



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“ESTUDIO DE LA COMUNICACIÓN ENTRE MASTOCITOS Y  
CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER DE MAMA”**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**M.BE. ANGÉLICA APONTE LÓPEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. EZEQUIEL M. FUENTES PANANÁ**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN VIROLOGÍA Y CÁNCER,**  
**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO, FEDERICO GÓMEZ**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. SAMIRA MUÑOZ CRUZ**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES**  
**INFECCIOSAS Y PARASITARIAS, CENTRO MÉDICO NACIONAL**  
**SIGLO XXI, IMSS**

**DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA**  
**DEPTO. DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES**  
**BIOMÉDICAS, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2021**



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.

## RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa) afecta a millones de mujeres anualmente. Los mastocitos son componentes frecuentes en tumores de CaMa que podrían cumplir roles pro- y anti-tumorales durante la progresión tumoral. Entender la participación de mastocitos en CaMa, podría dar origen a nuevas terapias para controlar el crecimiento tumoral. En este estudio, caracterizamos in vitro la respuesta de mastocitos estimulados por células de CaMa, enfocándonos en la degranulación temprana y en la actividad transcripcional tardía. Usando líneas celulares de CaMa agresivas y no agresivas, así como, las líneas celulares HMC1 y LAD-2 de mastocitos, modelamos la comunicación y respuesta celular de mastocitos a los componentes secretados por células de CaMa. En éste estudio encontramos que ambas líneas de mastocitos son quimioatraídas por todas las líneas celulares de CaMa, siendo su activación principalmente inducida por una línea agresiva. Además, se encontraron diferencias en sus programas transcripcionales activos, tanto en su estado basal, como después de su activación. Dentro de los genes que mostraron diferencias en su expresión encontramos la regulación negativa de *SPP1*, *PDCD1*, *IL17A* y *TGFB1*, así como la regulación positiva de *KITLG* e *IFNG*. Una baja expresión de *SPP1* y la expresión alta de *KITLG* e *IFNG*, correlacionan con mayor supervivencia de pacientes con CaMa. Finalmente, la alteración en la expresión de los genes mencionados ha sido asociada con señales anti-tumorales, sugiriendo que los mastocitos pudieran participar en el control de tumores mamarios. Del mismo modo, utilizando *TPSAB1* como un marcador de mastocitos, pudimos confirmar que el infiltrado de estas células se asocia a buen pronóstico en las pacientes con CaMa,

## ABSTRACT

Breast cancer (BRCA) affects millions of women yearly. Mast cells (MCs) are common components of breast tumors with documented agonistic and antagonistic roles in tumor progression. Understanding the participation of MCs in BrC may lead to new therapies to control tumor growth. In this study, we looked into mechanistic models of MC responses triggered in vitro by BRCA cells, assessing both early degranulation and late transcriptional activities. We used aggressive and non-aggressive BRCA cells to model the progressive staging of the disease over HMC1 and LAD-2 human MC lines. We found that both MC lines were chemoattracted by all BRCA cells, but their activation was preferentially induced by aggressive lines. We also found differences in their active transcriptional programs, both at basal level and after stimulation. Among those genes with altered expression were down-regulated *SPP1*, *PDCD1*, *IL17A* and *TGFB1* and up-regulated *KITLG* and *IFNG*. A low expression of *SPP1* and a high expression of *KITLG* and *IFNG* were associated with increased overall survival of BRCA patients from public databases. The set of altered genes is more often associated with tumor stromas enriched with anti-tumoral signals, suggesting that MCs may participate in tumor control. Using *TPSAB1* as a marker of mast cells, we also confirmed the MC infiltrate as a factor of good prognosis in BRCA patients.

## **ABREVIATURAS**

CaMa. Cáncer de mama

CCLE. Del inglés “Cancer Cell Line Encyclopedia”

EGA. Del inglés “the European Genome-phenome Archive”

ELISA. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ER. Receptor de estrógenos

Fc $\epsilon$ RI. Receptor Fc de alta afinidad de IgE

FGF2. Factor 2 de crecimiento de fibroblastos

GEO. Del inglés “Gene Expression Omnibus”

HER2. Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal

MCP1. proteína quimioatrayente de monocitos 1

MC<sub>C</sub>. Matocitos quimasa positivos

MC<sub>T</sub>. Matocitos triptasa positivos

MC<sub>TC</sub>. Mastocitos triptasa y quimasa positivo

MDSC. Células supresoras de origen mieloide

MMPs. Del inglés “Matrix metalloproteinases”

OMS. Organización mundial de la salud

OPN. Osteopontina

PCA. Del inglés “Principal Component Analysis”

PGD2. Prostaglandina D2

PR. Receptor de progesterona

SCF. Del inglés “Stem cell factor”

SFB. Suero fetal bovino

TAMs. Del inglés “Tumor associated macrophages”

TGF $\beta$ . Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$

TEM. Transición epitelio mesénquima

TCGA. Del inglés “the Cancer Genome Atlas”

VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular

## **INDICE**

RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 Cáncer de mama .....	7
1.2 Microambiente tumoral en cáncer.....	9
1.3 Mastocitos.....	11
1.4 Mecanismos pro- y anti-tumorales de los mastocitos .....	16
1.5 Mastocitos en cáncer de mama .....	19
1.5 Modelos de líneas celulares de mastocitos .....	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	23
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	24
4. HIPÓTESIS .....	24

5. OBJETIVO GENERAL.....	24
5.1 Objetivos particulares .....	24
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS.....	25
6.1 Líneas celulares de cáncer de mama y mastocitos .....	25
6.2 Medios condicionados de células de cáncer de mama.....	26
6.3 Análisis de citocinas en medios condicionados de células de cáncer de mama.....	27
6.4 Ensayo de quimioatracción de mastocitos por efecto de los medios condicionados de células de cáncer de mama .....	27
6.5 Estimulación de mastocitos con medios condicionados derivados de células de cáncer de mama .....	28
6.6 Determinación de la degranulación de mastocitos a través de LAMP-1 por citometría de flujo .....	29
6.7 Determinación de la expresión por RT-PCR de los genes <i>IL-8</i> , <i>IL-5</i> y <i>VEGF</i> en mastocitos.....	29
6.8 Determinación de la expresión de genes asociados a inflamación y cáncer en mastocitos.....	31
6.9 Análisis bioinformático de vías y procesos biológicos afectadas en mastocitos.....	32
6.10 Determinación de la supervivencia de pacientes con CaMa.....	32
6.11 Evaluación de la expresión de genes característicos de mastocitos ( <i>TPSAB1</i> y <i>CMA1</i> ) en diferentes subtipos de CaMa .....	32
6.12 Análisis estadístico .....	33
7. RESULTADOS .....	33
7.1 Mastocitos HMC1 y LAD-2 no estimulados muestran niveles de expresión diferencial de genes asociados con inflamación y cáncer .....	33

7.2 Componentes secretados por células de CaMa inducen el reclutamiento y bajos niveles de degranulación en mastocitos.....	36
7.3 RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1, IL-8 y SCF participan en la quimioatracción, pero no en la degranulación de mastocitos. ....	40
7.4 La línea de cáncer de mama agresiva MDA-MB-231 activa un programa transcripcional diferente en mastocitos.....	43
7.5 Genes alterados en mastocitos determinan una mayor supervivencia de pacientes con cáncer de mama .....	46
7.6 La expresión del gen que codifica para un marcador característico de mastocitos (triptasa) funciona como un factor de buen pronóstico. ....	49
8. DISCUSIÓN .....	50
9. CONCLUSIONES.....	57
10. BIBLIOGRAFÍA .....	57

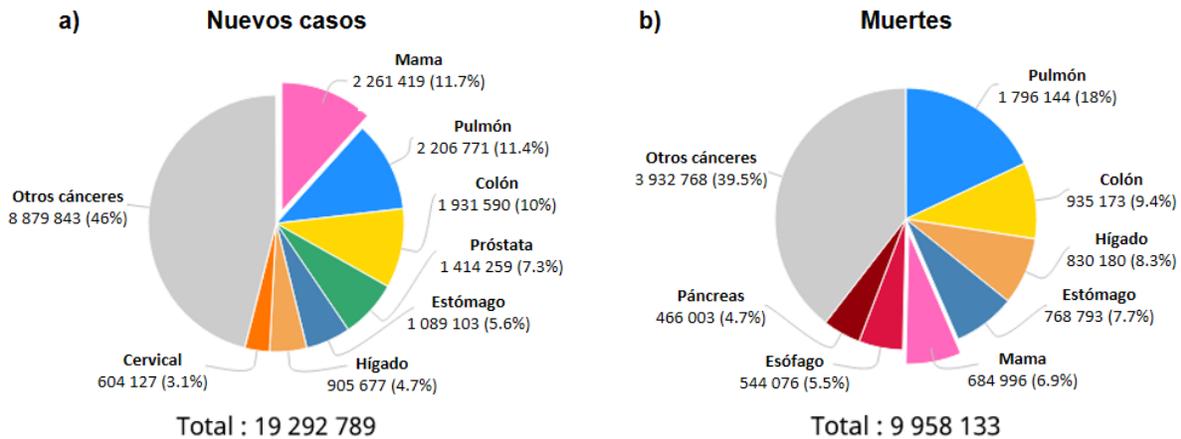
## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Cáncer de mama**

El cáncer alberga a un amplio grupo de enfermedades que afectan a cualquier órgano del cuerpo. Éste involucra un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células, las cuales inicialmente invaden tejidos circundantes y posteriormente se diseminan a órganos distantes en un proceso denominado metástasis [1].

Recientemente en 2020, el observatorio mundial del cáncer avalado por la organización mundial de la salud (OMS), reportó que el cáncer de mama (CaMa) representa el primer lugar en incidencia y el quinto lugar en mortalidad a nivel mundial [2] (Figura 1).

## Estimado número de casos por cáncer en 2020



**Figura 1.** Número estimado de nuevos casos (a) y muertes (b) por cáncer en 2020 en ambos sexos. Datos obtenidos en *Global cancer observatory*.

Similar a datos mundiales, para 2020 se reportó que el CaMa representa el primer lugar en incidencia en la población mexicana [2]. A pesar de existir el mismo riesgo de padecer ésta neoplasia, los datos reportan que la mortalidad es más alta en países en vías de desarrollo como México, la cual cuenta con el primer lugar en mortalidad de todos los cánceres. Esto puede deberse a que la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas, probablemente debido a que existe menor acceso a los servicios de salud pública para el diagnóstico temprano, tratamiento y control de la enfermedad.

Actualmente existen diversas clasificaciones del CaMa, las cuales tienen como objetivo comprender los mecanismos que conducen a su formación, mantenimiento y su uso para el diagnóstico y descubrimiento de biomarcadores clínicos que puedan predecir la respuesta a algún tipo de tratamiento. Estas clasificaciones se basan en diversos factores como: 1) el origen celular del tumor, 2) el grado de diferenciación histológico, 3) el estado TNM (por las siglas que se refieren al tamaño del tumor primario, el número de nódulos linfáticos positivos para células tumorales y la presencia o no de metástasis) y 4) la expresión de los receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2) [3]. Ésta última clasificación es una de las más utilizadas en la clínica para el tratamiento de cáncer, distinguiendo 4 subtipos de CaMa: Luminal

A, Luminal B, HER2-enriquecido y triple negativo, siendo los subtipos luminales los de mejor pronóstico, los HER2-enriquecido de pronóstico intermedio y los triple negativos de mal pronóstico [3]. Aunque éstas clasificaciones han sido de gran utilidad en determinar el estado clínico y la elección del tratamiento a seguir, el CaMa es ampliamente heterogéneo y muestra una gran variabilidad en su clonalidad y características genéticas y morfológicas [4, 5]. Por ello, a menudo los tumores que son clasificados como de buen pronóstico, no responden al tratamiento o recaen como tumores agresivos, siendo constantemente difícil predecir el curso de la enfermedad.

Muchos estudios han intentado mejorar la clasificación del CaMa, algunos de ellos se han concentrado en las características intrínsecas de las células tumorales como la taxonomía molecular de CaMa realizada por el consorcio internacional METABRIC [6], mientras que otros toman en cuenta las características fenotípicas de las células tumorales en conjunto con su microambiente [7-9]. Estos últimos estudios han puesto en evidencia diferencias en la infiltración de células inmunes que han sido asociados a factores pronóstico [10]. Además, sus hallazgos han sido de gran utilidad en el diseño de nuevas terapias que actualmente son utilizadas en combinación con terapias tradicionales de cirugía, terapia hormonal y quimio/radioterapia, resultando en el incremento de la supervivencia de pacientes con CaMa [5, 11]. A pesar de lo anterior, debido a los grandes costos que implica el uso de nuevas tecnologías para clasificar el CaMa, hoy en día se sugiere su uso únicamente como una alternativa a futuro [4].

## **1. 2 Microambiente tumoral en cáncer**

Los tumores están formados por células cancerosas en contacto con células del sistema inmune, matriz extracelular, células del tejido conectivo, así como vasos sanguíneos y linfáticos, formando lo que se conoce como el microambiente tumoral. Aunque los primeros estudios de cáncer se concentraron inicialmente en analizar la biología de las células cancerosas, hoy en día es evidente que la complejidad de los tumores está ligada con su microambiente y no únicamente

con las características intrínsecas de las células tumorales [9, 10]. Reciente evidencia ha apoyado un papel modulador de las células del sistema inmune y sus mediadores inflamatorios en el inicio y la progresión tumoral. Esto, a través de promover o inhibir la proliferación, supervivencia y adquisición de un fenotipo mesenquimal migratorio de células cancerosas; así como la modulación de procesos angiogénicos y de permeabilidad vascular [12, 13]. En muchos tipos de tumores humanos, los macrófagos asociados al tumor (TAMs por sus siglas en inglés *Tumor Associated Macrophage*) han sido ampliamente caracterizados como los mayores constituyentes celulares del infiltrado inmune [14]. En CaMa, éstos han sido identificados como la principal fuente de factores de crecimiento, citocinas, proteasas y otros mediadores asociados con progresión tumoral, por lo que son considerados las células con mayor potencial inflamatorio [15, 16]. Además, se ha descrito que una mayor densidad de TAMs correlaciona con CaMa de mal pronóstico [10, 15]. Usando modelos animales, se ha observado que fármacos que antagonizan la función de macrófagos asociados a tumor, resultan en tumores de crecimiento lento con poca o nula capacidad metastásica [17, 18]. Por el contrario, la infiltración y participación de linfocitos T CD8 han sido asociadas con pronóstico favorable, mejor respuesta a quimioterapia y una mayor supervivencia de pacientes con ésta enfermedad [10, 11, 19]. Así, actualmente los linfocitos T CD8 se consideran la población inmune con mayor potencial para contrarrestar y eliminar el CaMa.

El CaMa es un cáncer estéril y que no tiene un origen por exposición crónica a mutágenos ambientales, como el melanoma a la luz solar o el cáncer de pulmón al humo de tabaco. Es por esto que basado en la expresión de neoantígenos tumorales, el CaMa no siempre es altamente inmunogénico. A pesar de ello, por los datos antes mencionados de TAMs y linfocitos T CD8, así como a la participación de otras poblaciones inmunes como células NK y células supresoras de origen mieloide (MDSC) se ha demostrado que componentes del sistema inmune son biológica y clínicamente relevantes en ésta enfermedad [11, 20, 21]. Además, la importancia de estudiar sus componentes ha sido puesta en evidencia por el uso reciente de tratamientos que inducen el reconocimiento y eliminación de

células tumorales por células inmunes. Este tipo de terapia es conocida como inmunoterapia, la cual se constituye de vacunas, citocinas, anticuerpos monoclonales, inmunoterapia adoptiva de células CAR-T (células T con receptores de antígeno quimérico específicos contra antígenos tumorales) y cito-inmunoterapia (sistema de entrega de fármacos dirigidos contra células tumorales y activación de células inmunes) [5, 22, 23]. Cabe mencionar que la inmunoterapia convencional con anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 no parece proveer de un gran beneficio a las pacientes con CaMa, por lo que es necesario seguir buscando estrategias de fortalecimiento de la respuesta inmune anti-tumoral en CaMa.

