



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA NEONATAL EN LA RESPUESTA  
INMUNE AL CÁNCER DE MAMA EN UN MODELO MURINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**TANIA DE LOURDES OCHOA MERCADO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE MORALES MONTOR**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ**  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO  
**DR. RUDOLF MARINUS BUIJS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CD. MX., FEBRERO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA NEONATAL EN LA RESPUESTA  
INMUNE AL CÁNCER DE MAMA EN UN MODELO MURINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**TANIA DE LOURDES OCHOA MERCADO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE MORALES MONTOR**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ**  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO  
**DR. RUDOLF MARINUS BUIJS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., FEBRERO, 2019**



OFICIO CPCB/025/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de octubre del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **OCHOA MERCADO TANIA DE LOURDES** con número de cuenta 305136796 con la tesis titulada "EFECTO DE LA DENERVACIÓN SIMPÁTICA NEONATAL EN LA RESPUESTA INMUNE AL CÁNCER DE MAMA EN UN MODELO MURINO", realizada bajo la dirección del **DR. JORGE MORALES MONTOR**:

Presidente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ  
Vocal: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA  
Secretario: DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ  
Suplente: DR. PEDRO ULISES OSTOA SALOMA  
Suplente: DRA. KAREN ELIZABETH NAVA CASTRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de enero del 2019.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por haberme permitido realizar mis estudios de Maestría, así como el haberme dado las herramientas suficientes para poder desarrollar mi proyecto con éxito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme proporcionado apoyo económico (No. 449851) durante la realización de mis estudios de Maestría (CVU: 642725).

Al Proyecto IN209719 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, otorgado al Dr. Jorge Morales Montor.

Al Proyecto FC-2016-2125 de Fronteras en la Ciencia, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), otorgado al Dr. J. Morales-Montor.

Finalmente, agradezco a mi tutor principal, el Dr. Jorge Morales por haberme guiado en la realización de este proyecto, así como a los miembros de mi comité tutor, el Dr. Escobedo y el Dr. Buijs por haberme hecho recomendaciones necesarias y haberme ayudado a mejorar profesionalmente.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Al Dr. Jorge Morales Montor por haberme permitido realizar mis estudios de maestría, por sus enseñanzas y por todos los consejos y comentarios que me ayudaron a mejorar profesionalmente y académicamente. Gracias por la paciencia.

A la Dra. Karen Elizabeth Nava Castro, por todos sus comentarios y su valioso apoyo académico.

A la Dra. Margarita Isabel Palacios Arreola y a la cDra. Rocío Ruiz Manzano, por haberme apoyado académica y experimentalmente durante mis estudios de maestría.

A la cDra. Rosalía Hernández Cervantes y al Dr. Víctor Hugo del Río Araiza por su colaboración en los experimentos de este trabajo.

A los integrantes del laboratorio “Interacciones Neuroinmunoendócrinas” que con sus comentarios durante los seminarios me permitieron mejorar profesionalmente.

## DEDICATORIA

A mi esposo, Fernando Torres, por estar conmigo durante todo este largo y tortuoso camino de la maestría, por apoyarme y no dejar que me rindiera, por tus palabras de aliento, pero sobre todo por tu amor y compañía.

A mi abuelita Francisca, sé que desde el cielo siempre estás conmigo.

A mi abuelita Mode, siempre está en mi corazón. Espero que nunca me falte.

A mi mamá, María Mercado, y a mi papá, Felipe Ochoa, por su amor incondicional. Para que se sientan más orgullosos de mí, así como yo lo estoy de ustedes. Me han enseñado a luchar por mis sueños, y aquí está uno más.

A mi hermana, Omaira Ochoa, esto no sería posible sin todo tu apoyo, amor y la presión ejercida para seguir adelante.

A mi hermana, Saray Ochoa, a pesar de todo, mis logros siempre serán tuyos también.

A mis sobrinas, Hada y Danae, para que sigan adelante y persigan sus sueños y nunca dejen de estudiar y echarle ganas a todo en esta vida.

A mis suegros, Leonila León y José Luis Torres, por su apoyo incondicional y su gran cariño que me han brindado desde que los conocí. Gracias por aceptarme en la familia.

A Valentina y Sarita, para que cumplan todas tus metas y sueños, para que nunca se den por vencidas a pesar lo difícil que parezca.

A mis amigos, Gaby, Martín, Paty, Enrique y Sofía, por su valiosa e incomparable amistad de tantos años.

## ÍNDICE

Lista de figuras.....	11
Lista de tablas.....	12
Lista de abreviaturas.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
1. Introducción.....	16
1.1 Cáncer de mama.....	16
1.1.1 Epidemiología en México.....	16
1.1.2 Generalidades del cáncer de mama.....	16
1.2 Control inmunológico del cáncer de mama.....	17
1.2.1 Células asesinas naturales.....	18
1.2.2 Células dendríticas.....	19
1.2.3 Macrófagos.....	19
1.2.4 Linfocitos T.....	21
1.2.4.1 Linfocitos T cooperadores.....	22
1.2.4.2 Linfocitos T citotóxicos.....	23
1.2.5 Linfocitos B.....	23
1.3 Inmunovigilancia – inmunoedición – inmunoescape.....	24
1.4 Sistema nervioso simpático y sistema inmune.....	26
1.4.1 Innervación simpática del sistema inmune.....	28
1.4.1.1 Órganos linfoides primarios.....	29
1.4.1.2 Órganos linfoides secundarios.....	29
1.4.2 Señalización adrenérgica en células del sistema inmune involucradas en el control del cáncer de mama.....	30
1.4.2.1 Células NK.....	31
1.4.2.2 Macrófagos.....	31
1.4.2.3 Células dendríticas.....	33
1.4.2.4 Linfocitos T cooperadores.....	33

1.4.2.5	Linfocitos T citotóxicos.....	34
1.4.2.6	Linfocitos B.....	34
1.5	Cáncer de mama y su relación con el SNS.....	35
1.5.1	Innervación simpática tumoral.....	35
1.5.2	Señalización adrenérgica en células tumorales.....	36
1.6	La red neuroinmunoendócrina en el cáncer de mama.....	38
2.	Antecedentes.....	40
3.	Planteamiento del problema.....	40
4.	Hipótesis.....	41
5.	Objetivo general.....	41
5.1	Objetivos particulares.....	41
6.	Materiales y métodos.....	42
6.1	Animales de experimentación.....	42
6.2	Denervación.....	42
6.3	Inducción de tumores de glándula mamaria.....	43
6.3.1	Cultivo de línea celular 4T1.....	43
6.3.2	Cosecha de línea celular 4T1.....	44
6.3.3	Inoculación de línea celular 4T1.....	44
6.4	Obtención de muestras.....	44
6.4.1	Masas tumorales.....	45
6.4.2	Extracción del bazo.....	46
6.4.3	Ganglios linfáticos inguinales.....	46
6.5	Citometría de flujo.....	47
6.5.1	Tinción de superficie (linfocitos T y B) – bazo, ganglios linfáticos y tumor.....	47
6.5.2	Tinción intracelular (linfocitos T reguladores) – bazo, ganglios linfáticos y tumor.....	48
6.5.3	Bloqueo de receptores FC .....	48
6.5.4	Tinción de superficie (macrófagos y células NK).....	48
6.5.5	Selección de subpoblaciones.....	49
6.6	RT-PCR.....	51

6.6.1 Extracción de RNA.....	51
6.6.2 Cuantificación e integridad de RNA.....	51
6.6.3 Retrotranscripción.....	52
6.6.4 Cuantificación del gen control de referencia 18s.....	52
6.6.5 Cuantificación de citocinas.....	53
6.7 Análisis estadístico.....	54
7. Resultados.....	55
8. Discusión.....	66
9. Conclusiones.....	69
10. Perspectivas.....	70
11. Bibliografía.....	70

## LISTA DE FIGURAS

1.1 Control inmunológico del cáncer de mama, inmunovigilancia e inmunoescape.	20
1.2 Biosíntesis de catecolaminas.....	27
1.3 Interacción del sistema inmune con el sistema inmune – sistema nervioso simpático.....	28
1.4 Innervación simpática de masas tumorales.....	36
6.1 Diseño experimental.....	43
6.2 Diagrama de flujo.....	45
6.3 Selección de subpoblaciones celulares.....	49
6.3 Selección de macrófagos y células NK.....	50
7.1 Masas tumorales.....	56
7.2 Porcentaje de Linfocitos T CD3+ proveniente de linfocitos totales.....	57
7.3 Porcentaje de linfocitos T CD4+ proveniente de linfocitos T CD3+.....	58
7.4 Porcentaje de linfocitos T CD8+ proveniente de linfocitos T CD3+.....	59
7.5 Porcentaje de linfocitos T FoxP3+ proveniente de linfocitos T CD4+.....	60
7.6 Porcentaje de linfocitos B CD19+ proveniente de linfocitos totales.....	61
7.7 Porcentaje de macrófagos F4/80+ proveniente de células grandes complejas.....	62
7.8 Porcentaje de células NKp46+ proveniente de células pequeñas y complejas.	63
7.9 Expresión relativa de IFN- $\gamma$ .....	64
7.10 Expresión relativa de TNF- $\alpha$ .....	65
7.11 Expresión relativa de TGF- $\beta$ .....	65

## LISTA DE TABLAS

1.1 Expresión y función de los receptores $\beta$ -AR en células del sistema inmune.....	32
6.1 Anticuerpos utilizados para tinciones de citometría de flujo.....	47
6.2 Programa utilizado en el termociclador y reactivos utilizados para la retrotranscripción.....	52
6.3 Condiciones estandarizadas utilizadas en el termociclador para cada citocina y secuencia de oligonucleótidos empleados para las reacciones de PCR.....	53
6.4 Reactivos utilizados en las reacciones amplificación de 18s y citocinas.....	54
7.1. Peso y volumen promedio de masas tumorales.....	55

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**NK** Células asesinas naturales, del inglés Natural Killer

**SNA** Sistema Nervioso Autónomo

**SNS** Sistema Nervioso Simpático

**MHC** Complejo Principal de histocompatibilidad, del inglés Major Histocompatibility Complex

**MHC-I** Complejo Principal de histocompatibilidad clase I, del inglés Major Histocompatibility Complex class I

**MHC-II** Complejo Principal de histocompatibilidad clase II, del inglés Major Histocompatibility Complex class II

**IFN- $\gamma$**  Interferón gamma

**IL** Interleucina

**TNF- $\alpha$**  Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés Tumor Necrosis Factor

**TGF- $\beta$**  Factor de crecimiento tumoral beta, del inglés Tumor Growth Factor

**DC** Célula dendrítica, del inglés Dendritic Cell

**TAMs** Macrófagos asociados a tumores, del inglés Tumor Associated Macrophages

**VEGF** Factor de crecimiento vascular endotelial, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor

**CPAs** Célula presentadora de antígenos

**CTLs** Linfocitos T citotóxicos, del inglés Cytotoxic T lymphocytes

**Th** Linfocitos T cooperadores, del inglés T helper

**$\alpha$ -RA** Receptor adrenérgico alfa

**$\beta$ -RA** Receptor adrenérgico beta

**6-OHDA** 6-hidroxidopamina

## RESUMEN

Los nervios simpáticos inervan órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y secundarios (bazo y ganglios linfáticos). Por otra parte, algunas células del sistema inmune, como los linfocitos T, los linfocitos B, las células NK y los macrófagos, expresan receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos. Esta estimulación, regula el desarrollo celular, la supervivencia, la capacidad de proliferación, la circulación, el tráfico para la vigilancia inmunológica, el reclutamiento celular así como la expresión de quimiocinas y citocinas. Respecto a la interacción entre el cáncer y el sistema nervioso, se sabe que el sistema nervioso autónomo (SNA) regula la expresión de genes en tumores primarios y el microambiente tumoral. Sin embargo, se conoce poco del papel de la innervación simpática en la regulación de la respuesta inmunitaria al cáncer, particularmente del cáncer de mama. Nuestro laboratorio está interesado en definir el papel del sistema nervioso simpático sobre la respuesta del sistema inmune hacia tumores de la glándula mamaria. Para lo que se realizó denervación química específica del sistema nervioso simpático, que consiste en la eliminación de terminaciones nerviosas periféricas con una neurotoxina que actúa sobre neuronas noradrenérgicas. Lo anterior durante la etapa neonatal, y se determinó el efecto en la respuesta inmune antitumoral en la edad adulta. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias significativas en las subpoblaciones celulares ni en la producción de citocinas, así como tampoco en el tamaño, peso y volumen de las masas tumorales obtenidas independientemente del tratamiento. Concluimos que la denervación química simpática neonatal no tiene efecto en la respuesta inmune al cáncer de mama inducido experimentalmente en la edad adulta de ratones BALB/c.

## **ABSTRACT**

Sympathetic nerves innervate primary (bone marrow and thymus) and secondary (spleen and lymph nodes) lymphoid organs. Some immune cells, such as T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells and macrophages, express  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors. Their stimulation regulates cell development, survival, proliferation, circulation, traffic for immunological surveillance, cell recruitment, and chemokine and cytokines expression. In regard to cancer and nervous system interaction, it is known that the autonomic nervous system regulates gene expression in primary tumours and tumour microenvironment. However, little is known about the role of the sympathetic innervation in immune response towards a tumor, specifically breast cancer tumors. Our laboratory, is interested in defining the role of the sympathetic nervous system on the immune response against breast cancer tumors. Thus, we performed specific chemical sympathectomy, which consists of peripheral nerve endings elimination with a neurotoxin that acts on noradrenergic neurons during the neonatal stage. Moreover, the anti-tumor immune response in adulthood was determined. Results showed no significant differences in cellular populations, cytokine production nor tumour size, weight and volume regardless of treatment. We conclude that neonatal sympathetic denervation has no effect on the immune response against experimentally induced breast tumors in adulthood in BALB/c mice.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es la principal causa de cáncer en las mujeres y ocupa el segundo lugar en incidencia a nivel mundial. En 2012 se presentaron 1,7 millones de nuevos casos y 0.5 millones de muertes por cáncer según la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>1</sup>.

Se trata de un conjunto de enfermedades multifactoriales<sup>1,2</sup>, caracterizadas por alteraciones en la muerte y división celular<sup>3</sup> que desencadena la aparición, proliferación y diseminación incontrolada de células. Estas invaden tejidos circundantes y así forman masas tumorales, también puede haber invasión de tejidos distantes sanos mediante un proceso llamado metástasis (OMS 2017). Actualmente, la OMS reconoce más de 20 diferentes subtipos de cáncer de mama<sup>4</sup>. En la patogenia del cáncer de mama, los factores de riesgo más importantes son el sexo, las alteraciones genéticas, el ambiente, la edad y la obesidad<sup>5</sup>.

#### **1.1.1 Epidemiología en México**

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres, sólo después del cáncer cérvico-uterino<sup>6</sup>. En 2014, del total de casos diagnosticados de cáncer, el 19.4% correspondieron a cáncer de mama, mientras que en 2015, la incidencia fue de 14.8 casos nuevos por cada 100,000 personas y se presenta principalmente en mujeres de entre los 30 a 50 años con un pico entre los 45-49 años (INEGI, centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva, SSA).

#### **1.1.2 Generalidades del cáncer de mama**

Los tumores de glándula mamaria tienen poblaciones celulares heterogéneas<sup>5</sup>. El microambiente tumoral, está constituido por matriz extracelular (ECM) y células estromales (células endoteliales y células del sistema inmune, fibroblastos y

adipocitos). En el cáncer de mama, los fibroblastos se asocian a la progresión tumoral y a la resistencia terapéutica<sup>3</sup>.

El cáncer de mama se puede clasificar con base en sus características clínicas y expresión de marcadores<sup>7</sup>. Respecto a esta última clasificación, se encuentran los sarcomas y los carcinomas.

Los sarcomas son tumores de origen mesenquimatoso, que constituye parte del tejido conjuntivo. El más frecuente es el fibrosarcoma, de crecimiento rápido y de mal pronóstico, ya que es altamente invasivo y metastásico. Este tipo de cáncer, solamente representa el 1% de todos los casos de tumores de mama malignos<sup>6</sup>.

Los carcinomas provienen de células epiteliales, y se clasifican en dos tipos de cáncer: el carcinoma ductal y el carcinoma lobular<sup>7</sup>, y se caracterizan por ser lesiones peri-invasivas, que se encuentran en el árbol ductal-lobular de la glándula mamaria, mientras que la membrana basal de los conductos y los lóbulos se encuentran intactas, siempre y cuando no haya invasión de células cancerosas<sup>1</sup>. Si se trata de un carcinoma localizado, se le denomina carcinoma *in situ*; mientras que, si se encuentra diseminado, se le considera carcinoma infiltrante<sup>6</sup>.

Una particularidad de los tumores de glándula mamaria, es que sufren un proceso llamado Transición epitelio mesenquimal (EMT), se define por la pérdida de características epiteliales y adquisición de un fenotipo mesenquimal, a través de la disrupción de las uniones intracelulares y la pérdida del contacto célula-célula. Esto se asocia con agresividad invasividad y metástasis<sup>8,9</sup>.

## **1.2 Control inmunológico del cáncer de mama**

El microambiente tumoral, es una compleja red de distintos tipos celulares<sup>10</sup>, incluidas las células de sistema inmune<sup>11</sup> las cuales ejercen su acción protectora anti-tumoral. Sin embargo, las masas tumorales pueden generar mecanismos de evasión del sistema inmune que favorecen su proliferación, crecimiento, invasividad y metástasis. A continuación, detallaré las células del sistema inmunitario involucradas en el control de tumores mamarios.

### 1.2.1 Células asesinas naturales

Las células asesinas naturales (NK), reconocen y controlan a las células tumorales<sup>12,13</sup> sin necesidad de contacto previo. Forman parte del sistema inmune innato, que se caracteriza por su reconocimiento inespecífico con restricción de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II)<sup>11</sup>.

Estas células, reconocen a las moléculas del MHC clase I y clase II a través de sus receptores de inhibición y de activación. Las células tumorales activan a las células NK de distintas formas: 1) reducen la expresión de las moléculas del MHC-I; 2) por repertorio incompleto de estas moléculas en la superficie membranal<sup>11</sup>; y 3) expresión de señales de estrés a través de las moléculas del MHC-I no presentes en células normales<sup>14</sup>. Las células NK, en el contexto de la respuesta inmune antitumoral, tienen dos funciones: 1) eliminación de las células tumorales mediante citotoxicidad; y 2) activación de otras poblaciones inmunes como las células dendríticas, linfocitos y otras células NK. La función citotóxica de las células NK, ocurre a través de distintos mecanismos, como la activación de receptores de muerte en las células tumorales (FasL) y la secreción de perforinas y granzimas<sup>15</sup> que inducen la formación de cuerpos apoptóticos que las células dendríticas fagocitaran (Figura 1.1).

Por otro lado, las células NK también participan en la maduración y migración de las células dendríticas (CD), lo que lleva al aumento en la presentación de antígenos a los linfocitos T<sup>16</sup>.

Adicionalmente las células NK, producen citocinas (Figura 1.1) de manera controlada que potencian sus propios mecanismos citotóxicos, los cuales controlan la progresión tumoral<sup>15</sup>. Las citocinas producidas por las células NK son principalmente interleucina 2 (IL-2), interleucina 8 (IL-8), factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>15</sup> que modulan la actividad de los linfocitos T, a las propias células NK y a las células dendríticas<sup>11</sup>.

### 1.2.2 Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígenos profesionales (CPA)<sup>17</sup> que comunican al sistema inmune innato con el sistema inmune adaptativo. Presentan antígenos a los linfocitos T y B para su posterior activación mediante la producción de citocinas<sup>18</sup>. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la presentación de antígenos, inicia mediante distintas vías: 1) la clásica, a través de las moléculas del MHC-I y MHC-II y 2) la no clásica, por medio de las moléculas CD1<sup>11</sup> que regulan la respuesta inmune adaptativa<sup>19</sup>.

