sup>32,34</sup>

### **3.11. Exosomas**

El microambiente tumoral es un término que engloba a todas las células que interactúan en un tumor, comprendiendo a las células tumorales, células del sistema inmunológico, fibroblastos, células endoteliales, así como moléculas señalizadoras y la propia matriz extracelular.<sup>35</sup> Es en él donde se da la comunicación estrecha de todos los tipos celulares que convergen en este espacio a través de mediadores solubles como metabolitos, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, entre otros, pero también a través de vesículas extracelulares liberadas por los distintos tipos celulares presentes.<sup>35,36</sup> Entre las vesículas extracelulares más estudiadas en el contexto del microambiente tumoral se encuentran los exosomas.<sup>37,38</sup>

Los exosomas son vesículas extracelulares de origen endocítico conformadas por una bicapa lipídica, las cuales tienen un tamaño de 30-150 nm de diámetro. Los exosomas son secretados por prácticamente todos los tipos de células y pueden llegar a contener una gran variedad de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, cuya naturaleza dependerá de la célula a partir de la cual fueron producidos (**Figura 5**).<sup>39,40</sup>



**Figura 5. Exosomas: Biomoléculas que los componen.** Tomada de Kalra, et. al., *Int. J. Mol. Sci*, 2016.

Cuando fueron descubiertos, se pensaba que formaban parte de un mecanismo de eliminación de residuos de la célula y que su empaquetamiento ocurría de forma estocástica, pero hoy en día se sabe que son muy importantes en la comunicación intercelular, ya que son capaces de transportar biomoléculas de una célula a otra, inclusive a grandes distancias en el cuerpo, participando de esta forma en la homeostasis de diferentes tipos celulares.<sup>38,40</sup> Además, se ha descrito que existen diversos mecanismos a través de los cuales la célula es capaz de controlar el contenido de los exosomas que produce.<sup>41</sup>

Interesantemente, se ha identificado que su producción se encuentra alterada en muchas patologías, entre ellas el cáncer. Estas vesículas extracelulares han sido ampliamente descritas como promotores de la tumorigénesis, desarrollo y metástasis de muchos tipos de cáncer, transportando moléculas a sitios distantes de forma dirigida gracias a las integrinas y receptores de quimiocinas presentes en sus membranas, preparando así el nicho pre-metastásico en órganos distintos a donde se localiza el tumor primario.<sup>42</sup> Otros ejemplos de procesos pro-tumorales en los que participan los exosomas incluyen la angiogénesis y la inmunosupresión.<sup>38,48</sup>

Como ya se ha mencionado antes, las células del sistema inmunológico participan en el proceso de inmunoedición del cáncer, buscando en una primera etapa eliminar a las células transformadas. Los exosomas provenientes de células tumorales pueden afectar la supervivencia y función de las células del sistema inmunológico a lo largo de este proceso, modificando la respuesta anti-tumoral de forma que se favorezca el escape del tumor frente a la vigilancia inmunológica.<sup>43,44</sup>

En el caso de la fase de *eliminación* de la inmunoedición del cáncer, los exosomas tumorales pueden inhibir la actividad e incluso ejercer un efecto citolítico sobre las células que ejercen actividad citotóxica sobre las células tumorales (linfocitos T citotóxicos, células NK, entre otras) evitando que estas actúen de forma eficiente en la eliminación de las células malignas, favoreciendo así la progresión del crecimiento tumoral.<sup>43,44</sup> Por otro lado, en la fase de *escape*, los exosomas tumorales pueden promover el reclutamiento y la expansión de células inmunosupresoras (Tregs, MDSC, principalmente), las cuales suprimen la actividad anti-tumoral de las células del sistema inmunológico sobre el tumor, dando lugar a la progresión de la enfermedad.<sup>43,44</sup>

En el caso particular de las Tregs, ya se sabe que estas células se encuentran en mayor proporción en los tumores de pacientes con cáncer de mama con respecto al tejido mamario normal, y que este incremento correlaciona con etapas más avanzadas, así como con subtipos más agresivos de la enfermedad.<sup>32</sup> Por lo tanto, diferentes grupos se han dado a la tarea de dilucidar los mecanismos mediante los cuales se promueve el aumento de esta población intratumoral, lo cual se ha correlacionado con un peor pronóstico para las pacientes.

Existe evidencia de que los exosomas tumorales obtenidos de cultivos de células de cáncer de ovario y cáncer de cabeza-cuello promueven la inducción, expansión y aumento de la actividad supresora de las Tregs.<sup>45,46</sup> Por otro lado, antecedentes directos de nuestro grupo de investigación indican que los exosomas derivados de líneas celulares de cáncer de mama de diferentes grados de agresividad (MCF-7 y MDA-MB-468) promueven la inducción, expansión y actividad supresora de las Tregs.<sup>47</sup>

### 3.12. *Adiposomas*

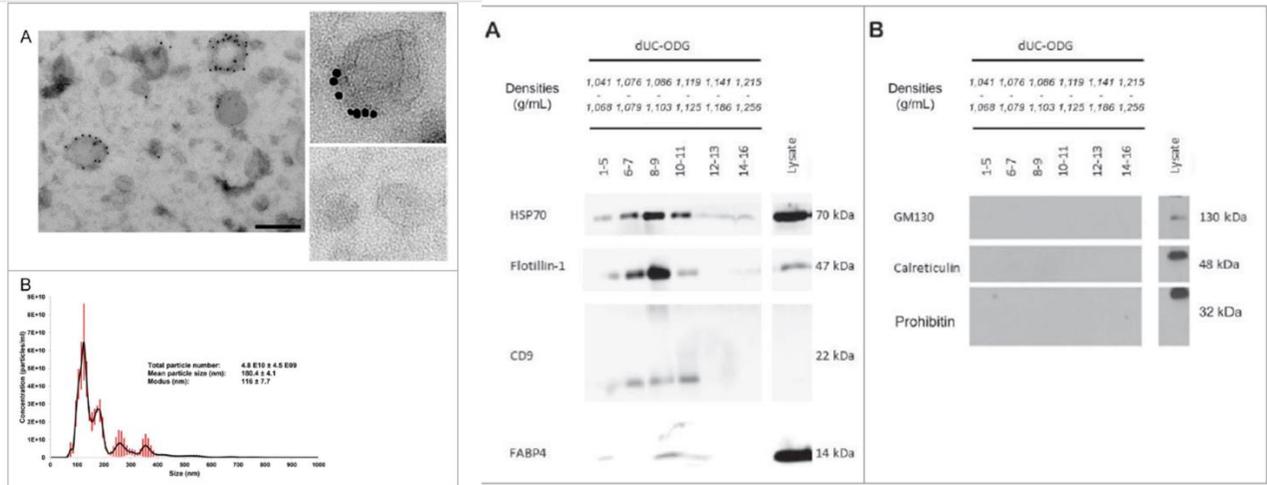
A los exosomas provenientes de los adipocitos se les ha denominado adiposomas. Estas vesículas han comenzado a estudiarse recientemente, habiendo a la fecha solo algunos reportes sobre su caracterización morfológica y dimensional, contenido lipídico, así como los efectos que tienen sobre células cancerosas y células del sistema inmunológico.<sup>49</sup>

Por ejemplo, se ha identificado que los adiposomas provenientes de la línea celular 3T3 de ratón, la cual es una línea mesenquimal que puede diferenciarse a adipocitos bajo el estímulo adecuado, aumentan la invasividad de células LLC, que son de una línea celular de cáncer de pulmón murina, por transferencia de metaloproteinasa 3 (MMP3) vía exosomas.<sup>50</sup>

En humanos, vesículas extracelulares purificadas de adipocitos humanos diferenciados *in vitro* y del cultivo *ex vivo* de explantes de tejido adiposo (subcutáneo y visceral) y co-cultivados con monocitos de sangre periférica, inducen la diferenciación de estos a macrófagos asociados a tumor (TAMs), evidenciado por un aumento en la expresión de moléculas tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, perfil característico de este tipo de macrófagos.<sup>51</sup>

Finalmente, en un modelo de estudio similar al que se utilizará en este proyecto, en donde se cultivaron explantes de tejido adiposo asociado a tumores de pacientes con cáncer de mama, se lograron obtener vesículas extracelulares derivadas de tejido adiposo mamario purificadas del sobrenadante por gradiente de densidad con sacarosa, las cuales se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET), análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y WB (presencia de moléculas características de exosomas como CD9, Flotilina-1, HSP70, moléculas propias de tejido adiposo, como FABP4 y ausencia de moléculas que evidencian contaminación del purificado con cuerpos apoptóticos) (**Figura 6**). Estos adiposomas provocaron al aumento en el número de mamíferas formadas por células de la línea MCF-7 al ser co-cultivados con estas.<sup>52</sup>

Sin embargo, hasta el momento se desconoce el efecto que pudieran tener estas vesículas extracelulares provenientes de adipocitos sobre la biología de los linfocitos T reguladores, por lo cual es de interés su estudio.



**Figura 6. Caracterización de los adiposomas derivados de tejido adiposo asociado a tumores mamarios.** En a) se observa la caracterización por MET, donde además se marcaron los adiposomas con anticuerpos anti-CD63 acoplados a partículas de oro, b) caracterización por NTA, c) WB de marcadores de exosomas y d) WB de marcadores de restos celulares y cuerpos apoptóticos.

Modificado de Jeurissen, et. al., *Cell Adhesion & Migration*, 2017.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad de gran importancia para el sector salud debido a la alta tasa de morbilidad y mortalidad que tiene alrededor del mundo y en nuestro país.

En años recientes, los exosomas han cobrado importancia como un mecanismo de comunicación celular clave en el desarrollo del cáncer, ya que son capaces de transportar biomoléculas de una célula a otra y de producir un efecto en las células receptoras.

Trabajos previos del laboratorio han demostrado que los exosomas liberados por líneas celulares de diferentes tipos de cáncer de mama promueven la conversión de células T reguladoras a partir de células T vírgenes, así como la expansión de Tregs *in vitro* y que su efecto es dosis dependiente. Sin embargo, en el contexto del microambiente tumoral, este efecto también podría estar influenciado por otras células. En el caso de la glándula mamaria, uno de los tipos celulares más abundantes después de las células epiteliales son los adipocitos. Cabe destacar que se ha identificado que la contribución del tejido adiposo a la producción de miRNAs exosomales circulantes es de las más importantes en el organismo. Hasta el momento, los adiposomas han sido poco estudiados habiendo solo algunos reportes donde se los ha comenzado a caracterizar por su morfología y contenido. También, se ha comenzado a describir el efecto que tienen tanto en el aumento de la invasividad de células cancerosas como en la polarización y activación de monocitos/macrófagos. Sin embargo, nada se ha descrito sobre el papel que podrían tener en la biología de los linfocitos T reguladores. Por lo tanto, es de interés determinar si los adiposomas liberados por los adipocitos provenientes del tejido adiposo mamario tienen un efecto sobre la expansión de las Tregs, cuyo incremento intratumoral en el cáncer de mama se asocia con un mal pronóstico para las pacientes. Para esto, es necesario, en un primer acercamiento, poder aislar y caracterizar adiposomas provenientes de adipocitos mamaros asociados a tumores de pacientes con cáncer de mama de una forma que permita su posterior uso en ensayos biológicos.