### **1.3 Mastocitos**

Las contribuciones de otras poblaciones celulares que también han sido encontradas en el infiltrado de tumores de CaMa no han sido del todo caracterizadas, dentro de ellos los mastocitos. Los mastocitos son células de origen mieloide pertenecientes a la inmunidad innata, las cuales se caracterizan por presentar un alto contenido de gránulos intracelulares que presentan en su interior una gran diversidad de moléculas bioactivas [24]. Estas células se localizan en todo el cuerpo, principalmente en regiones cercanas con el medio externo, tal como la piel y mucosas de vías aéreas e intestinales, donde de manera natural actúan como células centinelas, participando en la detección y defensa contra bacterias, virus y helmintos [25].

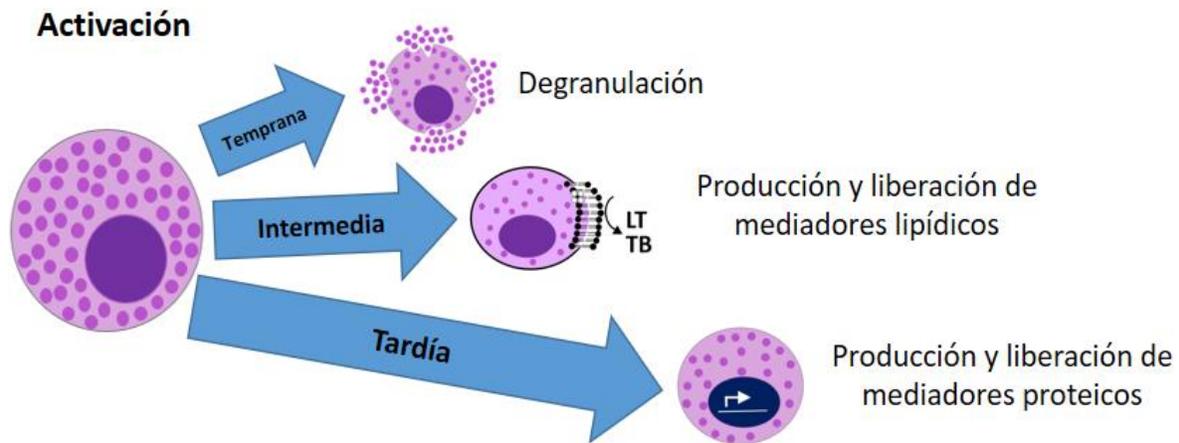
Los mastocitos son células residentes de tejidos que como otras poblaciones inmunes son originadas a partir de células troncales hematopoyéticas en medula ósea. Aunque el desarrollo de mastocitos humanos, no es completamente entendido, se sabe que éstas células pueden provenir de progenitores de mastocitos (MCP) y/o progenitores de monocitos/mastocitos (MC/MP) que son liberados en sangre periférica para posteriormente finalizar su maduración en tejidos [26]. Éstos progenitores se caracteriza por contener pocos gránulos y ser de tamaño reducido, expresar en superficie la integrina  $\beta 7$  y poco o nada del receptor  $Fc\epsilon RI$ , además de, derivados del gangliosido GD1b [27]. La infiltración de

éstos progenitores en los diferentes tejidos depende primordialmente de SCF (por sus siglas en inglés *stem cell factor*) y de la integrina  $\beta 7$  [28, 29]. Aunque no ha sido demostrado en condiciones basales, la proteína 1 quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), CXCL10 y las anafilotoxinas C3a y C5a también han sido involucrados en procesos de quimioatracción de mastocitos a diferentes tejidos. Una vez en tejido, los progenitores de mastocitos pueden diferenciarse hacia algunos de sus diferentes fenotipos conocidos. En humanos, los mastocitos se clasifican de acuerdo a su contenido de proteasas intracelulares, encontrando aquellos que contienen triptasa pero no quimasa (MC<sub>T</sub>), los que contienen quimasa pero no triptasa (MC<sub>C</sub>) y los que contienen ambas proteasas (MC<sub>TC</sub>) [30], los cuales suelen organizarse en diferentes regiones del cuerpo. Los mastocitos cutáneos están enriquecidos en MC<sub>TC</sub>, mientras que en pulmón el subtipo MC<sub>T</sub> es el que predomina, representando ~90% de todos los mastocitos. Los MC<sub>T</sub> se encuentran específicamente en la lámina propia de los bronquios, mientras que, en menor porcentaje, los MC<sub>TC</sub> son típicamente localizados bajo el epitelio, en la lámina propia y en la submucosa. Los mastocitos de tipo MC han sido poco definidos, sin embargo, ellos han sido encontrados en la lámina basal del miometrio y el endometrio uterino [31]. Poco se sabe acerca de los mecanismos que regulan la generación de un fenotipo u otro; sin embargo, se ha descrito que estímulos presentes en el microambiente pueden favorecer algún subtipo específico. Por ejemplo, IL-4 favorece la presencia de MC<sub>T</sub>, mientras que TGF- $\beta$ 1 favorece el subtipo MC<sub>TC</sub> [32, 33]. Otros factores que contribuyen a la maduración y formación de los distintos subtipos de mastocitos humanos son SCF, IL-3, IL-6 e IL-9 [30]. Los diferentes subtipos de mastocitos también han sido caracterizados por tener respuestas diferenciales a diversos estímulos. Un ejemplo de ello es que los mastocitos MC<sub>TC</sub> son capaces de producir leucotrieno C4 (LTC4) y prostaglandina D2 (PGD2) en respuesta a morfina, sustancia P, compuesto 48/80 y anafilotoxina C5a, mientras que los mastocitos MC<sub>T</sub> no [34]. A pesar de ésta clasificación de mastocitos, hoy en día se sabe que los mastocitos tienen un alto grado de plasticidad específica de sitio, mostrando diferencias en el

contenido granular y receptores, los cuales les pueden proporcionar funciones diferenciales [30]. Trabajos recientes han demostrado que dentro de un mismo tejido y bajo condiciones basales existen mastocitos fenotípicamente diferentes [30, 35]. Así, la tradicional clasificación basada en el contenido de proteasas parece ser muy reduccionista y la completa identidad y función de los mastocitos maduros parece estar determinado por los factores de crecimiento y citocinas presentes en el microambiente de cada tejido [30].

Como anteriormente se mencionó, los mastocitos se caracterizan por gránulos que se encuentran dentro de su citoplasma. Éstos pueden contener una gran variedad de mediadores preformados, dentro de los cuales podemos encontrar histamina, heparina, citocinas como  $\text{TNF}\alpha$  y GM-CSF, así como las proteasas triptasa, quimasa y carboxipeptidasa A. Las proteasas son las proteínas más abundantes de contenido intra-granular, siendo triptasa la más predominante y por la cual generalmente los mastocitos son detectados en tejidos [36]. Este contenido intra-granular preformado puede ser liberado inmediatamente tras la activación de mastocitos, permitiéndoles responder de manera rápida ante diferentes estímulos. La vía de activación mejor conocida en los mastocitos es el entrecruzamiento del receptor  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ , la cual permite la liberación inmediata y total de los componentes pre-formados a través de un proceso de exocitosis, mecanismo conocido como degranulación. Aunque éste proceso de activación es el más conocido en mastocitos, no todas las señales involucran una liberación de todas las moléculas bioactivas preformadas. Por ejemplo, señales de unión a TLR-3 y TLR-4, así como SCF e IL-9 inducen la liberación selectiva de biomoléculas y no el proceso de degranulación por exocitosis. Además de la secreción de componentes preformados, la activación de mastocitos puede inducir la síntesis de diferentes mediadores *de novo* y su posterior liberación. Dentro de éstos mediadores se pueden encontrar dos tipos, los de origen lipídico, como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos; y los de origen proteínico, como factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas [24].

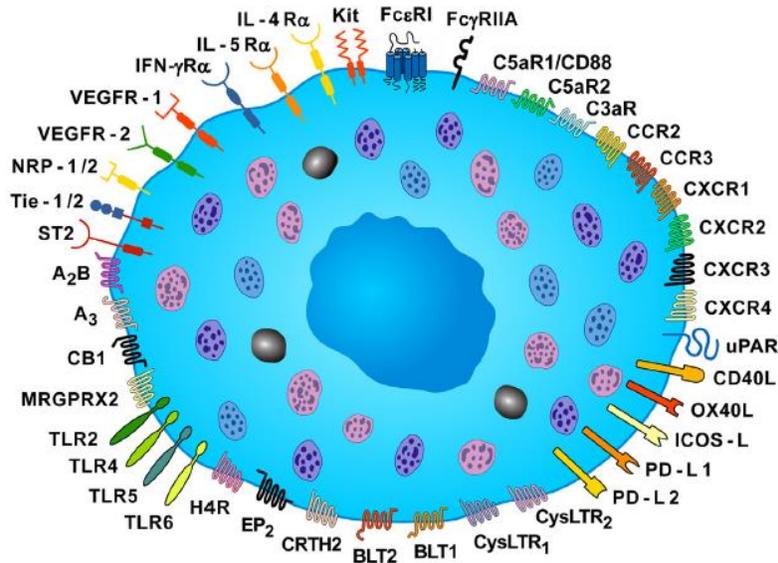
Tanto la liberación de componentes preformados como los sintetizados *de novo* puede darse tras la activación de mastocitos en un proceso secuencial como se muestra en la figura 2, sin embargo, ésta liberación puede llevarse a cabo de manera independiente una de otra. Así, el repertorio de moléculas que se liberan así como el mecanismo de liberación, dependen completamente de las señales recibidas y el receptor o receptores involucrados [25, 37].



**Figura 2. Temporalidad de la respuesta de mastocitos tras su activación.** Los mastocitos pueden responder de manera rápida (minutos), debido a la presencia de mediadores preformados en sus gránulos citoplasmáticos, los cuales pueden ser liberados a través de un proceso conocido como degranulación. Subsecuentemente a la degranulación, los mastocitos pueden ser capaces de iniciar la producción de mediadores derivados de lípidos, los cuales pueden ser liberados de minutos a horas después de la activación. Finalmente, los mastocitos son capaces de iniciar la síntesis y liberación de mediadores que son el resultado de la transcripción y traducción de genes (horas a días).

Los mastocitos pueden ser activados por una gran variedad de estímulos como LPS, complemento, complejos antígeno-anticuerpo, citocinas y quimiocinas. Esto debido a que presentan una gran diversidad de receptores como se muestra en la figura 3. Dentro de estos receptores se pueden encontrar TLRs (TLR2, TLR4, TLR5, etc.), receptores de complemento (C5aR y C3aR), receptores Fc (FC $\epsilon$ RI y Fc $\gamma$ RIIA), receptores de citocinas (SCF, IL-4R $\alpha$ , IL-4R $\alpha$ ), receptores de quimiocinas (CCR2, CCR3, CXCR3, CXCR4, etc), receptores de co-estimulación (ICOS-L y CD40L), receptores de regulación (PD-L1 y PD-L2), receptores de

mediadores lipídicos (CysLTR1, CysLTR2, BLT1 y BLT2), receptores de histamina (H4R), receptores de adenosinas (A<sub>2</sub>B, A<sub>3</sub>), receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2), entre muchos otros [38, 39].



**Figura 3. Receptores presentes en mastocitos.** Los mastocitos pueden presentar una gran diversidad de receptores en su superficie, dentro de ellos se pueden encontrar TLRs (TLR2, TLR4, TLR5, etc.), receptores de complemento (C5aR y C3aR), receptores Fc (FC $\epsilon$ RI y Fc $\gamma$ RIIA), receptores de citocinas (SCF, IL-4R $\alpha$ , IL-4R $\alpha$ ), receptores de quimiocinas (CCR2, CCR3, CXCR3, CXCR4, etc), receptores de co-estimulación (ICOS-L y CD40L), receptores de regulación (PD-L1 y PD-L2), receptores de mediadores lipídicos (CysLTR1, CysLTR2, BLT1 y BLT2), receptores de histamina (H4R), receptores de adenosinas (A<sub>2</sub>B, A<sub>3</sub>) y receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2). Tomado de Varrichi G., 2017.

Como resultado de la presencia de una gran variedad de receptores, así como su capacidad para liberar una gran diversidad de mediadores, los mastocitos son células multifuncionales implicadas en distintas respuestas fisiológicas y patológicas. Ellos contribuyen a la homeostasis de tejidos por promover procesos de inflamación, vasodilatación, angiogénesis y remodelación de tejidos [40]. Además, pueden ser acumulados en tejidos dañados o inflamados donde pueden amplificar o suprimir la inflamación. Todas éstas respuestas se deben a su directa función en procesos de fagocitosis y liberación de factores como VEGF o a su capacidad de influenciar la migración, maduración y función de otras células del

sistema inmune, como neutrófilos, células dendríticas y linfocitos NK, T y B [28, 37].

Algunos ejemplos de las implicaciones de mastocitos en procesos biológicos es  $TNF\alpha$  derivado de mastocitos, el cual es requerido para montar una respuesta citotóxica de células T a través de inducir la maduración y migración de células dendríticas en procesos de sensibilización inmunológica [41]. Por su parte, bajo condiciones fisiológicas, los mastocitos pueden inducir y aumentar la angiogénesis a través de la producción de una gran variedad de factores pro-angiogénicos clásicos como VEGF, el factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF2) e IL-8, así como no clásicos como triptasa [39]. Similarmente, prostaglandina E2 ( $PGE_2$ ) derivada de mastocitos actúan como un factor quimiotáctico de eosinófilos y neutrófilos, favoreciendo el proceso de inflamación en procesos de exposición a luz UV y tejido dañado [42]. Triptasa ha sido involucrada en permitir una adecuada recuperación de tejido epitelial, regulando la cicatrización a través de inhibir una excesiva síntesis de colágeno IV, fibronectina y laminina [43]. Por su parte, histamina muestra efectos pleiotrópicos dependiendo del receptor involucrado. De esta manera, ésta tiene la capacidad de aumentar o inhibir la proliferación y activación de diferentes células inmunes y no inmunes. A través de receptores H1, influencia el desarrollo de linfocitos T en subtipo Th1 y disminuye la actividad supresora de linfocitos T; por el contrario, a través de receptores H2 histamina estimula la actividad supresora de linfocitos T inhibiendo su actividad citotóxica [44]. Este último fenómeno, nos permite resaltar que la función efectora de mastocitos depende del tejido en el cual la respuesta ocurre, permitiendo que un mismo mediador derivado de mastocitos pueda inducir diferentes efectos.

#### **1.4 Mecanismos pro- y anti-tumorales de los mastocitos**

Los mastocitos han sido observados infiltrando diferentes tipos de cánceres humanos (gástrico, colon, pulmón, hígado y piel), en algunos de los cuales su participación ha sido descrita [45, 46]. Un ejemplo de ello, es en cáncer de colon, donde los mastocitos parecen sostener la inflamación y progresión del cáncer,

permitiendo su progresión sobre los márgenes invasivos. Además, los mastocitos parecen inducir de manera directa la proliferación de células cancerosas de colon, mientras que la densidad de mastocitos está asociada a procesos de angiogénesis, metástasis y corta supervivencia [39, 45, 46]. En general se sabe que los mastocitos ejercen diversas funciones durante el desarrollo y la progresión del cáncer, participando de manera directa o indirecta en los tumores. Así, dependiendo del microambiente, los mastocitos podrían ser pro-tumorales o anti-tumorales, ejerciendo la inhibición o promoción de varios procesos en la biología de los tumores, tal como proliferación y supervivencia de células cancerosas, procesos de angiogénesis, linfangiogénesis, remodelación de tejido, disrupción de la matriz extracelular, invasión y metástasis [39]. El valor pronóstico de los mastocitos ha sido ampliamente evaluado en varios tipos de cáncer, sin embargo, los mecanismos implicados han sido poco estudiados. Dentro de las actividades anti-tumorales de mastocitos que han sido caracterizadas, se ha observado microscópicamente que los mastocitos muestran fagocitosis y degradación de células tumorales [47, 48]. Además, actividades citolíticas por degranulación también han sido observadas [49, 50], una de las cuales confieren mayor supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón asociada a su expresión de moléculas anti-tumorales como TNF $\alpha$  [50]. Un estudio utilizando un modelo de carcinoma pulmonar demostró que PGD<sub>2</sub> proveniente de mastocitos disminuyen la angiogénesis y permeabilidad vascular del microambiente tumoral, disminuyendo así el crecimiento tumoral [51]. Además, en un modelo de carcinogénesis de piel en ratones deficientes de mastocitos, se evidenció que los mastocitos pueden reducir la incidencia y crecimiento tumoral a través de inducir la infiltración de células efectoras como granulocitos granzima positivos y linfocitos T CD8, proponiendo la inducción de inmunovigilancia y la regresión tumoral dependiente de mastocitos [52]. En melanoma, se ha demostrado que mastocitos activados por TLR2 son capaces de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* a través de una reducción en la angiogénesis y nuevamente el reclutamiento de células efectoras NK y T en el sitio del tumor. Este modelo demostró que IL-6 derivada de mastocitos fue responsable de la inhibición tumoral [53]. Similarmente, mastocitos

activados con TLR7 inducen la secreción de CCL2 y permiten el reclutamiento de células dendríticas plasmacitoides y su posterior transformación en un subtipo citotóxico secretor de IFN $\alpha/\beta$  y granzima B que permite la eliminación directa de células tumorales [54].