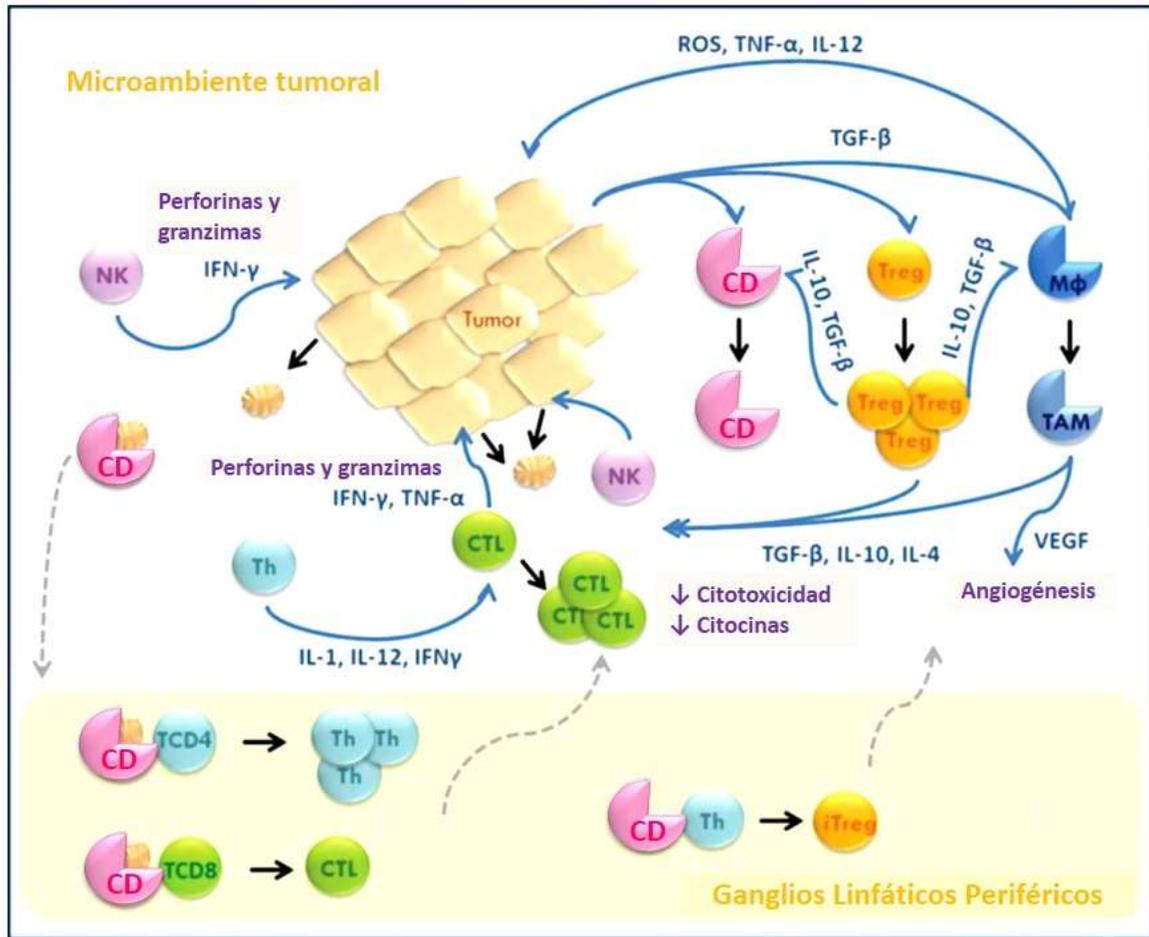
La activación de las CDs comienza por señales inflamatorias o por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)<sup>11</sup>, producidas por las células tumorales y los cuerpos apoptóticos, generados por la acción citotóxica de las células NK; este ambiente pro-inflamatorio favorece la maduración de las CDs<sup>16</sup>. Posteriormente, las CDs migran a los ganglios linfáticos periféricos, procesan y presentan antígenos tumorales específicos a los linfocitos T<sup>12,16</sup> ya sea mediante las moléculas MHC-II, que activan a los linfocitos T cooperadores; o a través de las moléculas del MHC-I, para los linfocitos T citotóxicos (Figura 1.1)<sup>20</sup>.

Por otro lado, las CDs también producen citocinas, tales como la IL-2, la IL-12, y la IL-15, que activan y promueven la proliferación y la función efectora de las células NK, los linfocitos T y los linfocitos B (Figura 1.1); que a su vez, potencian la respuesta inmune innata y adaptativa. Adicionalmente, estas células expresan moléculas de co-estimulación para los linfocitos T, tales como el CD80/86, el CD28, y el CD40, que promueven la maduración de las propias CDs y a la activación de los linfocitos T<sup>11</sup>.

### 1.2.3 Macrófagos (Mφ)

Los macrófagos son células que residen en todos los tejidos del organismo, a donde participan en la homeostasis del organismo. Son células fagocíticas que expresan en su membrana receptores para Fcγ, que se unen a la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG), que promueven la fagocitosis<sup>21</sup>. Además, son la primera

línea de defensa contra agentes patógenos<sup>22</sup>. Los macrófagos, comunican al sistema inmune innato con el sistema inmune adaptativo y se consideran CPAs profesionales<sup>12</sup>.



**Figura 1.1 Control inmunológico del cáncer de mama, inmunovigilancia e inmunoescape.** Las células NK reconocen a las células tumorales y ejercen su acción citotóxica a través de perforinas y granzimas que generan cuerpos apoptóticos y producen citocinas proinflamatorias como IFN-γ. Las células dendríticas fagocitan a los cuerpos apoptóticos y migran a los ganglios linfáticos cercanos al sitio del tumor, ahí presentan antígenos a los linfocitos T cooperadores y a los linfocitos T citotóxicos que se dirigen al sitio del tumor para ejercer su acción antitumoral. Por otro lado, las células tumorales producen citocinas antiinflamatorias como TGF-β, lo que genera CD anérgicas, inducción del fenotipo regulador de los linfocitos T y polarización de macrófagos hacia TAMs, que producen más TGF-β, IL-10 e IL-4 lo que favorece un microambiente protumoral. NK: células asesinas naturales, CD: células dendríticas, TCD4: linfocitos T CD4+, TCD8: linfocitos T CD8+, Th: linfocitos T cooperadores, CTL:

linfocitos T citotóxicos, iTreg: linfocitos T reguladores inducidos, TAM: macrófagos asociados a tumores, M $\phi$ : macrófagos, Perf: perforinas, Granz: granzimas, IFN- $\gamma$ : interferón gamma, TGF- $\beta$ : factor de crecimiento tumoral, TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, ROS: especies reactivas de oxígeno, IL: interleucina, PLN: ganglios linfáticos periféricos (del inglés peripheral lymph nodes). Modificada de Nava-Castro et al 2014<sup>12</sup>.

Como ya se mencionó con anterioridad, las células tumorales se encuentran desreguladas<sup>23</sup> y presentan características de estrés como hipoxia y muerte celular<sup>23</sup>. Ambos procesos alteran la homeostasis del tejido donde se presentan. Los macrófagos reconocen y fagocitan a los cuerpos apoptóticos<sup>12</sup> y posteriormente migran hacia los ganglios linfáticos cercanos donde maduran y presentan los antígenos tumorales específicos a los linfocitos T cooperadores para activar su función efectora anti-tumoral (Figura 1.1).

Adicionalmente, los macrófagos son células productoras de citocinas. Sin embargo, esta característica se encuentra polarizada por el tipo de estímulo que los activa<sup>22</sup>: la activación clásica o M1 y la activación alternativa o M2. Los macrófagos M1 se estimulan con citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  o por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o señales de daño endógenas; estos macrófagos M1 producen citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ ; mientras que los M2 se activan por citocinas del tipo Th2 como IL-4 e IL-13 lo que promueve la síntesis de citocinas antiinflamatorias como IL-10<sup>12,22,24</sup>.

#### 1.2.4 Linfocitos T

Los linfocitos T son células de sistema inmune adaptativo<sup>11</sup> que se activan por las CPAs profesionales<sup>20</sup>. Estos linfocitos se clasifican, principalmente, en dos grandes categorías: a) los linfocitos T CD4+ o linfocitos T cooperadores (Th) y b) los linfocitos T CD8+ o linfocitos T citotóxicos<sup>11</sup> (CTL). Los linfocitos Th se activan por el reconocimiento de antígenos presentados por las CPAs a través de las moléculas del MHC-II, mientras que los CTL reconocen antígenos expresados en las moléculas del MHC-I<sup>20</sup>. Cabe mencionar que los CTL dependen de la actividad de los linfocitos Th

para ejercer su función efectora<sup>11</sup>. Los linfocitos forman parte de las células inmunes que se encuentran en los infiltrados tumorales y son de gran importancia en el control inmunológico del cáncer<sup>25</sup>.

#### 1.2.4.1 Linfocitos T cooperadores

Como ya se mencionó, los linfocitos T cooperadores se activan por las células dendríticas (Figura 1.1), esta activación se lleva a cabo en los ganglios linfáticos, donde residen los linfocitos T, cercanos al sitio del tumor. La principal función efectora de estos linfocitos es la producción de citocinas (Figura 1.1), las cuales ayudarán a otros tipos celulares a activarse. Actualmente, se conocen principalmente tres tipos de linfocitos T cooperadores (Th1, Th2 y Th17)<sup>12</sup>; sin embargo se conocen también los linfocitos Th9<sup>26</sup> y Tfh<sup>27</sup>.

- 1) Linfocitos Th1: producen principalmente TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-12, este subtipo celular ejerce citotoxicidad en las células tumorales e induce inmunidad mediada por células<sup>28</sup>. También recluta a los CTL, células NK y a macrófagos tipo 1 al sitio del tumor<sup>26</sup>.
- 2) Linfocitos Th2: producen principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estos linfocitos tienen poca capacidad antitumoral, respecto a los Th1. Sin embargo, su acción frente a células tumorales es mediante la inducción de necrosis tumoral<sup>28</sup>.
- 3) Linfocitos Th17: producen principalmente IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22 y TNF- $\alpha$ <sup>12</sup>. Reclutan DC y activa a los CTL específicos antitumorales<sup>26</sup>. Sin embargo, tienen un efecto dependiente de la estimulación a la cual estén sometidas como las citocinas o el tipo de tumor<sup>29</sup>, es decir, en el microambiente donde se encuentren.
- 4) Linfocitos Th9: promueven la supervivencia y reclutamiento de las DC en el tumor, promueven la diferenciación de los CTL<sup>26</sup>.
- 5) Linfocitos Tfh: están asociados a la producción de CXCL13, también podrían estar involucrados en la generación de células de memoria<sup>27</sup>.

#### 1.2.4.2 Linfocitos T citotóxicos

Particularmente, en el cáncer de mama, la presencia de estos linfocitos en los infiltrados tumorales se asocian con un mejor pronóstico y supervivencia<sup>25,30,31</sup>.

Al igual que los linfocitos Th, los CTL requieren la activación por medio de las células dendríticas, vía presentación cruzada, que se caracteriza por la presentación de antígenos tumorales por medio de las moléculas del MHC-I. Se consideran de suma importancia en la inmunidad adaptativa antitumoral<sup>30</sup> ya que reconocen antígenos tumorales específicos presentes en las células cancerosas<sup>31</sup>.

Los linfocitos citotóxicos efectores, después de activarse, migran al sitio de tumor donde llevan a cabo su actividad citotóxica y producen citocinas (figura 1.1), principalmente IFN- $\gamma$ , que inhibe el ciclo celular, la apoptosis y la inducción de la actividad antitumoral de los macrófagos<sup>30</sup>, al igual que las células NK, los CTL inducen apoptosis a través de la acción de perforinas y granzimas<sup>31</sup>.

#### 1.2.5 Linfocitos B

Los linfocitos B son células inmunes adaptativas, que diferenciadas hacia células plasmáticas, se encargan de la producción de anticuerpos, reconocen antígenos a través del receptor de linfocitos B (BCR) que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (Igs), es decir, son Igs de membrana de tipo IgM<sup>32</sup>. Los linfocitos B también actúan como CPAs que producen citocinas y expresan moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e ICOS que activan a los CTLs y los linfocitos Th<sup>12</sup>. La activación de los linfocitos B promueve la liberación de citocinas que favorecen el reclutamiento de las células inmunes innatas para eliminar a las células dañadas<sup>33</sup>.

En la inmunopatología del cáncer, los linfocitos B participan en la producción de anticuerpos contra antígenos tumorales, los cuales se consideran autoantígenos<sup>11</sup>. Los anticuerpos reconocen al antígeno presente en la superficie de célula tumoral y a través de mecanismos como citotoxicidad dependiente de anticuerpo o activación del complemento, eliminan dichas células<sup>34</sup>.

### 1.3 Inmunovigilancia – inmunoedición – inmunoescape

En el control inmunológico del cáncer, existen mecanismos que controlan la progresión de los tumores mediante la inmunidad innata y adaptativa, que generan células con funciones efectoras específicas contra las células tumorales, mediante un proceso denominado inmunovigilancia, descrito anteriormente (sección 1.2).

Sin embargo, durante este proceso, se lleva a cabo la edición y selección de estos antígenos tumorales, lo que provoca la disminución de antigenicidad de las células cancerosas y disminución de la respuesta inmune. Este mecanismo se conoce como inmunoedición o inmunoselección, y provoca que las células tumorales adquieran mecanismos de evasión de la respuesta inmune y, finalmente, escapen a la acción de las células inmunes, generan progresión, proliferación y finalmente metástasis; este proceso se conoce como inmunoescape<sup>16</sup>.

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune se generan en diversos tipos celulares, como las células NK, las CD, los macrófagos, los linfocitos Th, los CTLs. Además, las células tumorales producen citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF- $\beta$ , que modulan la respuesta inmune, disminuyéndola. Esto a su vez, promueve un ambiente pro-tumoral (Figura 1.1), caracterizado, por la presencia de citocinas y otros factores solubles que favorecen el crecimiento del tumor. Adicionalmente, sintetizan otros factores solubles como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), prostaglandina E<sub>2</sub>, Fas y FasL, entre otras<sup>16</sup>.

A continuación se resumen los mecanismos de evasión más importantes (revisado en Zitvogel et al 2006, Rabinovich et al 2007, Kim et al 2007, Vinay et al 2015, Grabrilovich et al 2014 <sup>16,35-38</sup>):

- I) Las células tumorales disminuyen su antigenicidad, por la regulación a la baja de la maquinaria de procesamiento de antígenos que afecta a las moléculas del MHC-I<sup>37</sup>, así como la capacidad de señalización por factores solubles como el IFN- $\gamma$ . Además, en la inmunomodulación, las células tumorales expresan B7-H1, una molécula tipo inmunoglobulina que se

expresa en células cancerosas<sup>39</sup>; que genera apoptosis en los linfocitos T<sup>40</sup>.

- II) Los factores solubles producidos por el tumor generan el reclutamiento de células mieloides supresoras (CMS) de tumores e impiden su diferenciación hacia células dendríticas. Además las CMS inhiben la función efectora anti-tumoral de los linfocitos T y favorecen la anergia<sup>36,38</sup>. Por otro lado, las CDS plasmacitoides (CDp), promueven la diferenciación de los linfocitos T vírgenes, CD4+ y CD8+, hacia un fenotipo Th2<sup>35</sup>. Otro factor soluble que favorece el microambiente tumoral es el VEGF, el cual recluta células mieloides inmaduras como macrófagos<sup>41</sup> y células dendríticas inmaduras (CDi)<sup>16</sup>.
- III) Los TAMs promueven la angiogénesis, inmunosupresión, invasión y metástasis, es decir, se vuelven pro-tumorales. Tienen un fenotipo parecido a M2 que secretan factores solubles como VEGF, que permiten la vascularización de los tumores<sup>22</sup>. También sintetizan IL-1, TNF- $\alpha$ , e IL-6. que incrementan las metástasis<sup>42</sup>. Además, promueven la extravasación, supervivencia y crecimiento de las células tumorales durante los procesos metastásicos<sup>43</sup>.
- IV) Los linfocitos T reguladores, son de suma importancia en la regulación de la respuesta inmune. Particularmente, se han asociado a disminución de la respuesta inmune en contra de los tumores, y favorecen un microambiente pro-tumoral por la producción de factores solubles anti-inflamatorios. Estos se encuentran en la circulación, y dentro del microambiente tumoral, donde se reclutan por acción de la quimiocina CCL-22. La producción de moléculas de inhibición por parte de los linfocitos T reguladores, como CTLA4, generan el factor indolamina 2,3-dioxygenasa (IDO) que disminuye el triptófano y producen finalmente, la muerte y disminución de las células T<sup>35,36</sup>.
- V) La estimulación prolongada de los linfocitos T vírgenes por parte de las CD inmaduras, induce el desarrollo de un fenotipo anérgico en las células T. Por otro lado, los linfocitos T, al ser estimulados con TGF- $\beta$  (producido por

las células tumorales y otros tipos celulares) promueve la inducción hacia un fenotipo regulador<sup>37</sup>.

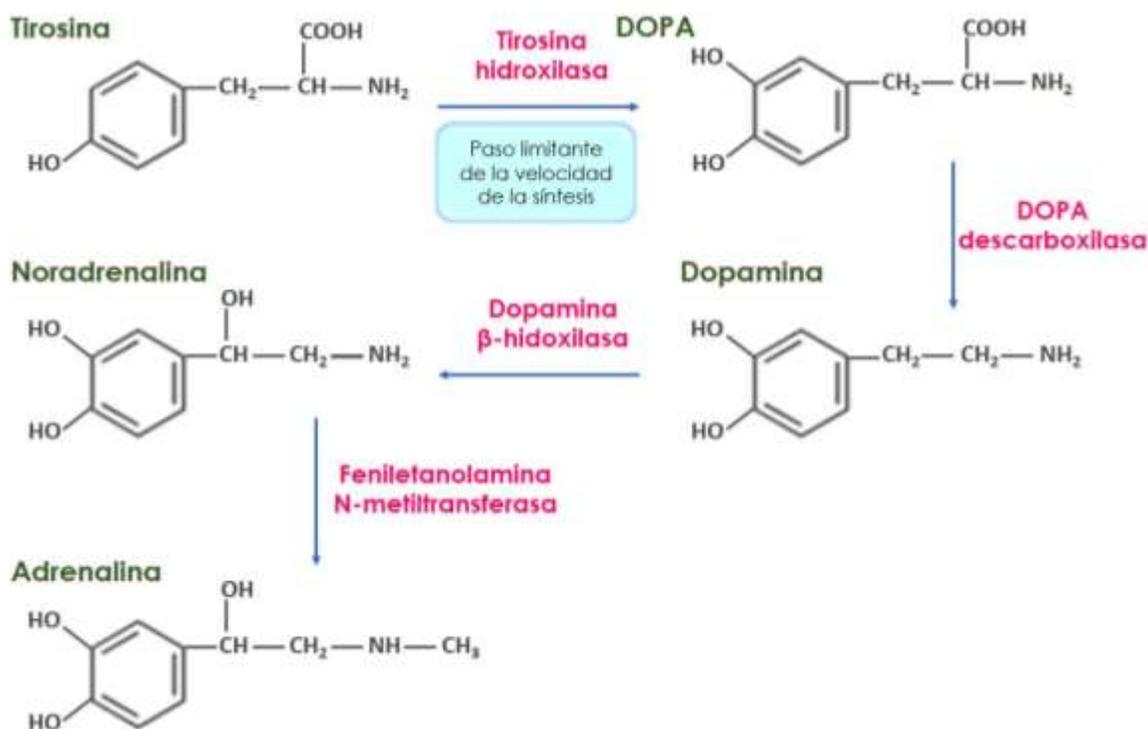
- VI) Los linfocitos T citotóxicos específicos, sufren deterioro funcional por la producción de citocinas anti-inflamatorias por parte de las células tumorales como TGF- $\beta$ <sup>35,36</sup>, que se caracteriza por la falta de actividad citotóxica así como tolerancia hacia los tumores<sup>36</sup>.
- VII) Las células NKT (células NK de origen linfoide) expresan el receptor de los linfocitos T (TCR). Estas células, sintetizan a la IL-13, que suprime a los CTLs y además activan a las CMS que sintetizan TGF- $\beta$ , que a su vez suprime de igual manera a los CTL<sup>38</sup>.
- VIII) Dentro de los factores solubles, el VEGF promueve la angiogénesis, linfoangiogénesis, migración e invasión<sup>44</sup>. Otro factor soluble que promueve la progresión y diseminación del cáncer de mama, es el TGF- $\beta$ , debido a que induce la transición epitelio mesenquimal tipo III que se caracteriza por ser un fenotipo invasivo<sup>44</sup>.

#### **1.4 Sistema nervioso simpático y sistema inmune**

El sistema nervioso simpático (SNS) es una de las tres subdivisiones anatómicas del sistema nervioso autónomo (SNA). Se encarga de las respuestas de estrés inmediato (lucha o huida) en caso de que el organismo detecte situaciones de peligro.

La noradrenalina (NA), junto con la adrenalina (A), también llamadas norepinefrina (NE) y epinefrina (E) respectivamente, son los principales mediadores de las neuronas del SNS, y conjuntamente con la dopamina se les conoce como catecolaminas. Se derivan del aminoácido L-tirosina (figura 1.2)<sup>45</sup>. Las catecolaminas, tienen un grupo catecol, es decir, un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo adyacentes, y una cadena lateral amino (Figura 1.2)<sup>46</sup>. La noradrenalina y la adrenalina, ejercen su efecto a través de la unión a los receptores adrenérgicos. Existen dos tipos de receptores adrenérgicos, los alfa-adrenérgicos ( $\alpha$ -AR) y los beta adrenérgicos ( $\beta$ -AR), que están acoplados a las proteínas G típicas. Se sabe que el

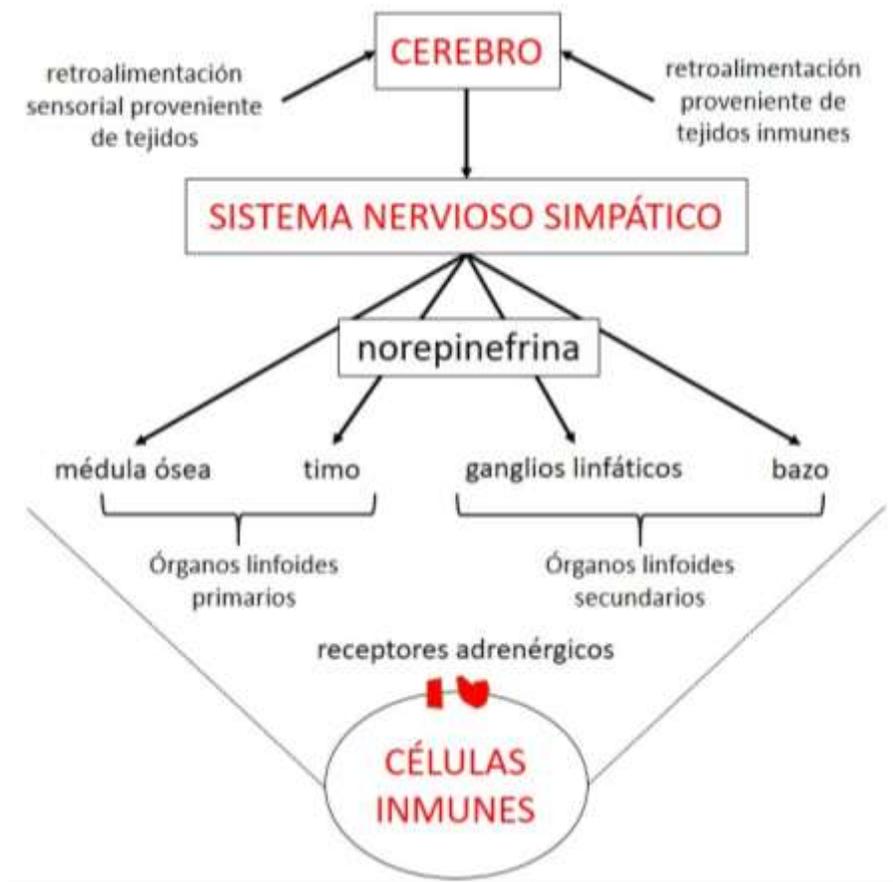
receptor  $\alpha$ -AR, consta de dos subtipos de receptores ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ). Mientras que el  $\beta$ -AR, tiene tres subtipos de receptores ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ )<sup>45</sup>. Estos receptores se distribuyen ampliamente en el organismo. Algunos de los órganos inervados por el SNS son los del sistema inmune<sup>47,48</sup>. De igual manera, las células encargadas de la vigilancia y protección inmunológica, expresan en su membrana receptores del sistema adrenérgico, en su mayoría del tipo  $\beta_2$ <sup>47</sup>.