## **5. HIPÓTESIS**

Es posible aislar y caracterizar adiposomas provenientes de muestras de tejido adiposo asociado a tumores de pacientes con cáncer mama para estudiar su efecto potencial sobre la expansión de linfocitos T reguladores.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo General**

Aislar y caracterizar adiposomas provenientes de tejido adiposo asociado a tumores de pacientes con cáncer de mama para su posterior uso en la evaluación del efecto que tienen en la expansión de linfocitos T reguladores.

### **6.2. Objetivos Particulares**

- 1) Purificar adiposomas a partir de tejido adiposo asociado a tumores de pacientes con cáncer de mama.
- 2) Caracterizar los adiposomas obtenidos por NTA, MET y WB.
- 3) Separar células mononucleares de muestras de sangre de sujetos sanos y criopreservarlas.
- 4) Purificar células T reguladoras a partir de las células mononucleares criopreservadas mediante separación celular por citometría de flujo (FACS sorting).
- 5) Establecer las condiciones para los ensayos de expansión *ex vivo* de Tregs con las muestras de sujetos sanos.

## 7. METODOLOGÍA

Se recolectaron muestras de tejido adiposo de pacientes femeninas diagnosticadas con cáncer de mama de entre 18 a 60 años, sometidas a cirugía (MT y/o MRM), las cuales fueron proporcionadas por los cirujanos del servicio de Oncología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, previo consentimiento informado y cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión (**APÉNDICE A**).

**Tabla 1. Datos antropométricos de las pacientes**

	Peso normal (n=5)	Sobrepeso (n=4)	Obesidad (n=5)
Edad (años)	36.6 ± 7.6	38.8 ± 8.7	48.0 ± 5.4
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20.7 ± 2.3	27.3 ± 1.2	32.2 ± 2.0
Cintura (cm)	75.0 ± 10.3	88.4 ± 7.2	99.1 ± 5.2
Estadio Clínico	0, IIA (2), IIIA y NA	I, IIIA, IIIB y NA	0, IIA, IIB, IIIA, IV
Subtipo Molecular	LumA, LumB (2), TN y NA (1)	LumB (3) y NA (1)	LumA (2), LumB (3)

Las muestras de tejido adiposo periférico al tumor (1.5-3 gramos) se recolectaron post-resección mamaria en un tubo con PBS 1X + Anti-Anti 2X. Se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. El tiempo de transporte de las muestras varió entre 2-4 horas.

Por otro lado, las células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos se obtuvieron a partir de paquetes leucocitarios y/o sangre recolectada en tubos con EDTA como anticoagulante.

## **7.1. *Obtención y purificación de adiposomas a partir de tejido adiposo mamario de pacientes con cáncer de mama.***

### **7.1.1. Digestión del tejido adiposo y cultivo de adipocitos.**

Las muestras de tejido adiposo mamario se disgregaron mecánicamente en pequeños pedazos (3-5 mm), los cuales se lavaron en un tubo con 10 mL de amortiguador para adipocitos (BA) (ver **APÉNDICE B**), invirtiendo suavemente. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el tejido adiposo, el cual se localiza sobre el BA y se transfirió a un tubo con 10 mL de medio de digestión (ver **APÉNDICE B**). En una incubadora orbital, se digirió el tejido a 230 rpm por 1 hora a 37°C. La digestión se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos para eliminar células estromales y leucocitos infiltrantes del tejido. Se recuperaron los adipocitos (interfase blanca/amarilla localizada entre la fase del aceite y la fase del medio de digestión), los cuales se transfirieron a un tubo con 10 mL de BA para lavar. Los adipocitos se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos.

Los adipocitos lavados se recuperaron y transfirieron a un frasco para cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 10 mL de medio de cultivo para adipocitos (ver **APÉNDICE B**). Se cultivaron por 1 hora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes (SN) del cultivo se filtraron por membrana de 0.22 µm y se almacenaron a 4°C por no más de 1 mes para la posterior purificación de adiposomas.

### **7.1.2. *Purificación de adiposomas por ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaño.***

El SN se transfirió a un tubo Amicon® Ultra de 15 mL con membrana de PLTK Ultracel-PL de 30 kDa (Merck Millipore). Para la ultrafiltración, se centrifugó a 3100 g por 30 minutos a 4°C. Con una jeringa, se recuperó la fracción retenida por la membrana (aprox. 200 µL). El concentrado obtenido de la ultrafiltración se llevó a 1.5 mL con medio de cultivo para adipocitos. Por otro lado, se empacó una columna con 10 mL de sepharosa CL-2B (Sigma) para realizar la purificación de los exosomas por cromatografía de exclusión por tamaño con la que se busca eliminar

proteínas extra-exosomales. Cuidadosamente, se colocó el concentrado sobre la sepharosa. Una vez colocada la muestra se comenzaron a recolectar fracciones de 500  $\mu$ L, eluyendo la muestra hasta que esta se encontró por completo dentro de la columna de sepharosa, esto con el fin de evitar diluir la muestra con el eluyente. Se continuó eluyendo la columna con PBS 1X recientemente filtrado por membrana de 0.22  $\mu$ m. Se juntaron las fracciones 8-12 (2.5 mL) y se transfirieron a tubos Amicon Ultra de 2 mL con membrana de PLTK Ultracel-PL de 30 kDa (Merck Millipore). Para concentrar los adiposomas purificados, las fracciones recolectadas se centrifugaron a 3100 g por 1 hora a 4°C. Finalmente, el concentrado de adiposomas se almacenó por no más de 24 horas a 4°C para la caracterización de las vesículas obtenidas.

## **7.2. Caracterización de los adiposomas.**

### *7.2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).*

Se fijó la muestra de adiposomas con glutaraldehído al 1%. Se colocaron 10  $\mu$ L de la muestra sobre una rejilla para microscopía electrónica por 3 minutos, después de los cuales se retiró el exceso de muestra. Para la tinción de contraste se utilizaron 10  $\mu$ L de ácido fosfotúngstico, los cuales se depositaron sobre la muestra que se colocó en la rejilla por 1 minuto. Se retiró el exceso de la tinción y se dejó secando la rejilla por 15 minutos. Las imágenes fueron tomadas a 60000X en un TEM JEOL-JEM 1010 (JEOL, Japan), operando con un voltaje de aceleración de 60 kV.

### *7.2.2. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).*

Se cargaron 500  $\mu$ L de las muestras diluidas 1:100 en el PBS 1X filtrado que se utilizó para la purificación en una jeringa para insulina. Las muestras se inyectaron en la cámara del módulo el cual se colocó dentro del analizador de partículas Nanosight NS300 (Malvern®). Se adquirieron 3 videos de 60 segundos de 3 campos diferentes de la muestra, cada uno con un nivel de cámara de 14. Los videos fueron analizados por el software del equipo con un umbral de 5 para la determinación del tamaño y concentración de las partículas en la muestra.

### **7.3. Establecimiento de las condiciones experimentales para la expansión de Tregs: Paquetes leucocitarios/muestras de sangre de sujetos sanos.**

#### *7.3.1. Aislamiento de CMNs de sangre periférica por gradiente de densidad.*

Se aislaron las CMNs de diferentes paquetes leucocitarios y/o muestras de sangre de donadores sanos por medio de un gradiente de densidad con Ficoll. Brevemente, las muestras se diluyeron con PBS 1X a una proporción 1:1. Posteriormente, se colocó la sangre diluida sobre el Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), manteniendo una proporción de 3 partes de sangre diluida por una parte de Ficoll. Se centrifugó a 2000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente y sin freno. Se recuperó la interfase correspondiente a las CMN (interfase entre el Ficoll y el plasma) con una pipeta pasteur de plástico, transfiriéndola a un tubo falcon de 15 mL con 5 mL de medio RPMI + 10% SFB. Se invirtió suavemente el tubo para lavar las células y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente sin freno. Se descartó el SN y se agregaron 5 mL de RPMI + 10% SFB y se resuspendieron las células. Para eliminar el exceso de plaquetas, se realizaron 2 centrifugaciones diferenciales; la primera a 1200 rpm y la segunda a 900 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, en ambos casos eliminado el SN y resuspendiendo en 5 mL de RPMI + 10% SFB. Finalmente, las células se colocaron en un baño de hielo y se tomó una alícuota para realizar el conteo en una cámara de Neubauer con azul tripano. Si durante el conteo se observaba que había muchas plaquetas, las células se volvían a centrifugar a 900 rpm por 5 minutos.

#### *7.3.2. Criopreservación de CMNs.*

Se ajustó la densidad de la suspensión celular a  $20 \times 10^6$  células/mL de RPMI 10% SFB. Por otro lado, se preparó una mezcla de DMSO y SFB a una relación 20:80, la cual se colocó en un baño de hielo por 5 minutos. En crioviales correctamente identificados, se colocó 1 mL de la suspensión celular y 1 mL de la mezcla DMSO/SFB quedando así el DMSO a una concentración final del 10%. Las células

se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 1-6 días y después se transfirieron a un tanque de  $\text{N}_2$  líquido.

### *7.3.3. Descongelación de las CMNs.*

Los viales con células congeladas se colocaron directamente en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$ . Inmediatamente después de descongeladas, las células se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL con 5-8 mL de RPMI + 10% SFB previamente atemperado a  $37^{\circ}\text{C}$ . El tubo se invirtió suavemente para lavar las células y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos sin freno a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 mL de RPMI + 10% SFB y se repitió el procedimiento de lavado y centrifugación. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3 mL de medio. Se colocó el tubo con la suspensión celular en hielo y se tomó una alícuota para realizar el conteo de las células en cámara de Neubauer con azul de tripano.