Dentro de los mecanismos pro-tumorales que involucran la participación de los mastocitos en cáncer, se ha observado que los mastocitos pueden inducir la proliferación y supervivencia de células tumorales a través del contacto directo o la liberación de diferentes mediadores. A través del uso de ratones deficientes de mastocitos se demostró que los mastocitos inducen el desarrollo y crecimiento de pólipos pre-neoplásicos [55]. Además, a través de un análisis por co-cultivo, se demostró que los mediadores secretados por mastocitos son capaces de estimular la proliferación directa de células de cáncer de colon [56]. En cáncer gástrico, se evidenció que IL17A proveniente de mastocitos, promueve la proliferación y supresión de apoptosis en células cancerosas gástricas, contribuyendo así al crecimiento y progresión tumoral [57]. Por otra parte, la comunicación por co-cultivo de mastocitos y células de cáncer de pulmón demostró que los mastocitos liberan histamina capaz de inducir la proliferación de las células cancerosas a través del receptor H4 [58]. Al tener un gran potencial de inducir angiogénesis y lfangiogénesis, los mastocitos han sido reiterativamente asociados con la promoción de estos procesos en cáncer. Una gran cantidad de estudios han evidenciado que la densidad de mastocitos correlaciona positivamente con una alta cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos en diferentes cánceres humanos [18, 59, 60], sin embargo, los mecanismos específicos han sido poco caracterizados. Algunas de las moléculas que han sido propuestas para llevar a cabo éstos fenómenos son FGF, IL-8, TGF $\beta$ , VEGF y triptasa. Por último, los procesos de invasión y metástasis son esenciales en la progresión y etapas tardías del cáncer. A través de un meta-análisis de varios tumores sólidos se encontró que la infiltración de mastocitos triptasa positivos está asociada con la metástasis en cáncer de colon e hígado. Un mecanismo propuesto para llevar a cabo éstos procesos es la capacidad de los mastocitos de liberar proteasas como triptasa, quimasa, CPA y MMPs, las cuales podrían degradar componentes de la

matriz y permitir la salida de células tumorales hacia sitios distantes al del tumor primario.

## **1.5 Mastocitos en cáncer de mama**

Los mastocitos son componentes que se encuentran en el tejido mamario sano, donde cumplen un papel crucial en la homeostasis del tejido, incluyendo morfogénesis, desarrollo ductal, secreción de leche, remodelación de tejido e inmunovigilancia contra patógenos y células transformadas [11, 28, 61]. Particularmente para CaMa, aunque también se ha reportado una infiltración de mastocitos, su participación hasta el momento no está del todo clara y es controversial. Actualmente existe evidencia correlativa que apoya que la densidad de los mastocitos se asocia positivamente con procesos que favorecen el proceso tumoral [18, 62-64]. Por otra parte, también existe evidencia que sugiere que los mastocitos favorecen respuestas anti-tumorales del hospedero [49, 65-68]. La tabla 1 muestra todos los estudios realizados hasta la fecha que analizan la posible participación de mastocitos en CaMa. Así, de 25 estudios realizados, 10 (44%) apoyan una función anti-tumoral, 12 (48%) una función pro-tumoral y 2 (8%) no encuentran alguna asociación. Cabe notar que, la mayoría de éstos estudios son descriptivos y correlativos, donde en general se correlaciona la evaluación por inmunohistoquímica del número de células triptasa o c-Kit positivo en el tejido tumoral con el subtipo de CaMa de buen o mal pronóstico y otras características clínicas. De ellos, probablemente triptasa es un marcador más específico de mastocitos ya que c-Kit es expresado por varias otras células del sistema inmune e incluso por células troncales cancerosas, y éstas últimas marcarían un pronóstico adverso en los tejidos que están enriquecidas. Los estudios en los que se utilizan diferentes colorantes ácidos o básicos probablemente son menos específicos. También, hasta ahora los mecanismos responsables de las asociaciones observadas no han sido estudiados.

**Tabla 1.** Estudios que analizan la participación de mastocitos en CaMa

Tipo de estudio (24)	Marcador de detección de MCs	Espécimen analizado	Asociación	Rol en cáncer de mama	Autor, año
D/C/E	Triptasa	Tejido tumoral y sangre. Ratón xenotransplantado con cromolin	Disminución de aglutinación sanguínea e hipoxia	Anti-tumoral	M. Samoszuk, 2003
D/C	c-kit (CD117)	Tejido tumoral de CDI de diferente subtipo molecular	Mayor supervivencia	Anti-tumoral	S. Dabiri, 2004
D/C/E	Triptasa	Tejido tumoral y co-cultivo de células de CaMa con fibroblastos	Reducción del tamaño y número de colonias de células tumorales en contacto con fibroblastos	Anti-tumoral	M. Samoszuk, 2005
D/C	Azul de alcian y Giemsa	Tejido tumoral de CDI	Subtipos que tienen pronóstico favorable. Actividad citolítica activa	Anti-tumoral	F. della Rovere, 2007
D/C	c-kit (CD117)	Tejido tumoral	Mayor supervivencia	Anti-tumoral	A. Rajput, 2008
D/C	Azul de alcian y Giemsa	Tejido tumoral de CDI	Fagocitosis de células tumorales características de buen pronóstico	Anti-tumoral	F. della Rovere, 2009
D/C	Azul de Toluidina	Tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama invasivo	Subtipos que tienen pronóstico favorable (luminales y ki67 bajo)	Anti-tumoral	Jianfeng Sang , 2016
D/C	Triptasa y quimasa	Tejido tumoral de CDI	Subtipos (moleculares e histológicos) de mejor pronóstico	Anti-tumoral	A. Glajcar, 2017
E	Azul de toluidina, trip/quim, c-kit	Mastocitos derivados de tejido adiposo	Actividad tumoricida de células cancerosas (con anticuerpo específico HER2)	Anti-tumoral	Jesse D. Plotkin, 2019
D/C	Triptasa	Tejido tumoral de pacientes con CaMa	Subtipos que tienen pronóstico favorable.	Anti-tumoral	E. Carpenco, 2019
D/C	Firma de MC (CIBERSORT)	GEO, TCGA y METABRIC	Mayor #MC en subtipos lum A, B y menor grado histológico, #MC activados en nódulos neg	Anti-tumoral	Jingxin Jiang, 2020
E	Azul de Toluidina	Tejido tumoral murino tras la inhibición farmacológica de la degranulación de MC	Crecimiento tumoral e invasión <i>in vivo</i> y proliferación <i>in vitro</i>	Pro-tumoral	M.Kh Dabbous, 1991
D/C	Triptasa y quimasa	Lesiones benigna de mama y tejido tumoral de pacientes con CaMa.	Subtipo triptasa + asociado a lesiones malignas	Pro-tumoral	Jussi-Pekka, 1997
D/C	Triptasa	Tejido adyacente sano y de lesiones benignas y malignas de mama.	Mayor número de mastocitos en lesiones malignas que benignas	Pro-tumoral	Yayoi Kashiwase, 2004
D/C	Triptasa	Nódulos linfoide centinela	Angiogénesis en micrometastasis	Pro-tumoral	D. Ribatti, 2007
D/C	Triptasa	Tejido tumoral	Angiogénesis	Pro-tumoral	G. Ranieri, 2009
D/C/E	Triptasa	Tejido tumoral de CaMa Línea celular tratada con triptasa	Mayor grado histológicos, procesos invasivos y metastásicos	Pro-tumoral	M. Xiang, 2010
D/C	Triptasa	Tejido tumoral de pacientes	Linfangiogénesis en área peritumoral de subtipos agresivos	Pro-tumoral	Marius Raica, 2013
D/C	Triptasa	Tejido tumoral y sangre	Angiogénesis	Pro-tumoral	I. Marech, 2014
D/C	Azul de toluidina	Tejido tumoral de CDI	Mayor grado histológico	Pro-tumoral	A. Fakhrou, 2016
E	Azul de toluidina	Ratón propenso a cáncer de mama deficiente de mastocitos	Progresión, metástasis y angiogénesis	Pro-tumoral	L. He, 2016
D/C	Azul de toluidina	Tejido tumoral de CDI	linfangiogénesis	Pro-tumoral	S. Keser, 2017
D/C	Firma de MC (CIBERSORT)	Datos TCGA	Tumores ANXA1 high (de mal pronóstico) están asociados con infiltración de MC activados	Pro-tumoral	Maiko Okano

D/C/E	Azul de toluidina	Tejido tumoral de pacientes tratados con cimetidina	Ninguna (índice de proliferación de células tumorales)	Ninguno	P. Bowrey, 2000
D/C/E	Ninguno	Tejido tumoral murino tras la inhibición farmacológica de H1R y degranulación	Ninguna (vascularización de tumores)	Ninguno	Faustino-Rocha, 2017

CaMa, Cáncer de mama; CDI, carcinoma ductal invasivo, Iniciales en la columna del tipo de estudio: D = estudio descriptivo, C = correlativo y E = experimental.

Similar a sus funciones fisiológicas, debido a la presencia de los mastocitos en los tumores de CaMa y a su capacidad de secretar una gran variedad de mediadores inflamatorios (preformados y sintetizados de *novo*), estas células pudieran ser un elemento importante en la modulación de ésta neoplasia, donde pudieran participar en su control y diseminación; o por el contrario, favorecer su crecimiento y agresividad. A la fecha, la función de los mastocitos en CaMa no ha sido estudiada en modelos *in vitro*.

### 1.5 Modelos de líneas celulares de mastocitos

Debido a que los niveles de mastocitos en tejidos son muy bajos y a los altos costos que involucran los procesos de purificación de dichas células, muchos estudios que implican su análisis, han sido basados en el uso de las líneas celulares humanas HMC1 y LAD-2 (Tabla 2). Ambas son derivadas de pacientes con leucemia de mastocitos y a pesar de pertenecer a un mismo linaje, éstas han mostrado diferencias funcionales [69]. Una de las más importantes es que HMC1 presenta una mutación con ganancia de función del receptor de SCF conocido como c-kit, lo que permite su crecimiento independiente de éste factor. Adicionalmente, ésta línea presenta pocos receptores funcionales Fc de alta afinidad a IgE (FcεRI) y es considerada menos diferenciada por contener muy pocos gránulos intracelulares [69, 70]. Por su parte, el crecimiento y mantenimiento de LAD-2 depende de SCF, expresa de manera abundante el receptor FcεRI y contiene altos niveles de gránulos, lo que permite su uso en el análisis de señales de degranulación. Poco se sabe acerca de las similitudes y/o diferencias en los niveles basales de expresión de componentes inflamatorios entre ambas líneas de mastocitos.

**Tabla 2.** Comparación de líneas de mastocitos HMC1 y LAD-2

Característica	Línea celular	
	HMC1	LAD-2
Origen	Sangre de paciente con leucemia de mastocitos	Médula ósea de paciente con leucemia de mastocitos
Mutación en c-kit	Sí, receptor (V560G)	NO
Dependencia de factor de crecimiento (SCF)	No	Sí
Crecimiento	Rápido (36-48hrs)	Lento (10-15 días)
Expresión FcεR1	Ausente o poca	Presente
Gránulos	Nulos o pocos	Muchos (>100 por célula)
Tipo de gránulos	Triptasa+ Quimasa -	Triptasa + Quimasa +
Contenido de histamina por célula	0.9pg	3.1pg
Respuesta de degranulación	No	Sí

Algunos estudios utilizando HMC1 y LAD-2 han evaluado lo siguiente:

- 1) La caracterización funcional de receptores de histamina en mastocitos, demostrando que el receptor H4 en mastocitos permite la producción de una gran variedad de mediadores inflamatorios a nivel transcripcional y proteínico [71].
- 2) La contribución de mastocitos como fuentes de factores angiogénicos y linfangiogénicos de la familia de VEGF [72].
- 3) La capacidad de mastocitos para expresar y liberar proteasas asociadas a linfocitos T, como granzima B [73].
- 4) La activación y función de mastocitos en enfermedades inflamatorias, por ejemplo la liberación de IL-8 tras la activación del receptor PAR-2 [74].

Cabe destacar que todas estas funciones han sido confirmadas en mastocitos humanos de origen primario, sosteniendo que éstas células funcionan como buenos modelos en el estudio de mastocitos.

Existen otras líneas de mastocitos humanas que han sido descritas, sin embargo, pocas han sido utilizadas en el estudio de la biología de mastocitos. Ellas incluyen las células LUVA, ROSA, MCPV-1 y LADR [75, 76]. LUVA es una línea celular que surgió de manera espontánea de un cultivo de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ no transformadas. Esta línea no presenta mutación en el receptor c-kit, pero tiene una alta tasa de proliferación [77]. La línea celular ROSA fue generada en 2014 a partir de células CD34+ de sangre de cordón umbilical. Aunque ésta línea parece contar con receptores FcεRI funcionales, parece tener pocos gránulos, por lo que tinciones con colorantes básicos no parecen generar los patrones característicos de mastocitos [78]. MCPV-1 fue generada por inmortalización lentiviral de precursores de mastocitos de médula ósea de un paciente con mastocitosis [79]. Ésta es una de las menos utilizadas, probablemente por mantener características de inmadurez. LADR es una línea descrita recientemente en 2019, ésta muestra una gran similitud a la línea de mastocitos LAD-2, sin embargo parece ser más grande, granular y tener periodos de proliferación más largos [76]. A pesar de contar con todas éstas líneas de mastocitos, HMC1 y LAD-2 continúan siendo las más utilizadas como modelo de mastocitos, probablemente por tener suficiente información sobre ellas y ser los primeros modelos de mastocitos. De las líneas anteriormente descritas, LUVA y LADR también parecen ser buenos modelos para el estudio de mastocitos, esto por su alta granularidad y funcionalidad de receptores característicos de mastocitos.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las células tumorales interactúan con células del sistema inmune, las cuales pueden modular procesos centrales en la progresión del cáncer como proliferación, supervivencia, invasión y metástasis. Los mastocitos se encuentran infiltrados en el estroma de tumores mamarios, sin embargo, su influencia como promotor o inhibidor de la enfermedad ha sido controversial. Hasta el momento existe evidencia que apoya efectos pro- y anti-tumorales, sin embargo, la mayoría

de los estudios realizados hasta el momento han sido de tipo correlativo y observacional, existiendo muy pocos estudios que provean evidencia experimental de los mecanismos de respuesta del mastocito en comunicación con células tumorales de CaMa. Debido a esto, y a que estas células son capaces de producir una gran variedad de moléculas con capacidad de influenciar el microambiente y el desarrollo tumoral, éste proyecto plantea establecer un modelo *in vitro* que permita estudiar la respuesta de mastocitos en comunicación con células tumorales de CaMa con diferentes niveles de agresividad, lo que nos llevará a entender mejor los mecanismos de interacción del tumor con su microambiente.