**Figura 1.2 Biosíntesis de las catecolaminas.** La enzima tirosina hidroxilasa (paso limitante en la síntesis de catecolaminas) cataliza la reacción de L-tirosina a DOPA adicionando un grupo -OH, posteriormente esta es convertida en dopamina por acción de la enzima DOPA descarboxilasa, que elimina el ácido carboxílico. Una vez formada la dopamina, la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa la transforma en noradrenalina, por adición de un grupo -OH. Finalmente la conversión de noradrenalina en adrenalina, se da por la adición de un grupo metilo por acción de la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa. Modificado de Rang et al 2008<sup>46</sup>.

### 1.4.1 Innervación simpática del sistema inmune

Se sabe que los nervios simpáticos inervan órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y secundarios (bazo y nódulos linfáticos) (Figura 1.3). Estos nervios liberan noradrenalina, y dentro del microambiente modulan la funcionalidad de las células del sistema inmune (Figura 1.3)<sup>48,49</sup>.



**Figura 1.3 Interacción sistema inmune – sistema nervioso simpático.** El sistema nervioso simpático inerva los órganos linfoides, se estimula por el sistema nervioso central, ejerce su función sobre tejidos linfoides primarios y secundarios y finalmente sobre las células del sistema inmune que expresan receptores ya sea  $\alpha$ -AR o  $\beta$ -AR. Modificado de Jänig 2014<sup>50</sup>.

#### 1.4.1.1 Órganos linfoides primarios

Dentro de la médula ósea se lleva a cabo la hematopoyesis, regulada por la señalización nerviosa. La médula ósea está inervada por el SNS, las fibras simpáticas eferentes ingresan a los huesos largos a través de los vasos sanguíneos en los canales de Haversian y Volkmann, que se distribuyen en la médula ósea, y se encuentran en estrecha interacción con las células del estroma y las células hematopoyéticas<sup>48,51,52</sup>. Las células hematopoyéticas a su vez, expresan en su mayoría receptores del tipo  $\beta_2$ -adrenérgico<sup>47</sup>. En el microambiente de la médula ósea, la innervación simpática, regula que las células madre hematopoyéticas se auto-renuevan: tamaño del repertorio celular, la diferenciación, así como el ingreso y egreso de las células sanguíneas maduras<sup>47</sup>.

Por otro lado, el timo es el órgano donde se lleva a cabo la diferenciación y maduración de los linfocitos T. Este órgano se encuentra ampliamente inervado por el SNS, los nervios simpáticos ingresan al timo, junto con los vasos sanguíneos, como plexos nerviosos densos. Los cuales se dirigen, en menor densidad, hacia la corteza externa e interna del timo donde interactúan con las células del estroma<sup>52,53</sup>. En el timo, el SNS regula algunos procesos importantes como: el ingreso de las células madre hematopoyéticas progenitoras, la proliferación y la maduración de timocitos, el re-arreglo del receptor de linfocitos T y la selección positiva y negativa de los mismos linfocitos T<sup>47</sup>.

#### 1.4.1.2 Órganos linfoides secundarios

El bazo se encuentra inervado simpáticamente en un 98%<sup>54</sup>. Esta innervación, se desarrolla de manera posnatal. Ingresas a través del plexo peri-vascular junto con la arteria esplénica y llega hasta la pulpa blanca<sup>48,53</sup>. Las zonas marginales y para-foliculares, también presentan innervación simpática. De igual manera, las fibras simpáticas inervan a la pulpa roja<sup>52</sup>.

Respecto a los ganglios linfáticos, la innervación simpática, al igual que en el bazo, ingresa a través los vasos sanguíneos y linfáticos hacia las regiones corticales

y paracorticales<sup>48</sup>. Sin embargo, el origen de los nervios simpáticos que los inervan no se ha estudiado ampliamente, es probable que exista una inervación regional. Los nervios simpáticos ingresan a los ganglios, junto con los vasos sanguíneos, en el hilus y terminan como plexos sub-capsulares o peri-vasculares en los cordones medulares, mientras que en la zona medular, las fibras nerviosas se asocian a los vasos sanguíneos y linfáticos e ingresan a regiones para-corticales; las cuales llegan hasta regiones ricas en linfocitos T pero no a las regiones donde residen los linfocitos B<sup>52,53</sup>. Por otro lado, se consideraba al sistema nervioso central, como un sistema que carecía de vasos linfáticos; sin embargo, Louveau et al reportaron la presencia de vasos linfáticos funcionales en los senos duros dentro del sistema nervioso central<sup>55</sup>.

#### 1.4.2 Señalización adrenérgica en las células del sistema inmune involucradas en el control del cáncer de mama

Algunas células del sistema inmune, como los linfocitos T, los linfocitos B, las células NK y los macrófagos, expresan receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos (mediante los cuales ejercen su efecto la adrenalina y la noradrenalina). La estimulación de los receptores adrenérgicos en las células del sistema inmune, regula el desarrollo celular, supervivencia, capacidad de proliferación, circulación, el tráfico para la vigilancia inmunológica y el reclutamiento. Además, dirige la expresión de moléculas de superficie y la síntesis de citocinas, quimiocinas y enzimas involucradas en la síntesis de prostaglandinas<sup>47</sup>.

La innervación de órganos linfoides secundarios modula la respuesta inmune, regula a la baja, la migración de linfocitos hacia los tejidos y modifica la capacidad de respuesta de los receptores quimioatrayentes<sup>56</sup>, así como la disminución de interferón tipo 1 (Tabla 1.1)<sup>57</sup> y favorece la inmunidad humoral a través de la transcripción de citocinas de los tipos Th2 y Th17 (Tabla 1.1)<sup>57</sup>. Sin embargo, la señalización  $\beta$ -adrenérgica suprime la acción citotóxica de los linfocitos T y de las células NK y la función de las células dendríticas<sup>58,59</sup>.

#### 1.4.2.1 Las células NK

Las células NK expresan receptores adrenérgicos del tipo  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_2$ . La estimulación de estos receptores, modifica su funcionalidad. Respecto a la activación de los receptores  $\beta_2$ , se han asociado al incremento de AMPc intracelular<sup>52</sup>. También, se ha reportado que la señalización de este receptor, disminuye la citotoxicidad y la adhesión a células endoteliales (Tabla 1.1)<sup>60,61</sup>. La activación de las células NK a través de sus receptores adrenérgicos (específicamente del tipo  $\beta$ ), produce efectos que dependen del tipo de activación, ya sea aguda o crónica: la activación aguda aumenta la presencia de las células NK en el torrente sanguíneo, mientras que la activación crónica disminuye su presencia, así como su capacidad citotóxica y la síntesis de citocinas (Tabla 1.1)<sup>47</sup>. Por otro lado, la señalización del tipo  $\alpha$ -AR incrementa la citotoxicidad a través de las vías PLC y PKA<sup>62</sup>.

#### 1.4.2.2 Macrófagos

Los macrófagos expresan receptores adrenérgicos del tipo  $\alpha_2$  y  $\beta_2$ <sup>52</sup>. La estimulación de los receptores  $\beta_2$ , incrementa la concentración del AMPc, así como la inhibición de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ <sup>63</sup>. Esta activación, disminuye la producción de IL-12 (Tabla 1.1)<sup>47</sup>. En este sentido, la activación de los receptores  $\beta_2$ , suprime la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  mediada por LPS (Tabla 1.1). Sin embargo, en ausencia de un estímulo pro-inflamatorio, la síntesis de IL-1 $\beta$  e IL-6 aumenta por acción de los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos<sup>64</sup>. Por otro lado, la activación de los receptores  $\alpha$ -AR, aumenta la actividad de los macrófagos (la quimiotaxis, la fagocitosis<sup>65</sup> y la síntesis de TNF- $\alpha$ ). En general, la señalización a través de este receptor, potencia las funciones efectoras de los macrófagos (Tabla 1.1).

Tipo celular	Función	
	$\alpha_1$ -AR	$\beta_2$ -AR
<b>Sistema inmune innato</b>		
<b>Células NK</b>	↑ Citotoxicidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Liberación al torrente sanguíneo relacionada con antígeno o estrés agudo</li> <li>↓ Liberación al torrente sanguíneo relacionada con estrés crónico</li> <li>↓ Sensibilidad para eliminar células tumorales</li> <li>↓ Capacidad para matar células infectadas con virus</li> <li>↓ Producción de perforinas, granzimas, IL-12, IFN-<math>\gamma</math> e IFN-<math>\alpha</math></li> </ul>
<b>Sistema inmune adaptativo</b>		
<b>Macrófagos y Células dendríticas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Quimiotaxis</li> <li>↑ Procesamiento y presentación de antígenos</li> <li>↑ Maduración y migración a ganglios linfáticos</li> <li>↑ Fagocitosis</li> <li>↑ Secreción de citocinas proinflamatorias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Producción de IFN-<math>\gamma</math></li> <li>↑ Producción de IL-10 mediada por LPS</li> <li>↓ Producción de TNF-<math>\alpha</math> e IL-12 e IL-6 mediada por LPS</li> <li>↓ Producción de moléculas de superficie: I-Cam, CD40 y CD14 mediada por LPS</li> </ul>
<b>Linfocitos Th0</b>	---	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Diferenciación hacia Th2</li> <li>↓ Diferenciación hacia Th1</li> </ul>
<b>Linfocitos Th1</b>	---	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Producción de INF-<math>\gamma</math></li> <li>↓ Producción de IL-12</li> </ul>
<b>Linfocitos Th 2</b>	---	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Inmunidad humoral*</li> <li>↑ Producción de IL-10*</li> <li>↓ Diferenciación hacia Th1*</li> </ul>
<b>Linfocitos Th 17</b>	---	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Producción de IL-17A</li> </ul>
<b>Linfocitos T reguladores</b>	---	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Producción de TGF-<math>\beta</math> e IL-10</li> </ul>
<b>Linfocitos T citotóxicos</b>	---	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Citotoxicidad</li> <li>↓ Desarrollo de CTL de memoria</li> <li>↓ Producción de TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>
<b>Linfocitos B</b>	---	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Diferenciación hacia células plasmáticas</li> <li>↑ Inmunidad humoral</li> </ul>

**Tabla 1.1 Expresión y función de los receptores  $\beta$ -AR en las células del sistema inmune.** Las células de sistema inmune expresan receptores del sistema adrenérgico, en su mayoría del tipo  $\beta_2$ . Se muestran los efectos que tiene la activación de los receptores. La flecha hacia arriba ( $\uparrow$ ) indica un efecto positivo mientras que la flecha hacia abajo ( $\downarrow$ ) muestra un efecto negativo. (\*) Efecto indirecto ya que no se expresa el receptor en los linfocitos Th2<sup>66</sup>. Datos tomados de Bellinger y Lorton 2014, Elenkov et al 2000 y Marino y Consentino 2013<sup>47,53,67</sup>.

#### 1.4.2.3 Células dendríticas

La actividad de las células dendríticas, se modula por: la acción de los receptores adrenérgicos y por la activación con sus agonistas endógenos, como la noradrenalina<sup>68</sup>. De la misma manera que en los macrófagos, la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos disminuye la liberación de citocinas pro-inflamatorias por parte de las células dendríticas<sup>69</sup>. La activación de estos receptores, produce una disminución de la funcionalidad de las CDs (Tabla 1.1). Una función efectora importante que disminuye, es la presentación cruzada: se ha observado que la activación, específicamente del receptor  $\beta_2$ , disminuye la capacidad de las CDs de presentar antígenos a los linfocitos T citotóxicos a través de las moléculas de MHC-I, esto se debe a la degradación fagosómica de los antígenos<sup>70</sup>. Por otro lado, la señalización del  $\alpha_2$ -AR promueve la capacidad de fagocitar antígenos en las CD<sup>68</sup>, es decir, la activación del receptor adrenérgico  $\beta_2$  podría promover la función efectora de este subtipo celular.

#### 1.4.2.4 Linfocitos T cooperadores

Los linfocitos T cooperadores se diferencian principalmente en dos tipos: Th1 y Th2, dependiendo del tipo del microambiente en el que se encuentren. Actualmente se sabe que, los linfocitos T expresan receptores del sistema adrenérgico, especialmente del tipo  $\beta_2$ <sup>71,72</sup>. Específicamente, los linfocitos Th1 expresan receptores del sistema adrenérgico<sup>66</sup>. La activación de estos receptores en los linfocitos Th1, genera la acumulación de AMPc lo que disminuye la capacidad de proliferación<sup>72</sup> e inhibe la producción de IL-12, IL-3 e IFN- $\gamma$  en los linfocitos T (Tabla

1.1)<sup>73,74</sup>. También se ha observado que la señalización  $\beta_2$ -adrenérgica, disminuye el tráfico de los linfocitos T de los ganglios linfáticos, y por lo tanto, su reclutamiento en los sitios blanco<sup>56</sup>.

Respecto a los linfocitos Th2, estos no expresan receptores del sistema adrenérgico<sup>66</sup>. No obstante, se observan efectos en la síntesis de citocinas Th2, es decir, el receptor  $\beta$ -adrenérgico, a través de otras células del sistema inmune, como las células dendríticas, induce la síntesis de citocinas en los linfocitos Th2. Adicionalmente, la señalización adrenérgica en los linfocitos T vírgenes, promueve la diferenciación hacia un perfil Th2, mientras que suprime a los linfocitos Th1<sup>74</sup>.

#### 1.4.2.5 Linfocitos T citotóxicos

De la misma manera que los linfocitos T cooperadores, los linfocitos T citotóxicos expresan receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Los CTL de memoria expresan en mayor número este receptor, en comparación con los CTL vírgenes<sup>75</sup>. La señalización adrenérgica en estos linfocitos se asocia con una disminución en la actividad citotóxica<sup>76</sup>, así como una baja diferenciación hacia linfocitos T citotóxicos de memoria<sup>47</sup> en ratones. Sin embargo, en humanos, los resultados obtenidos muestran que el incremento de noradrenalina produce aumento en el número de linfocitos T citotóxicos, lo cual se revierte al administrar un antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos<sup>77</sup>.

#### 1.4.2.6 Linfocitos B

Los linfocitos B expresan en su superficie celular receptores  $\beta$  adrenérgicos. La señalización de este receptor, genera la acumulación intracelular del AMPc, pero no se pueden generalizar los efectos de esta acumulación sobre los linfocitos B, ya que su activación depende del tipo de estímulo<sup>72</sup>. Asimismo, se ha observado que esta señalización incrementa la síntesis de anticuerpos<sup>77</sup> (Tabla 1.1). Por otro lado, la expresión de moléculas co-estimuladoras, se regula positivamente por la acción de los receptores adrenérgicos en los linfocitos B<sup>47,78</sup>.

## 1.5 Cáncer de mama y su relación con el SNS

Algunas líneas celulares<sup>79</sup>, y células tumorales provenientes de tumores de glándula mamaria humanas, expresan receptores del sistema adrenérgico<sup>80,81</sup>. Estos receptores son principalmente del tipo  $\beta$ , mediante los cuales ejercen efectos proliferativos y de invasión/agresividad (figura 1.4)<sup>82-84</sup>. Se ha asociado, que la señalización a través de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, promueve la progresión de tumores en modelos animales sometidos a condiciones estresantes<sup>85-87</sup>. Mientras que el bloqueo de estos receptores, tiene efectos benéficos en la recurrencia de cáncer de mama y la metástasis<sup>88</sup>. Por otro lado, las células tumorales producen factores neurotróficos, que favorecen el crecimiento de fibras nerviosas que inervan el tumor<sup>83</sup>.

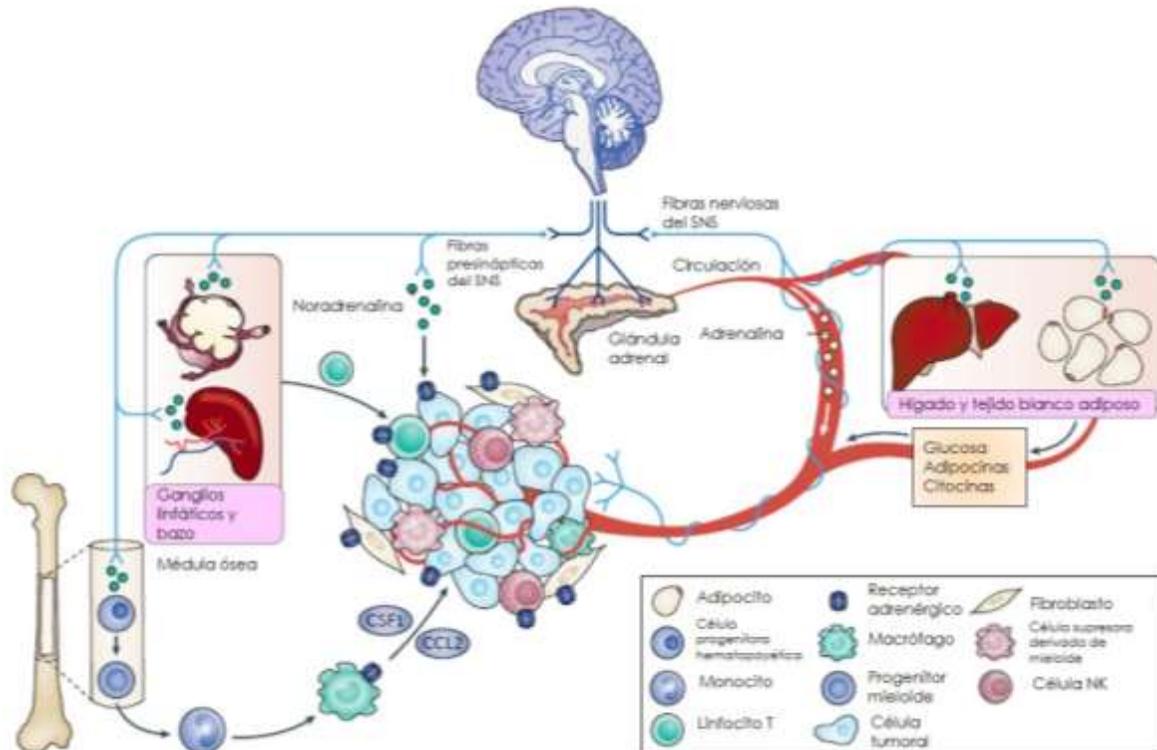
### 1.5.1 Innervación simpática tumoral

La innervación simpática que se presenta en los tumores, en asociación con la vasculatura<sup>89</sup>, entran al tumor y ocasionalmente irradian el parénquima del tumor<sup>90,91</sup> (Figura 1.4). El tejido sano que se encuentra alrededor del tumor, funciona como fuente de fibras nerviosas simpáticas, que infiltran el perímetro de los tumores en crecimiento<sup>92</sup>, posiblemente en respuesta a factores neurotróficos expresados por las células tumorales como el factor de crecimiento nervioso (NGF)<sup>83</sup> y el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF)<sup>90</sup>.

Por otro lado, el contenido de catecolaminas dentro de los tumores, se debe a la innervación simpática local<sup>89,93</sup>, ya que los niveles de noradrenalina en plasma son menores<sup>93</sup>. La exposición a estresores, y la consecuente activación del SNS, que promueve la liberación de noradrenalina dentro de los tumores (Figura 1.4), podría regular la progresión de los tumores<sup>89</sup>. Por lo tanto, la infiltración por fibras nerviosas, es una característica del microambiente tumoral, y está asociado con la agresividad del tumor, e implica la producción de NGF por las células cancerosas<sup>83</sup>

En estudios donde los animales son sometidos a aislamiento social (similar al tipo de estrés y depresión severa que experimentan las pacientes con cáncer de mama), han relacionado al estrés con el incremento en la recurrencia de cáncer de

mama, supervivencia reducida y mal pronóstico<sup>86,94</sup>. También se han observado aumento en la progresión de tumores y de las metástasis en otros modelos animales de estrés<sup>85,87</sup>.



**Figura 1.4 Inervación simpática de masas tumorales.** La inervación simpática puede regular el microambiente tumoral de manera directa e indirecta. Directa: inerva las masas tumorales y provee de noradrenalina y adrenalina al tumor para incrementar la expresión de los receptores  $\beta$ -AR y favorece el microambiente tumoral. Indirecta: libera catecolaminas en sitios distantes como el hígado y el tejido adiposo donde, la adrenalina, regula procesos biológicos que favorecen el crecimiento tumoral, como son la liberación de glucosa por el hígado o adipocinas del tejido graso, estos nutrientes llegarán al sitio de tumor a través de los vasos sanguíneos que lo irrigan lo que favorece nuevamente el microambiente tumoral. Modificado de Cole et al 2015<sup>90</sup>.