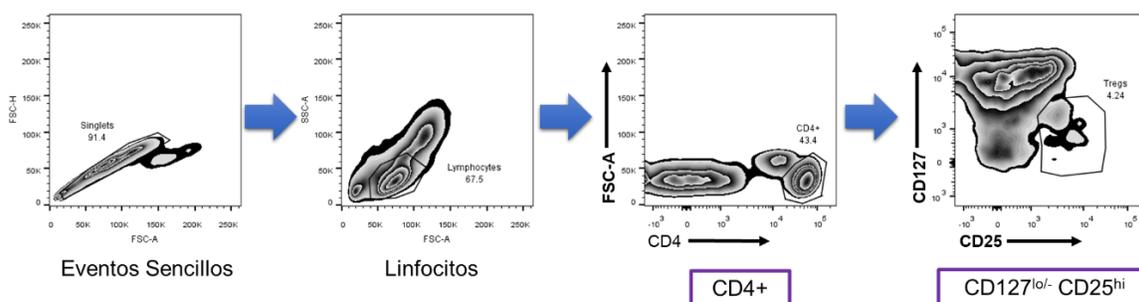
### *7.3.4. Tinción para FACS de CMNs.*

Una vez conocido el número de células viables después de la descongelación, se procedió a centrifugarlas a 1500 rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el SN y se resuspendió el pellet en 5 mL de PBS 1X para lavar. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se descartó el SN. Se resuspendió el pellet en la mezcla de tinción con los anticuerpos anti-CD4, CD25, CD127 y CD45 RA (Apéndice C). Por cada  $100\ \mu\text{L}$  de tinción, se tiñen  $10 \times 10^6$  células. Se incubaron las muestras por 20 minutos a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz, agitando suavemente el tubo a la mitad del tiempo de tinción. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 4 mL de PBS 1X para lavar. Las muestras teñidas se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se descartó el SN y las células se resuspendieron en PBS 1X ajustando la concentración de la suspensión celular a  $15 \times 10^6$  células/mL. La suspensión se filtró por malla de  $75\ \mu\text{m}$  a otro tubo, el cual se colocó en hielo hasta el FACS. NOTA: Ver títulos de los anticuerpos y detalles en **APÉNDICE C**.

### 7.3.5. FACS.

La suspensión celular fue trasladada al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNalCit) para llevar a cabo la separación celular en el equipo BD FACSAria I (Becton Dickinson).

Se aislaron Tregs con un fenotipo  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{lo/-}$  siguiendo esta estrategia de selección de la población de interés:



**Figura 7. Purificación por FACS de Tregs a partir de CMNs.**

Las células se mantuvieron a 4°C en RPMI + 20% SFB protegidas de la luz.

### 7.3.6. Tinción con CTV de Tregs separadas por FACS.

Las células recuperadas después de la separación celular por FACS se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el SN y el pellet se resuspendió con 4 mL PBS 1X para lavarlas. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets de aproximadamente  $2-3 \times 10^5$  Tregs con 250  $\mu$ L de CTV diluido 1:1000 en PBS 1X previamente atemperado a 37°C. Las células se incubaron a 37°C por 15 minutos protegidas de la luz con una agitación de 100 rpm en una incubadora orbital. Posteriormente, se les agregaron 750  $\mu$ L de RPMI + 10% SFB y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el SN y se resuspendió el pellet celular con 750  $\mu$ L de RPMI + 10% SFB. Se incubaron nuevamente con las mismas condiciones por 20 minutos. Finalmente, se

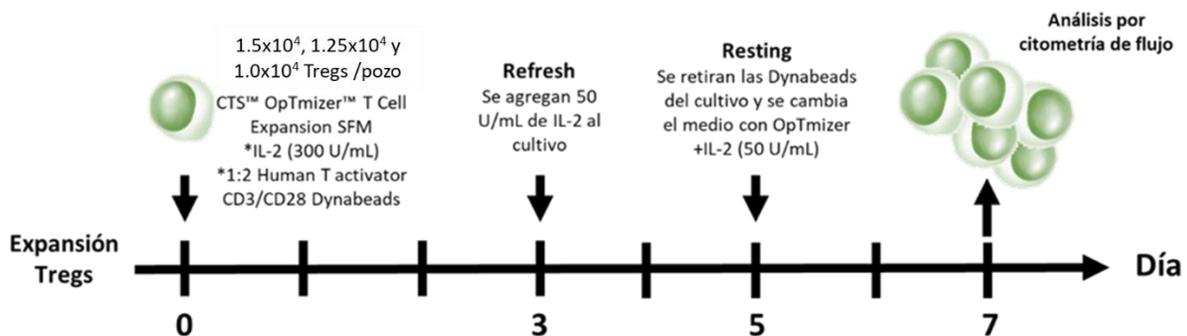
centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se descartó el SN y se resuspendieron en 150  $\mu$ L de medio de expansión (**APÉNDICE B**).

### 7.3.7. Expansión ex vivo

De forma general, las Tregs teñidas con CTV se cultivaron en 200  $\mu$ L de medio de expansión (ver **APÉNDICE B**) suplementado con 300 U/mL de IL-2 recombinante humana (Peprotech) y con anticuerpos anti-CD3/CD28 acoplados a perlas (Dynabeads™ CD3/CD28 activadoras de células T humanas para expansión y activación de células T, Gibco).

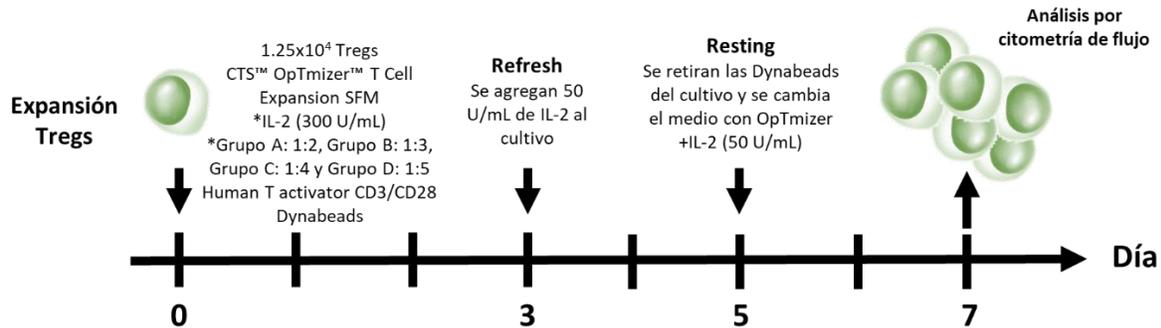
Para el establecimiento de las condiciones óptimas se realizaron las siguientes curvas:

- Curva de cantidad de células con condiciones óptimas.



**Figura 8. Diagrama de la estrategia experimental “Curva de número de células iniciales.”**

- Curva de dosis de estímulo anti-CD3/CD28 (Dynabeads): Reducción del estímulo para condiciones subóptimas.



**Figura 9. Diagrama de la estrategia experimental “Curva de Dosis de estímulo anti-CD3/CD28.”**

### 7.3.8. Tinción del Tiempo 0

Para verificar el fenotipo de las células puestas en cultivo, determinar su viabilidad y la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la marca del CTV al inicio del experimento, después de cada purificación por FACS, se realizó una tinción con las células. Las Tregs se incubaron con 20  $\mu$ L de Zombie Aqua® por 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Posteriormente, se incubaron con 100  $\mu$ L de solución de Fijación/Permeabilización para detección de FoxP3 (Tonbo) por 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos. Se descartó el SN y se resuspendieron con 150  $\mu$ L de solución permeabilizadora para citometría de flujo (Tonbo). Después, las células se incubaron con 10  $\mu$ L del anti-FoxP3 por 30 minutos a temperatura ambiente, agitando a la mitad del tiempo de tinción. Se lavaron con 150  $\mu$ L de solución permeabilizadora. Se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS 1X y se mantuvieron a 4°C hasta la adquisición en el citómetro de flujo (Attune Nxt, Invitrogen). Las muestras se analizaron con el software FlowJo V10 (BD Biosciences).

#### **7.4. Tinción para análisis por citometría de flujo**

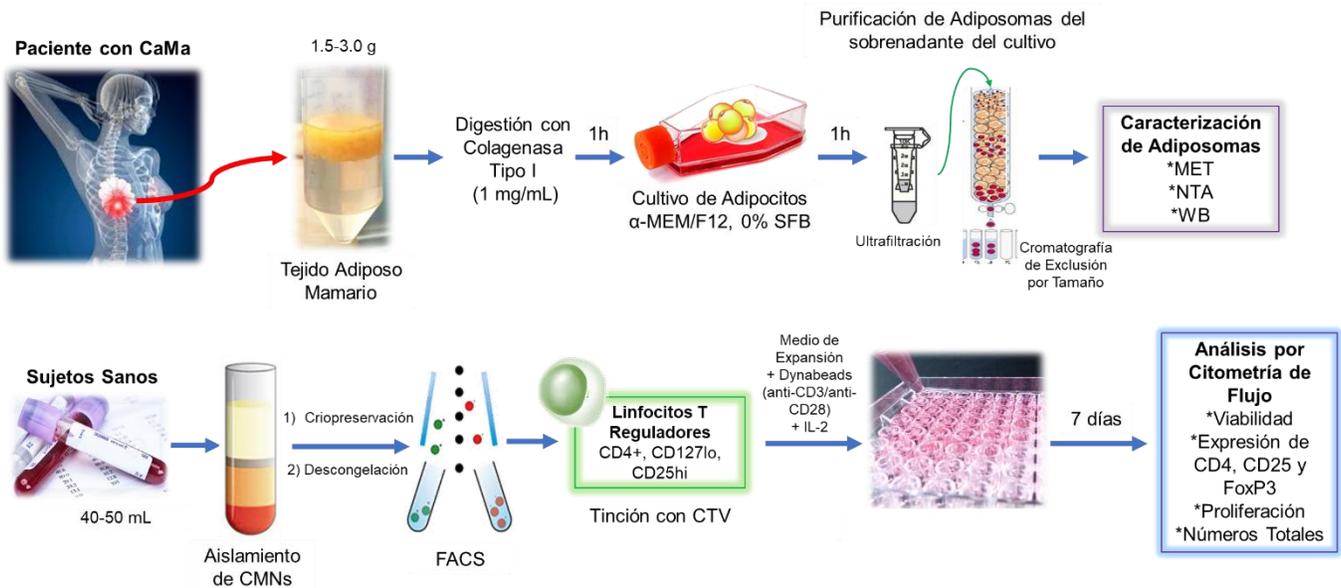
Después de 7 días, las Tregs se marcaron con anticuerpos acoplados a fluorocromos para el análisis. Se centrifugó la placa con las células del cultivo a 1500 rpm por 3 minutos. Se descartó el SN y se re-suspendieron los pellets con 150  $\mu$ L de PBS 1X para lavar. Se centrifugó la placa a 1500 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 20  $\mu$ L de la mezcla de tinción superficial (Zombie Aqua, anti-CD4 y anti-CD25). Se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz, agitando vigorosamente la placa a la mitad del tiempo de tinción. Para lavar, se adicionaron 150  $\mu$ L de PBS 1X y se centrifugó la placa a 1500 rpm por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se re-suspendieron con 100  $\mu$ L de la solución de Fijación/Permeabilización para detección de FoxP3 (Tonbo Biosciences). Se incubaron con esta solución por 1 hora a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos. Se descartó el SN y se re-suspendieron los pellets con 150  $\mu$ L de solución permeabilizadora para citometría de flujo (Tonbo Biosciences) para lavar. Después, las células se incubaron con 10  $\mu$ L del anti-FoxP3 por 30 minutos a temperatura ambiente, agitando a la mitad del tiempo de tinción. Se lavaron con 150  $\mu$ L de solución permeabilizadora. Se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 200  $\mu$ L de PBS 1X y se mantuvieron a 4°C hasta la adquisición en el citómetro de flujo (Attune Nxt, Invitrogen). Las muestras se analizaron con el software FlowJo V10.