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cómo responden los mastocitos en comunicación con componentes secretados por células de CaMa y a qué tipo de respuesta pro- o anti-tumoral se asocia?

### **4. HIPÓTESIS**

Los componentes secretados por células de CaMa inducen la quimioatracción de mastocitos, así como una activación temprana de degranulación y tardía de síntesis de mediadores *de novo* que sea asociada a una función pro- o anti-tumoral.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Establecer un sistema de interacción *in vitro* entre mastocitos y líneas celulares de CaMa que permita estudiar mecanismos de quimioatracción, activación y elucidar potenciales respuestas pro- o anti-tumorales de mastocitos.

#### **5.1 Objetivos particulares**

1. Determinar la quimioatracción de mastocitos por efecto de los factores secretados de células de CaMa, así como identificar los factores involucrados en la quimioatracción.

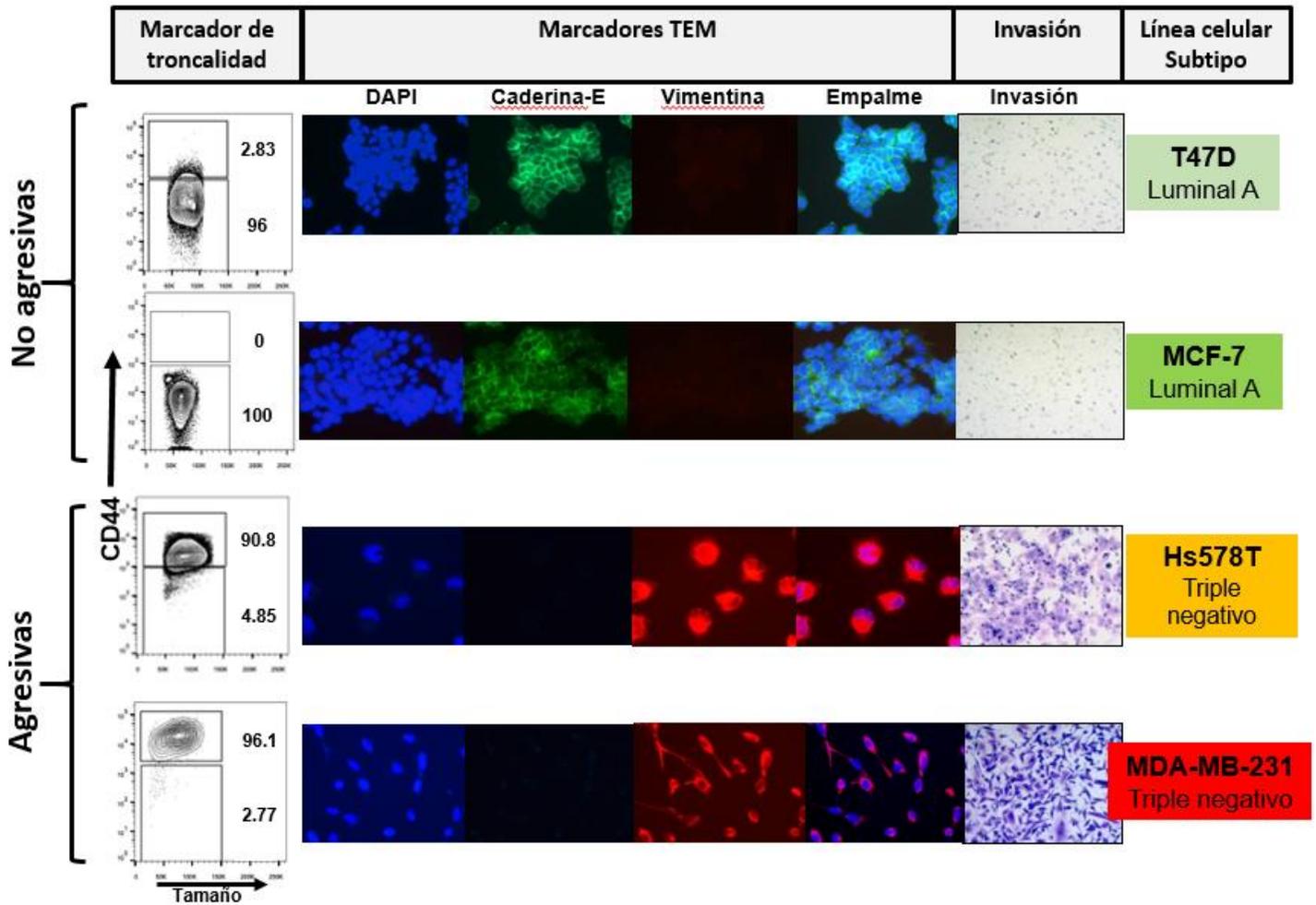
2. Analizar y caracterizar la activación temprana de mastocitos (degranulación) por acción de factores secretados por células de CaMa.
3. Caracterizar la activación tardía de expresión de genes inflamatorios (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y sus receptores) en mastocitos por efecto de factores secretados por células de CaMa.
4. Evaluar *in silico* la supervivencia de pacientes con CaMa en relación al tipo de repuesta de mastocitos en contacto con componentes secretados por células de CaMa.
5. Determinar un posible factor pronóstico de mastocitos en pacientes con CaMa

## **6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Líneas celulares de cáncer de mama y mastocitos**

Las siguientes líneas celulares de CaMa fueron utilizadas: T47D y MCF-7 de origen luminal y de buen pronóstico, las cuales se designan como poco agresivas debido a características mostradas en la figura 4. Como modelo de líneas agresivas se utilizaron las líneas MDA-MB-231 y Hs578T, las cuales son de origen triple negativo de mal pronóstico. Como modelo de mastocitos se utilizaron las líneas celulares humanas HMC1 y LAD-2.

Para el crecimiento de las líneas MCF7 y Hs578T se utilizó medio de cultivo DMEM alto en glucosa; para las líneas T47D y HMC1 se utilizó RPMI; para la línea MDA-MB-231 se utilizó DMEM/F12 y para la línea LAD-2 se utilizó medio StemPro-34. Los medios RPMI, DMEM y DMEM/F12 fueron suplementados con 8% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico-antimicótico (100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomycin, 0.25 µg/mL fungizona). El medio de cultivo StemPro-34 fue complementado con Supplement-34 de acuerdo a las instrucciones del fabricante, 100 ng/ml de SCF recombinante humano (Peprotech) y antibiótico-antimicótico.



**Figura 4. Determinantes de agresividad de las líneas tumorales de CaMa evaluadas.**

Las líneas de CaMa utilizadas en este proyecto se diferencian de acuerdo a su agresividad, la cual es definida por la expresión de marcadores de troncalidad, de transición epitelio-mesénquima (TEM) y la capacidad invasiva. El panel exterior izquierdo muestra la expresión del marcador de troncalidad CD44 en estas líneas celulares, siendo expresado por las líneas altamente agresivas. El panel interior izquierdo muestra la expresión de marcadores involucrados en transición epitelio mesénquima en las diferentes líneas de CaMa. Las células consideradas como poco agresivas tienen un fenotipo caderina-E<sup>+</sup> vimentina<sup>-</sup>, mientras las líneas agresivas son caderina-E<sup>-</sup> vimentina<sup>+</sup>. El panel interior derecho muestra el resultado de un ensayo de invasión *in vitro* realizado con las líneas tumorales, mostrando que únicamente las células agresivas tienen capacidad invasiva. Finalmente, el panel exterior derecho muestra el nombre de las líneas tumorales de cáncer de mama, así como el subtipo al que pertenecen de acuerdo a la expresión de receptores hormonales y HER2.

## 6.2 Medios condicionados de células de cáncer de mama

Una vez que las líneas de CaMa llegaron a una confluencia del 80%, se realizó un lavado con PBS 1X y se adicionó medio de cultivo StemPro-34 suplementado con

1% de Supplement-34, denominado en este documento como medio fresco. Posterior a 72 hrs de incubación, los sobrenadantes fueron recolectados y centrifugados a 2500 rpm por 5 min a temperatura ambiente para la eliminación de residuos celulares. Los medios condicionados fueron utilizados inmediatamente en los experimentos realizados en una dilución 3:1 con medio fresco para todos los experimentos.

### **6.3 Análisis de citocinas en medios condicionados de células de cáncer de mama.**

Diferentes citocinas y factores de crecimiento con capacidad quimiotáctica y de activación de mastocitos fueron determinadas en los medios condicionados de células de CaMa previamente descritos. Los niveles de RANTES/CCL5, SDF1/CXCL12, G-CSF, GM-CSF y MCP1/CCL2 se determinaron a través de un ensayo multiplex HCYTOMAG-60K kit (EMD Millipore) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, mientras que la determinación de SCF (Biolegend) e IL-8 (BD) se realizó a través de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAS) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### **6.4 Ensayo de quimioatracción de mastocitos por efecto de los medios condicionados de células de cáncer de mama**

Este ensayo se realizó a través de un sistema de migración *in vitro*, el cual se compone de insertos transwell que contienen una membrana con poros de 5.0 µm de diámetro a través de los cuales las células migratorias cruzan en respuesta al componente quimioatrayente. 100,000 células de mastocitos HMC1 o LAD-2 fueron resuspendidas en 200 µl de medio fresco y colocadas en la parte superior de los insertos transwell. Como factor quimioatrayente se utilizaron 500 µl de los diferentes medios condicionados o medio fresco suplementado con las proteínas recombinantes humanas RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1, IL-8 y SCF de manera individual o en combinación como se describe a continuación. SCF, RANTES y SDF1 fueron utilizadas en la concentración media encontrada en todos

los medios condicionados (20, 50 y 200 pg/ml respectivamente); G-CSF, GM-CSF, MCP1 e IL-8 fueron usadas en dos concentraciones diferentes: la media encontrada en células no agresivas (definida como concentración baja) y la media encontrada en la línea agresiva MDA-MB-231 (definida como concentración alta). Las concentraciones bajas fueron 50 pg/ml para G-CSF, GM-CSF e IL-8 y 500 pg/ml para MCP1; las concentraciones altas fueron 5 ng/ml para G-CSF y MCP1, 500 pg/ml para GM-CSF y 80 ng/ml para IL-8. Además de lo anterior, la combinación de toda las citocinas a concentraciones bajas y altas fueron incluidas en los cocteles descritos a continuación. Coctel 1: 20 pg/ml SCF + 50 pg/ml RANTES + 200 pg/ml SDF1 + 50 pg/ml G-CSF + 50 pg/ml GM-CSF + 500 pg/ml MCP1 + 50 pg/ml IL-8. Coctel 2: 20 pg/ml SCF + 50 pg/ml RANTES + 200 pg/ml SDF1 + 5 ng/ml G-CSF + 500 pg/ml GM-CSF + 5 ng/ml MCP1 + 80 ng/ml IL-8. En cada experimento, medio fresco fue utilizado como control negativo y medio suplementado con 5% de SFB como control positivo. Posterior a 24 hrs de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, las células migratorias fueron observadas en el fondo del pozo usando una cámara digital Motic 5.0 MP con un objetivo 10X. Un total de 4 campos por pozo fueron contados. Tres experimentos independientes por triplicado fueron realizados.

## **6.5 Estimulación de mastocitos con medios condicionados derivados de células de cáncer de mama.**

Previo a la estimulación, los mastocitos fueron colocados en una concentración de  $5 \times 10^5$ /ml en medio fresco durante 4 hrs. Posterior a este tiempo, el medio de cultivo fue descartado y sustituido por medios condicionados de células de CaMa o con medio fresco suplementado con RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1, IL-8 y SCF. La estimulación de mastocitos se mantuvo por 30 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se cosecharon las células dividiendo la fracción celular y los sobrenadantes. Para determinar el proceso de degranulación, se realizaron tinciones extracelulares de LAMP1 en la fracción celular y se analizaron por citometría de flujo, mientras que los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la liberación de histamina y triptasa mediante ELISAS siguiendo las

indicaciones de los fabricantes (Cayman Chemicals y Genway Biotech respectivamente). Para los experimentos de degranulación medio fresco fue utilizado como control negativo y el estímulo con 5  $\mu$ M del activador sustancia-P como control positivo. Para el análisis de expresión de genes los mastocitos fueron incubados por 4, 12, 24, 36 y 48 hrs, para posteriormente ser procesados como se describe más adelante.

## **6.6 Determinación de la degranulación de mastocitos a través de LAMP-1 por citometría de flujo**

150,000 mastocitos fueron estimulados como previamente se describió. Después de la cosecha celular, los mastocitos fueron mantenidos a 4°C durante todo el proceso de tinción y análisis. Para el bloqueo de unión inespecífica, las células fueron incubadas con 10% SFB y 3 $\mu$ l de reactivo bloqueador de receptores Fc (Miltenyi) e incubadas por 20 min. Posteriormente las células fueron lavadas con 1.5 ml de PBS 1X e incubadas con anti-LAMP1 acoplado a ficoeritrina en una dilución 1:100 e incubadas por 20 min. A continuación de dos lavados, las células fueron resuspendidas con 150 $\mu$ l de PBS 1X y 3 $\mu$ l de 7AAD e incubadas por 5 min. 30,000 eventos por muestra fueron adquiridos en un citómetro de flujo Guava (Luminex). Los análisis de datos fueron realizados con el software Flowjo V10, donde la compensación se realizó con tinciones simples y los eventos dobles y células muertas 7AAD positivas fueron descartadas para el análisis de LAMP1. Los datos fueron normalizados a la condición sin estímulo.

## **6.7 Determinación de la expresión por RT-PCR de los genes *IL-8*, *IL-5* y *VEGF* en mastocitos**

3X10<sup>6</sup> de mastocitos HMC1 y LAD-2 fueron cosechados después de su estimulación como previamente se describió. De cada condición experimental, el RNA fue extraído a través del kit RNAeasy Plus (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración de RNA fue evaluada en un nanodrop One/OneC (Thermo Fisher). 1.2 $\mu$ g de RNA fueron utilizados para la

síntesis de cDNA a través del kit *The first strand synthesis* (Invitrogen) y posteriormente se determinó la expresión de *IL-8*, *IL-5*, *VEGF* y el gen de referencia *GAPDH* a través de reacciones qPCR con los cebadores descritos en la tabla 3.

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para determinar la expresión de los genes indicados por qPCR.

Gen	Cebador sentido	Cebador antisentido
<i>IL-8</i>	5'-AGGTGCAGTTTTGCCAAGGA-3'	5'-TTTCTGTGTTGGCGCAGTGT-3'
<i>VEGF</i>	5'-CTCGATTGGATGGCAGTAGCT-3'	5'-GCACCCATGGCAGAAGG-3'
<i>IL-5</i>	5'-CGTTTCAGAGCCATGAGGATGC-3'	5'-GCCAAGGTCTCTTTCACCATGC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CTTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Las reacciones de qPCR para todos los genes fueron realizadas usando la mezcla RT2 SYBR Green Mastermix (Qiagen) e un termociclador Rotor-gene Q (Qiagen) bajo las siguientes condiciones:

	95°C 10 min
1 ciclo (desnaturalización inicial)	95°C 15 segundos
	60°C 30 segundos
45 ciclos (amplificación)	72°C 30 segundos
1 ciclo (disociación)	65-95°C

Para el cálculo del incremento en la expresión, se siguieron las siguientes formulas en el orden enumerado.

$$(1) \Delta Ct = Ct GI - Ct GAPDH$$

$$(2) 2^{\Delta Ct ME - \Delta Ct MC}$$

$\Delta Ct$ . Normalización de la expresión del gen de interés con el gen de referencia *GAPDH*

Ct GI. Ciclo umbral del gen de interés (*IL-8*, *IL-5* ó *VEGF*)

Ct GAPDH. Ciclo umbral del gen constitutivo GAPDH

$\Delta Ct$  ME.  $\Delta Ct$  de la muestra estimulada

$\Delta Ct$  MC.  $\Delta Ct$  de la muestra control (muestra no estimulada).

El análisis de expresión fue realizado en tres experimentos independientes por triplicado.