### 1.5.2 Señalización adrenérgica en células tumorales

Actualmente, se ha documentado que la señalización  $\beta$ -adrenérgica regula múltiples procesos que contribuyen a la iniciación, proliferación, migración e invasión celular<sup>88</sup>. De igual manera, en estudios *in vitro*, se ha observado que la activación de estos receptores en células de cáncer de mama, representa un mecanismo que promueve la metástasis<sup>79</sup>.

Se conocen diversos procesos de señalización mediante los cuales estos receptores ejercen su efecto. Uno de ellos, es la activación de Src en respuesta a la señalización  $\beta$ -adrenérgica en las células cancerosas, lo cual es mediado por AMPc/PKA<sup>85</sup>. Otro mecanismo que promueve la metástasis de las células cancerosas, es la activación de AMPc/calcio. Por ejemplo, la estimulación *in vitro* de la línea celular MDA-MB-231HM<sup>82</sup>, con agonistas selectivos  $\beta_2$ -adrenérgicos y no selectivos, inducen incremento de AMPc dependiente de la concentración. De igual manera, se ha observado que la estimulación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico estimula la señalización del calcio<sup>82,95</sup> que incrementa la invasividad<sup>82,96</sup>.

Por otro lado, en algunos estudios *in vitro* con células tumorales, la señalización  $\beta_2$ -adrenérgica sugiere que la noradrenalina podría promover la progresión de los tumores. Lo anterior, mediante una vía pro-angiogénica que incrementa la producción de VEGF, IL-6, metaloproteinasas de matriz<sup>79</sup> y de otras citocinas pro-inflamatorias como la IL-8 y el TNF- $\alpha$ <sup>90</sup>. Asimismo, se ha observado que el uso de agonistas de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos promueve la producción de IL-6<sup>79</sup>.

Otro mecanismo mediante el cual ejerce su acción el sistema adrenérgico, es la inhibición de la reparación del daño al DNA<sup>97</sup>. Esto mediante dos vías: la activación de la vía de la ataxia-telangiectasia<sup>90</sup> y la apoptosis asociada a p53<sup>97,98</sup>.

La activación de oncogenes, como Src<sup>85</sup> y Her2<sup>99</sup>, es otro mecanismo mediante el cual las células cancerosas promueven la progresión de los tumores. Se ha descrito que, la sobreexpresión de Her2, induce la liberación de adrenalina y la activación del receptor adrenérgico  $\beta_2$ . Además, la expresión de Her2, está correlacionada con la expresión del receptor  $\beta_2$  adrenérgico<sup>99</sup>. Todo lo anterior es en las células de cáncer de mama

El uso de antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, podría tener un papel importante en el desarrollo de nuevas terapias para disminuir el riesgo de metástasis y lenta progresión de tumores. Se ha documentado que los bloqueadores de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están involucrados en la progresión y metástasis lenta del cáncer de mama<sup>87,100,101</sup>, del cáncer de próstata, de melanoma y la leucemia<sup>102</sup>. Además, en pacientes con cáncer de mama triple negativo (un subtipo de cáncer donde el receptor de estrógeno y el receptor progesterona no se expresan y el

receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano no está amplificado ni sobreexpresado<sup>103</sup>), el uso de  $\beta$ -bloqueadores se ha asociado con supervivencia mejorada sin recaída, con reducciones en la recurrencia de las metástasis y de muertes asociadas al cáncer de mama<sup>82,88</sup>. El uso de  $\beta$ -bloqueadores también se ha asociado con supervivencia prolongada de pacientes con cáncer de próstata, pulmón, ovario y melanoma cutáneo<sup>102,104</sup>. Asimismo, los  $\beta$ -bloqueadores, como el propranolol, reducen el establecimiento de células de cáncer de mama en sitios como los huesos, pulmón<sup>104</sup> y cerebro<sup>88</sup>.

También, se ha documentado que los agonistas de estos receptores aceleran la progresión y metástasis de los tumores en ausencia de factores estresantes, como el sulfato de terbutalina, un agonista específico del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, que incrementa el tamaño de los tumores<sup>88</sup>. Lo mismo se puede observar con el formoterol, que induce invasión de células tumorales de cáncer de mama<sup>82</sup>. Finalmente, el estrés conduce a cambios neuroquímicos, que a su vez, promueven la tumorigenesis y la proliferación celular. Por otro lado, los antagonistas adrenérgicos desarrollan un ambiente anti-tumoral<sup>105</sup>, así como el bloqueo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos podría reducir la producción de factores pro-angiogénicos inducidos por estrés<sup>79</sup>.

## **1.6 La red neuroinmunoendócrina en el cáncer de mama**

En el organismo, los órganos y sistemas interactúan unos con otros, tal es el caso del sistema inmune, que interactúa con el sistema nervioso y con el sistema endócrino: estos tres sistemas conforman una compleja red de interacciones sistémicas y moleculares, y forman la red neuroinmunoendócrina. En esta interacción, las hormonas, citocinas y neurotransmisores modulan la respuesta inmune, la respuesta endócrina y la respuesta neuronal del organismo y todo esto en conjunto mantienen la homeostasis corporal <sup>106</sup>. En condiciones de enfermedad o estrés para el organismo, esta red se afecta, y muchas funciones de la misma, produciendo la patofisiología de dicha enfermedad.

El microambiente tumoral también se modifica por la innervación simpática de tejidos distantes. En la médula ósea hematopoyética, las catecolaminas condicionan el tráfico de monocitos<sup>107</sup> que migran al tumor.

En las masas tumorales, los macrófagos se polarizan hacia un fenotipo M2 por la activación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, que junto con las células T reguladoras, tienen un efecto pro-tumoral<sup>59</sup>. También se ha observado que el reclutamiento de macrófagos en tumores primarios, incrementa la síntesis de citocinas pro-inflamatorias en las células tumorales, así como en las células del sistema inmunitario, lo cual está mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo que influye en la progresión del tumor<sup>94,102</sup>. Las poblaciones de macrófagos dentro del tumor se modifican por la presencia de adrenalina y noradrenalina, que son liberadas bajo condiciones de estrés<sup>108</sup>. El sistema nervioso simpático, también recluta a los macrófagos, a través de la señalización  $\beta$ -adrenérgica, que los dirige hacia el parénquima del tumor (TAMs)<sup>59</sup>. Lo anterior sucede a través de la producción de factores quimiotácticos, como son el CCSF y la CCL2 en las células tumorales<sup>90</sup>, que promueve eventos pro-metastásicos, como la angiogénesis, la remodelación de matriz extracelular, la generación de un ambiente pro-inflamatorio y las respuestas anti-tumorales<sup>59</sup>. Por otra parte, se ha descrito que los macrófagos activados sintetizan catecolaminas bajo ciertas circunstancias, y éstas funcionan como una fuente no neural dentro del microambiente tumoral<sup>90</sup>.

La activación del SNS es un regulador de metástasis hacia órganos distantes como pulmón y ganglios linfáticos, a través de la señalización  $\beta$ -adrenérgica, que recluta macrófagos alternativamente activados en el parénquima del tumor primario e induce la expresión de genes pro-metastásicos como *PTGS2*, *MMP9*, *ARG1*, *TGFB*, *IL6* y *VEGF*. Así como la infiltración de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) en tumores mamarios primarios<sup>87</sup>.

Por otro lado, al estimular a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con un agonista selectivo adrenérgico (como lo es el isoproterenol), se incrementa la infiltración de macrófagos en tumores mamarios primarios<sup>87</sup>. Finalmente, los macrófagos asociados a tumores que expresan F4/80 y CD11b, se incrementan bajo condiciones de estrés,

lo que promueve la progresión del tumor a través de la modulación de la células del sistema inmunitario<sup>86</sup>.

## **2. ANTECEDENTES**

Se conoce muy poco de la interacción ente el sistema inmune y el sistema nervioso en el cáncer, particularmente en el cáncer de mama. Los estudios a la fecha no evalúan en conjunto estos sistemas. Lo que si se conoce, son los efectos de la modulación del sistema nervioso simpático en diferentes tipos de cáncer como el hepatocarcinoma<sup>109</sup> o en tumores de la glándula mamaria<sup>86,87,99</sup> pero no los efectos sobre las células del sistema inmune y su repercusión en su función efectora.

La modulación adrenérgica de las células tumorales está involucrada en la progresión, invasividad y metástasis de tumores primarios, así como su asociación con la supervivencia<sup>87,110-112</sup>. Sin embargo, poco se ha evaluado sobre la función efectora o modulación de las células de la respuesta inmune innata y adaptiva en conjunto con el sistema nervioso simpático en presencia de tumores de la glándula mamaria.

## **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Dado que una alteración en el sistema nervioso durante un periodo crítico del desarrollo de un organismo, puede modificar permanentemente la respuesta del sistema inmune, y a que en la literatura no se ha descrito por completo cómo se produce la regulación inmunitaria por el sistema nervioso contra el cáncer de mama, es de nuestro interés evaluar los efectos de la denervación simpática neonatal sobre los principales componentes del sistema inmune encargados de controlar a las células tumorales en la etapa adulta del animal.

#### **4. HIPÓTESIS**

La denervación simpática neonatal en el ratón disminuirá la proporción de los linfocitos T, de los linfocitos B, y las células NK, y aumentará la proporción de linfocitos T reguladores y TAMs, así como la secreción de TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , lo que redundará en una mayor susceptibilidad y progresión de tumores mamarios inducidos experimentalmente en ratones adultos.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Identificar el efecto de la denervación neonatal sobre la respuesta inmunitaria contra tumores mamarios inducidos en individuos adultos.

##### **5.1 Objetivos particulares**

1. Estudiar el efecto de la denervación simpática sobre el peso y volumen de masas tumorales inducidas por la inoculación de células 4T1 en tejido mamario del ratón.
2. Determinar por citometría de flujo, los porcentajes de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores, linfocitos B, células NK y macrófagos asociados a tumores en bazo en todos los grupos experimentales.
3. Cuantificar por citometría de flujo, los porcentajes de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores, linfocitos B, células NK y macrófagos asociados a tumores en ganglios linfáticos mesentéricos de ratones controles y denervados con y sin tumores
4. Analizar intratumoralmente por citometría de flujo, los porcentajes de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores, linfocitos B, células NK y macrófagos asociados a tumores.
5. Evaluar la expresión del mRNA para TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en el bazo de los ratones de todos los grupos experimentales.
6. Estudiar por RT-PCR tiempo final, la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en las masas tumorales de ratones controles y denervados.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Animales de experimentación

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c AnN, de 8 semanas de edad. Los animales tuvieron acceso al agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h, y cambio de cama con regularidad (2 veces por semana). Los animales se mantuvieron en las instalaciones de la Unidad de Modelos Biológicos (UMB) del IIB. Se formaron 6 grupos de animales, cada uno con una “n” diferente, en total 43 ratones. La eutanasia se llevó a cabo con una sobredosis por inhalación de Sevoflurano® (sevoflurano, abbot®) seguida de dislocación cervical.

#### GRUPOS EXPERIMENTALES

- Control Intacto (n = 7)
- Control con línea celular 4T1 (n = 6)
- Vehículo Intacto (n = 6)
- Vehículo con línea celular 4T1 (n = 9)
- 6OHDA Intacto (n = 6)
- 6OHDA con línea celular 4T1 (n = 9)

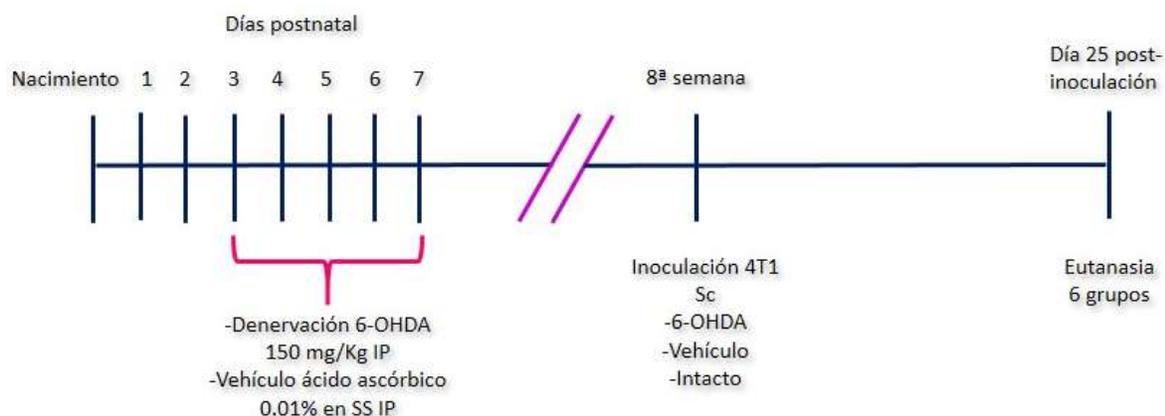
### 6.2 Denervación

La denervación se realizó utilizando 6-hidroxidopamina (6OHDA) (Aldrich®), una neurotoxina específica del sistema nervioso simpático. Uno de los mecanismos descritos de la denervación, se basa en la auto-oxidación y degradación de la 6OHDA por la monoaminoxidasa A, que genera especies reactivas de oxígeno y otras especies oxidantes afectando la cadena respiratoria en la mitocondria de las neuronas<sup>113,114</sup>.

El esquema utilizado, se basó en modelos experimentales publicados<sup>115,116</sup>. Se determinó la fecha de nacimiento y al tercer día pos-natal y se identificó a las hembras por la distancia ano-genital y se comenzó con el esquema de administración

de 6OHDA. La dosis utilizada fue de 150 mg/kg, por vía intraperitoneal, durante cinco días consecutivos. El vehículo utilizado, fue ácido ascórbico (Sigma®) al 0.01% en solución salina 0.9% (PiSA®), el cual se administró de la misma manera que la 6OHDA, de ambas soluciones se administró un volumen de 20 µL. La solución de 6OHDA, se preparó el mismo día de la administración y se utilizaron jeringas de insulina BD Ultra-Fine® de 1mL, 30GX13mm.

En la Figura 6.1 se muestra una línea de tiempo que ejemplifica cómo se llevó a cabo la denervación y en general el proceso experimental.



**Figura 6.1 Diseño experimental.** Se muestra la línea de tiempo que se siguió para este protocolo que incluyen, la denervación, la inoculación de la línea celular 4T1 y finalmente la eutanasia.

### 6.3 Inducción de tumores de glándula mamaria

#### 6.3.1 Cultivo de la línea celular 4T1

El contenido de un criovial con suspensión celular de la línea celular 4T1 (ATCC CRL-2539) se colocó en un tubo Falcon y se adicionaron 9 mL de medio RPMI 1640 (Sigma®), posteriormente se centrifugó a 1200-1250 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y se decantó. Se adicionó 1mL de RPMI 1640 suplementado (con suero fetal bovino, SFB (By Products®)), y se colocó en una caja de cultivo P25 y se adicionaron 4 mL de medio RPMI 1640 suplementado. Se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener 70-80% de confluencia. Se realizaron dos sub-cultivos. Se decantó el medio de cultivo, y se lavó por duplicado con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 1x (PBS, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Posteriormente se adicionaron 200 µL de tripsina-EDTA 0.25% (Gibco®)

con incubación de 5 minutos a 37°C y se llevó a volumen de 1 mL con medio RPMI 1640 suplementado. Esta suspensión se colocó en una caja nueva y se agregaron 4 mL de medio RPMI 1640 suplementado, se incubó a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta obtener entre el 70-80% de confluencia. Después del segundo sub-cultivo (pase 2) las células se cosecharon para preparar el inóculo.

### 6.3.2 Cosecha de la línea celular 4T1

Después de decantar el medio de cultivo se realizaron dos lavados con PBS 1x, y se incubó durante 5 minutos a 37 °C con 200 µL de tripsina (0.25%)-EDTA. Pasado este tiempo, se adicionaron 100 µL de SBF y se llevó a 1 mL con PBS 1x, en un tubo Eppendorf, esta suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos, y se resuspendió en 1 mL de solución salina 0.9%. Se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer, utilizando el colorante azul tripan 0.4% (Sigma®) para obtener la viabilidad. Posteriormente, se realizaron cálculos necesarios para inocular 10,000 células en 40 µL de PBS 1x.

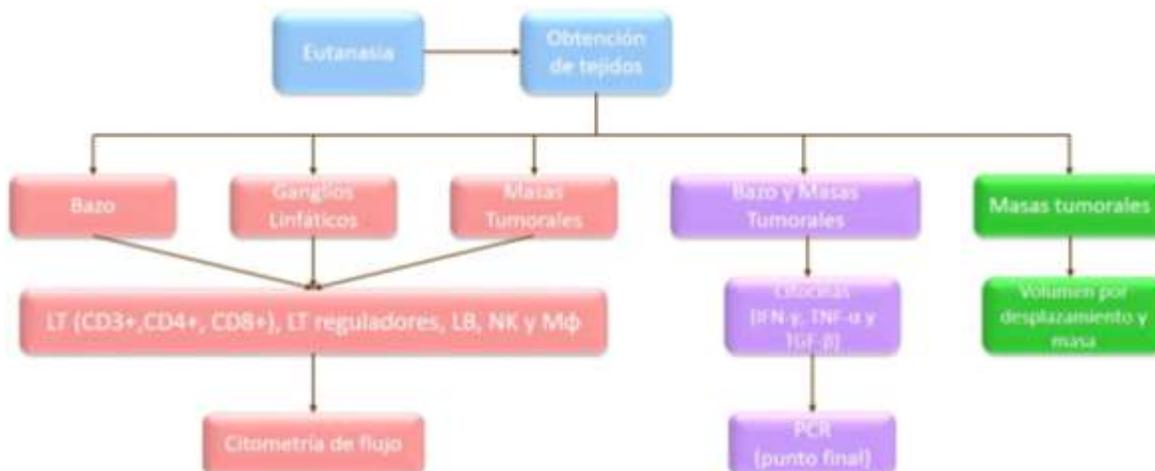
### 6.3.3 Inoculación de la línea celular 4T1

A la octava semana de edad (Figura 6.1), con anestesia por inhalación de sevoflurano (Abbot®) y aire, se realizó asepsia del vientre con alcohol al 70%. En el cuarto cojinete graso de la glándula mamaria se inocularon, con una jeringa de insulina de 1 mL con aguja 27G; vía subcutánea, 40 µL de la suspensión celular, el equivalente a 10,000 células. Se monitoreó el desarrollo de la masa tumoral durante 25 días (Figura 6.1), y en este día se procedió a la eutanasia (como se menciona en el punto 6.1).

## 6.4 Obtención de muestras

Después de la eutanasia se extrajeron los órganos siguientes: masas bazo, ganglios linfáticos inguinales y las masas tumorales. También se obtuvieron hígado y pulmones para hacer una evaluación morfológica (macroscópica) de estos tejidos,

así como identificación de posibles focos metastásicos. Cada uno de los tejidos de proceso de manera diferente (Figura 6.2). Para la citometría de flujo, las muestras se colocaron sobre hielo en placas de cultivo de 24 pozos con 1 mL de PBS 1x hasta su procesamiento (aproximadamente dos horas).



**Figura 6.2 Diagrama de flujo.** Clasificación de las muestras de tejidos para el procesamiento de cada una.

#### 6.4.1 Masas tumorales

Los tumores obtenidos se pesaron y se determinó su volumen por el método de desplazamiento (Figura 6.2). La masa tumoral, se dividió en tres partes más o menos iguales: una para tinción de citometría de flujo, otra para guardar en tubos con TRIzol en hielo seco a -20 °C y finalmente a -70 °C, previamente cortado en trozos pequeños. La última parte se guardó para tratamiento deshidratación de tejidos para posterior uso (no incluido en este trabajo).

Previo a la tinción de citometría, se realizó la digestión de las masas tumorales. Se disectó finamente el tumor y se colocó en un tubo Eppendorf con medio de digestión (medio RPMI 1640 + 10 U/mL DNasa I (Roche®) + 0.5 mg/mL Colagenasa IV (Sigma®)) y se colocó a 37 °C durante 30 minutos agitando en vortex cada 5 minutos, después se adicionaron 50 µL de SFB (para detener la reacción). Sobre hielo y en un placa de cultivo se llevó a cabo el disgregado del tejido con un émbolo de jeringa (se colocó el tejido entre dos mallas). La suspensión se colocó nuevamente

en el tubo Eppendorf y se centrifugó a 1200 rpm. Las células se lavaron con PBS 1x y se resuspendieron en 300  $\mu$ L de amortiguador de FACS (PBS 1x, 2% SFB, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) y se dejó en hielo hasta la tinción.

La masa y volumen de las masas tumorales se normalizaron respecto al grupo control de cada repetición. Esto se realizó obteniendo el promedio del grupo control (masa y volumen), posteriormente, cada dato de masa y v volumen de las masas tumorales se dividió entre el valor de la media del grupo control respectivamente, resultando en la normalización de cada uno.

#### 6.4.2 Extracción del bazo

Se pesó, y se dividió en dos partes (Figura 6.2), una parte finamente cortada se almacenó en tubos Eppendorf con TRIzol en hielo seco a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  y finalmente a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . El resto del bazo, se colocó en una caja de cultivo con 500  $\mu$ L de PBS 1x, entre dos mallas y se disgregó con un émbolo de jeringa, todo esto en hielo. La suspensión obtenida, se centrifugó a 1500 rpm en un tubo Eppendorf, el botón celular se resuspendió en 1 mL de amortiguador de lisis de eritrocitos (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 M  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7.3) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó con 500  $\mu$ L de PBS 1x y se resuspendió en 500  $\mu$ L de amortiguador de FACS y se procedió a realizar la tinción para citometría de flujo.

#### 6.4.3 Ganglios linfáticos inguinales

Los ganglios linfáticos inguinales, debido a su tamaño, únicamente se procesaron para citometría de flujo (Figura 6.2). Se colocaron sobre hielo en una placa de cultivo entre dos mallas con 500  $\mu$ L de PBS 1x y se disgregó con émbolo de jeringa, se centrifugó a 1500 rpm y se resuspendió en 200  $\mu$ L de amortiguador de FACS.