#### **7.5. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 7.00. Para identificar si los datos presentaban una distribución normal se utilizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk con una  $\alpha=0.05$ . Para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos evaluados se utilizó ANOVA de una vía y la prueba post hoc Tukey. Los resultados se describen

como media  $\pm$  desviación estándar, considerando como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

### 7.6. Diagrama resumen del diseño experimental

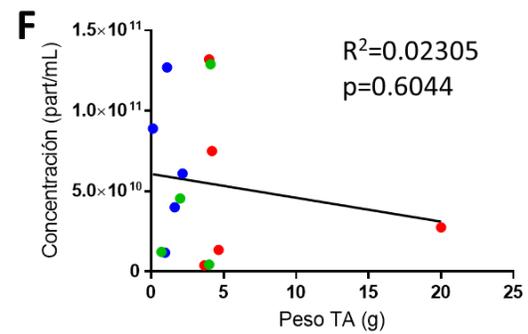
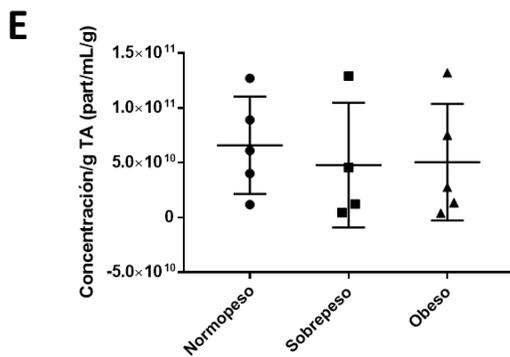
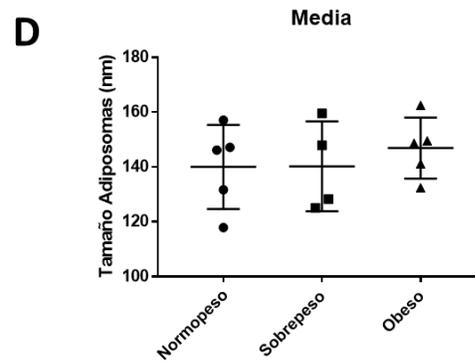
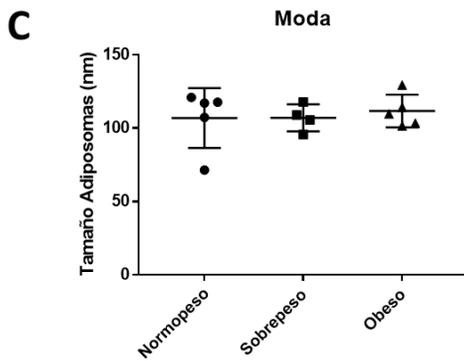
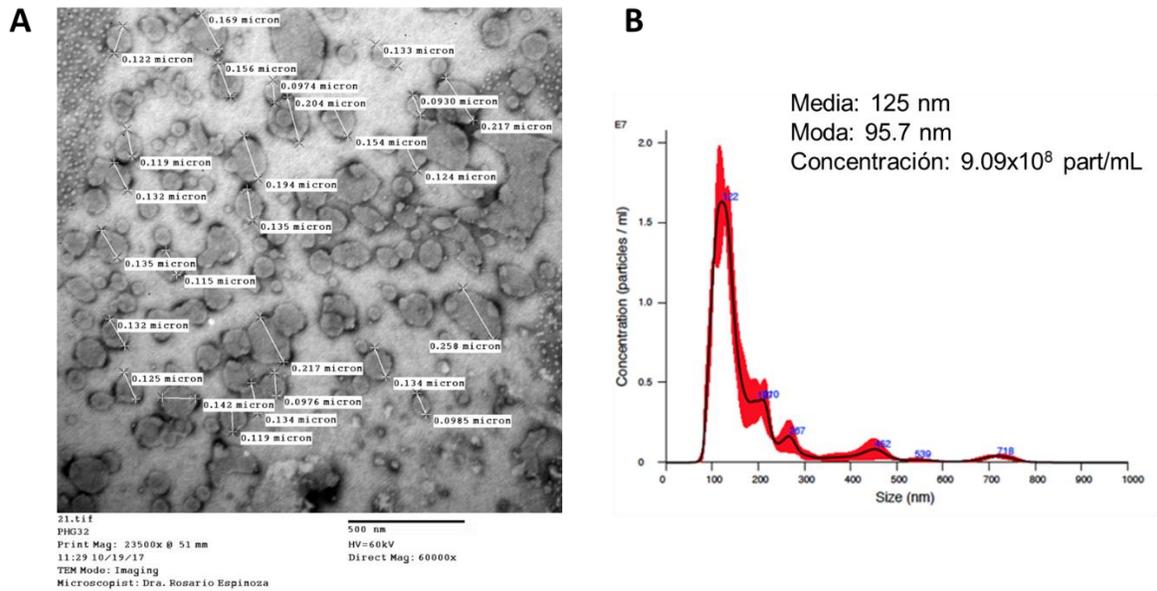


**Figura 10. Resumen de la metodología utilizada para el desarrollo del trabajo.**

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Caracterización de adiposomas

Se llevó a cabo la caracterización de los adiposomas obtenidos del cultivo de los adipocitos provenientes del tejido adiposo de pacientes con cáncer de mama.



**Figura 11. Caracterización de adiposomas. A)** Imagen representativa de los adiposomas obtenida por microscopía electrónica de transmisión (MET). **B)** Histograma representativo de la concentración de partículas con respecto a su tamaño (NTA). **C)** Moda y **D)** Media del tamaño y **E)** Concentración por gramo de tejido adiposo de los adiposomas purificados de cada muestra. **F)** Correlación entre la cantidad de tejido adiposo cultivado y la concentración de adiposomas purificados (puntos azules=normopeso, puntos verdes= sobrepeso, puntos rojos=obeso).

Como se observa en las imágenes obtenidas de la microscopía electrónica de transmisión (**Figura 11A**), los adiposomas purificados presentan una morfología y estructura característica de un exosoma: son esféricos, formados por una bicapa, la cual se puede apreciar gracias a la tinción de contraste con ácido fosfotúngstico (PTA). El tamaño de las vesículas es heterogéneo, variando desde los 90 a los 250 nm.

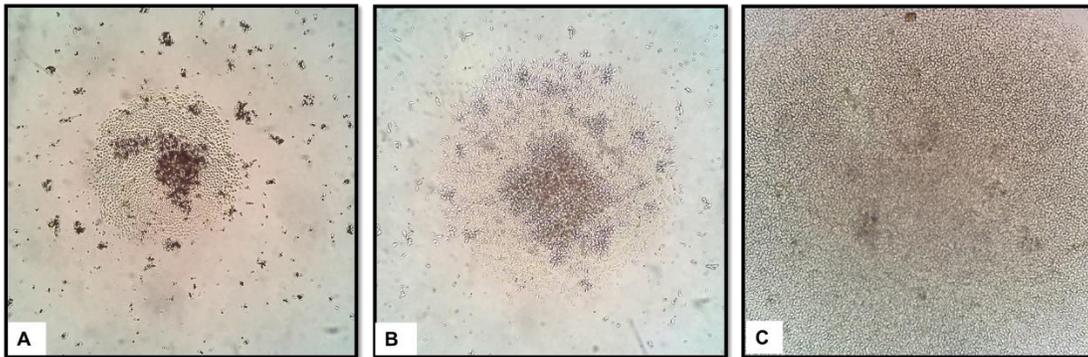
Por otro lado, la caracterización realizada a través del análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) nos proporciona información sobre la distribución proporcional de las diferentes poblaciones de adiposomas que conforman la muestra en cuanto a su tamaño, así como la concentración total de partículas en la muestra. De acuerdo con los resultados obtenidos por esta técnica, el patrón de la gráfica de tamaño contra concentración es similar al ya reportado para vesículas extracelulares derivadas de tejido adiposo (**Figura 11B**). La moda del tamaño es de  $108.6 \pm 13.8$  nm, mientras que la media es de  $142.5 \pm 13.6$  nm.

Al hacer una clasificación de los datos obtenidos por NTA para realizar una comparación de las muestras de acuerdo a si estas habían sido obtenidas de pacientes con obesidad, sobrepeso o de peso normal, no se observaron diferencias en la moda o media del tamaño de los adiposomas entre muestras de estos tres grupos (**Figura 11C,D**). Tampoco parece haber diferencias entre los tres grupos (normopeso, sobrepeso y obesidad) con respecto a la concentración de vesículas por gramo de tejido obtenidas después de su purificación, ni una correlación entre

la cantidad de tejido cultivada y la concentración obtenida de las vesículas (**Figura 11E,F**).