## **6.8 Determinación de la expresión de genes asociados a inflamación y cáncer en mastocitos**

La expresión de 84 genes asociados a inflamación y cáncer fueron determinados a través de arreglos de expresión comercial “*Human Cancer Inflammation and Immunity Crosstalk*” RT2 Profiler PCR Array (Qiagen) después de 36 y 48 hrs de estimulación en mastocitos HMC1 y LAD-2 respectivamente. Dichos arreglos determinan 84 genes que involucran presentación de antígenos, interleucinas, quimiocinas, factores de crecimiento y apoptosis. La extracción de RNA, síntesis de cDNA y los arreglos de expresión se realizaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Qiagen). Tres replicados biológicos independientes fueron realizados para cada condición experimental.

El programa NormFinder V20 fue utilizado para identificar los genes con mayor estabilidad y poder ser utilizados para la normalización de los genes de interés. El perfil transcripcional en estado basal y posterior a la estimulación fue evaluado a través del portal “Gene Globe Data Analysis Center” perteneciente al fabricante (Qiagen). En dicha plataforma los valores con cambio igual o mayores a 2 fueron considerados significativamente alterados. El portal libre “Bioinformatics & Evolutionary genomics” fue utilizado para la generación de diagramas de Venn que muestra los genes alterados en ambas líneas de mastocitos. El análisis de componentes principales fue realizado a través de la herramienta Clustvis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) y la expresión de los genes *PTGS2*, *ALOX12*, *ALOX5AP*, *ALOX5*, *PTGES*, *PTGDS*, *TBXAS1*, *LTC4S*, *C2*, *C3*, *C4B* y *C5* en las líneas de CaMa evaluadas fueron obtenidas desde la base de datos “Cancer Cell Line Encyclopedia” (CCLE) [80].

## **6.9 Análisis bioinformático de vías y procesos biológicos afectadas en mastocitos**

Para el análisis de vías de señalización y procesos afectados en mastocitos estimulados, se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento de factores de transcripción (TFE), expansión de redes y un análisis de enriquecimiento extendido (PEA) con los genes que fueron significativamente alterados en mastocitos. TFE y PEA fueron realizados usando una herramienta en línea “Enrich” y la interacción de redes fueron inferidas usando la herramienta X2Kweb [81, 82].

## **6.10 Determinación de la supervivencia de pacientes con CaMa**

Gráficos de probabilidad de supervivencia fueron realizados utilizando la plataforma “Kaplan- Meier plotter” empleando datos de pacientes con CaMa. Esta plataforma usa datos de expresión de genes e información de supervivencia desde las bases de datos GEO, EGA y TCGA. Los análisis de supervivencia se realizaron de acuerdo a los genes característicos de mastocitos *TPSAB1* y *CMA1*; así como a los genes alterados en mastocitos estimulados con medios condicionados de células de CaMa: *IFNG*, *SPP1*, *IL17A*, *PDCD1*, *KITLG* y *TGB1*. Para cada gen la expresión fue dividida en terciles, comparándose la supervivencia de pacientes con el tercil de expresión superior e inferior en un seguimiento de 180 meses. La supervivencia basada en la expresión de *PDCD1* fue adicionalmente realizada en datos filtrados por la media de expresión del gen *CD8A*.

## **6.11 Evaluación de la expresión de genes característicos de mastocitos (*TPSAB1* y *CMA1*) en diferentes subtipos de CaMa**

Datos clínicos y de expresión génica de pacientes con CaMa provenientes de la base de datos TCGA fueron descargados de la plataforma libre c-bioportal (<https://www.cbioportal.org>). Un análisis de la expresión relativa z-score de *TPSAB1* y *CMA1* fue realizado comparando los diferentes subtipos de CaMa.

## **6.12 Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado usando el programa GraphPad Prism 5, donde la distribución y normalización de datos fue analizada por una prueba D'Agostino. Los datos con más de dos grupos que presentaron una distribución normal y homogeneidad de varianza fueron analizados con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de 1 vía con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los datos ausentes de normalidad y homogeneidad de varianza fueron analizados con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y posteriormente una prueba de Dunn para comparaciones múltiples. La descripción de los replicados experimentales son descritos en los pies de figura correspondientes. Los resultados son mostrados como media  $\pm$  el error estándar (SEM). Para los análisis de supervivencia, se utilizaron cocientes de riesgo con intervalos de confianza del 95% para el modelo de regresión de Cox.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Mastocitos HMC1 y LAD-2 no estimulados muestran niveles de expresión diferencial de genes asociados con inflamación y cáncer**

Debido a que nuestro modelo de estudio involucra caracterizar la respuesta de mastocitos en comunicación con células de CaMa, lo primero que realizamos fue la caracterización de similitudes/diferencias a nivel transcripcional basal en ambas líneas de mastocitos evaluadas, HMC1 y LAD-2. Para ello determinamos la expresión de genes asociados a inflamación y cáncer a través del arreglo de expresión "Cancer Inflammation and Immunity Crosstalk", el cual mide la expresión de 84 genes clasificados de acuerdo a sus funciones biológicas, como a) quimiocinas y receptores de quimiocinas, b) interleucinas/citocinas, c) factores de crecimiento, d) genes de inmunoregulación e inmunosupresión y e) apoptosis. El arreglo proporciona 5 genes endógenos como controles de carga: beta actina

(*ACTB*), Beta-2-microglobulina (*B2M*), Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa 1 (*HPRT1*) y subunidad P0 de la proteína ribosomal larga (*RPLP0*). Éstos fueron utilizados para realizar un análisis de estabilidad a través del programa NormFinderV20 para la normalización de los genes de interés. Como se puede observar en la tabla 4, para la línea de mastocitos HMC1, los genes endógenos *ACTB* y *RPLP0* mostraron una menor variación a través de todas las condiciones experimentales, con valores de estabilidad de 0.046 y 0.034, respectivamente. Por ello, la combinación de éstos dos genes fue utilizada para la normalización del arreglo completo en ésta línea de mastocitos. Para los análisis transcripcionales de la línea LAD-2, *GAPDH* y *RPLP0* fueron de genes utilizados debido a su mayor estabilidad, siendo sus valores de 0.057 y 0.035 respectivamente. La combinación de *GAPDH* y *HPRT1* fue utilizada para los análisis de comparación de ambas líneas de mastocitos, debido a que éstos mostraron mayor estabilidad con valores de 0.04 en ambos genes.

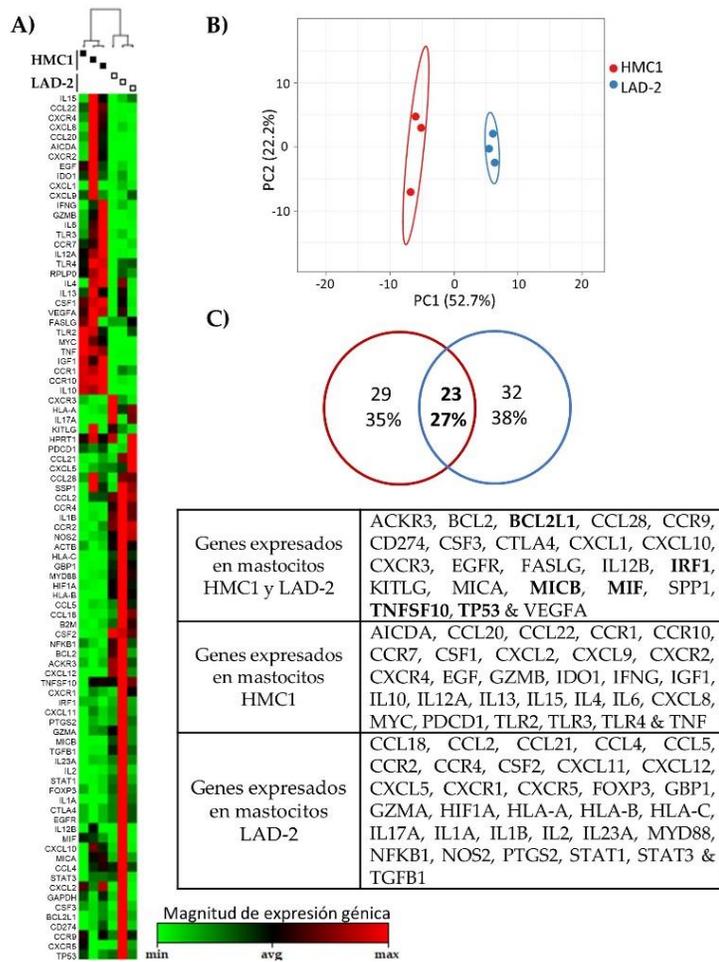
**Tabla 4.** Análisis de estabilidad de los genes de referencia proporcionados en el arreglo de expresión de inflamación y cáncer evaluado en mastocitos.

	Estímulo	Ct				
		<i>ACTB</i>	<i>BM2</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>RPLP0</i>
HMC1	Medio control (1)	11.66	16.49	14.25	19.86	13.07
	Medio control (2)	11.75	15.17	14.23	20.3	13.13
	Medio control (3)	11.61	16.02	14.28	20.25	13.59
	MC-T47D (1)	11.87	15.58	14.25	20.11	13.17
	MC-T47D (2)	11.6	15.25	13.89	19.97	12.99
	MC-T47D (3)	11.52	15.68	14.43	19.69	13.2
	MC-MCF7 (1)	12.02	15.76	14.28	20.36	13.42
	MC-MCF7 (2)	11.83	15.48	14.24	20.41	13.29
	MC-MCF7 (3)	11.43	15.77	14.2	19.91	13.16
	MC-Hs578T (1)	11.83	15.58	14.36	20.2	13.31
	MC-Hs578T (2)	11.77	15.51	14.42	20.15	13.25
	MC-Hs578T (3)	11.19	15.68	13.91	19.19	12.98
	MC-MDA-MB-231 (1)	11.81	15.66	14.33	20.39	13.54
	MC-MDA-MB-231 (2)	11.62	15.48	14.02	20.42	13.4
	MC-MDA-MB-231 (3)	11.35	15.44	14.36	19.98	13.09
Valores de estabilidad HMC1		<b>0.046</b>	0.13	0.057	0.107	<b>0.034</b>
LAD-2	Medio control (1)	11.33	13.94	14.6	20.26	14.44
	Medio control (2)	11.66	13.06	14.86	21.5	14.72
	Medio control (3)	11.44	13.13	14.76	20.31	14.25

MC-T47D (1)	11.33	14.1	14.37	20.91	14.83
MC-T47D (2)	11.77	13.55	14.78	22.04	15.49
MC-T47D (3)	11.13	14.79	14.68	19.89	14.46
MC-MCF7 (1)	11.67	14.48	14.76	21.38	15.17
MC-MCF7 (2)	11.8	13.03	14.64	21.64	14.96
MC-MCF7 (3)	11.5	14.03	14.85	20.53	15.03
MC-Hs578T (1)	11.54	14.11	14.66	21.05	14.9
MC-Hs578T (2)	11.75	13.47	14.62	21.39	14.93
MC-Hs578T (3)	11.47	13.91	15.3	21.19	15.33
MC-MDA-MB-231 (1)	11.36	13.39	14.23	19.95	14.14
MC-MDA-MB-231 (2)	11.88	13.56	14.81	22.15	15.28
MC-MDA-MB-231 (3)	11.35	13.95	14.96	20.89	14.98
Valores de estabilidad LAD-2	0.064	0.273	<b>0.057</b>	0.267	<b>0.035</b>
Valores de estabilidad HMC1 y LAD-2	0.06	0.35	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	0.24

El programa NormFinderV20 fue utilizado para identificar los genes de normalización óptimos entre los cinco genes endógenos proporcionados por el arreglo. Ct: ciclo umbral, *ACTB*: beta actina, *B2M*: Beta-2-microglobulina, *GAPDH*: Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa, *HPRT1*: Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa 1, *RPLP0*: subunidad P0 de la proteína ribosomal larga, MC: medio condicionado. Los números (1), (2) y (3) se refieren a tres experimentos independientes. Los valores marcados en negritas identifican los genes con mayor estabilidad en cada una de las condiciones.

Después de normalizar los valores crudos de expresión obtenidos, un análisis no supervisado representado a través de un dendograma jerárquico y un análisis de componentes principales (PCA) mostró que ambas líneas de mastocitos difieren significativamente formando grupos independientes (Figuras 5A y 5B). Los datos muestran que ambas líneas de mastocitos comparten únicamente la expresión del 27% (23/84) de los genes analizados, mientras 35% (29/84) fueron expresados de manera basal únicamente en mastocitos HMC1 y 38% (32/84) en mastocitos LAD-2 (Figura 5C). De manera interesante, de los 23 genes compartidos por ambas líneas de mastocitos, los genes *BCL2L1*, *IRF1*, *MICB*, *MIF*, *TNFSF10* y *TP53* fueron altamente expresados, obteniendo valores de Ct menores que 23, similar a los Ct de los genes endógenos de referencia.



**Figura 5. Diferencia transcripcional entre las líneas de mastocitos HMC1 y LAD-2.** A) Mapa de calor, dendrograma y B) análisis de componentes principales comparando la expresión basal de 84 genes asociados con inflamación y cáncer. C) Diagrama de Venn muestra el número y porcentaje de genes diferencialmente expresados o compartidos entre ambas líneas de mastocitos. Abajo se muestra la identidad de los genes, donde los genes marcados en negritas son altamente expresados en ambas líneas de mastocitos. Datos representan 3 experimentos independientes.

## 7.2 Componentes secretados por células de CaMa inducen el reclutamiento y bajos niveles de degranulación en mastocitos

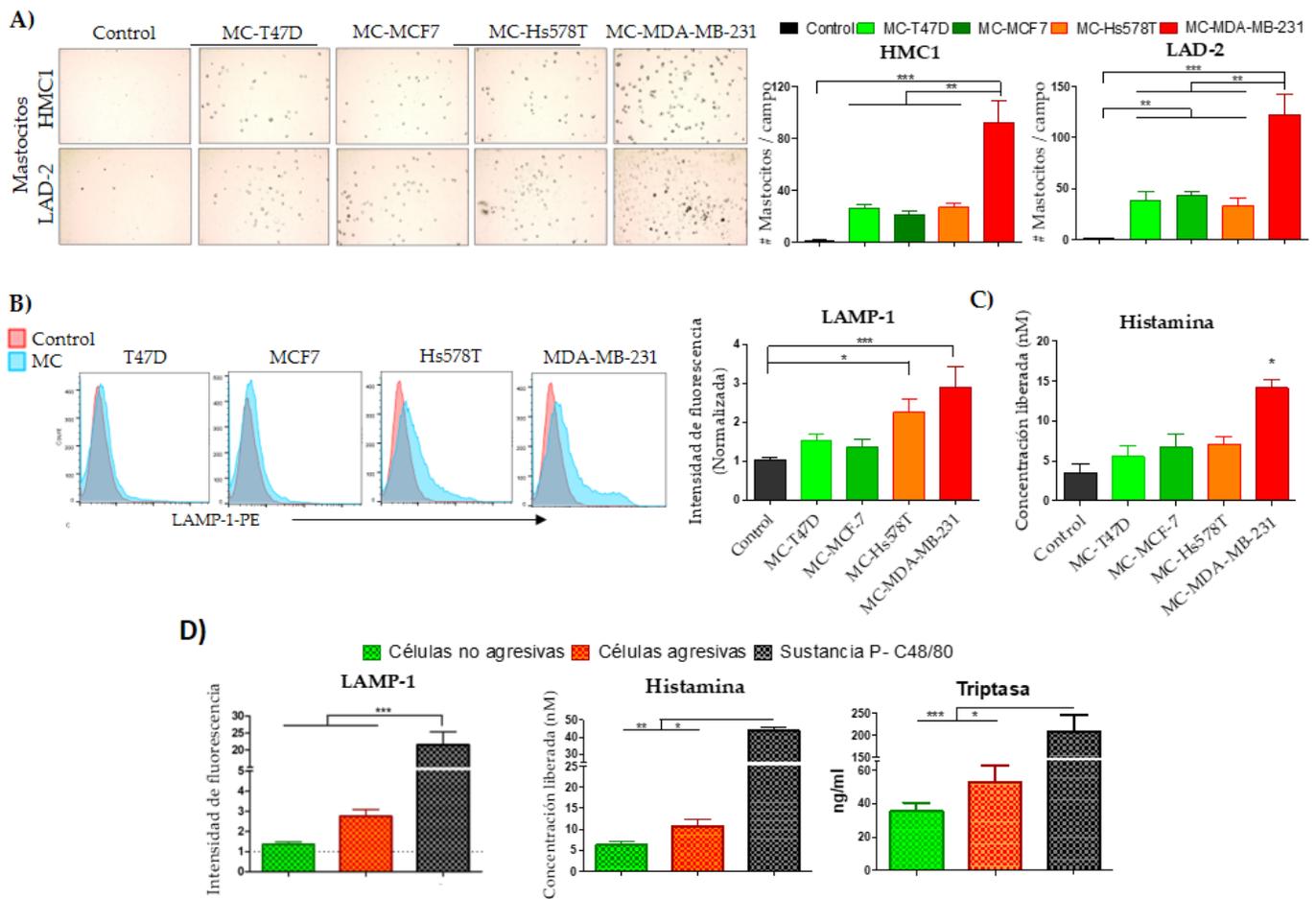
Como anteriormente se describió, los mastocitos han sido reiterativamente encontrados en el infiltrado de tumores de CaMa, sin embargo, hasta el momento no se ha determinado si los componentes secretados por células de CaMa pueden influir en su reclutamiento y activación. En éste trabajo utilizamos cuatro líneas de CaMa con la finalidad de modelar la respuesta de mastocitos a diferentes

propiedades agresivas y estadios de la enfermedad. Las líneas T47D y MCF7 provienen de pacientes con tumores luminales de buen pronóstico, presentan un fenotipo terminalmente diferenciado y no muestran capacidad invasiva en modelos *in vitro*, ni metástasis en modelos de ratón; por otra parte, las líneas Hs578T y MDA-MB231 provienen de pacientes con tumores triple negativos de mal pronóstico, presentando un fenotipo mesenquimal migratorio y capacidad invasiva y metastásica en modelos murinos.