## 6.5 Citometría de flujo

En todos los tejidos (bazo, ganglios linfáticos inguinales y tumores) se llevó a cabo la tinción para linfocitos: linfocitos T totales, linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores y linfocitos B. Para bazo y masas tumorales, además se realizó tinción para macrófagos y células NK. Las células teñidas se capturaron mediante el citómetro Attune NXT (Life Technologies®) y se analizaron con el software FlowJo® (Tree Star Inc.). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 7®.

En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos utilizados para cada marcador, así como su clona, fluoróforo acoplado y concentración utilizada.

Anticuerpo	Clona	Fluoróforo	Dilución	Marca
Anti-CD3	145-2C11	APCy7	1:200	Biologend
Anti-CD4	GK1.5	PE	1:300	Biologend
Anti-CD8	53-6.7	PerCP	1:200	Biologend
Anti-FoxP3	150D	AlexaFluor® 647	1:100	Biologend
Anti-CD19	6D5	PE	1:200	Biologend
Anti-F4/80	BM8	AlexaFluor® 647	1:200	Biologend
Anti-NKp46	29A1.4	PE	1:100	Biologend
Anti-FC (CD16/32)	939	---	1:200	Biologend

Tabla 6.1 Anticuerpos utilizados para tinciones de citometría de flujo

En dos placas de 96 pozos de fondo U (una para tinción de linfocitos y otra para tinción de células NK y macrófagos), se colocaron 25 µL en dos pozos para cada una de las muestras (control sin teñir y teñidas). Se diseñaron dos mezclas maestras: una para los marcadores de superficie de los linfocitos (mezcla de superficie: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD19) y una para los macrófagos y células NK (mezcla de superficie: anti-F4/80 y anti-NKp46). Se utilizaron controles de compensación para cada uno de los fluoróforos por separado.

### 6.5.1 Tinción de superficie (linfocitos T y linfocitos B) – bazo, ganglios linfáticos y tumor

Se utilizaron 25 µL de la suspensión celular y se adicionaron 25 µL de la mezcla de superficie, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz; todos los pozos se lavaron con 100 µL de amortiguador de FACS

y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se procedió a realizar tinción intracelular.

#### 6.5.2 Tinción intracelular (linfocitos T reguladores) – bazo, ganglios linfáticos y tumor

Las muestras se resuspendieron en 200  $\mu$ L de amortiguador Fix-Perm® (Tonbo®) y se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se lavó con 200  $\mu$ L de amortiguador Perm® (Tonbo®). Posteriormente, en los pozos teñidos, se agregaron 25  $\mu$ L de anti-FoxP3 (preparado en amortiguador Perm®) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz, se lavó con 200  $\mu$ L de amortiguador Perm® y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de amortiguador  $\mu$ de FACS y se guardaron en refrigeración protegidas de la luz hasta su captura en el citómetro de flujo.

#### 6.5.3 Bloqueo de receptores FC

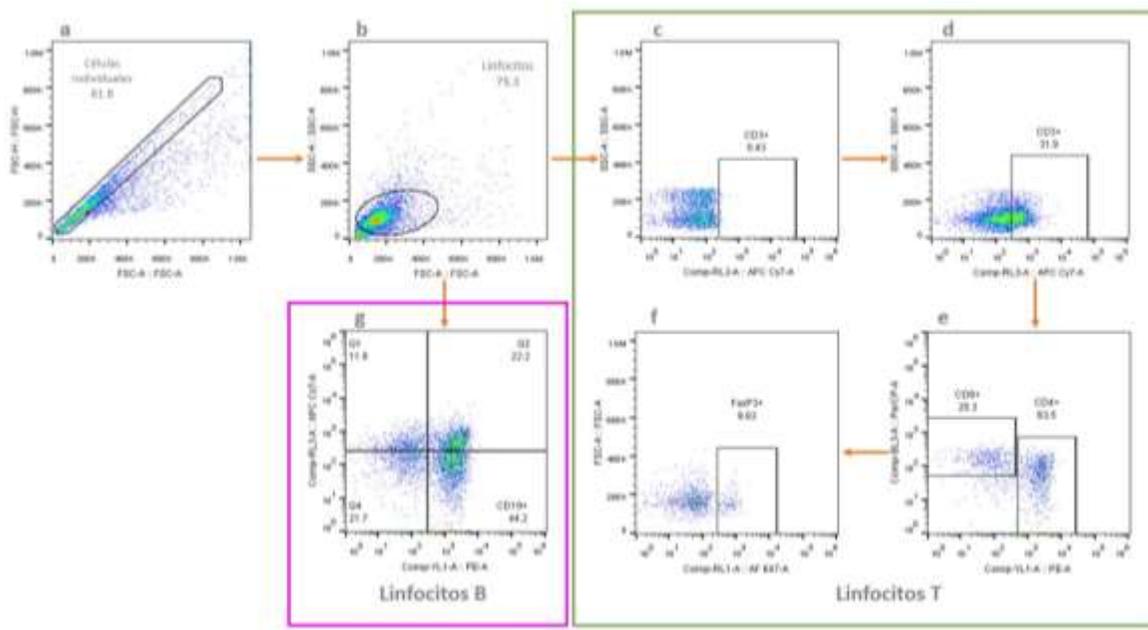
A todos los pozos, se les agregaron 25  $\mu$ L de anti-FC (TruStain®) y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron con 200  $\mu$ L de amortiguador de FACS y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos.

#### 6.5.4 Tinción de superficie (macrófagos y células NK)

En los pozos teñidos, se le adicionaron 25  $\mu$ L de la mezcla de tinción de superficie y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C protegidas de la luz, se lavaron con 200  $\mu$ L de amortiguador de FACS y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de paraformaldehído (Aldrich®) al 4% y nuevamente se incubaron durante 20 minutos a 4 °C protegidas de la luz, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de amortiguador de FACS y se mantuvieron a 4 °C protegidas de la luz hasta su captura en el citómetro de flujo.

### 6.5.5 Selección de subpoblaciones

La selección de subpoblaciones de linfocitos se realizó a partir de las características de tamaño asociadas al parámetro FSC-H vs FSC-A para obtener células individuales en el análisis (figura 6.3–a), posteriormente de esta selección se obtuvo el dotplot de complejidad vs tamaño, SSC-A vs FSC-A respectivamente, del cual se seleccionó la región de los linfocitos respecto a su tamaño y granularidad (Figura 6.3–b). De la región de linfocitos, se seleccionaron a los linfocitos T y a los linfocitos B.



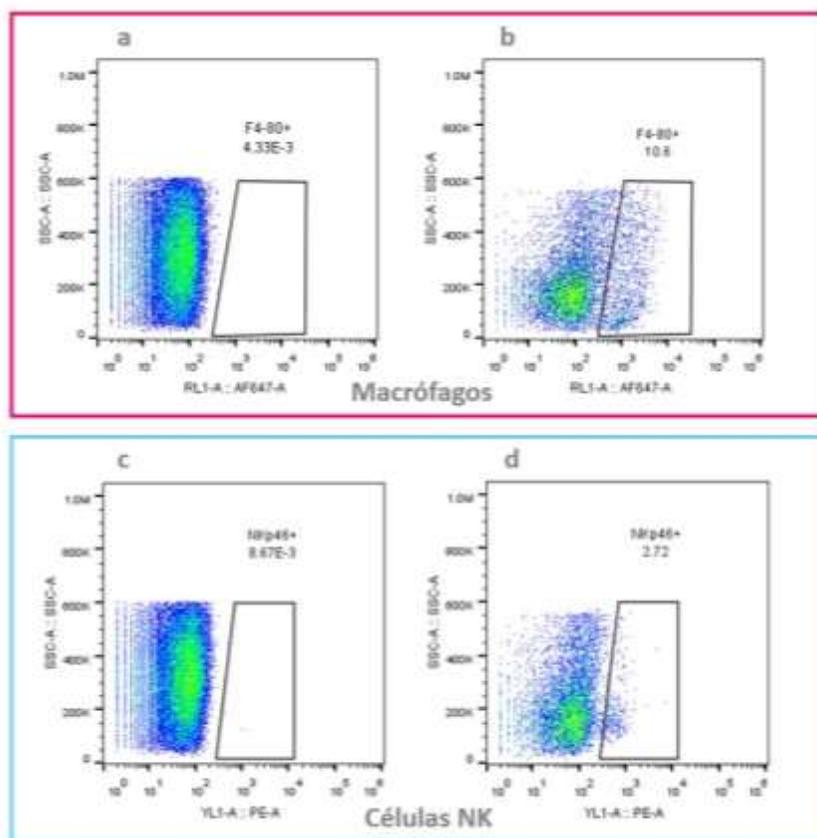
**Figura 6.3 Selección de subpoblaciones celulares.** Se muestra el diagrama de selección de las subpoblaciones celulares de linfocitos T y linfocitos B. (a) células individuales, (b) región de linfocitos proveniente de (a), (c) muestra sin teñir para linfocitos T (CD3+) proveniente de (b), (d) muestra teñida para linfocitos T (CD3+) proveniente de (b), (e) selección de regiones para linfocitos T cooperadores (CD4+) proveniente de (d) y linfocitos T citotóxicos (CD8+) proveniente de (d), (f) región de linfocitos T reguladores proveniente de linfocito T cooperadores (e) y (g) subpoblación de linfocitos B (CD19+) proveniente de (b).

Para los linfocitos T, a partir de la región de linfocitos, se obtuvo la región correspondiente a los linfocitos T totales (SSC-A vs APCy7) (figura 6.3–d). Se realizó comparativo con el mismo dotplot para muestras sin teñir (figura 6.3–c) y poder determinarla correctamente en las muestras teñidas (figura 6.3–d), de esta selección

se realizó un nuevo dotplot de PerCP vs PE para determinar las regiones correspondientes a los linfocitos T citotóxicos y linfocitos T cooperadores, respectivamente (figura 6.3–e). Dentro de estos últimos se seleccionaron a los linfocitos T reguladores (FSC-A vs AF-647) (figura 6.3–f).

Para los linfocitos B, se seleccionó un dotplot que mostrara APCy7 y PE, en este gráfico se seleccionó el cuarto cuadrante que es negativo para el marcador de linfocito T y positivo para el marcador de linfocitos B (PE) (figura 6.3–g).

Respecto a la selección de macrófagos y células NK, se tomó como referencia a las células sin teñir, se seleccionaron las células positivas para los marcadores específicos a partir de los dotplot de SSC-A vs AF-647 y SSC-A PE respectivamente (figura 6.4).



**Figura 6.4 Selección de macrófagos y células NK** Se muestra el diagrama de selección de los macrófagos y células NK. (a) control sin teñir para macrófagos (F4/80+), (b) macrófagos, (c) control sin teñir para células NK y (d) células NK.

## 6.6 RT-PCR

La determinación de citocinas se realizó por el método de RT-PCR punto final del bazo y masas tumorales. Para este procedimiento, se utilizaron las muestras previamente almacenadas en TRIzol a -70°C.

### 6.6.1 Extracción de RNA

Se lavó la cuchilla del politrón con agua DEPC, etanol en agua DEPC al 75%, solución saturada de cloruro de sodio y finalmente con TRIzol. Se realizó el homogenizado del tejido con 600 µL de trizol. Este se colocó en un tubo Eppendorf y se realizaron dos extracciones orgánicas. Se adicionaron 200 µL de una mezcla de fenol/cloroformo (1:5), se mezcló vigorosamente en el vortex y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se separó la fase acuosa, a donde se encuentra el RNA. A esta fase se le agregaron 200 µL de cloroformo, se centrifugó (13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C), nuevamente se obtuvo la fase acuosa, a la cual se le adicionó un volumen igual de isopropanol y se dejó precipitar el RNA a 4 °C durante 12 horas. Pasado este tiempo, se obtuvo el precipitado por centrifugación a 13000 rpm durante 15 minutos y se lavó con etanol al 75% en agua DEPC, se dejó secar el botón obtenido y se resuspendió entre 30-50 µL de agua DEPC (dependiendo del tamaño del botón).

### 6.6.2 Cuantificación e integridad de RNA

La cuantificación de RNA se llevó a cabo en espectrofotómetro (GenquantPRO®), haciendo una dilución de la solución anterior 1:70 (por duplicado) y se obtuvo la concentración, este valor se utilizó para hacer los cálculos necesarios para la retrotranscripción (obtención de cDNA). La integridad del RNA extraído, se evaluó mediante electroforesis. Se utilizaron 3 µL de RNA extraído con 4 µL de amortiguador de carga (azul bromofenol 12.5 mg, xilenocianol 12.5 mg, glicerol 2.5 mL, EDTA (0.5 M pH 8) 10 µL, H<sub>2</sub>O cpb 5 mL) y 13 µL de H<sub>2</sub>O DEPC, y se cargaron 20 µL por pozo. Se empleó gel del agarosa (Promega®) al 1.2% y bromuro de etidio

(Invitrogen®) 20 µL/100 mL a 90 watts durante 1 hora y se tomó foto del gel en el fotodocumentador.

### 6.6.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción, se realizó en las muestras que no estaban degradadas, previo a la realización del PCR del gen control 18s y las citocinas. El programa utilizado en la retrotranscripción y la reacción correspondiente se muestra en la Tabla 5.2. El volumen de muestra utilizado en la retrotranscripción, es el necesario para tener 5 µg de RNA por reacción. Antes de colocar la muestra en el termociclador, se preparó la mezcla A con la muestra correspondiente y se prosiguió con el paso 1 (Tabla 6.2). Pasado este tiempo, se dejó enfriar en hielo por tres minutos y se adicionó la mezcla B, y se prosiguió con paso 2 (Tabla 6.2). Finalmente, se agregó la enzima y se dejó continuar el resto del programa, pasos 3, 4 y 5 (Tabla 6.2).

RT	Mezcla	Reactivo	Para 1 Rx (µl)
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 65 °C x 5 min</li> <li>2. 37 °C x 2 min</li> <li>3. 37 °C x 50 min</li> <li>4. 75 °C x 15 min</li> <li>5. 4 °C ∞</li> </ol>	Mezcla A	Oligo DT 0.5 µg/µl	0.5
		dNTPs 10 mM c/u	2
	Mezcla B	Amortiguador FS 5x	5
		DTT 0.1 M	2
		M-MLV 200 u/µl	1

**Tabla 6.2 Programa utilizado en el termociclador y reactivos utilizados para la retrotranscripción.**

### 6.6.4 Cuantificación del gen control de referencia 18s

Antes de proseguir con la cuantificación de citocinas, se realizó la prueba del gen constitutivo 18s, el cual se realizó bajo las condiciones mostradas en la Tabla 5.3. Las cantidades utilizadas por cada reacción se muestran en la tabla 5.4. La determinación del 18s se realizó en gel del agarosa (Promega®) al 1.2% y bromuro de etidio (Invitrogen®) 20 µL/100 mL a 90 watts durante 1 hora y se tomó foto en el foto documentador para su posterior análisis. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 6.3.

<b>18s</b>	<b>INF-<math>\gamma</math></b>
1. 94 °C x 10 min 2. 94 °C x 30 seg 3. 60 °C x 45 seg 4. 72 °C x 1 min <b>5. 30 ciclos desde 2</b> 6. 72 °C x 7 min 7. 4 °C $\infty$ <b>Tamaño: 219 pb</b> Sentido: CGCGGTTCTATTTTGTGGT Antisentido: AGTCGGCATCGTTTATGGTC	1. 94 °C x 5 min 2. 94 °C x 45 seg 3. 60 °C x 45 seg 4. 72 °C x 45 seg <b>5. 35 ciclos desde 2</b> 6. 72 °C x 7 min 7. 4 °C $\infty$ <b>Tamaño: 247 pb</b> Sentido: AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG Antisentido: GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>
1. 94 °C x 5 min 2. 94 °C x 1 min 3. 63 °C x 1 min 4. 72 °C x 1 min <b>5. 30 ciclos desde 2</b> 6. 72 °C x 7 min 7. 4 °C $\infty$ <b>Tamaño: 300 pb</b> Sentido: GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC Antisentido: ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	1. 94 °C x 5 min 2. 94 °C x 45 seg 3. 61 °C x 45 seg 4. 72 °C x 45 seg <b>5. 30 ciclos desde 2</b> 6. 72 °C x 7 min 7. 4 °C $\infty$ <b>Tamaño: 298</b> Sentido: CTTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGA Antisentido: CACAATCATGTTGGACAACTGCTCC

**Tabla 6.3 Condiciones estandarizadas utilizadas en el termociclador para cada citocina y secuencia de oligonucleótidos empleados para las reacciones de PCR.**

#### 6.6.5 Cuantificación de citocinas

Finalmente, se realizó la determinación de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ), y las condiciones empleadas en el termociclador se muestran en la Tabla 6.3. Las cantidades empleadas para la amplificación de las citocinas por cada reacción de PCR, se muestran en la Tabla 6.4. Las citocinas se evaluaron en un gel de agarosa (Promega®) al 1.2% y bromuro de etidio (Invitrogen®) 20  $\mu$ L/100 mL a 90 watts durante 1 hora y se tomó foto en el fotodocumentador para posterior análisis. Las secuencias de oligonucleotidos utilizados se muestran en la tabla 6.3.

La expresión relativa de cada gen se obtuvo mediante el cociente de la densidad óptica de la banda del gen de interés entre la intensidad de la banda de 18S de cada muestra.

La cuantificación final de 18s y de citocinas se realizó con el programa ImageJ® y el análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 7®.

Reactivo	18s, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	TGF- $\beta$
	Para 1 Rx ( $\mu$ l)	Para 1 Rx ( $\mu$ l)
Amortiguador de Amplificasa 10x	2.5	2.5
MgCl <sub>2</sub> 30 mM	1.25	1.25
dNTPs 10mM c/u	2	2
Oligo sentido 20 $\mu$ M	1.7	1.7
Oligo sentisentido 20 $\mu$ M	1.7	1.7
H <sub>2</sub> O DEPC	13.6	14.1
Taq DNA pol 5 U/ $\mu$ l	0.25	0.25
cDNA (RT)	2	1.5

**Tabla 6.4** Reactivos utilizados en las reacciones amplificación de 18s y citocinas, para el caso del TGF- $\beta$ , se utiliza menor volumen de cDNA debido a la alta cantidad extraída de RNA.

## 6.7 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes. El análisis estadístico, se realizó en el software GraphPad Prism 7®. Se consideraron dos variables: animales denervados neonatalmente (control, vehículo, 6OHDA) e inducción de tumores de glándula mamaria (grupo 4T1). La normalidad de los datos se realizó con la prueba *t*-student. Posteriormente se realizó una ANOVA de dos vías ( $\alpha=0.05$ ) seguida de una prueba post hoc de Tukey. Las diferencias significativas se consideraron con una  $p<0.05$ .

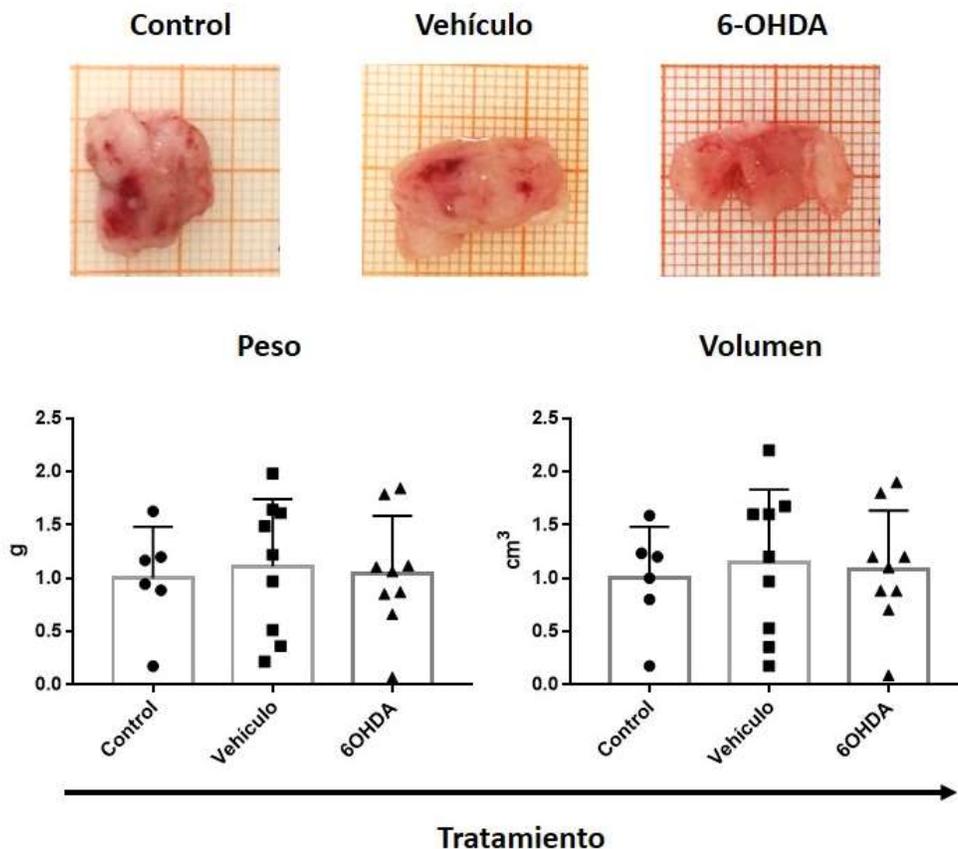
## 7. RESULTADOS.

En la Tabla 7.1, se presentan el peso y volumen promedio de las masas tumorales obtenidas. En cada uno de los tres grupos inoculados (control, vehículo y 6OHDA), se observó crecimiento de masas tumorales a partir del día de 10 post-inoculación. Para el peso y el volumen de los tumores, se realizó normalización de peso y volumen respecto a los animales controles. Esto nos muestra que la denervación neonatal con 6OHDA no afecta la formación de masas tumorales en la etapa adulta del animal.