## **8.2. Establecimiento de las condiciones experimentales para la expansión de Tregs**

### **8.2.1. Curso temporal de la expansión de Tregs ex vivo**

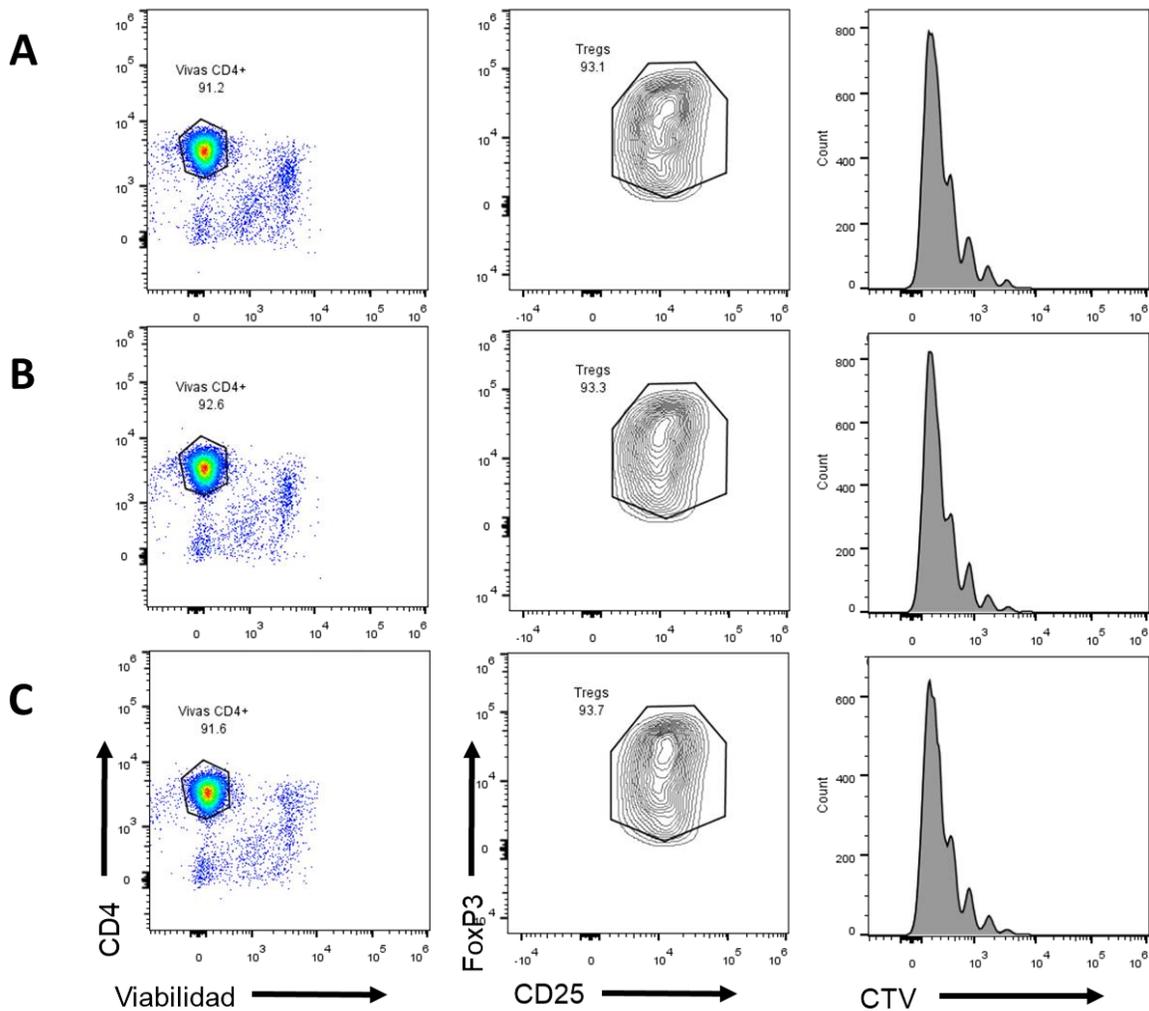


**Figura 12. Curso temporal de Tregs en un cultivo de expansión ex vivo.**

Imágenes tomadas al **A)** día 1, **B)** día 3 y **C)** día 7 de cultivo (10X).

Como se puede observar en la **Figura 12**, bajo las condiciones óptimas, previamente establecidas en nuestro laboratorio para la expansión *ex vivo* de Tregs, estas proliferan, observándose un aumento considerable en la cantidad de células a los 7 días de comenzado el cultivo. Hay cambios morfológicos en las células que pueden apreciarse desde el día 3, por inspección en el microscopio, los cuales nos indican que las células han respondido al estímulo (presencia de anti-CD3/CD28 e IL-2), cambiando tanto su forma como incrementando su tamaño, lo cual es indicativo de que las células se han activado y están proliferando.

### 8.2.2. Curva de cantidad de células con condiciones óptimas.

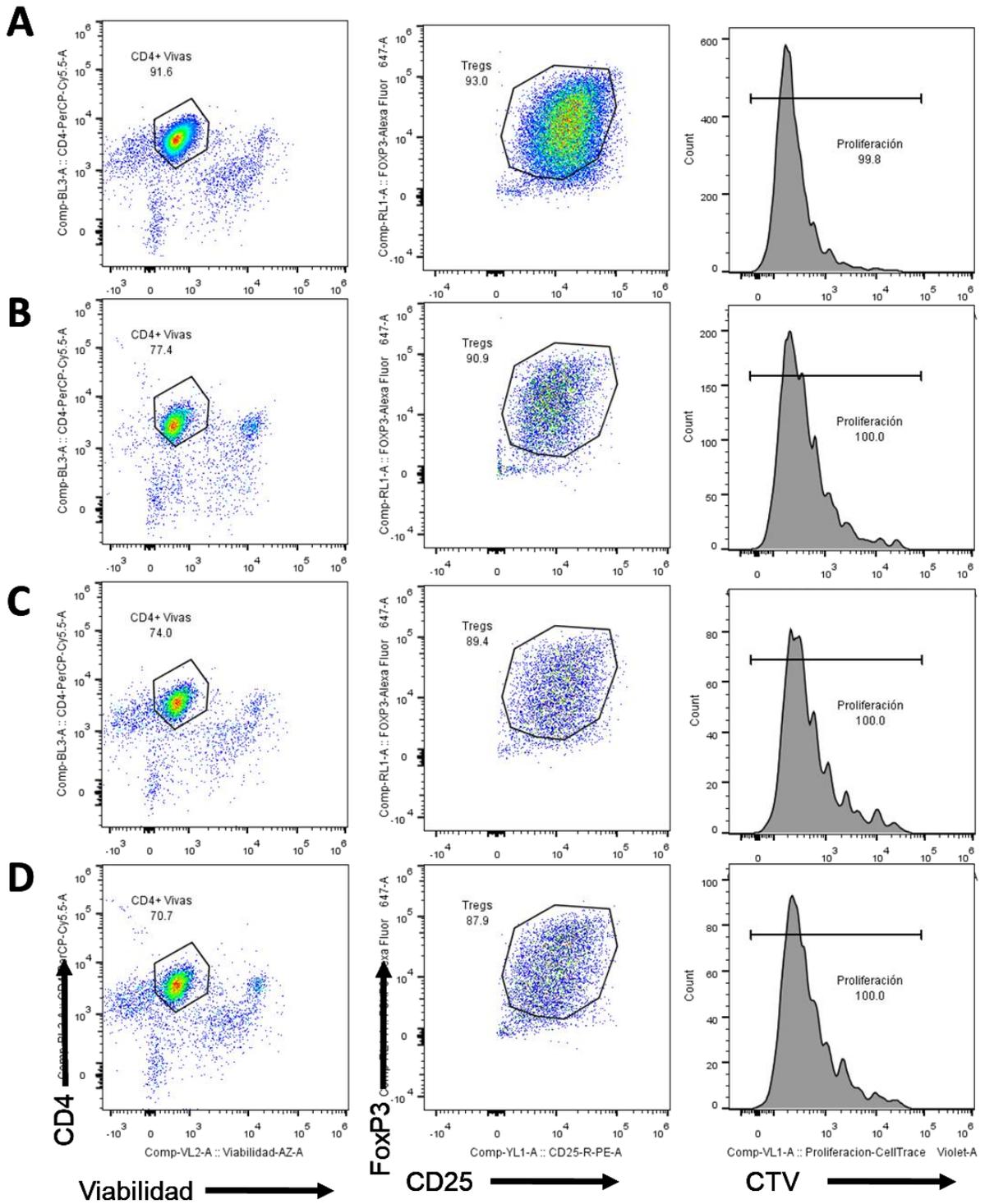


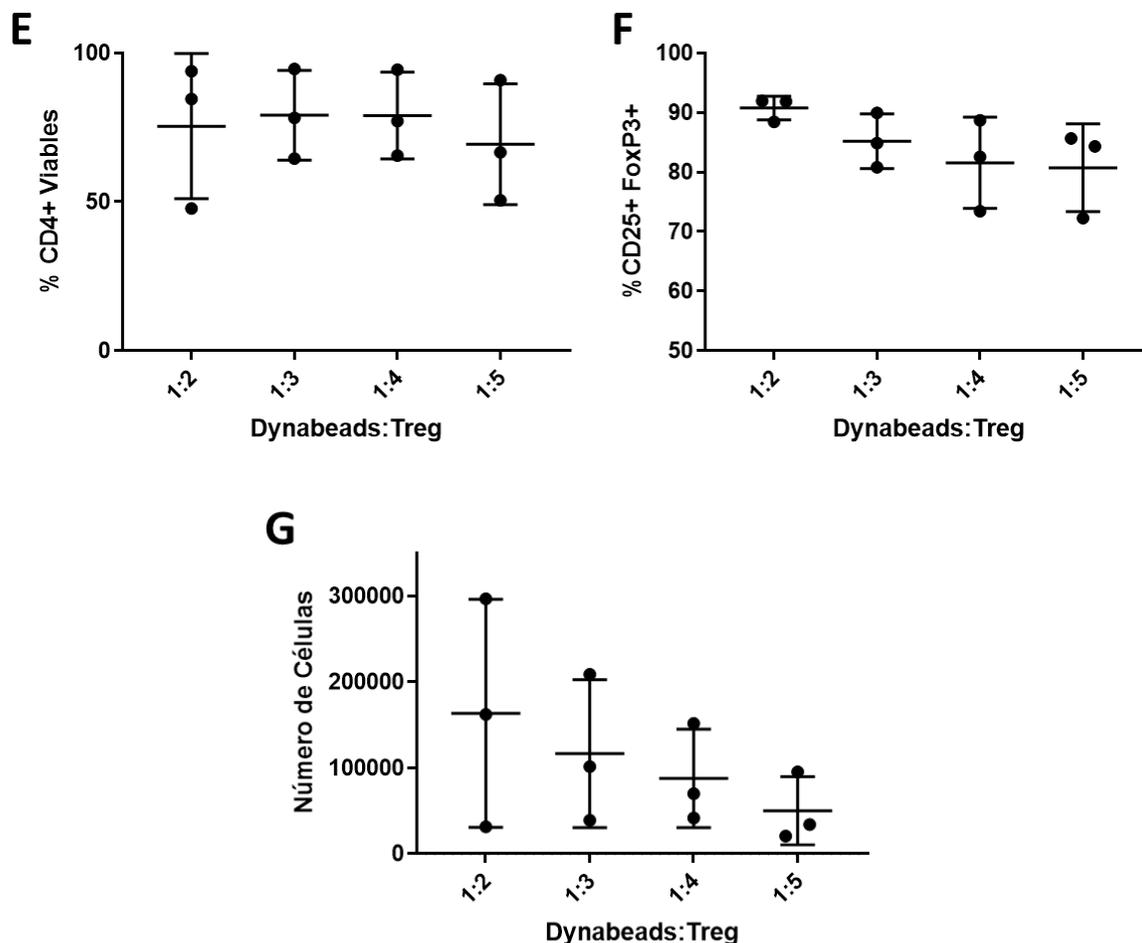
**Figura 13. Gráficas de puntos representativas de la expansión de Tregs *ex vivo* con A) 15000, B) 12500 y C) 10000 Tregs iniciales cultivadas 1:1 Dynabeads/célula. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.**