En la búsqueda del posible reclutamiento de mastocitos por efecto de los factores secretados por las células de CaMa, llevamos a cabo ensayos de migración en placas transwell. En la figura 6A se puede observar que los factores secretados por todas las líneas tumorales son capaces de inducir la quimioatracción de ambas líneas de mastocitos HMC1 y LAD-2; sin embargo, los niveles de migración inducidos por la línea agresiva triple negativa MDA-MB-231 fueron significativamente mayores, lo que indica que los componentes liberados por ésta línea tienen un mayor potencial quimiotáctico de mastocitos. Para evaluar si al igual que la inducción migratoria, las células de CaMa son capaces de inducir la activación de mastocitos, procedimos a determinar la activación temprana por degranulación. Esto se evaluó a través de la translocación de LAMP-1 desde los gránulos secretorios hasta la membrana extracelular de mastocitos por citometría de flujo. Para éste experimento, únicamente la línea de mastocitos LAD-2 fue evaluada, debido a que la línea HMC1 es considerada inmadura por contener muy pocos gránulos intracelulares. Como se puede observar en la Figura 6B, únicamente el estímulo con los sobrenadantes provenientes de las líneas agresivas Hs578T y MDA-MB-231 indujo la translocación de LAMP-1, lo que sugiere que sólo los componentes secretados por líneas agresivas, y no aquellos secretados por líneas no agresivas, son capaces de inducir la degranulación de mastocitos. Cabe notar, que la translocación de LAMP-1 fue 10 veces más alta con el activador sustancia P que la inducida por los medios condicionados (Figura 6D), lo que sugiere que la degranulación masiva no es un mecanismo dominante de activación inducido por células de CaMa en el microambiente tumoral. Esto probablemente indicaría la liberación selectiva de mediadores que no

necesariamente involucran la unión de membranas inducida por la exocitosis total de los gránulos. Para confirmar la activación temprana observada, realizamos la determinación de histamina liberada por los mastocitos estimulados, una de las principales señales de degranulación. Los resultados mostraron que el medio condicionado de la línea agresiva MDA-MB-231 indujo la secreción de 14.18 nM de histamina, lo cual fue significativamente más alto que las células no estimuladas (3.52 nM) (Figura 6C); por su parte, el medio proveniente de la línea Hs578T activó la liberación de histamina moderadamente (7.07 nM), sin embargo no fue significativo cuando se comparó con los niveles basales. Estos resultados son consistentes con los niveles de translocación de LAMP-1 más altos inducidos por la línea MDA-MB-231. Por su parte, las líneas no agresivas T47D y MCF7 no indujeron una secreción de histamina significativa (5.58 y 6.71 nM, respectivamente) (Figura 6C). Al igual que sustancia P, el activador C48/80 usado como control positivo, causó una secreción mayor de histamina (43.65 nM), siendo 4 veces más alto que el inducido por la línea agresiva MDA-MB-231 (Figura 6D).

Triptasa es una de las principales proteínas encontradas en los gránulos preformados, por ello la liberación de ésta enzima también fue evaluada tras el estímulo de mastocitos con células de CaMa, caracterizando mejor el proceso de degranulación. Se encontró que el estímulo por células no agresivas indujo la liberación de un promedio de 35.24 pg/ml, similar a los niveles liberados de manera basal (34.93 pg/mL), sin embargo, éstos fueron más bajos que los inducidos por las líneas agresivas (53.43 pg/mL). A pesar de lo anterior, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa (Figura 6D). Todos éstos datos apoyan que las células tumorales de CaMa, particularmente provenientes de tumores agresivos, secretan componentes con capacidad de atraer y activar bajos niveles de degranulación en mastocitos.



**Figura 6. Análisis de quimioatracción y activación temprana de mastocitos en respuesta a componentes secretados por células de CaMa.** Medios condicionados (MC) de células de CaMa fueron utilizados como factor quimioatrayente para mastocitos en ensayos de migración por transwell. **A)** Imagen representativa (izquierda) y su respectivo gráfico (derecha) de la quimioatracción de mastocitos en respuesta a los medios condicionados de células de CaMa. **B)** Histogramas representativos de la deposición de LAMP-1 en la membrana externa de mastocitos LAD-2 (izquierda) y su representación gráfica (derecha). **C)** Niveles de histamina liberada por mastocitos LAD-2 estimulados con los medios condicionados indicados. **D)** Comparación de los niveles de deposición de LAMP-1, liberación de histamina y triptasa por mastocitos estimulados con MC de células no agresivas, agresivas y los activadores sustancia P y el compuesto C48/80. Medio fresco fue utilizado como control negativo. Los gráficos representan la media  $\pm$  la media del error estándar de 4 experimentos independientes por duplicado. Asteriscos denotan significancia estadística. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$

### **7.3 RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1, IL-8 y SCF participan en la quimioatracción, pero no en la degranulación de mastocitos.**

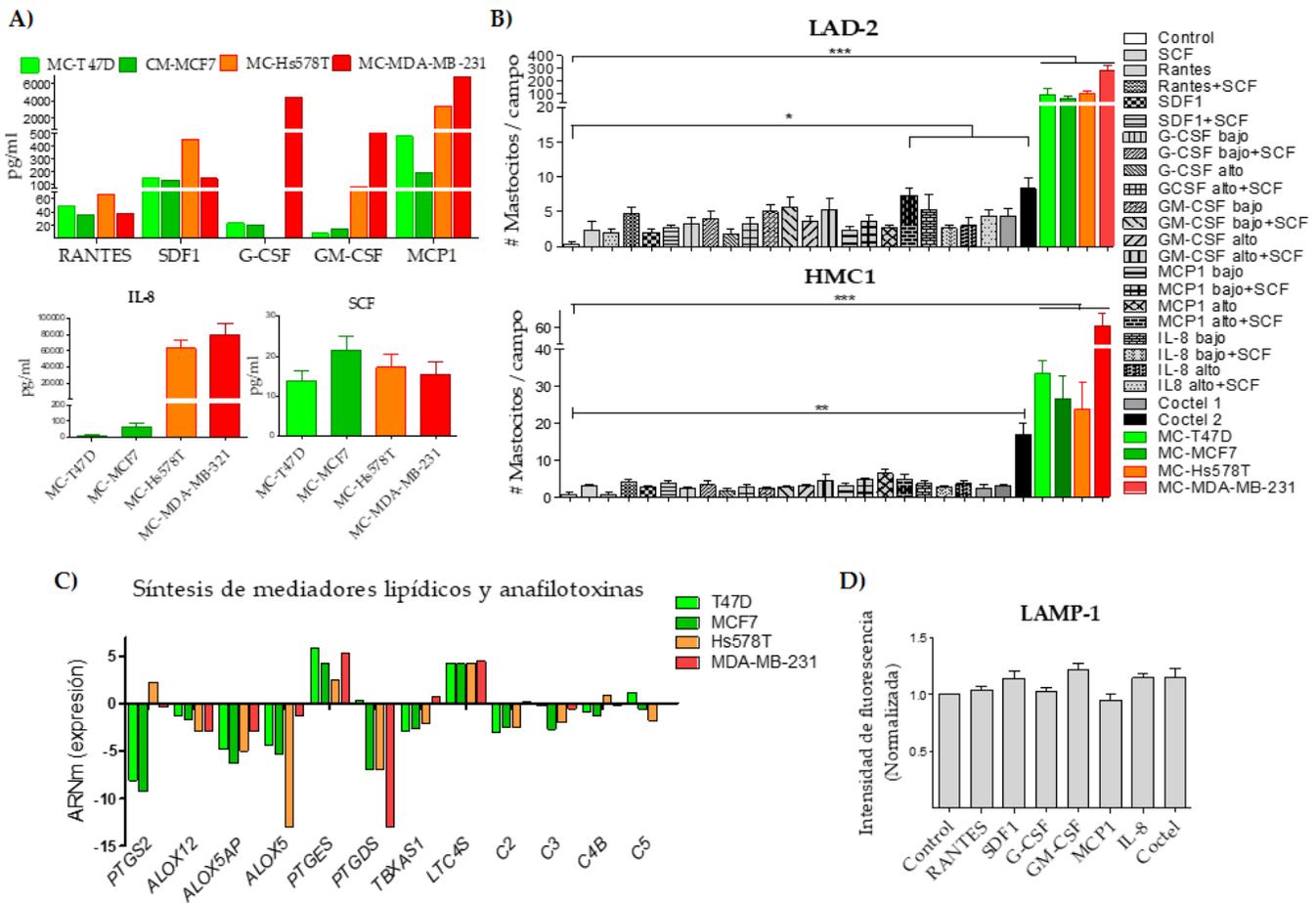
Se ha reportado que diferentes moléculas pueden inducir la migración y activación de diferentes células de origen mieloide, dentro de ellas los mastocitos. Algunas de las más importantes son RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1, IL-8 y SCF [16, 83, 84]. En este estudio analizamos los niveles de estas proteínas que pudieran explicar la quimioatracción de mastocitos al estroma de tumores mamarios. La figura 7A muestra que todas las líneas de cáncer evaluadas liberan niveles similares de RANTES, SDF1 y SCF, mientras que los niveles de G-CSF, GM-CSF, MCP-1 e IL-8 fueron mayores en el medio condicionado de líneas agresivas.

Para determinar si los niveles liberados de éstas moléculas eran capaces de inducir la quimioatracción de mastocitos, se procedió a realizar ensayos de migración por placas transwell utilizando como factor quimiotáctico las respectivas proteínas recombinantes. Estas proteínas fueron evaluadas de manera individual, en combinación con SCF o en cocteles que contenían a todas ellas. Para RANTES, SDF1 y SCF se usó el promedio de la concentración encontrada en el medio condicionado de todas las líneas de cáncer evaluadas, ya que las concentraciones fueron bastante homogéneas en todas las líneas; mientras que para G-CSF, GM-CSF, MCP1 e IL-8 se usaron dos concentraciones diferentes, una correspondiente a los niveles encontrados en los medios de las líneas no agresivas (bajo) y otro a los de las líneas agresivas (alto). En general, los resultados mostraron que los medios condicionados de células de CaMa mostraron mayores niveles de quimioatracción que cualquiera de las proteínas recombinantes, solas o en combinación. De manera importante, la combinación de MCP1 en alta concentración combinada con SCF indujo la quimioatracción de mastocitos LAD-2, mientras que la combinación de todas las biomoléculas en el coctel 2 (alta concentración) indujo la quimioatracción de ambas líneas de mastocitos, HMC1 y LAD-2 (Figura 7B). Esto podría indicar que estas moléculas al ser producidas por células de CaMa, son capaces de inducir la quimiotaxis de mastocitos al estroma tumoral. A pesar de haber quimioatracción de mastocitos

por las citocinas recombinantes, ésta no alcanzó los niveles de quimioataxis de los medios condicionados de células de CaMa, indicando que otras moléculas están participando en este proceso. Continuando con la caracterización del proceso de quimioatracción, diferentes compuestos lipídicos y anafilotoxinas de complemento han sido involucrados en el reclutamiento de mastocitos [85], por ello decidimos evaluar *in silico* si las células de CaMa expresan las enzimas responsables para la síntesis de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos, así como proteínas responsables en la síntesis de anafilotoxinas C3a y C5a. Utilizando la base de datos de expresión de la enciclopedia de líneas celulares de cáncer del “Broad Institute” (CCLE) que contiene datos de 1457 líneas de cáncer, decidimos evaluar los datos transcripcionales de *PTGS2*, *ALOX12*, *ALOX5AP*, *ALOX5*, *PTGES*, *PTGDS*, *TBXAS1*, *LTC4S*, *C2*, *C3*, *C4B* y *C5* en las líneas de CaMa utilizadas en este estudio. Los resultados mostraron únicamente la expresión de los genes *PTGES* y *LTC4S*, los cuales no fueron específicamente regulados positivamente en la línea agresiva MDA-MB-231, la cual indujo la mayor quimioatracción (Figura 7C). Lo anterior sugiere que la síntesis de mediadores lipídicos y las anafilotoxinas de complemento no explican la quimiotaxis de mastocitos por efecto de los componentes secretados por las células de CaMa. CCL15, TGF $\beta$ , angiopoyetina 1 y VEGF son otros factores que han sido identificados como quimioatrayentes de mastocitos [39, 56]. Datos publicados muestran que la secreción de TGF $\beta$  no parece ser específicamente enriquecida por la línea MDA-MB-231 comparado con las líneas T47D, MCF7 y HS578T [86]. Aunque en éste estudio no evaluamos la secreción de CCL15, angiopoyetina 1 y VEGF por células de CaMa, datos transcripcionales nuevamente no mostraron señales de una mayor expresión por la línea MDA-MB-231 con mayor potencial quimiotáctico (datos no mostrados).

En relación a la respuesta de degranulación, evaluamos la capacidad de RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1 e IL-8 para degranular los mastocitos. Contrario al efecto de quimioatracción en mastocitos, ninguna de las proteínas recombinantes evaluadas, solas o en combinación, fueron capaces de inducir la degranulación de mastocitos (Figura 7D). Así, los datos señalan que estas moléculas pueden

participar en la quimioatracción de mastocitos inducida por los medios condicionados de células de CaMa, sin embargo, no en su degranulación.