<b>Grupo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Animales que desarrollaron tumor</b>
<b>Control</b>	1.000	1.00	6/6
<b>Vehículo</b>	1.186	1.22	9/9
<b>6-OHDA</b>	0.998	1.03	9/9

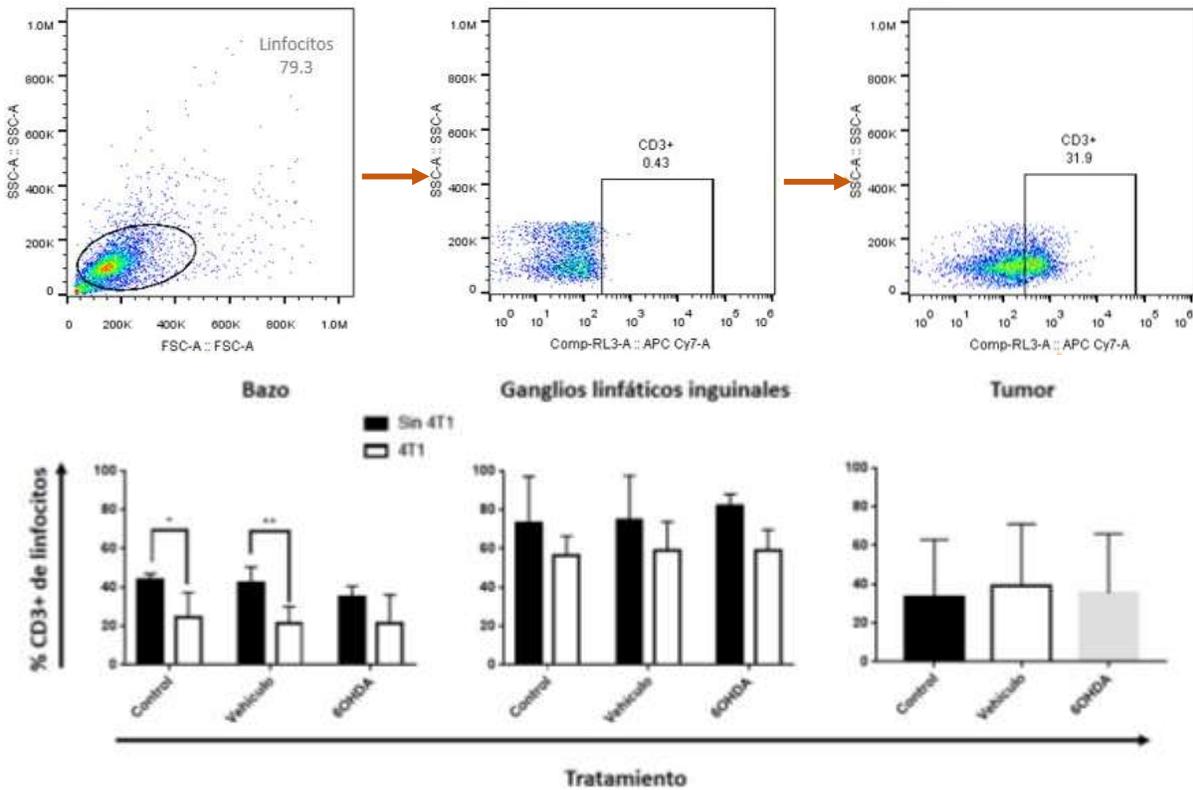
**Tabla 7.1. Peso y volumen promedio de masas tumorales.** Se muestran los pesos y volúmenes promedios de cada uno de los grupos inoculados con la línea celular 4T1. Control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9.

En la Figura 7.1 se muestran las masas tumorales, representativas de cada grupo: control, vehículo y 6OHD; obtenidas 25 días post-inoculación de la línea celular 4T1, así como su peso y volumen normalizado respecto al grupo control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas. La denervación neonatal no afectó el desarrollo de masas tumorales ni el peso final de los tumores inducidos en la etapa adulta.



**Figura 7.1 Masas tumorales.** Masa tumoral de animales: controles, administrados con vehículo y administrados con 6OHDA. El peso se expresa en g y el volumen en  $\text{cm}^3$ . Control  $n=6$ , vehículo  $n=9$ , 6OHDA  $n=9$ . No se obtuvieron diferencias significativas.

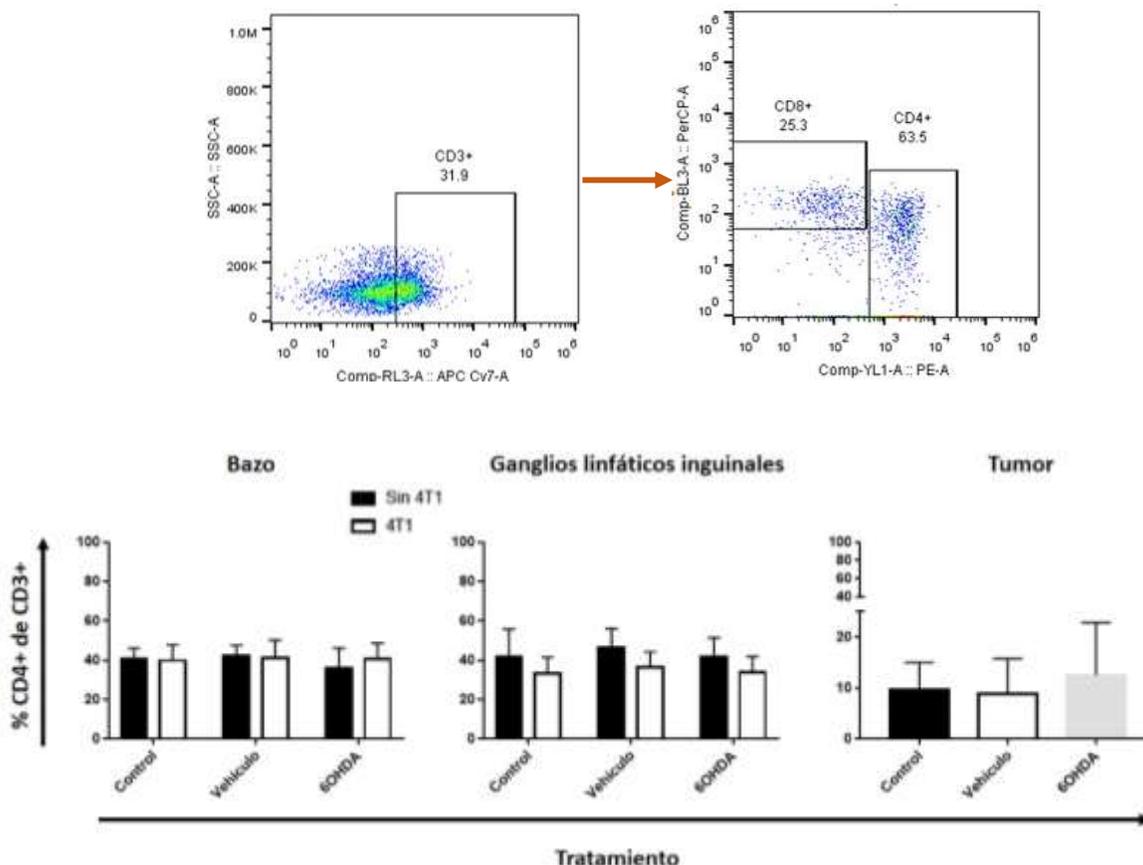
En la figura 7.2 se muestra el porcentaje de linfocitos T  $\text{CD3}^+$  en bazo, ganglios linfáticos inguinales y en tumor medido por citometría de flujo, obtenidos a partir de los linfocitos T totales ( $\text{CD3}^+$ ). En la gráfica de bazo y ganglios linfáticos inguinales, las barras negras representan a los animales sin tumor, mientras que las barras blancas muestran a los animales con tumor. Únicamente se observa diferencia significativa en el bazo, de animales control y tratados con vehículo; causada por la presencia del tumor, mientras que en los animales administrados con 6OHDA (denervados) no se observa esta diferencia. En los ganglios linfáticos inguinales y en el tumor no se observaron diferencias significativas.



**Figura 7.2 Porcentaje de Linfocitos T CD3+ proveniente de linfocitos totales.** Arriba: linfocitos totales (derecha) para selección de subpoblación CD3+ (centro) respecto al control sin teñir (izquierda). Abajo: porcentaje de linfocitos T CD3+ en el bazo, los ganglios linfáticos inguinales y los tumores. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo y los ganglios linfáticos inguinales, para el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9, \*p<0.01, \*\*p<0.001.

En la Figura 7.3, se observa el porcentaje de los linfocitos de la subpoblación T CD4+ provenientes de la población de linfocitos T CD3+ (Figura 7.2), en bazo, ganglios linfáticos inguinales y tumores obtenidos por citometría de flujo. A diferencia de la subpoblación de linfocitos T CD3+, en los linfocitos T CD4+ no se observan diferencias significativas provocadas por los tratamientos (vehículo y 6OHDA) ni tampoco por la presencia de tumores. Los porcentajes de esta subpoblación en el bazo y los ganglios linfáticos inguinales de los animales inoculados con la línea celular 4T1 (barras blancas) se mantienen dentro del rango de los animales controles (barras negras). Respecto a los linfocitos T CD4+ en tumores, no se observan

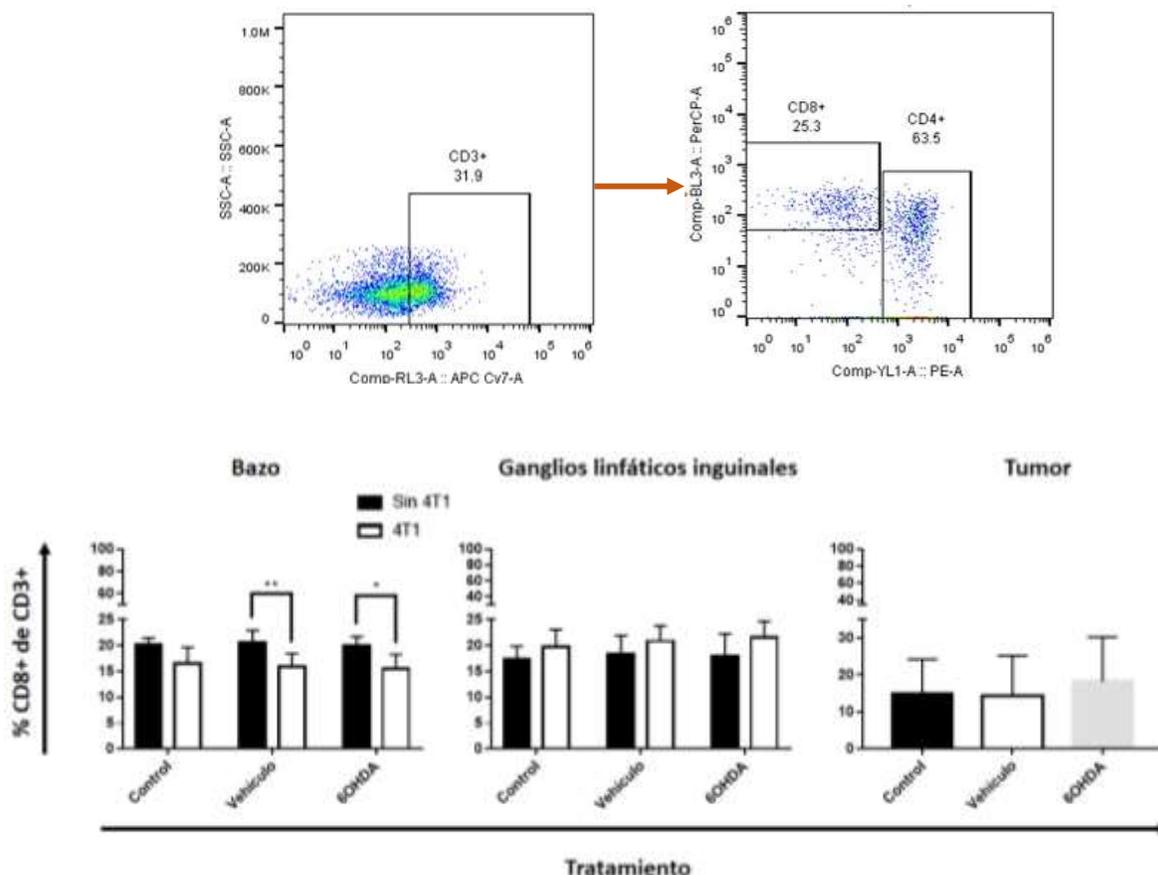
diferencias significativas entre los grupos. Aunque se observa un ligero aumento en esta subpoblación, en animales administrados con 6OHDA, no es significativa, por lo que no se observó el efecto de la denervación en los porcentajes de esta subpoblación.



**Figura 7.3 Porcentaje de linfocitos T CD4+ proveniente de linfocitos T CD3+.** Arriba: selección de subpoblaciones CD4+ (derecha) provenientes de los linfocitos T CD3+ (izquierda). Abajo: porcentaje de linfocitos T CD4+ en el bazo, los ganglios linfáticos inguinales y los. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo y los ganglios linfáticos inguinales, para el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9.

En la Figura 7.4, se observan el porcentaje obtenido de los linfocitos T de la subpoblación CD8+ en el bazo, los ganglios linfáticos inguinales y el tumor obtenidas a partir de la población de linfocitos T CD3+ (figura 7.2). Al igual que en los linfocitos T CD3+ (Figura 7.2), se presentaron diferencia significativa debido al tumor y no al efecto de la denervación. Por otra parte, se observó disminución de los linfocitos T

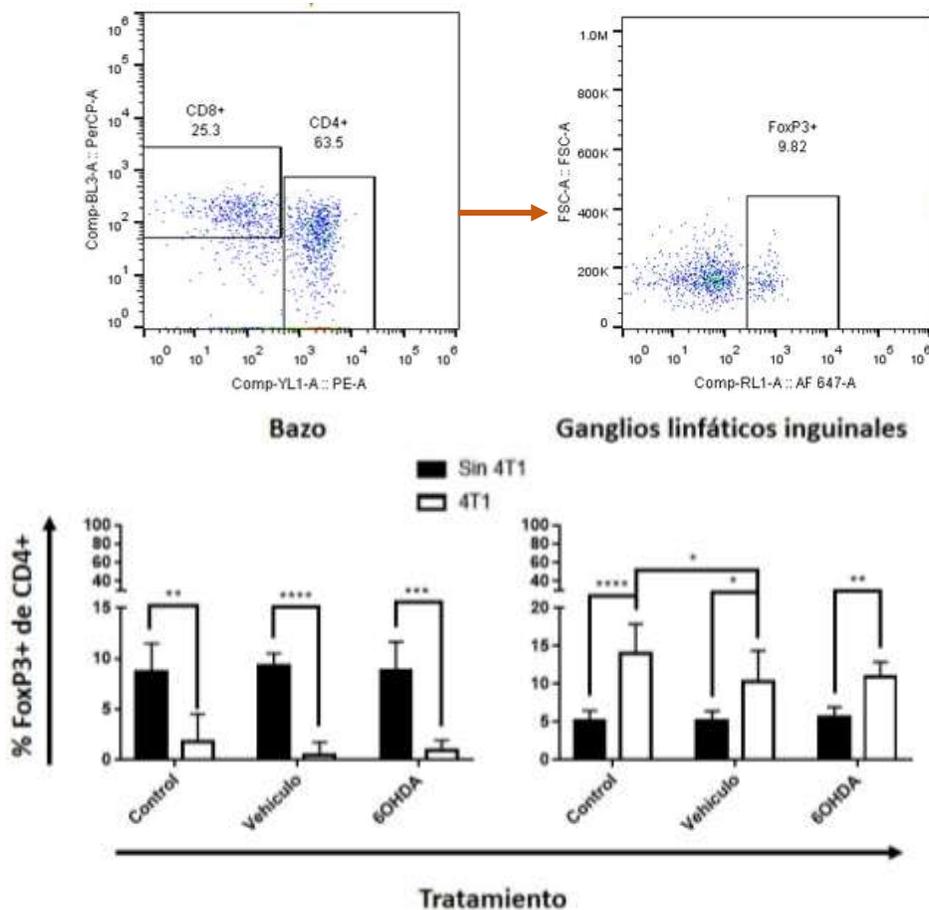
CD8+ en el bazo de animales tratados con vehículo y tratados con 6-OHDA respecto a su control sin tumor; sin embargo, en el grupo control no se detectó esta disminución, por lo que el efecto observado, sobre los linfocitos T CD8+, podría ser efecto del vehículo. Aunque en los ganglios linfáticos inguinales de animales con tumor y en las masas tumorales, se detectó un ligero aumento de esta subpoblación respecto a su control sin tumor, no se detectaron diferencias significativas.



**Figura 7.4 Porcentaje de linfocitos T CD8+ proveniente de linfocitos T CD3+.** Arriba: selección de subpoblaciones CD8+ (derecha) provenientes de los linfocitos T CD3+ (izquierda). Abajo: porcentaje de linfocitos T CD8+ en el bazo, los ganglios linfáticos inguinales y los tumores. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo y los ganglios linfáticos inguinales, para el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9, \*p<0.01, \*\*p<0.001.

La Figura 7.5, muestra el porcentaje de expresión de los linfocitos T positivos para FoxP3, que proviene de los linfocitos T CD4+ (Figura 7.3) en el bazo y los

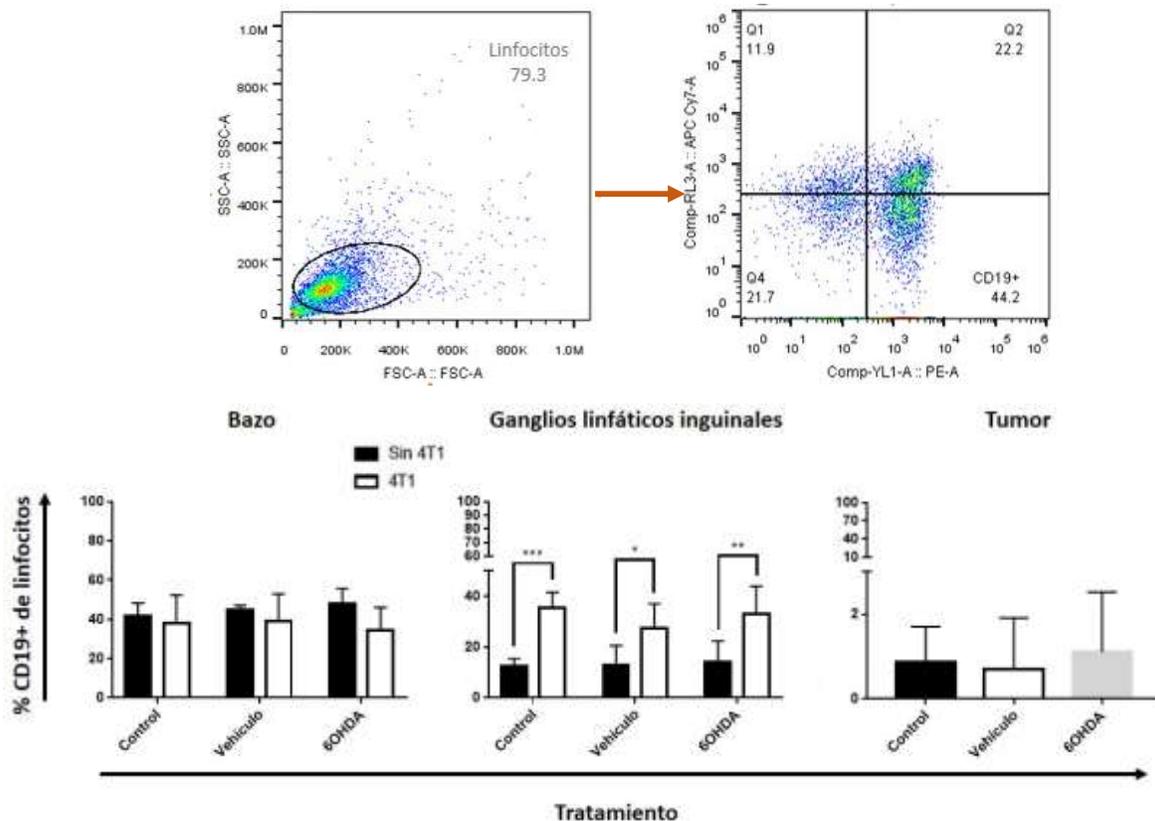
ganglios linfáticos inguinales. En el bazo, se presentó una disminución de los linfocitos T FoxP3+ en los animales que fueron inoculados con la línea celular 4T1 respecto a su control sin tumor independientemente del tratamiento (control, vehículo y 6-OHDA). En los ganglios linfáticos inguinales de los animales con tumor, se observó aumento de los linfocitos T FoxP3+ respecto a su control sin tumor independiente del tratamiento. Por otro lado, en los animales tratados con vehículo y con tumor (barra blanca) se presentó disminución de los linfocitos T FoxP3+ respecto al grupo control con tumor, lo que podría ser efecto del vehículo sobre los linfocitos FoxP3+. No se muestra la gráfica de los linfocitos T FoxP3+ en el tumor, ya que, como hemos observado en otros trabajos del laboratorio, aún después de la digestión del tumor el infiltrado leucocitario es bajo y se han utilizado métodos diferentes a la citometría de flujo, como la inmunofluorescencia para ser analizados.



**Figura 7.5** Porcentaje de linfocitos T FoxP3+ proveniente de linfocitos T CD4+. Arriba: selección de subpoblaciones FoxP3+ (derecha) provenientes de los linfocitos T CD4+ (izquierda). Abajo:

porcentaje de linfocitos FoxP3+ en el bazo y los ganglios linfáticos inguinales. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo y los ganglios linfáticos inguinales, para el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9, \*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001, \*\*\*\*p<0.00001.