Como se puede apreciar en la **Figura 13**, iniciar con un menor número de células para expandir en 7 días no parece comprometer la viabilidad de estas (paneles de la izquierda). Sin embargo, los números que se obtienen al final de la expansión sí se ven disminuidos (paneles derechos), lo cual podría representar problemas al momento del análisis del fenotipo de estas células y su posible uso en ensayos de supresión. Asimismo, observamos que el porcentaje de células dobles positivas

para la expresión de CD25 y FoxP3 (paneles centrales) es alto, a pesar de haber sometido a las células a un periodo de “resting” o reposo, en donde se les retiró el estímulo anti-CD3/CD28, por lo que es necesario definir condiciones subóptimas de expansión de las Tregs, en donde se espera se observe una disminución de la expresión de CD25 y FoxP3 en condiciones de reposo, con el fin de poder apreciar si los adiposomas son capaces de mantener la expresión de estas moléculas aún en ausencia del estímulo de activación con los anticuerpos anti-CD3/CD28.

### 8.2.3. Curva de dosis de estímulo anti-CD3/CD28 (Dynabeads)





**Figura 14. Establecimiento de condiciones subóptimas del estímulo con Dynabeads acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 para la expansión de Tregs *ex vivo*.** Gráficas de puntos representativas de la expansión de Tregs separadas por FACS y cultivadas en presencia de **A)** 1:2, **B)** 1:3, **C)** 1:4 y **D)** 1:5

Dynabeads/células como estímulo para su expansión. Después de 7 días, se evaluó **E)** el porcentaje de células CD4+ viables, **F)** el porcentaje de células dobles positivas CD25+ FoxP3+ a partir de las CD4+ viables y **G)** el número de células por citometría de flujo. La línea sólida representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes y cada punto representa la media de dos repeticiones por sujeto. \* $p < 0.05$ .

Finalmente, para encontrar las condiciones subóptimas que nos permitan realizar los ensayos funcionales con adiposomas para la evaluación de su efecto en este sistema, variamos la dosis de estímulo que reciben las células en cultivo, para que se observara una disminución en la expresión de CD25 y FoxP3 durante el reposo con el fin de observar una diferencia al retar a las células con los adiposomas. Como se muestra en la **Figura 14**, se logró disminuir el porcentaje de células CD4+ dobles positivas para CD25 y FoxP3 con la condición 1:3 de Dynabeads/células después del reposo sin alterar la viabilidad del cultivo (**Figura 14B, E y F**), además de que con esta dosis, se pueden apreciar de mejor manera los ciclos de proliferación a lo largo de los 7 días de expansión (**Figura 14B**, panel derecho), lo que nos permitirá estudiar el índice de división y proliferación de estas células en los ensayos funcionales. Si bien la disminución observada en el porcentaje de la población CD25+ FoxP3+ para esta condición de estímulo puede ser mejorada al disminuir más la dosis del estímulo (como lo que se observa con las dosis de 1:4 y 1:5 Dynabeads/células), la cantidad de Tregs recuperadas al final del ciclo de expansión es menor (**Figura 14G**), lo cual podría generar un inconveniente metodológico si no se obtuvieran suficientes células para analizar su fenotipo y realizar la evaluación de su función supresora a través de ensayos *in vitro*.

## 9. DISCUSIÓN

El estudio de las interacciones que tienen lugar dentro del microambiente tumoral entre los diferentes tipos de células que se encuentran dentro de él es de suma importancia. Como ya se ha mencionado antes, las células que convergen en este sitio son de diversos orígenes y funciones, lo que complica su estudio. Es por esto, que muchas veces se busca aislar ciertas interacciones para poder comprenderlas mejor, buscando posteriormente incorporarlas a estudios más complejos.

En el presente trabajo se comenzó por la caracterización de los adiposomas derivados de los adipocitos provenientes de tejido adiposo mamario asociado a tumor. A diferencia de otros trabajos reportados en la literatura, donde se caracterizaron las vesículas provenientes de este tipo de tejido adiposo asociado completo<sup>52</sup>, en este trabajo por primera vez, se obtuvieron adiposomas producidos por adipocitos aislados a partir de tejido adiposo mamario digerido, para eliminar la contaminación de vesículas producidas por otras células que forman parte de este tejido, entre ellas las células mesenquimales y el infiltrado de células del sistema inmunológico.

Además, la técnica de purificación utilizada en este trabajo difiere de la utilizada por otros grupos de trabajo, donde aún es muy común realizar la purificación de exosomas por ultracentrifugación diferencial.<sup>53</sup> Sin embargo, en los últimos años, han surgido diversas metodologías que buscan mejorar el rendimiento de purificación, la preservación de la integridad y funcionalidad de las vesículas purificadas, así como eliminar con mayor eficiencia proteínas contaminantes y otros tipos de vesículas extracelulares que pudieran influir en los resultados de las evaluaciones del efecto biológico de exosomas.<sup>53,54</sup>

Es por esto que, en nuestro grupo de trabajo, se decidió implementar una metodología ya bien descrita en la literatura que consiste en una primera etapa de filtración por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  para eliminar detritos celulares y aquellas vesículas extracelulares de mayor tamaño que los exosomas (cuerpos apoptóticos y microvesículas), los cuales son retenidos en el filtro. Enseguida, se realizó la

ultrafiltración del sobrenadante del cultivo que contiene los adiposomas a purificar, para eliminar proteínas de bajo peso molecular (menor a 30 kDa) de la muestra. Finalmente, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño, en la cual se recuperaron y evaluaron de manera individual cada una de las fracciones por NTA, encontrándose que (en al menos 3 muestras) las fracciones 8-12 se recuperaron las vesículas que por su tamaño podrían corresponder a exosomas. De esta forma, se seleccionaron las fracciones eluidas de la columna en las que, en al menos 3 muestras, hallamos la mayor cantidad de partículas que tenían un tamaño dentro del rango de 30-150 nm. A continuación, se procedió a caracterizar los adiposomas mediante técnicas descritas para la identificación de vesículas extracelulares.

De acuerdo con la ISEV (Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares, por sus siglas en inglés), es necesario contar con al menos dos técnicas de caracterización de vesículas individuales que permitan evaluar la heterogeneidad de la muestra de vesículas obtenidas. Dichas técnicas incluyen: microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fuerza atómica, análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) y dispersión dinámica de la luz. Mientras que las dos primeras nos permiten obtener información acerca de la morfología y el tamaño de vesículas individuales, las dos últimas nos permiten evaluar la distribución del tamaño de las vesículas entre las diferentes poblaciones que conforman la muestra. Por ello, es necesario comparar la información proporcionada por las técnicas de microscopía con la de las técnicas que evalúan la distribución del tamaño de las vesículas que conforman la muestra, ya que estas últimas no pueden discriminar si las partículas evaluadas son partículas compuestas por una membrana o si pertenecen a una contaminación de la muestra con partículas de similar tamaño, pero de otro origen (aglomeración de cristales de sal, proteínas, entre otros).<sup>55</sup>

Por lo tanto, seleccionamos la microscopía de transmisión y el NTA para realizar la caracterización de los adiposomas que purificamos. Siempre existe cierta disparidad entre las dos técnicas de caracterización en cuanto al tamaño promedio de los adiposomas. Sin embargo, los resultados que obtuvimos de ambas metodologías son consistentes entre sí, ambos encontrándose en el rango de

tamaño de los exosomas (30-150 nm). No se sabe si estas diferencias son producto del tratamiento al que se somete la muestra para realizar cada determinación; por ejemplo, el proceso de fijación que se usa para tratar las muestras que se analizan por MET.<sup>56</sup> Por otro lado, recordando que los exosomas tienen un tamaño de entre 30-150 nm, las partículas que presentan un tamaño mayor y que son detectadas tanto por NTA como por MET podrían ser producto de la fusión de membranas de dos o más adiposomas, lo cual podría ocurrir posterior a la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño. También, cabe la posibilidad de que se trate de cuerpos apoptóticos o microvesículas, las cuales tienen un mayor tamaño y que pudieron no ser adecuadamente eliminadas. Sin embargo, lo anterior es muy poco probable debido al tamaño del poro del filtro utilizado durante la primera filtración del sobrenadante, aunado a la cromatografía de exclusión por tamaño. A pesar de esto, la presencia de proteínas clásicamente empaquetadas en otras vesículas extracelulares distintas a los exosomas debe de ser descartada por alguna técnica de análisis molecular.

Al realizar la comparación de la característica de tamaño entre los adiposomas obtenidos de diferentes muestras de pacientes con cáncer de mama, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos (entre pacientes de peso normal, con sobrepeso o con obesidad). Tampoco observamos una diferencia en la concentración de vesículas obtenida por gramo de tejido procesado entre pacientes con y sin obesidad, contrario a lo que esperábamos encontrar, de acuerdo con observaciones que se han realizado sobre la concentración de adiposomas producidos por el tejido adiposo visceral de ratones obesos, donde estos produjeron una mayor cantidad de vesículas por gramo de tejido comparado con el tejido adiposo de ratones de peso normal.<sup>57</sup> Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que, aumentando la cantidad de muestras, pudiera llegar a observarse alguna diferencia significativa, puesto que a pesar de comparar pacientes obesos y normopeso, posiblemente existe heterogeneidad de acuerdo con en el estadio de progresión del tumor o el subtipo molecular del cáncer, lo que haría interesante re-subclasificar las muestras de acuerdo con más criterios.

Sin embargo, si bien es de interés evaluar el tamaño y número de exosomas producidos en pacientes con obesidad o de peso normal, para poder evaluar la relevancia biológica de los adiposomas en el contexto del microambiente tumoral, es fundamental evaluar a nivel molecular el contenido de estas tanto a nivel lipídico, proteico y de miRNAs u otros ácidos nucleicos que pudieran contener y transferir a otras células. Dicho análisis profundo quedó pendiente en el presente estudio, debido a que el tamaño de las muestras recolectadas no fue suficiente para obtener una cantidad adecuada de adiposomas, pero está contemplado dentro de las perspectivas de este trabajo.