**Figura 7. Análisis de la quimioatracción y degranulación de mastocitos por diferentes citocinas y factores de crecimiento. A)** Los niveles de RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1 (arriba) e IL-8 y SCF (abajo) fueron determinados en los medios condicionados de células de CaMa usando un ensayo luminex múltiple (arriba) y ensayos de ELISA (abajo). Todas las proteínas fueron indetectables en el medio control. **B)** Análisis de quimioatracción de mastocitos LAD-2 (arriba) y HMC1 (abajo) usando como factor quimiotáctico proteínas recombinantes o medios condicionados de células de CaMa. Bajo y alto se refiere a la concentración media de citocinas encontradas en los medios condicionados provenientes de células no agresivas y la agresiva MDA-MB-231 respectivamente (especificado en la sección de métodos). Coctel 1 y 2 se refiere a la mezcla de todas las citocinas en bajas y altas concentraciones respectivamente. **C)** Comparación de la expresión de genes que codifican para proteínas asociadas a la síntesis de mediadores lipídicos y a las anafilotoxinas C3a y C5a en las líneas celulares de CaMa mostradas. Datos fueron obtenidos desde la base de datos “*Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)*” **D)** Análisis de degranulación de mastocitos LAD-2 en respuesta a proteínas recombinantes, individualmente o combinación (coctel 2) en altas concentraciones. Los resultados son mostrados como intensidad media de fluorescencia normalizada a la condición de mastocitos no estimulados. Datos representan la media  $\pm$  la

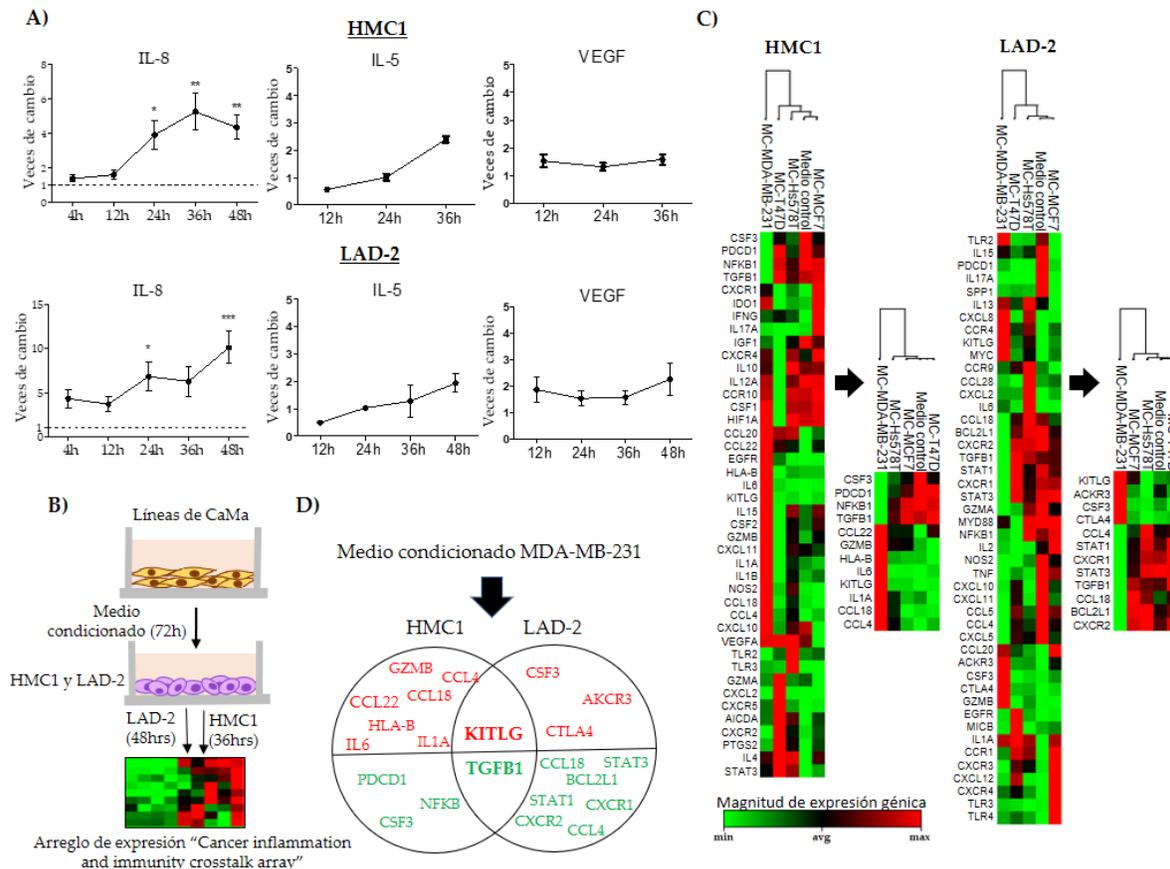
media del error estándar de 4 experimentos independientes por duplicados. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### **7.4 La línea de cáncer de mama agresiva MDA-MB-231 activa un programa transcripcional diferente en mastocitos**

Debido a que los componentes secretados por las líneas de CaMa evaluadas inducen la quimioatracción, pero no una potente degranulación de mastocitos, se evaluó si el perfil transcripcional de mastocitos es modificado después de su estimulación con medios condicionados de células de CaMa. Para ello utilizamos nuevamente el arreglo de expresión “Cancer Inflammation and Immunity Crosstalk”, evaluando el potencial de los mastocitos para influenciar el microambiente tumoral. Antes de realizar el arreglo, se determinó si existía evidencia de la inducción de cambios transcripcionales en mastocitos posterior al estímulo con el medio condicionado de la línea tumoral agresiva MDA-MB-231, debido a que ésta mostró un mayor efecto sobre la quimioatracción y degranulación de mastocitos. Para lo anterior, evaluamos una cinética de expresión del gen *IL-8* en las líneas de mastocitos HMC1 y LAD-2, encontrando que ambas líneas incrementan su expresión en respuesta al medio condicionado de la línea agresiva (Figura 8A). La cinética de expresión muestra un pico en la expresión de *IL-8*, a las 36 hrs para la línea HMC1 y a las 48 hrs para la línea LAD-2. Para confirmar que éstos tiempos son los adecuados para medir la expresión génica asociada a una respuesta tardía, también se determinaron las cinéticas de expresión de los genes *IL-5* y *VEGF* hasta los tiempos establecidos como óptimos. Como se muestra en la figura 8A, *IL-5* mostró similares resultados a *IL-8*, mientras que *VEGF* no mostró cambios a lo largo de los tiempos evaluados. Basado en estos resultados, los tiempos de 36 y 48 hrs fueron elegidos para el análisis del arreglo de expresión en mastocitos HMC1 y LAD-2 respectivamente (Figura 8B).

En acuerdo con la mayor inducción de quimioatracción y degranulación, un análisis no supervisado mostró que la estimulación de los mastocitos con la línea agresiva MDA-MB-231 indujo un programa transcripcional diferencial en ambas

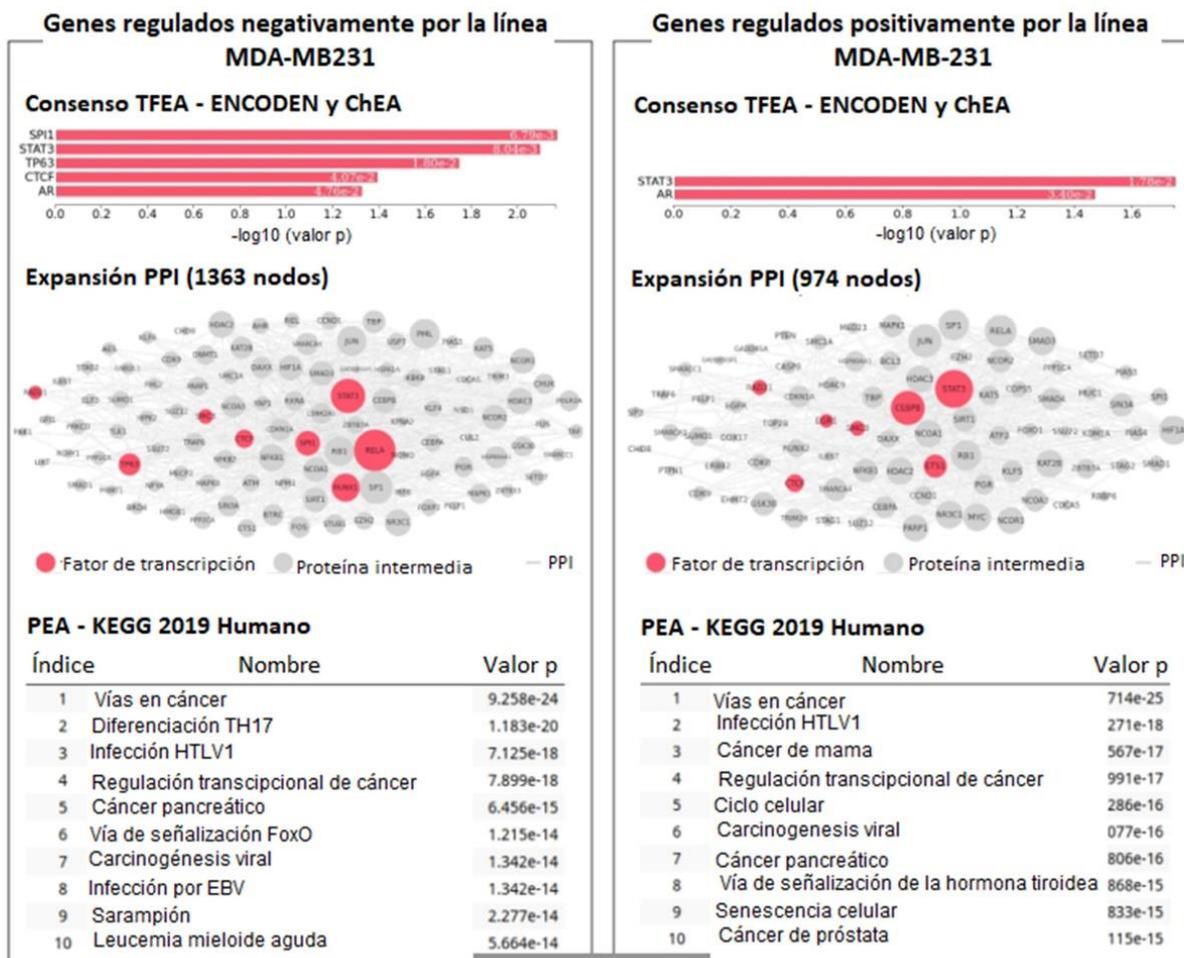
líneas de mastocitos, agrupándose diferencialmente de la condición control y el estímulo de las otras líneas de CaMa (Figura 8C). A través de un análisis supervisado se identificaron 12 genes responsables de la agrupación de la línea agresiva MDA-MB-231, los cuales fueron en su mayoría diferentes en mastocitos HMC1 y LAD-2. Los genes alterados en mastocitos HMC1 fueron *GZMB*, *CCL4*, *CCL22*, *CCL18*, *HLA-B*, *IL-6*, *IL-1A*, *KITLG*, *PDCD1*, *NFKB*, *CSF3* y *TGFB1*; mientras que en los mastocitos LAD-2 fueron *CSF3*, *AKCR3*, *CTLA4*, *KITLG*, *CCL18*, *STAT3*, *BCL2L1*, *STAT1*, *CXCR1*, *CXCR2*, *CCL4* y *TGFB1*. De manera importante la regulación positiva de *KITLG* y la regulación negativa de *TGFB1* fueron factores comunes en ambas líneas de mastocitos (Figura 8D).



**Figura 8. Análisis transcripcional de mastocitos estimulados con células de CaMa.** **A)** Cinética de expresión de *IL-8*, *IL-5* y *VEGF* en mastocitos HMC1 (arriba) y LAD-2 (abajo) en respuesta al medio condicionado de la línea agresiva MDA-MB-231. **B)** Flujo de trabajo del diseño experimental usado para evaluar el arreglo de expresión en mastocitos estimulados. **C)** Mapas de calor y dendogramas no supervisados (izquierda) y

supervisados-simplificados (derecha) en mastocitos HMC1 y LAD-2 en respuesta a los medios condicionados de las líneas de CaMa. Los mapas de calor del análisis supervisado muestran los genes responsables de la respuesta de agrupación del estímulo con la línea agresiva MDA-MB-231. **D)** Diagrama de Venn de mastocitos HMC1 y LAD-2 mostrando los genes expresados de manera individual o compartidos por ambas líneas de mastocitos después de su estimulación con el medio condicionado de la línea MDA-MB-231. Los colores rojo y verde en los dendogramas representan regulación positiva y negativa respectivamente. En **A)** los datos de *IL-8* representan tres experimentos independientes por duplicado, mientras que *IL-5* y *VEGF* simbolizan un experimento por triplicado. Los datos se muestran como la media  $\pm$  la media del error estándar. En **C y D)** los datos representan tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ .

Con los genes diferencialmente regulados por las células de MDA-MB-231 en ambas líneas de mastocitos, se realizaron análisis de enriquecimiento de factores de transcripción, construcción de redes de interacción funcional y análisis de enriquecimiento de vías de señalización. Sin embargo, debido a la diversidad de los genes alterados en ambas líneas de mastocitos, los datos nos mostraron información nueva relevante acerca de procesos biológicos asociados en la promoción y/o regresión del cáncer, más allá de vías involucradas en la señalización de citocinas y respuestas inflamatorias. La figura 9 muestra un ejemplo de éste análisis por la estimulación de la línea MDA-MB-231, donde SPI1, STAT3, TP63, CTCF y el receptor de andrógenos (AR) son factores de transcripción alterados en mastocitos.

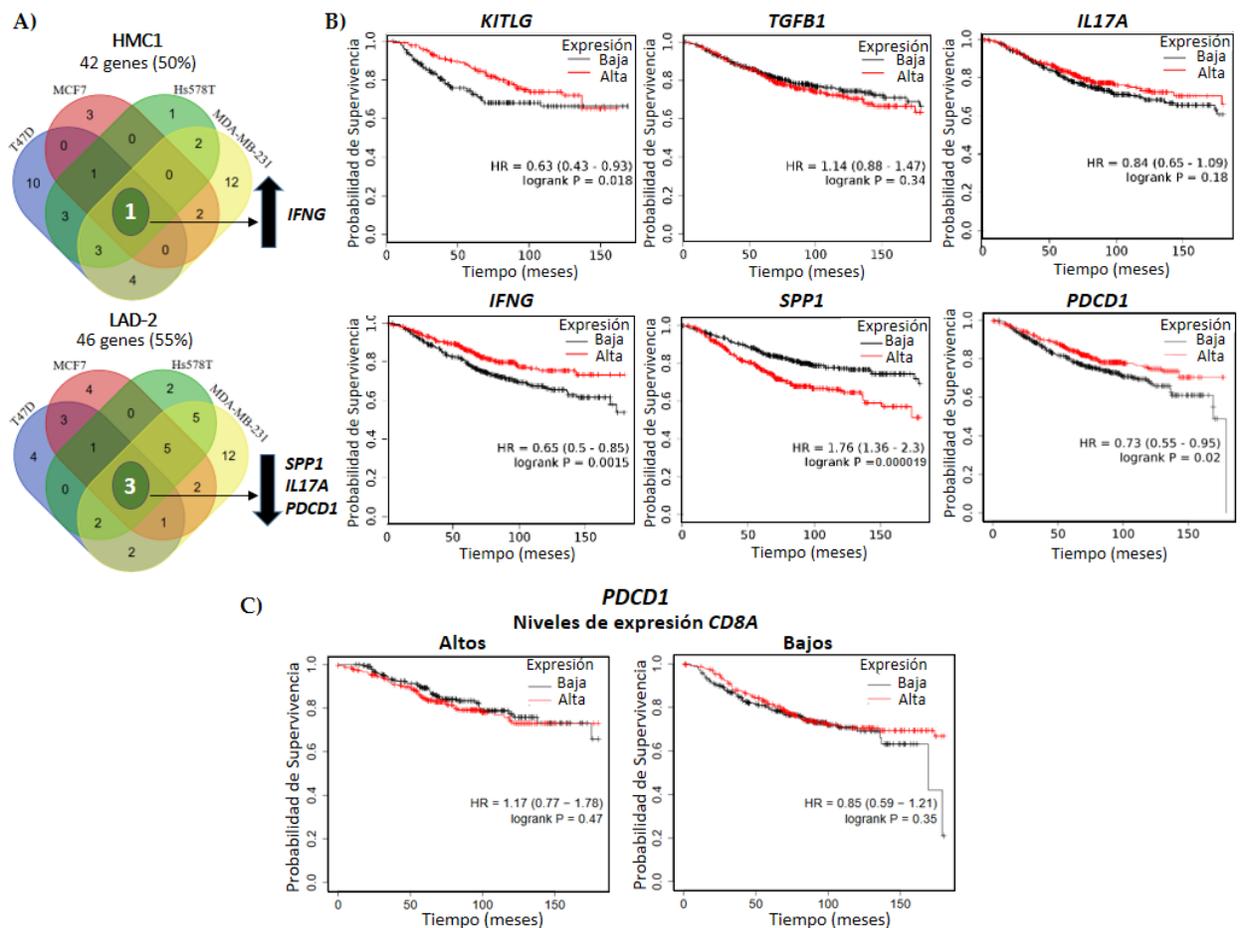


**Figura 9. Análisis bioinformático de genes regulados diferencialmente en los mastocitos después de su estimulación con medios condicionados de la línea agresiva MDA-MB-231.** Análisis de enriquecimiento de factores de transcripción, expansión de redes de interacción proteína-proteína y análisis de vías de enriquecimiento. El análisis de enriquecimiento de vías fue realizado con los nodos (factores de transcripción y proteínas intermedias) de las redes de interacción. Las tablas de abajo resumen las diez principales vías enriquecidas con su correspondiente valor de significancia.