En la Figura 7.6, se muestran los linfocitos B CD19+ proveniente de los linfocitos totales (Figura 7.2). En células del bazo, de los ganglios linfáticos inguinales y de las de masas tumorales. En el bazo, no se observan diferencias significativas ni entre tratamientos (control, vehículo y 6-OHDA) ni entre grupos (sin 4T1 y con 4T1); es decir, esta subpoblación se mantiene estable tanto por efecto de la denervación como por presencia del tumor. En los ganglios linfáticos inguinales aumentan los linfocitos B CD19+ independientemente del tratamiento. En los tumores no se observa diferencia significativa. No se observa efecto de la denervación simpática neonatal.



**Figura 7.6 Porcentaje de linfocitos B CD19+ proveniente de linfocitos totales.** Arriba: selección de subpoblación CD19+ (derecha) provenientes de los linfocitos T totales (izquierda). Abajo: porcentaje de linfocitos CD19+ en el bazo, los ganglios linfáticos inguinales y los tumores. Las barras

se muestran con desviación estándar. En el bazo y los ganglios linfáticos inguinales, para el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9, \*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

En la Figura 7.7, se presentan los macrófagos F4/80+ obtenidos de células grandes y granulares del bazo y los tumores. En el bazo de animales con tumor (barras blancas), se observó disminución de los macrófagos en animales denervados neonatalmente respecto a los tratados con vehículo. En las células de tumor no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (control, vehículo y 6-OHDA). Para los ganglios linfáticos no se muestra la gráfica ya que los porcentajes obtenidos son aproximadamente del 0.5%, que caen dentro del error metodológico de la citometría de flujo.

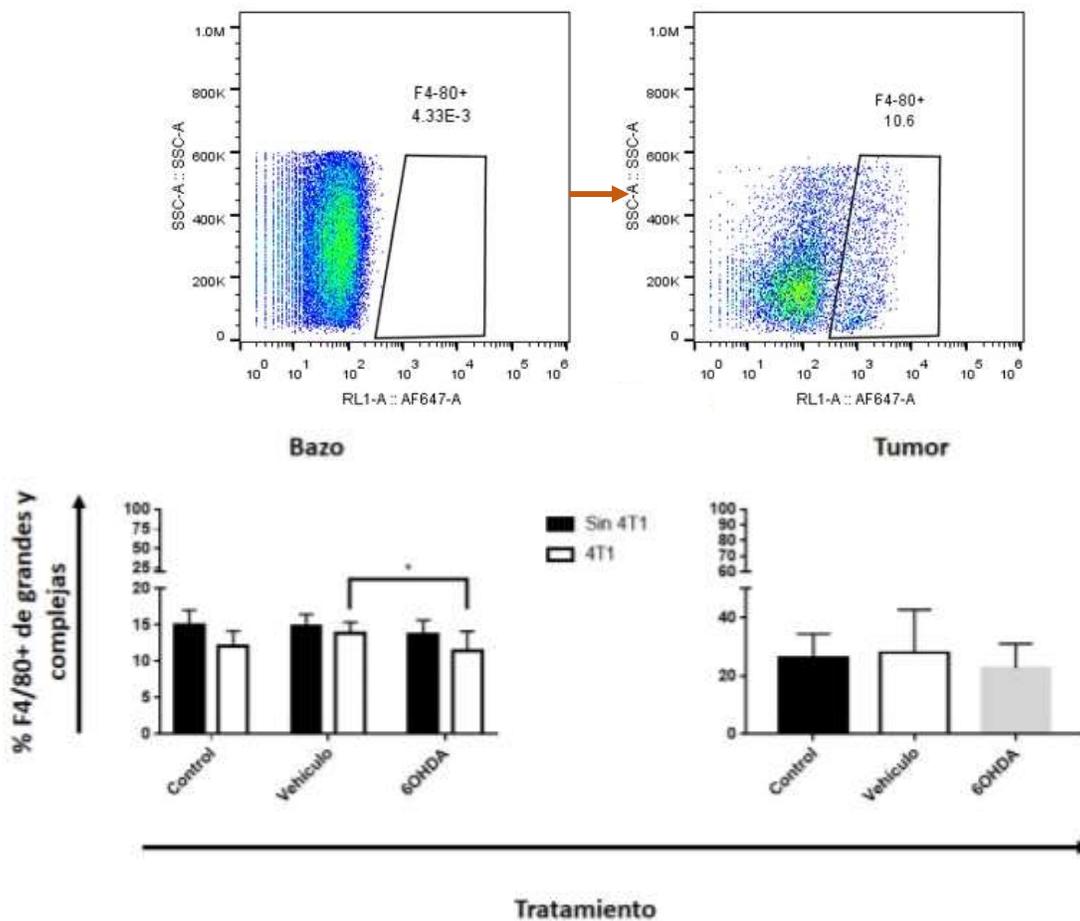
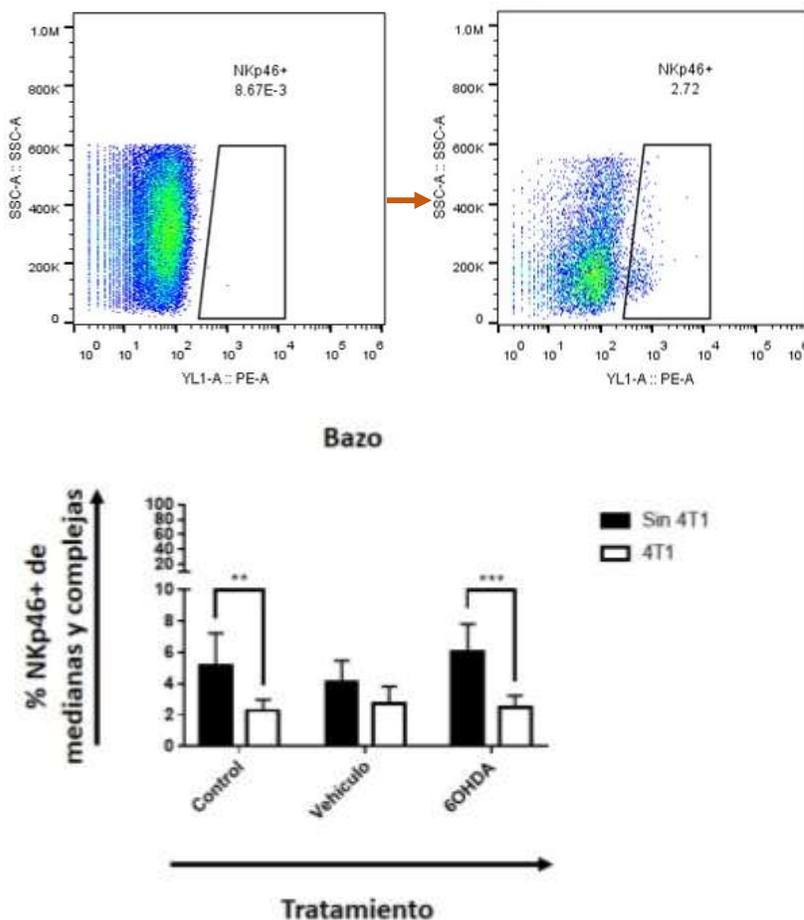


Figura 7.7 Porcentaje de macrófagos F4/80+ proveniente de células grandes y complejas. Arriba: selección de macrófagos F4/80+ (derecha) respecto a su control son teñir (izquierda). Abajo:

porcentaje de macrófagos F4/80+ en el bazo y los tumores. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo: el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9, \*p<0.01.

En la Figura 7.8, se presentan las células NK del bazo. Se observa disminución de las células NK en los animales con tumor de los grupos control y tratados con 6OHDA (barras blancas) respecto a su grupo sin tumor (barras negras). Sin embargo, en los animales tratados con vehículo, no se observaron diferencias significativas. No se obtuvieron diferencias entre tratamientos, solamente debido a la presencia de tumor. Para los ganglios linfáticos y las masas tumorales, no se presentan las gráficas ya que los porcentajes obtenidos en ambos tejidos, son aproximadamente del 0.5%, que caen dentro del error metodológico de la citometría de flujo.



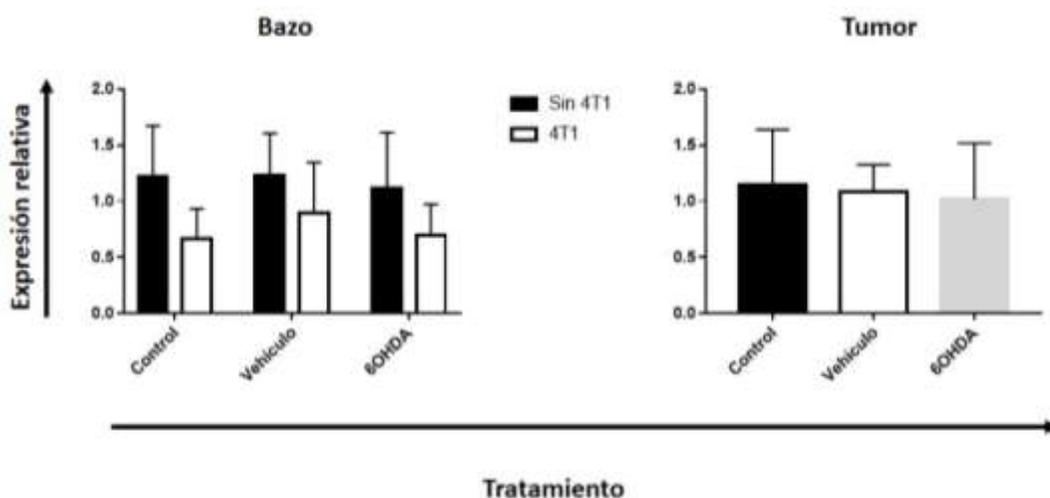
**Figura 7.8** Porcentaje de células NKp46+ proveniente de células pequeñas y complejas del bazo. Arriba: selección de células NKp46+ (derecha) respecto a su control son teñir (izquierda). Abajo: porcentaje de células NKp46+ en el bazo. Las barras se muestran con desviación estándar. El grupo

“sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=6, vehículo n=9, 6OHDA n=9, \*p<0.001, \*\*\*p<0.0001.

En los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, no se observa que la denervación modificara a las poblaciones celulares evaluadas. En algunas subpoblaciones celulares, se aprecia efecto del vehículo.

Se realizó también cuantificación de citocinas por RT-PCR punto final, en bazo y masas tumorales, y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

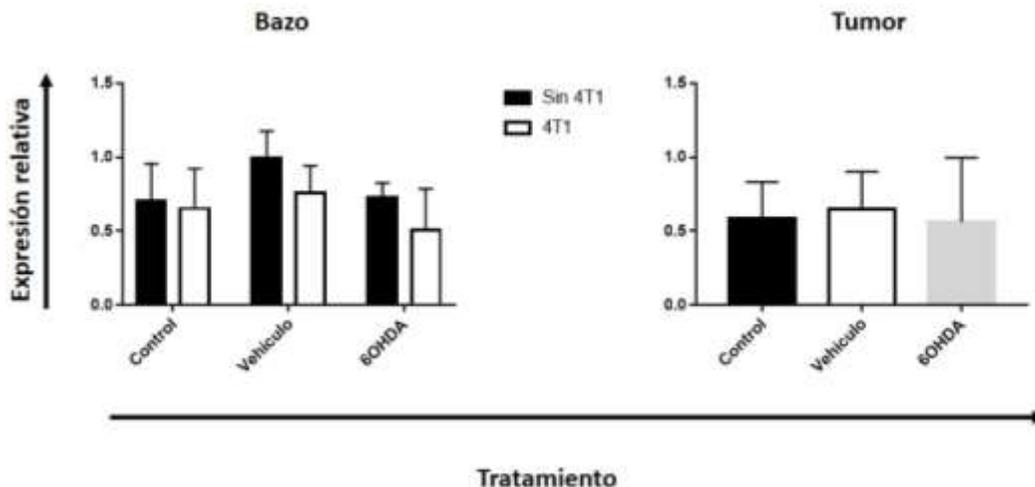
En la Figura 7.9, se observa la expresión relativa de IFN- $\gamma$  en bazo y en masas tumorales. En ninguna de las gráficas se observa diferencia significativa entre grupos (4T1 y sin 4T1) ni entre tratamientos (control, vehículo y 6OHDA), aunque en el bazo, se observa disminución de la expresión relativa del IFN-  $\gamma$  en animales con tumores respecto a su control sin tumor, pero no es estadísticamente significativa.



**Figura 7.9 Expresión relativa de IFN- $\gamma$ .** Se observa expresión relativa de IFN- $\gamma$  en el bazo y el tumor. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo: el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=5, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=5, vehículo n=9, 6OHDA n=7.

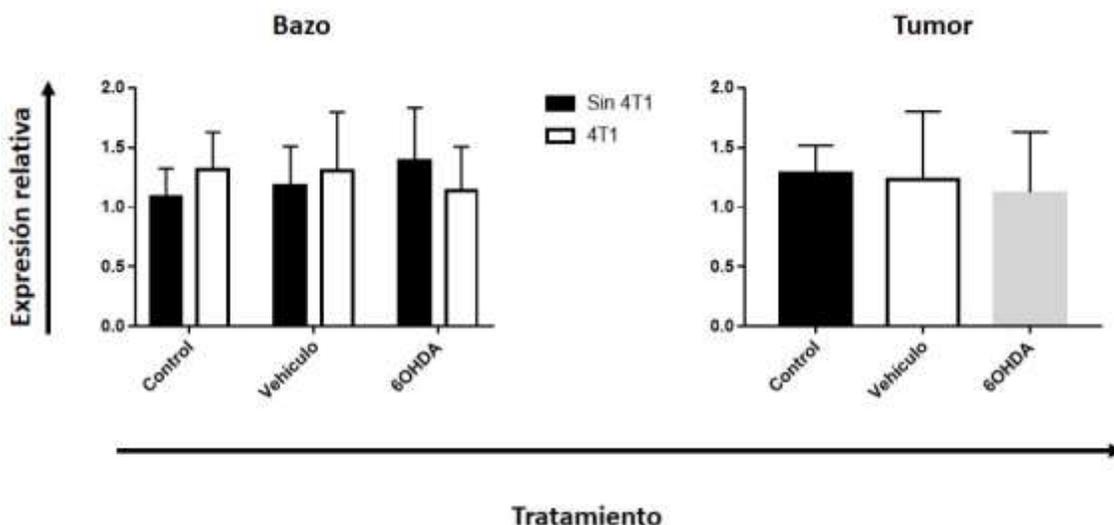
La expresión relativa de TNF- $\alpha$  se presenta en la Figura 7.10, tanto en el bazo como en los tumores. Al igual que en la Figura anterior, no existen diferencias significativas entre grupos ni entre tratamientos. En el bazo, a pesar de que en la gráfica se observa aumento de la expresión relativa de esta citosina en los animales tratados con vehículo (barra negra) respecto a los animales control (barra negra), no

se observó diferencia significativa. En los tumores no se observan diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 7.10 Expresión relativa de TNF- $\alpha$ .** Se observa expresión relativa de TNF- $\alpha$  en el bazo y el tumor. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo: el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=6, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=5, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=5, vehículo n=9, 6OHDA n=9.

Respecto al TGF- $\beta$  (Figura 7.11), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, ni entre grupos o debidas a los tratamientos. Se presentan los resultados de la expresión relativa de TGF- $\beta$  en el bazo y los tumores. No es observable ningún cambio en la expresión relativa de esta citocina por lo que tampoco es posible observar que la denervación tenga efecto en la síntesis de citocinas.



**Figura 7.11 Expresión relativa de TGF- $\beta$ .** Se observa expresión relativa de TGF- $\beta$  en el bazo y el tumor. Las barras se muestran con desviación estándar. En el bazo: el grupo “sin 4T1” control n=7, vehículo n=5, 6OHDA n=6; para el grupo “4T1” control n=5, vehículo n=9, 6OHDA n=9. En el tumor: control n=4, vehículo n=8, 6OHDA n=7.

## 8. DISCUSIÓN

No se detectó un efecto de la denervación en los elementos de la respuesta inmune al cáncer de mama, así como tampoco en la producción de citocinas. Sin embargo, existen reportes experimentales en animales que documentan que la denervación simpática neonatal en la edad adulta produce cambios en la modulación de la respuesta inmune<sup>115</sup>, aunque en estos modelos el estímulo antigénico es diferente.

Aunque las masas tumorales de animales denervados visualmente se observaron con mayor peso y volumen (Figura 7.1), estadísticamente no existen diferencias significativas entre los grupos, debido a que se presentó mucha heterogeneidad en los resultados. Sin embargo, se ha descrito que las masas tumorales de los animales denervados son más pequeñas respecto a los controles<sup>108</sup>, contrario a lo que se esperaba en este trabajo; pero se trata de modelos animales y esquemas de denervación diferentes. De igual manera, en un modelo de cáncer de próstata, con denervación simpática neonatal, se observan tumores más pequeños; cabe resaltar que son animales desnudos, los cuales no cuentan con sistema inmunitario adaptativo, en comparación con los animales utilizados en este trabajo, quienes tienen un sistema inmunitario intacto.<sup>91</sup>

Madden et al, y Sloan et al, han descrito que en los animales sometidos a condiciones experimentales de estrés, se promueve la modulación de la respuesta inmunitaria y el aumento de las masas tumorales<sup>86,87</sup>. Sin embargo, en estos modelos experimentales, se involucra la señalización  $\beta$ -adrenérgicos *per se*, ya sea sobre células del sistema inmunitario<sup>87</sup> o directamente en las células tumorales<sup>86</sup>. Respecto a la línea celular 4T1 y la expresión de receptores del sistema adrenérgico, lo reportado en la literatura es contradictorio, ya que Szpunar et al documentaron que

esta línea celular no expresa receptores  $\beta$ -adrenérgicos en estudios *in vitro*<sup>117</sup>; sin embargo, Kang et al, reportaron que este receptor se expresa ampliamente en las células 4T1 también en estudios *in vitro*<sup>118</sup>. Sería interesante, realizar una evaluación en condiciones estresantes en animales sometidos a denervación neonatal y la progresión de los tumores de la glándula mamaria inducida experimentalmente, ya que las células del sistema inmunitario expresan receptores del sistema adrenérgico<sup>47,53</sup> y es posible que la activación sea diferente en condiciones estresantes posteriores a la denervación simpática neonatal. También, podría evaluarse la expresión de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en los tumores *ex vivo*; no solo en condiciones *in vitro* debido a que estos estudios no contemplan el microambiente en el que se desarrollan los tumores.

Respecto a las poblaciones de linfocitos CD3+ (Figura 7.2-bazo), no se detectaron diferencias entre los tratamientos (control, vehículo y 6-OHDA), sólo genera diferencia la presencia del tumor. Sin embargo, en los animales denervados, no se observa diferencia significativa entre animales con tumor y sin tumor, esto puede ser resultado de la administración del vehículo (ácido ascórbico al 0.01%) ya que en estos grupos se observan diferencias significativas. Este dato concuerda con lo descrito por Horvathova et al, donde el porcentaje de los linfocitos no se modificó por la denervación, pero si el porcentaje de neutrófilos<sup>119</sup>, los cuales no fueron evaluados en el presente trabajo. En los ganglios linfáticos y en las masas tumorales no se observan diferencias significativas entre grupos ni entre tratamientos.

En la subpoblación de linfocitos T cooperadores (CD4+) (Figura 7.3), no se detectaron diferencias significativas, entre los tratamientos, ni entre los grupos en ninguno de los tejidos evaluados, que corresponde con lo mencionado anteriormente.

En los CTLs, se observa efecto del vehículo en el porcentaje de ésta subpoblación, ya que las diferencias observadas se presentan en animales tratados con el vehículo y en animales denervados, esto se presenta en el bazo (figura 7.4). Es posible que se deba a la administración neonatal del vehículo sobre las células del sistema inmune presentes en estos tejidos, aunque en la literatura no se ha descrito nada al respecto. Sin embargo, se ha reportado que la denervación simpática

en la edad adulta incrementa la habilidad de las células dendríticas de activar a los linfocitos T vírgenes<sup>120</sup>.

La subpoblación celular más afectada en la respuesta inmune al cáncer de mama son los linfocitos T reguladores, los cuales disminuyen en el bazo (figura 7.5-bazo) de animales con tumores respecto a su control sin tumor, independientemente del tratamiento. Sin embargo, en los ganglios linfáticos, se observa lo contrario (figura 7.5-ganglios linfáticos inguinales). Esto puede ser consecuencia de que los linfocitos migran del bazo hacia los ganglios linfáticos cercanos al tumor para poder salir al sitio del tumor y ejercer su acción efectora, además que, como parte de los mecanismos de evasión del tumor, se lleva a cabo la proliferación de los linfocitos T reguladores que favorecen un ambiente protumoral<sup>16,35,36</sup>.

Los linfocitos B, otro subtipo celular importante en el control inmunológico del cáncer de mama, únicamente aumentó esta subpoblación en los ganglios linfáticos con respecto a su control sin tumor independientemente del tratamiento (figura 7.6-ganglios linfáticos inguinales). Esto puede deberse a un aumento en la proliferación para ejercer su efecto antitumoral, aunque este mecanismo debería evaluarse experimentalmente para poder emitir una conclusión respecto a esta subpoblación.

En los macrófagos (figura 7.7-bazo), solamente se observa diferencia significativa entre los grupos de animales administrados con vehículo y los denervados, ambos con tumores de glándula mamaria, esto podría ser causa de la acción del vehículo sobre esta subpoblación celular, así como se ha observado en otras subpoblaciones (linfocitos T CD8+, linfocitos T FoxP3+ y macrófagos F4/80+). Se tendría que evaluar *in vitro* la acción de este compuesto sobre las poblaciones celulares. A pesar de ser un nutriente para el organismo, parece tener efectos en los porcentajes de algunas células del sistema inmune. En las masas tumorales (figura 7.7-tumor) no se observan diferencias significativas.