Como parte de la caracterización de vesículas extracelulares, también es necesaria la identificación y cuantificación semicuantitativa de moléculas comúnmente enriquecidas en exosomas, las cuales pueden ser identificadas a través de diversas técnicas como el análisis proteómico por espectroscopía de masas, ELISA, citometría de flujo y western blot, siendo esta última la más utilizada en publicaciones del área.<sup>55</sup> En este contexto, y de acuerdo con la ISEV, es necesario identificar: a) la presencia de al menos una proteína transmembranal (indica la existencia de membranas en la preparación de vesículas aisladas), como pueden ser tetraspaninas (CD9, CD63, o CD81), b) la presencia de al menos una proteína citosólica relacionada con el origen endosomal de las vesículas o de unión a membrana, como pueden ser Alix, proteínas Rab o TSG101 y c) la ausencia o baja proporción de proteínas asociadas con otros compartimentos diferentes a membrana y endosomas, como pueden ser proteínas de retículo endoplásmico, mitocondria o aparato de Golgi, esto último con el fin de descartar la contaminación de la muestra con detritos celulares o cuerpos apoptóticos, donde pudieran encontrarse estas proteínas.<sup>55</sup> Debido a la escasa cantidad de muestra que obtuvimos de las intervenciones quirúrgicas, la concentración de proteína de los adiposomas que obtuvimos por muestra no fue suficiente para obtener resultados por western blot. Por ello se concluye que, incrementando la cantidad de tejido adiposo obtenida por muestra, será posible completar la caracterización molecular de los adiposomas.

Por otro lado, debido a la logística de la recolección de las muestras de las pacientes y los requerimientos temporales para su procesamiento, se requerirá realizar la criopreservación de las CMNs mientras se lleva a cabo la purificación de adiposomas, cuando posteriormente se busque analizar el efecto de los adiposomas purificados en las Tregs del mismo paciente a través de ensayos funcionales autólogos. Con dicha perspectiva en mente, el establecimiento de las condiciones para realizar los ensayos que se llevó a cabo en el presente trabajo se hizo tomando en cuenta las limitaciones que tendríamos cuando trasladáramos la técnica establecida en células de donadores sanos a las condiciones con las que tendremos que trabajar con las células de las muestras de pacientes.

En primera instancia, para el establecimiento de las condiciones experimentales para la expansión de Tregs *ex vivo* se buscó encontrar unas condiciones que fueran “subóptimas”, las cuales permitieron que las células proliferaran de forma moderada con respecto a como lo harían en las condiciones óptimas establecidas en nuestro laboratorio, con el propósito de poder observar de forma clara si los adiposomas pueden modular este proceso, promoviendo o inhibiendo la expansión de las células. Así mismo, después de un ciclo de expansión, es común observar una disminución en el porcentaje de células CD25+ FoxP3+ después de que las Tregs expandidas son puestas en condiciones de reposo (donde se retira el estímulo con anti-CD3/CD28), disminución que no se observa en Tregs co-cultivadas con exosomas de líneas celulares de cáncer de mama<sup>47</sup>, lo que nos indica que los exosomas provenientes de células cancerosas pueden promover el mantenimiento de la expresión de estas moléculas clave en la función de las Tregs aún en ausencia de un estímulo de activación.

Trabajos previos en el laboratorio habían establecido que era posible expandir Tregs partiendo de 15,000 células iniciales, disminuyendo el estímulo óptimo a la mitad y agregando IL-2 a una concentración de 300 U/mL al inicio de la expansión (en lugar de las 500 U/mL que se utilizan en condiciones óptimas).<sup>47</sup> Teniendo como base este antecedente, se probaron diferentes dosis de estímulo y número inicial de

células con el fin de encontrar las mejores condiciones para los ensayos funcionales que se realizarán con las muestras de pacientes.

De acuerdo con los resultados, la mejor condición encontrada fue cultivar 12,500 células con una relación de perlas anti-CD3/CD28 de 1:3 Dynabeads/células; condiciones que nos permitirán tener suficientes células iniciales para probar una curva dosis-respuesta con diferentes proporciones entre adiposomas y células, considerando que existe la posibilidad de que las células que obtengamos de los pacientes sean un factor limitante. Si bien, la disminución en el porcentaje de células CD25+ FoxP3+ no fue la esperada al reducir la dosis de estímulo después del reposo (cercana a un 70%)<sup>47</sup>, creemos que será suficiente para estudiar si los adiposomas son capaces o no de mantener la expresión de estas moléculas en las células cultivadas. Como se observó en la **Figura 14**, al reducir la dosis de estímulo, es posible disminuir este porcentaje aún más. Sin embargo, se comienzan a comprometer otros parámetros de estudio del modelo como lo son la cantidad de células obtenidas al final del ciclo de expansión, su viabilidad y proliferación.

En ese contexto, estas condiciones nos permiten evaluar la proliferación celular de forma adecuada, ya que dicha dosis de estímulo promueve la proliferación moderada de las células, de forma que, después de 7 días de expansión, la señal del CTV aún es detectable en los diferentes ciclos de proliferación, lo cual es fundamental para el cálculo de parámetros como el índice de división y el índice de proliferación que describen el comportamiento de las células en el cultivo.

También, podemos concluir que utilizar 12,500 células al inicio del cultivo potencialmente nos permitirán obtener suficientes Tregs expandidas para llevar a cabo tanto su caracterización fenotípica como su caracterización funcional, a través de ensayos de supresión de proliferación de linfocitos T efectores.

Al momento, desconocemos si las células provenientes de pacientes tendrán el mismo comportamiento que las utilizadas en este punto del proyecto; provenientes de paquetes leucocitarios de donadores sanos (dentro de los cuales observamos mucha variabilidad de sujeto a sujeto en los distintos parámetros analizados), pero

los hallazgos de este trabajo nos servirán de guía para el ajuste de las condiciones experimentales de acuerdo con lo que observemos con las células de pacientes.

Los resultados obtenidos de este trabajo harán posible realizar los ensayos funcionales para determinar el efecto de adiposomas provenientes de tejido adiposo asociado a tumores de pacientes con cáncer de mama en la expansión de Tregs, ya que con la metodología utilizada se pueden aislar estos exosomas de muestras de pacientes y las consideraciones realizadas para el establecimiento de las condiciones necesarias del cultivo fueron hechas tomando en cuenta las posibles limitantes a las que nos enfrentaremos al realizar la expansión de Tregs provenientes de muestras de sangre de pacientes.

## 10. CONCLUSIONES

Se consiguió caracterizar a los adiposomas liberados por los adipocitos de tejido adiposo asociado a tumor de pacientes con cáncer de mama a través de dos metodologías (NTA y TEM). Estos tienen las dimensiones y morfología características de los adiposomas previamente reportados. Para complementar esta caracterización es necesario corroborar la presencia de proteínas características de exosomas y descartar la presencia de otros tipos de vesículas extracelulares en las muestras a través de WB.

Se consiguió establecer las condiciones necesarias para la expansión subóptima de Tregs *ex vivo*, de acuerdo con las necesidades que presenta nuestro modelo de estudio, las cuales podrán utilizarse para determinar el efecto que tienen los adiposomas sobre la expansión de Tregs y su implicación en cáncer de mama.

## 11. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Realizar la caracterización molecular de los adiposomas a través de la identificación de los marcadores clásicos de exosomas (CD9, CD63, CD81, Alix y/o TSG101) y descartar contaminación con cuerpos apoptóticos por WB.
- Incorporar más controles al estudio: Sujetos control que no padezcan cáncer de mama obesos y de peso normal para poder realizar las comparaciones pertinentes.
- Realizar los ensayos funcionales en donde se co-cultiven las Tregs en presencia de los adiposomas para determinar su efecto en la expansión de estas células, su efecto en la expresión de diferentes moléculas en las Tregs, así como su efecto en la función supresora de estas células a través de ensayos de supresión.
- Complementar el estudio con ensayos de conversión a Tregs de células T vírgenes *ex vivo*.

## 12. REFERENCIAS

1. Javed, A., et. al. **(2013)**. Development of the human breast. *Semin Plast Surg.* 27(1), 5-12.
2. Avagliano, A., et. al. **(2020)**. Influence of fibroblasts on mammary gland development, breast cancer microenvironment remodeling, and cancer cell dissemination. *Cancers.* 12(6), 1697.
3. Vargo-Gogola, T., et. al. **(2007)**. Modelling Breast Cancer: One size does not fit all. *Nature Reviews Cancer.* 7(9), 659-672.
4. Harbeck, N., et. al. **(2019)**. Breast Cancer. *Nature Reviews Disease Primers.* 5 (66), 1-31.
5. Sung, H., et. al. **(2021)**. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal for Clinicians.* 71, 209-249.
6. Argüello-Esparza, E. Y., Cáncer de mama en México. Recuperado el 24 de noviembre de 2018 de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/248801/CancerdeLaMujer.pdf>
7. Wong, E., et. al., Breast Cancer. Recuperado el 24 de noviembre de 2018 de <http://www.pathophys.org/breast-cancer/>
8. Wyant, T., et. al., Breast Cancer Risk Factors. Recuperado el 24 de noviembre de 2018 de <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention.html>
9. Obesity. Recuperado el 27 de noviembre de 2018 de <https://www.who.int/topics/obesity/en/>
10. Purnell, J., Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. Recuperado el 21 de mayo de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279167/>
11. Kushner, R. **(2012)**. Clinical Assessment and Management of Adult Obesity. *Circulation.* 126(24), 2870-2877.
12. Arce-Salinas, C., et. al. **(2014)**. Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 146(1), 183-188.