Para las células NK, solamente se evaluó el bazo (figura 7.8) ya que el porcentaje de esta subpoblación en masas tumorales y ganglios linfáticos obtenida mediante citometría de flujo resultó muy baja, alrededor de 0.5%, por lo que se encuentra dentro del error del método analítico, esto se ha demostrado en diversos

trabajos de este grupo de investigación. Solamente se detectaron diferencias significativas entre animales con tumor independientemente del tratamiento, esta población celular disminuye en los animales controles y en los denervados con tumor respecto a su control sin tumor. En el vehículo no se observan diferencias significativas (figura 7.8).

Finalmente, respecto a las citocinas evaluadas IFN- $\gamma$  (figura 7.9), TNF- $\alpha$  (figura 7.10) y TGF- $\beta$  (figura 7.11), no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ni entre tratamientos ni entre grupos. Se ha reportado que la denervación crónica, modifica la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias; empero, se trata de modelos de denervación diferentes al empleado en el presente trabajo<sup>121</sup>. Asimismo, se ha descrito que la eliminación de neuronas noradrenérgicas en el cerebro altera la producción de citocinas en sitios distantes como el bazo<sup>122</sup>.

En resumen, los resultados obtenidos muestran solamente efecto por la inducción del tumor, pero no por la denervación, lo que sugiere que con este modelo o esquema de denervación no se detecta algún efecto sobre las células del sistema inmune contra la inducción de tumores de glándula mamaria como reto antigénico.

## **9. CONCLUSIONES**

1. La denervación simpática neonatal no afectó el desarrollo de masas tumorales de glándula mamaria inducidas experimentalmente.
2. La denervación no afectó las subpoblaciones celulares del bazo involucradas en el control inmunitario del cáncer de mama.
3. La denervación simpática neonatal no altera los porcentajes de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores, linfocitos B, células NK y macrófagos asociados a tumores en ganglios linfáticos inguinales de ratones controles y denervados con y sin tumores

4. Los porcentajes de de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, li9nfocitos T CD8+, linfocitos T reguladores, linfocitos B, células NK y macrófagos asociados a tumores analizados no se afectan por denervación simpática neonatal
5. La secreción de citocinas en el bazo, no se modifica por la acción de la denervación en animales con tumor.
6. La expresión del mRNA de TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en las masas tumorales no se afecta por acción de la denervación simpática neonatal.

## 10. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos del presente trabajo, se proponen las siguientes perspectivas:

1. Evaluar si la línea celular 4T1 expresa receptores adrenérgicos, ya que lo reportado en la literatura muestra contradicciones.
2. Analizar el efecto de condiciones estresantes en animales denervados neonatalmente y la respuesta inmune al cáncer de mama.
3. Realizar denervación en la etapa adulta previa a la inducción de los tumores de glándula mamaria.
4. Realizar denervación en la etapa adulta previa a la inducción de los tumores de glándula mamaria y someter al animal a condiciones estresantes para observar si existe modulación de la respuesta inmune y la progresión de los tumores.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Schnitt, S. J. & Lakhani, S. R. *Breast Cancer. World Cancer Report 2014* (2014).
2. Golubnitschaja, O. *et al.* Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. *Tumor Biol.* 1–17 (2016). doi:10.1007/s13277-016-5168-x
3. Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic

- targeting of the microenvironment. *Cell. Signal.* **26**, 2843–2856 (2014).
4. Forman, D. & Ferlay, J. *The global and regional burden of cancer. World Cancer Report 2014* (2014). doi:9283204298
  5. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Cell Biol.* **100**, 3983–3988 (2003).
  6. Secretaría de Salud. *Compendio de Patología Mamaria. Secretaría de Salud* **1**, (2009).
  7. Li, C. I., Uribe, D. J. & Daling, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br. J. Cancer* **93**, 1046–1052 (2005).
  8. Sarrió, D. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* **68**, 989–997 (2008).
  9. Wu, Y., Sarkissyan, M. & Vadgama, J. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **5**, 13 (2016).
  10. Augustine, T. N., Dix-Peek, T., Duarte, R. & Candy, G. P. Establishment of a heterotypic 3D culture system to evaluate the interaction of TREG lymphocytes and NK cells with breast cancer. *J. Immunol. Methods* **426**, 1–13 (2015).
  11. Arango-Prado, M. del C., Faxas-García, M. E., Álvarez-Goyanez, I., Camacho-Rodríguez, R. & Rodríguez-Padilla, C. Compromiso del sistema inmune en pacientes con cáncer de mama. *Cancerología* **3**, 191–197 (2008).
  12. Nava-Castro, K. E. *et al.* The immunoendocrine network in breast cancer. *Adv. Neuroimmune Biol.* **5**, 109–131 (2014).
  13. Jiang, X. & Shapiro, D. J. The immune system and inflammation in breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 673–682 (2014).
  14. Arango-Prado, M. del C. *et al.* Deficit de la actividad NK en pacientes con cáncer de mama avanzado. *Cancerología* **3**, 183–189 (2008).

15. Augustine, T. N., Dix-Peek, T., Duarte, R. & Candy, G. P. Establishment of a heterotypic 3D culture system to evaluate the interaction of TREGlymphocytes and NK cells with breast cancer. *J. Immunol. Methods* **426**, 1–13 (2015).
16. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. *Immunology* **121**, 1–14 (2007).
17. Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 265–277 (2012).
18. Hamilos, D. L. Antigen presenting cells. *Immunol. Res.* **8**, 98–117 (1989).
19. Singh, S. *et al.* Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. *Biochim. Open* **4**, 8–18 (2017).
20. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
21. Sosale, N. G., Spinler, K. R., Alvey, C. & Discher, D. E. Macrophage engulfment of a cell or nanoparticle is regulated by unavoidable opsonization , a species- specific ‘ Marker of Self ’ CD47 , and target physical properties. *Curr. Opin. Immunol.* **35**, 107–112 (2015).
22. De Palma, M. & Lewis, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* **23**, 277–286 (2013).
23. Ruffell, B., Affara, N. I. & Coussens, L. M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* **33**, 119–126 (2012).
24. Laoui, D. *et al.* Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol* **55**, 719–729 (2011).
25. Liu, S. *et al.* CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* **14**, R48 (2012).
26. Chraa, D., Naim, A., Olive, D. & Badou, A. T lymphocyte subsets in cancer

- immunity: Friends or foes. *J. Leukoc. Biol.* 1–13 (2018).  
doi:10.1002/JLB.MR0318-097R
27. Gu-Trantien, C. *et al.* CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* **123**, 2873–2892 (2013).
  28. Nishimura, T. *et al.* Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. *J. Exp. Med.* **190**, 617–628 (1999).
  29. Salgado, R. *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann. Oncol.* **26**, 259–271 (2015).
  30. Mahmoud, S. M. A. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1949–1955 (2011).
  31. Varn, F. S., Mullins, D. W., Arias-Pulido, H., Fiering, S. & Cheng, C. Adaptive immunity programs in breast cancer. *Immunology* (2016).  
doi:10.1111/imm.12664
  32. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and molecular immunology*. (Elsevier Saunders, 2015).
  33. DeNardo, D. G. & Coussens, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* **9**, 212 (2007).
  34. Sabel, M. S. & Nehs, M. A. Immunologic approaches to breast cancer treatment. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **14**, 1–31 (2005).
  35. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715–727 (2006).
  36. Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 267–

296 (2007).

37. Vinay, D. S. *et al.* Immune evasion in cancer : Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* **35**, S185–S198 (2015).
38. Serafini, P. & Bronte, V. in *Tumor-Induced Immune Suppression* (eds. Gabrilovich, D. I. & Hwang, A. A.) 99–150 (Springer, 2014).
39. Azuma, T. *et al.* B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* **111**, 3635–3644 (2008).
40. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis : A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793–800 (2002).
41. Leek, R. D. *et al.* Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* **190**, 430–436 (2000).
42. Mantovani, A. & Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 231–237 (2010).
43. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
44. Méndez-García, L. A. *et al.* Breast Cancer Metastasis: Are Cytokines Important Players During Its Development and Progression? *J. Interf. Cytokine Res.* **39**, jir.2018.0024 (2018).
45. Charlton, M. & Thompson, J. P. Drugs affecting the autonomic nervous system. *Anaesth. Intensive Care Med.* **17**, 575–580 (2016).
46. Rang, H., Dale, M., Ritter, J. & Flower, R. in *Farmacología* (eds. Rang, H., Dale, M., Ritter, J. & Flower, R.) 168–188 (Elsevier, 2008).
47. Bellinger, D. L. & Lorton, D. Autonomic regulation of cellular immune function. *Auton. Neurosci.* **182**, 15–41 (2014).
48. Bellinger, D. L. *et al.* Sympathetic modulation of immunity: Relevance to disease. *Cell. Immunol.* **252**, 27–56 (2008).

49. Nance, D. M. & Sanders, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain. Behav. Immun.* **21**, 736–745 (2007).
50. Jänig, W. Sympathetic nervous system and inflammation: A conceptual view. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **182**, 4–14 (2014).
51. Madden, K. S. Sympathetic neural-immune interactions regulate hematopoiesis, thermoregulation and inflammation in mammals. *Dev. Comp. Immunol.* **66**, 92–97 (2017).
52. Bellinger, D. L. *et al.* Innervation of lymphoid organs: Clinical implications. *Clin. Neurosci. Res.* **6**, 3–33 (2006).
53. Elenkov, I. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. & Vizi, E. S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* **52**, 595–638 (2000).
54. Klein, R. L., Wilson, S. P., Dzielak, D. J., Yang, W. H. & Viveros, O. H. Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. *Neuroscience* **7**, 2255–2261 (1982).
55. Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatics. *Nature* **523**, 337–341 (2015).
56. Nakai, A., Hayano, Y., Furuta, F., Noda, M. & Suzuki, K. Control of lymphocyte egress from lymph nodes through  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *J. Exp. Med.* **211**, 2583–2598 (2014).
57. Sloan, E. K., Capitanio, J. P. & Cole, S. W. Stress-induced remodeling of lymphoid innervation. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 15–21 (2008).
58. Sarkar, C., Chakroborty, D. & Basu, S. Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: The role of catecholamines. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 7–14 (2013).
59. Kim, T.-H., Rowat, A. C. & Sloan, E. K. Neural regulation of cancer: from mechanobiology to inflammation. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, e78 (2016).

60. Takamoto, T. *et al.* Norepinephrine Inhibits Human Natural Killer Cell Activity in Vitro. *Int. J. Neurosci.* **58**, 127–131 (1991).
61. Benschop, R. J., Schedlowski, M., Wienecke, H., Jacobs, R. & Schmidt, R. E. Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. *Brain. Behav. Immun.* **11**, 321–332 (1997).
62. Xiao, J., Huang, H., Peng, Y., Huang, J. & Qiu, Y. Modulation of natural killer cell function by alpha-adrenoreceptor-coupled signalling. *Neuro Endocrinol. Lett.* **31**, 635–644 (2010).
63. Rosati, C., Hannaert, P., Dausse, J. -P, Braquet, P. & Garay, R. Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits calcium-dependent potassium-channels in mouse macrophages. *J. Cell. Physiol.* **129**, 310–314 (1986).
64. Tan, K. S. *et al.*  $\beta$ 2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF- $\kappa$ B-independent mechanisms. *Cell. Signal.* **19**, 251–260 (2007).
65. García, J. J., Sáez, M. del C., De la Fuente, M. & Ortega Rincón, E. Regulation of phagocytic process of macrophages by noradrenaline and its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxyphenyl-glycol. Role of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoreceptors. *Mol. Cell. Biochem.* **254**, 299–304 (2003).
66. Sanders, V. M. *et al.* Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J. Immunol.* **158**, 4200–4210 (1997).
67. Marino, F. & Cosentino, M. Adrenergic modulation of immune cells: An update. *Amino Acids* **45**, 55–71 (2013).
68. Takenaka, M. C., Guerreschi, M. G. & Basso, A. S. Neuroimmune interactions: dendritic cell modulation by the sympathetic nervous system. *Semin. Immunopathol.* **39**, 165–176 (2017).
69. Goyarts, E. *et al.* Norepinephrine modulates human dendritic cell activation by altering cytokine release. *Exp. Dermatol.* **17**, 188–196 (2008).

70. Herve, J. *et al.* 2-Adrenoreceptor Agonist Inhibits Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells. *J. Immunol.* **190**, 3163–3171 (2013).
71. Fan, X. & Wang, Y.  $\beta$ 2 Adrenergic receptor on T lymphocytes and its clinical implications. *Prog. Nat. Sci.* **19**, 17–23 (2009).
72. Kohm, A. P. & Sanders, V. M. Norepinephrine and  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Stimulation Regulate CD4<sup>+</sup> T and B Lymphocyte Function in Vitro and in Vivo. **53**, 487–525 (2001).
73. Borger, P. *et al.*  $\beta$ -Adrenoceptor-mediated Inhibition of IFN- $\gamma$ , IL-3, and GM-CSF mRNA Accumulation in Activated Human T Lymphocytes Is Solely Mediated by the  $\beta$ 2-Adrenoceptor Subtype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 400–407 (1998).
74. Panina-Bordignon, P. *et al.* Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J. Clin. Invest.* **100**, 1513–1519 (1997).
75. Slota, C., Shi, A., Chen, G., Bevans, M. & Weng, N. Norepinephrine preferentially modulates memory CD8 T cell function inducing inflammatory cytokine production and reducing proliferation in response to activation. *Brain Behav. Immun.* **46**, 168–179 (2015).
76. Cook-Mills, J. M., Mokyry, M. B., Cohen, R. L., Perlman, R. L. & Chambers, D. A. Neurotransmitter suppression of the in vitro generation of a cytotoxic T lymphocyte response against the syngeneic MOPC-315 plasmacytoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **40**, 79–87 (1995).
77. Padro, C. J. & Sanders, V. M. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin. Immunol.* **26**, 357–368 (2014).
78. Sanders, V. M. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: Do we understand it yet? *Brain. Behav. Immun.* **26**, 195–200 (2012).
79. Madden, K. S., Szpunar, M. J. & Brown, E. B. Beta-Adrenergic receptors (B-AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high B-AR-

- expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 747–758 (2011).
80. Powe, D. G. *et al.* Alpha- and beta-adrenergic receptor (AR) protein expression is associated with poor clinical outcome in breast cancer: An immunohistochemical study. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 457–463 (2011).
  81. Du, Y. *et al.* Association of alpha2a and beta2 adrenoceptor expression with clinical outcome in breast cancer. *Curr Med Res Opin* **30**, 1337–1344 (2014).
  82. Pon, C. K., Lane, J. R., Sloan, E. K. & Halls, M. L. The B2-adrenoceptor activates a positive cAMP-calcium feedforward loop to drive breast cancer cell invasion. *FASEB J.* **30**, 1144–1154 (2016).
  83. Pundavela, J. *et al.* Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Mol. Oncol.* **9**, 1626–1635 (2015).
  84. Voss, M. J. & Entschladen, F. Tumor interactions with soluble factors and the nervous system. *Cell Commun. Signal.* **8**, 21 (2010).
  85. Armaiz-Pena, G. N. *et al.* Src activation by  $\beta$ -adrenoreceptors is a key switch for tumour metastasis. *Nat. Commun.* **4**, 1403 (2013).
  86. Madden, K. S., Szpunar, M. J. & Brown, E. B. Early impact of social isolation and breast tumor progression in mice. *Brain. Behav. Immun.* **30**, S135–S141 (2013).
  87. Sloan, E. K. *et al.* The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 7042–7052 (2010).
  88. Choy, C. *et al.* Inhibition of  $\beta$ 2-adrenergic receptor reduces triple-negative breast cancer brain metastases: The potential benefit of perioperative  $\beta$ -blockade. *Oncol. Rep.* **35**, 3135–42 (2016).
  89. Szpunar, M. J., Belcher, E. K., Dawes, R. P. & Madden, K. S. Sympathetic innervation, norepinephrine content, and norepinephrine turnover in orthotopic

- and spontaneous models of breast cancer. *Brain. Behav. Immun.* **53**, 223–233 (2016).
90. Cole, S. W., Nagaraja, A. S., Lutgendorf, S. K. & Green, P. A. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 563–572 (2015).
  91. Magnon, C. *et al.* Autonomic Nerve Development Cancer Progression. *Science* **341**, 1–10 (2013).
  92. Ayala, G. E. *et al.* Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 7593–7603 (2008).
  93. Lutgendorf, S. K. *et al.* Social isolation is associated with elevated tumor norepinephrine in ovarian carcinoma patients. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 250–255 (2011).
  94. Eleftheriou, F. Chronic stress, sympathetic activation and skeletal metastasis of breast cancer cells. *Bonekey Rep.* **4**, 1–6 (2015).
  95. Stallaert, W., Dorn, J. F., van der Westhuizen, E., Audet, M. & Bouvier, M. Impedance responses reveal B2-adrenergic receptor signaling pluridimensionality and allow classification of ligands with distinct signaling profiles. *PLoS One* **7**, (2012).
  96. Monteith, G. R., Davis, F. M. & Roberts-Thomson, S. J. Calcium channels and pumps in cancer: Changes and consequences. *J. Biol. Chem.* **287**, 31666–31673 (2012).
  97. Hara, M. R. *et al.* A stress response pathway regulates DNA damage through  $\beta$ 2-adrenoreceptors and  $\beta$ -arrestin-1. *Nature* **477**, 349–353 (2011).
  98. Wolter, J. K. *et al.* Anti-tumor activity of the beta-adrenergic receptor antagonist propranolol in neuroblastoma ABSTRACT : **5**, (2013).
  99. Shi, M. *et al.* The  $\beta$ 2-adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **125**,

- 351–362 (2011).
100. Melhem-Bertrandt, A. *et al.* Beta-blocker use is associated with improved relapse-free survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2645–2652 (2011).
  101. Powe, D. G. *et al.* Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. *Oncotarget* **1**, 628–38 (2010).
  102. Cole, S. W. & Sood, A. K. Molecular pathways: Beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1201–1206 (2012).
  103. Marotti, J., de Abreu, F., Wells, W. & Tsongalis, G. Triple-Negative Breast Cancer: Next-Generation Sequencing for Target Identification. *Am. J. Pathol.* **187**, 2133–2138 (2017).
  104. Eleftheriou, F. Role of sympathetic nerves in the establishment of metastatic breast cancer cells in bone. *J. Bone Oncol.* **5**, 132–134 (2016).
  105. Saloman, J. L., Albers, K. M., Rhim, A. D. & Davis, B. M. Can Stopping Nerves, Stop Cancer? *Trends Neurosci.* **39**, 880–889 (2016).
  106. Besedovsky, H. O. & del Rey, A. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocr. Rev.* **17**, 64–102 (1996).
  107. Hanoun, M., Maryanovich, M., Arnal-Estapé, A. & Frenette, P. S. Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer. *Neuron* **86**, 360–373 (2015).
  108. Qin, J. F. *et al.* Adrenergic receptor B2 activation by stress promotes breast cancer progression through macrophages M2 polarization in tumor microenvironment. *BMB Rep.* **48**, 295–300 (2015).
  109. Huan, H. bo *et al.* Sympathetic nervous system promotes hepatocarcinogenesis by modulating inflammation through activation of alpha1-adrenergic receptors of Kupffer cells. *Brain. Behav. Immun.* **59**, 118–

- 134 (2017).
110. Le, C. P. *et al.* Chronic stress in mice remodels lymph vasculature to promote tumour cell dissemination. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
  111. Chang, A. *et al.*  $\beta$ 2-Adrenoceptors on tumor cells play a critical role in stress-enhanced metastasis in a mouse model of breast cancer. *Brain. Behav. Immun.* **57**, 106–115 (2016).
  112. Pimentel, M. A., Chai, M. G., Le, C. P., Cole, S. W. & Sloan, E. K. Beta-Adrenergic Signaling Promotes Metastasis.
  113. Rodriguez-Pallares, J. *et al.* Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* **103**, 145–156 (2007).
  114. Simola, N., Morelli, M. & Carta, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* **11**, 151–167 (2007).
  115. Roggero, E. *et al.* The sympathetic nervous system affects the susceptibility and course of *Trypanosoma cruzi* infection. *Brain. Behav. Immun.* (2016). doi:10.1016/j.bbi.2016.07.163
  116. Reder, A., Checinski, M. & Chelmicka-Schorr, E. The Effect of Chemical Sympathectomy Killer Cells in Mice ' on Natural. *Brain. Behav. Immun.* **3**, 110–118 (1989).
  117. Szpunar, M. J., Burke, K. A., Dawes, R. P., Brown, E. B. & Madden, K. S. The antidepressant desipramine and  $\alpha$ 2-adrenergic receptor activation promote breast tumor progression in association with altered collagen structure. *Cancer Prev. Res.* **6**, 1262–1272 (2013).
  118. Kang, F. *et al.* Propranolol Inhibits Glucose Metabolism and  $^{18}\text{F}$ -FDG Uptake of Breast Cancer Through Posttranscriptional Downregulation of Hexokinase-2. *J. Nucl. Med.* **55**, 439–445 (2014).

119. Horvathova, L. *et al.* Chemical sympathectomy increases neutrophil-to-lymphocyte ratio in tumor-bearing rats but does not influence cancer progression. *J. Neuroimmunol.* **278**, 255–261 (2015).
120. Grebe, K. M. *et al.* Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8+ T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5300–5 (2009).
121. Ruohonen, S. *et al.* Cytokine responses during chronic denervation. *J. Neuroinflammation* **2**, 26 (2005).
122. Engler, H. *et al.* Chemical destruction of brain noradrenergic neurons affects splenic cytokine production. *J. Neuroimmunol.* **219**, 75–80 (2010).