13. Jiralerspong, S., et. al. **(2016)**. Obesity and Breast Cancer Prognosis: Evidence, Challenges, and Opportunities. *J. Clin. Oncol.* 34(35), 4203-4216.
14. Argolo, D.F., et. al. **(2018)**. The Impact of Obesity on Breast Cancer. *Current Oncology Reports.* 20(47), 1-8.
15. Blücher, C., et. al. **(2017)**. Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in promoting Breast cancer growth and progression. *Frontiers in Endocrinology.* 8(293), 1-7.
16. Deng, T., et. al. **(2016)**. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease.* 11, 421-449.
17. Kammoun, H.L., et. al. **(2014)**. Adipose tissue inflammation in glucose metabolism. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15(1), 31-44.
18. Kolb, R., et. al. **(2020)**. Obesity and Breast Cancer: A Case of Inflamed Adipose Tissue. *Cancers.* 12(1686), 1-18.
19. Dunn, G. P., et. al. **(2002)**. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology.* 3(11), 991-998.
20. Schreiber, R. D., et. al. **(2011)**. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science.* 331(6024), 1565-1570.
21. Sakaguchi, S., et. al. **(2008)**. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell.* 133(5), 775-787.
22. Fontenot, J. D., et. al. **(2003)**. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4(4), 330-336.
23. Lu, L., et. al. **(2017)**. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nature Reviews Immunology.* 17(11), 703-717.
24. Dhamne, C., et. al. **(2013)**. Peripheral and thymic Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. *Front. Immunol.* 4(253), 1-11.
25. Klein, L., et. al. **(2019)**. Central CD4<sup>+</sup> T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology.* 19(1), 7-18.
26. Kanamori, M., et. al. **(2016)**. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in Immunology.* 37(11), 803-811.
27. Vignali, D. A. A., et. al. **(2008)**. How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology.* 8(7), 523-532.

28. Schmidt, A., et. al. **(2012)**. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. *Front. Immunol.* 3(51), 1-20.
29. Shang, B., et. al. **(2015)**. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systemic review and meta-analysis. *Scientific Reports.* 5(15179), 1-9.
30. Shou, J., et. al. **(2016)**. Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 16(687), 1-8.
31. Li, C., et. al. **(2020)**. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies, and future prospects. *Molecular Cancer.* 19(116), 1-23.
32. Plitas, G., et. al. **(2016)**. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity.* 45(5), 1122-1134.
33. Khaja, A. S. S., et. al. **(2017)**. Preferential accumulation of regulatory T cells with highly immunosuppressive characteristics in breast tumor microenvironment. *Oncotarget.* 8(20), 33159-33171.
34. Su, S., et. al. **(2017)**. Blocking the recruitment of naïve CD4+ T cells reverses immunosuppression in breast cancer. *Cell Research.* 27, 461-482.
35. Kalluri, R. **(2016)**. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 16(9), 582-598.
36. Quail, D. F., et. al. **(2013)**. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine.* 19(11), 1423-1437.
37. Hu, C., et. al. **(2018)**. Exosome-related tumor microenvironment. *Journal of Cancer.* 9(17), 3084-3092.
38. Zhang, X., et. al. **(2015)**. Exosomes in cancer: Small particle, big player. *Journal of Hematology & Oncology.* 8(83), 1-13.
39. Colombo, M., et. al. **(2014)**. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255-289.
40. Kalra, H., et. al. **(2016)**. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the next small big thing. *Int. J. Mol. Sci.* 17(2), 1-30.

41. Wei, H., et. al. **(2021)**. Regulation of exosome production and cargo sorting. *Int. J. Biol. Sci.* 17(1), 163-177.
42. Hoshino, A., et. al. **(2015)**. Tumor exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 527(7578), 329-335.
43. Whiteside, T. L. **(2016)**. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J. Clin. Invest.* 126(4), 1216-1223.
44. Liu, Y., et. al. **(2015)**. The exosomes in tumor immunity. *Oncoimmunology.* 4(9), 1-8.
45. Szajnik, M., et. al. **(2010)**. Tumor-Derived Microvesicles Induce, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg). *PLoS ONE.* 5(7).
46. Wieckowski, E.U., et. al. **(2009)**. Tumor-Derived microvesicles promote regulatory T cell Expansion and Induce Apoptosis in Tumor-Reactive Activated CD8+ T lymphocytes. *Journal of Immunology.* 183(6), 3720-3730.
47. Ortega-Chávez, E.S. **(2019)**. *Determinación del efecto de exomas tumorales de cáncer de mama en la generación, expansión y función de células T reguladoras FOXP3+ y en la inducción de angiogénesis in vitro.* Tesis de Maestría. Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
48. Rong, L., et. al. **(2016)**. Immunosuppression of breast cancer cells mediated by transforming growth factor beta in exosomes from cancer cells. *Oncology Letters.* 11(1), 500-504.
49. Robado de Lope, L., et. al. **(2017)**. Tumor-adipose tissue crosstalk: Fueling tumor metastasis by extracellular vesicles. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 373(1737), 1-10.
50. Wang, J., et. al. **(2017)**. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget.* 8(47), 81880-81891.
51. Kranendonk, M., et. al. **(2014)**. Human Adipocyte Extracellular Vesicles in Reciprocal Signaling between adipocytes and macrophages. *Obesity Biology and Integrated Physiology.* 22(5), 1296-1308.

52. Jeurissen, S., et. al. **(2017)**. The Isolation of morphologically intact and biologically active extracellular vesicles from the secretome of cancer-associated adipose tissue. *Cell Adhesion & Migration*. 11(2), 196-204.
53. Li, P., et. al. **(2017)**. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 7(3), 789-804.
54. Sidhom, K., et. al. **(2020)**. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *Int. J. Mol. Sci.* 21(18), 1-19.
55. Lötvall, J., et. al. **(2014)**. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 3: 26913.
56. Dragovic, R., et. al. **(2011)**. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 7(6), 780-788.
57. Flaherty III, S.E., et. al. **(2019)**. A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes. *Science*. 363(6430), 989-993.

## 13. APÉNDICES

### 13.1. APÉNDICE A

#### **Criterios de Inclusión y Exclusión y Datos clínicos de las pacientes**

##### ✓ Criterios de Inclusión

- Pacientes femeninas con diagnóstico confirmado de cáncer de mama de cualquier estadio clínico y subtipo molecular.
- 18-60 años de edad.
- Pacientes que vayan a ser sometidas a cirugía.
- Pacientes que acepten participar en el estudio y hayan firmado el consentimiento informado.

##### ✓ Criterios de Exclusión

- Pacientes que no deseen participar en el estudio.
- Pacientes que presenten comorbilidades relacionadas con metabolismo y/o sistema inmunológico.
- Pacientes que hayan recibido neoadyuvancia (quimioterapia o radioterapia).
- Tamaño de la muestra insuficiente para realizar el estudio.
- Pacientes con embarazo y/o lactancia.

## 13.2. APÉNDICE B

### Soluciones y Medios de Cultivo

- PBS 10X

Sustancia	Concentración Final (mM)	Cantidad para 500 mL (g)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15	1.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	81	5.75
$\text{NaCl}$	1380	40.3
$\text{KCl}$	30	1.1

Disolver las sales en 500 mL de agua bidestilada utilizando un agitador magnético. Almacenar a 4°C.

- PBS 1X

Para preparar 1000 mL, diluir 100 mL de PBS 10X con 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 M o NaOH 5 M. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Esterilizar filtrando por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Almacenar a 4°C.

Sustancia	Concentración Final (mM)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8.1
$\text{NaCl}$	138.0
$\text{KCl}$	3.0

- PBS + 0.32% Citrato de sodio

Disolver 0.32 g de citrato de sodio en 80 mL de PBS 1X utilizando un agitador magnético. Aforar a 100 mL con PBS 1X. Esterilizar filtrando por membrana de 0.22. Almacenar a 4°C. Esta solución se utiliza para lavar la sepharosa y almacenarla después de la purificación de adiposomas.

- Amortiguador para Adipocitos (BA)

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>	<b>Cantidad para 500 mL</b>
<b>NaCl</b>	0.14 M	58.44	4.06 g
<b>KCl</b>	4.7 mM	74.56	0.175 g
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	2.5 mM	147.026	0.183 g
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1.2 mM	246.498	0.148 g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1.2 mM	136.09	0.082 g
<b>HEPES</b>	20 mM	238.3	2.383 g
<b>BSA</b>	0.2%	-	1 g
<b>Anti-Anti</b>	1%	-	5 mL (Stock 100X)
<b>Piruvato</b>	1 mM	-	5 mL (Stock 100mM)

Disolver en agua bidestilada. Esterilizar filtrando por membrana de 0.22 µm. Almacenar a 4°C.

- Medio de Digestión para TA

<b>Sustancia</b>	<b>Concentración Final (mM)</b>	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>	<b>Cantidad para 500 mL (g)</b>
<b>HEPES</b>	100	58.44	4.06
<b>NaCl</b>	120	74.56	0.175
<b>KCl</b>	50	147.026	0.183
<b>Glucosa</b>	5	246.498	0.148
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1	136.09	0.082

Disolver en medio RPMI 1640. Esterilizar filtrando por membrana de 0.22 µm. Almacenar a 4°C. Antes del procesamiento de cada muestra, agregar por cada 10 mL de medio de digestión 0.15 g de BSA cristalizado [1.5%] (Sigma, A-2153) y 0.01g

de Colagensa tipo I [1 mg/mL] (Gibco, 17100-017). Disolver sin agitar fuertemente para evitar la formación de espuma y filtrar por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

- Medio de Cultivo para adipocitos

Mezclar partes iguales (1:1) de medio  $\alpha$ -MEM y F12 sin SFB.

- Medio de Expansión

<b>Complemento</b>	<b>Volumen para 20 mL de medio de expansión (mL)</b>
<b>Anti-Anti (100X)</b>	0.2
<b>L-glutamina (100X)</b>	0.2
<b>Piruvato (100X)</b>	0.2
<b>Suplemento Optimizer</b>	0.52
<b>Medio Optimizer</b>	18.88

El medio de expansión se filtra por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se almacena a 4°C protegido de la luz por no más de 1 mes.

### 13.3. APÉNDICE C

#### Anticuerpos utilizados para el análisis por citometría de flujo

<b>Molécula Blanco</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clona</b>	<b>Marca; No. De Catálogo</b>	<b>Título de uso</b>	<b>Diluyente</b>
<b>CD4</b>	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	Tonbo; 65-0049-T100	1:150	PBS 1X
<b>CD4</b>	PE-Cy7	RPA-T4	Tonbo; 60-0049-T100	1:400	PBS 1X
<b>CD4</b>	PE	RPA-T4	Tonbo; 50-0049-T100	1:1000	PBS 1X
<b>CD4</b>	APC	OKT4	Tonbo; 20-0049-T100	1:800	PBS 1X
<b>CD4</b>	APC-Cy7	RPA-T4	Tonbo: 63-0049-T100	1:400	PBS 1X
<b>CD25</b>	PE-Cy7	BC96	Tonbo; 60-0259-T100	1:40	PBS 1X
<b>CD45 RA</b>	APCFire750	HI100	Biolegend; 304152	1:400	PBS 1X
<b>CD127</b>	PE	A019D5	Biolegend; 351304	1:200	PBS 1X
<b>FoxP3</b>	AF 647	-	Beckman Coulter; B30650	1:50	Solución Perm.