## 7.5 Genes alterados en mastocitos determinan una mayor supervivencia de pacientes con cáncer de mama

El análisis de expresión de genes inflamatorios mostró que, en ambas líneas de mastocitos, alrededor del 50% de los genes evaluados fueron alterados en al menos una condición de estimulación por las líneas de CaMa (Figura 10A). La

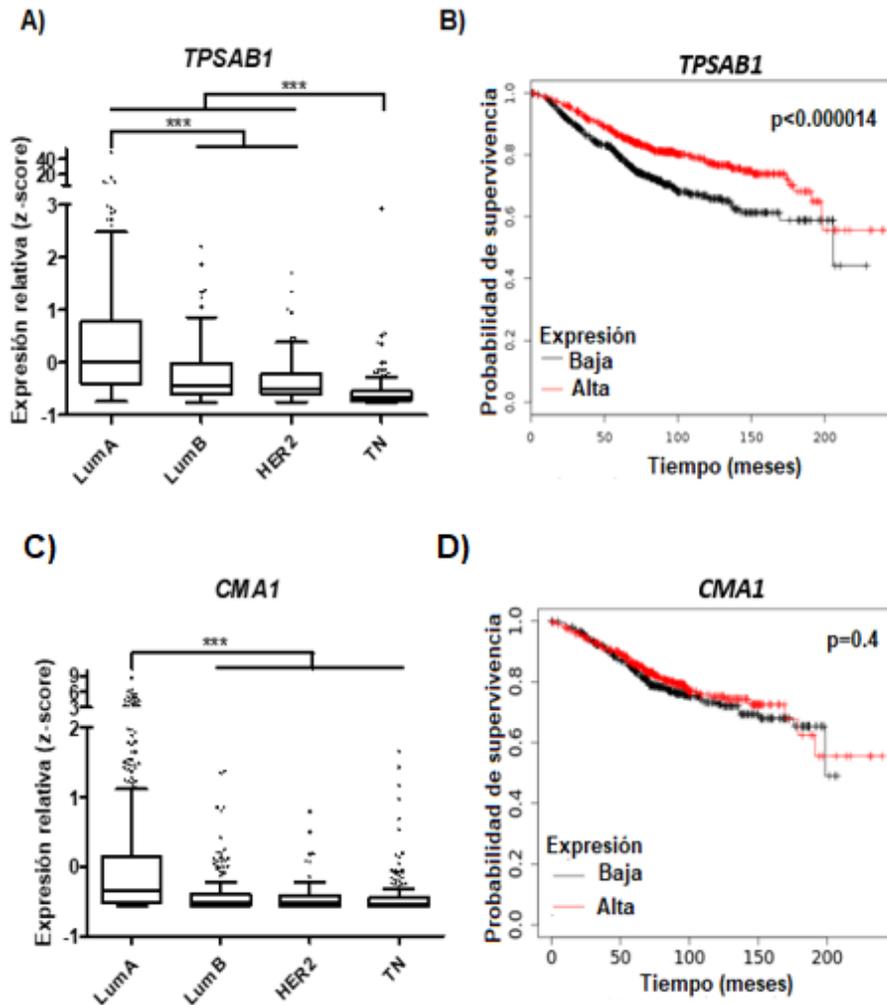
estimulación con todas las líneas de cáncer evaluadas compartió la regulación positiva de un gene (*IFNG*) en mastocitos HMC1 y la regulación negativa de tres genes (*IL17A*, *PDCD1* y *SPP1*) en mastocitos LAD-2 (Figura 10A). Interesantemente, aunque no hubo cambios similares en la expresión génica de ambas líneas de mastocitos,  $IFN\gamma$  y SCF (codificado por *KITLG*) han sido asociados con respuestas anti-tumorales, mientras que *IL17A*, PD-1 (codificado por *PDCD1*), Osteopontina (OPN, codificada por *SPP1*) y TGF- $\beta$ 1 han sido principalmente asociados a respuestas pro-tumorales. A través de la plataforma “Kaplan–Meier plotter” analizamos la supervivencia de pacientes con CaMa de acuerdo a los niveles de expresión de los genes *KITLG*, *TGFB1*, *IFNG*, *IL17A*, *PDCD1* y *SPP1*. Estos análisis se realizaron con datos públicos encontrados en las bases de datos “Gene Expression Omnibus (GEO)”, “the European Genome-phenome Archive (EGA)” y “the Cancer Genome Atlas (TCGA)”. Como era de suponer, los resultados mostraron que la alta expresión de *IFNG* (HR = 0.65, 95% CI = 0.5–0.85, p = 0.0015) y *KITLG* (HR = 0.63, 95% CI = 0.43–0.93, p = 0.018) están asociados a un buen pronóstico en pacientes con CaMa, mientras que *SPP1* fue asociado a un mal pronóstico (HR = 1.76, 95% CI = 1.36–2.3, p = 0.000019). Es de notar que contrario a lo esperado, *PDCD1* pareció ser un factor de buen pronóstico cuando es expresado en niveles altos. Sin embargo, es posible que *PDCD1* esté marcando la densidad de infiltrado de linfocitos CD8 positivos ya que también se ha observado su expresión en memoria central. Considerando esto las muestras se agruparon entre aquellas enriquecidas en la expresión de CD8 y las no enriquecidas en CD8. Cuando *PDCD1* se evaluó en tumores que homogéneamente presentan un alto infiltrado de linfocitos T CD8, aunque no significativo, el cociente de riesgo de la expresión de *PDCD1* se incrementó a HR = 1.17 (Figura 10C). Notablemente, los resultados mostraron que la expresión de *TGFB1* e *IL17A* parecen no influenciar significativamente la supervivencia de pacientes con CaMa (Figura 10B). Juntos estos hallazgos argumentan que los componentes secretados por células de CaMa alteran el estado transcripcional de mastocitos, siendo los cambios de expresión inducidos, asociados con señales anti-tumorales y una mayor supervivencia de pacientes con dicha enfermedad.



**Figura 10. Análisis de supervivencia de pacientes con CaMa. A)** Diagramas de Venn de mastocitos HMC1 (arriba) y LAD-2 (abajo) mostrando la intersección de genes que cambian después de la estimulación con medios condicionados de células de CaMa. Las zonas azul, roja, verde y amarilla presentan el número de genes alterados por los medios condicionados provenientes de las líneas T47D, MCF7, Hs578T y MDA-MB-231 respectivamente. Las flechas que indican hacia arriba y hacia abajo señalan el incremento o disminución en la expresión respectivamente. **B)** Gráficos de supervivencia de pacientes con CaMa comparando bajos y altos niveles de expresión de genes relevantes encontrados en mastocitos estimulados con células de CaMa. **C)** Gráficos de supervivencia de pacientes con CaMa comparando bajos y altos niveles de expresión del gen *PDCD1* en datos filtrados por la media de expresión alta y baja del gen *CD8A*. En **A)** los datos representan tres experimentos independientes.

## **7.6 La expresión del gen que codifica para un marcador característico de mastocitos (triptasa) funciona como un factor de buen pronóstico.**

Estudios previos han evaluado la presencia de mastocitos en el infiltrado tumoral con la finalidad de asociarlo a un factor pronóstico en pacientes con CaMa [18, 62, 66, 87-90]. La mayoría de éstos estudios se llevaron a cabo en pocos pacientes, siendo un promedio de 103 individuos por estudio. A través del uso de datos de expresión de 1,082 tumores de CaMa obtenidos por el TCGA, realizamos una re-evaluación de mastocitos como factor pronóstico. Para ello se evaluó la expresión de los genes *TPSAB1* y *CMA1* que codifican para las proteínas triptasa y quimasa respectivamente, marcadores clásicos y característicos de mastocitos. La figura 11A muestra que la expresión de *TPSAB1* está principalmente enriquecida en subtipos luminales de buen pronóstico. Adicionalmente, se pudo observar que pacientes con alta expresión de *TPSAB1* muestran una mayor sobrevida comparado con aquellos que presentan una baja expresión de dicho gen (Figura 11B). Pocos estudios han analizado la proteína quimasa, la cual se expresa en un subtipo particular de mastocitos humanos. Similar a los resultados de *TPSAB1*, el subtipo luminal A de buen pronóstico está enriquecido con la expresión de *CMA1* (Figura 11C), sin embargo, ésta no parece tener una relación con la supervivencia de pacientes con CaMa (Figura 11D). En conjunto, estos datos también apoyan que una aparente mayor infiltración de mastocitos, preferentemente triptasa positivos (MC<sub>T</sub>), parecen ser un factor benéfico y de buen pronóstico en pacientes con CaMa.



**Figura 11. Análisis de la expresión de los marcadores de mastocitos triptasa y quimasa en diferentes subtipos de CaMa y su relación con la supervivencia de pacientes.** Gráficos de la expresión relativa de los genes *TPSAB1* (A) y *CMA1* (C) que codifica para la proteína triptasa en diferentes subtipos de CaMa. Gráficos de la supervivencia de pacientes con CaMa comparando bajos y altos niveles de expresión de los genes *TPSAB1* (B) y *CMA1* (D).

## 8. DISCUSIÓN

La infiltración de mastocitos ha sido reiterativamente encontrada en tumores de CaMa, donde su densidad ha sido asociada con la promoción o supresión del crecimiento tumoral [18, 49, 62, 64, 66, 67, 87-93]. Algunos de los mecanismos pro-tumorales que han sido sugeridos son la promoción de angiogénesis a través de la síntesis y liberación de VEGF, así como la inducción de invasión y metástasis por efecto de diferentes proteasas. Por otra parte, entre los

mecanismos involucrados en la función anti-tumoral se encuentran la actividad citolítica dirigida contra células tumorales en regiones peri-tumorales [47] y la inhibición del crecimiento clonogénico de células de CaMa [94]. Una reciente función anti-tumoral fue evidenciada a través de la activación de mastocitos con anticuerpos IgE dirigidos contra el antígeno HER2, induciendo actividad tumoricida contra células de CaMa positivas para HER2 [95].

Debido a la plasticidad en la respuesta de mastocitos por señales externas, existe la posibilidad que diferentes funciones de mastocitos en tumores de CaMa sean influenciadas por el estado, grado y subtipo de CaMa. Adicionalmente, la presencia de diferentes subtipos de mastocitos con componentes intracelulares diferentes y localización específica en el tumor puedan favorecer respuestas anti- o pro-tumorales particulares. Aunque resolver todas estas variaciones es de gran importancia, este estudio tuvo como principal finalidad encontrar un modelo mecanístico de la respuesta de mastocitos en contacto con componentes secretados por células de CaMa. Por ello, evaluamos su capacidad de quimioatracción, activación temprana por degranulación y tardía por su actividad transcripcional de mediadores inflamatorios y de comunicación cruzada con el cáncer. Los mastocitos pueden ser reclutados por varios estímulos inflamatorios dentro del microambiente tumoral, algunos de ellos incluyen hipoxia, daño celular y factores solubles secretados por células tumorales y células estromales no cancerosas. Sin embargo, actualmente no es claro el origen de los mastocitos infiltrantes en el estroma tumoral del CaMa. Algunas posibilidades que se han planteado es que sean derivados de la expansión local de mastocitos residentes o de su quimioatracción a partir de mastocitos residentes de tejidos vecinos o precursores de medula ósea. En éste estudio se puso en evidencia que factores secretados por células de CaMa son capaces de inducir la quimioatracción de dos modelos celulares de mastocitos.

SCF es el factor quimiotáctico mejor caracterizado para el reclutamiento de mastocitos en tejidos sanos [36, 84]. Además, SCF derivado de tumores, ha sido caracterizado en la quimioatracción e infiltración de mastocitos en varios tipos de

cáncer, siendo algunos de ellos el carcinoma renal y el hepático [45, 96]. A pesar de observar la secreción de SCF por todas las líneas de CaMa evaluadas, así como su capacidad de quimioatracción de mastocitos HMC1 y LAD-2, particularmente en combinación con MCP1 u otras quimiocinas, estos datos no explican del todo la quimioatracción inducida por células de CaMa, lo cual nos sugiere la existencia de factores quimiotácticos adicionales. Aunque CCL15, TGF $\beta$ , angiopoyetina 1 y VEGF son factores que han sido identificados como quimioatrayentes de mastocitos, ellos no parecen ser los responsables de la quimioatracción de mastocitos inducida por las células de CaMa evaluadas. SCF, SDF1, RANTES y MCP1 también han sido previamente documentados como quimioattractores de mastocitos [84, 97], sin embargo, en los estudios que se evaluó esta quimioatracción se usaron concentraciones significativamente más altas en comparación con las encontradas en los medios condicionados de células de CaMa, lo cual pudiera no ser relevante fisiológicamente. De esta manera, aunque algunas de éstas moléculas pueden participar en el reclutamiento de mastocitos muy probablemente otras biomoléculas también están involucradas.

La degranulación de mastocitos es un proceso complejo que se regula por distintas señales de activación, induciendo diferentes estrategias de degranulación. Por ejemplo, la degranulación mediada por IgE que se observa en la defensa contra helmintos se caracteriza por la liberación masiva del contenido granular. En contraste, la vía alternativa conocida como degranulación piecemeal que se activa principalmente por citocinas y algunos productos microbianos, involucra la liberación selectiva de biomoléculas específicas [98, 99]. Este último proceso ha sido identificado durante procesos patológicos crónicos, tal como la enfermedad de Crohn's, angiosarcoma, urticaria y melanoma [98-100]. El cáncer es una enfermedad crónica, por lo que este proceso puede ser el mecanismo preferencial de la actividad de mastocitos en el microambiente tumoral. En este estudio, pudimos observar niveles moderados de degranulación y secreción de histamina y triptasa en respuesta a células de CaMa agresivas, sugiriendo un mecanismo de degranulación piecemeal, el cual requiere ser confirmado con estudios de microscopía electrónica. Similar a nuestros resultados, un estudio de

cáncer gástrico determinó que G-CSF, GM-CSF, TGF- $\beta$ , M-CSF, IL1 $\beta$ , IL17A, IL-6, TNF $\alpha$ , IL10 e IL22 no fueron capaces de inducir la degranulación de mastocitos, mientras que adrenomedulina sí [57]. Actualmente desconocemos si células de CaMa secretan éste componente, sin embargo, a nivel transcripcional existe una expresión independiente de la agresividad tumoral, lo cual sugiere que no es el factor que explica la degranulación observada ante el estímulo de las células Hs578T y MDA-MB-231 (datos no mostrados).

Los niveles de transcripción basal de mastocitos HMC1 y LAD-2 han sido previamente explorados en varios estudios. Sven Guhl y colaboradores analizaron la expresión de siete genes característicos de mastocitos [69]; las tres cadenas que forman el complejo del receptor FcERI (*FCER1A*, *FCER1B* y *FCER1G*), triptasa (*TPSAB1*), quimasa (*CMA1*), c-kit (*KIT*) e histidina descarboxilasa (*HDC*). Los autores encontraron que *TPSAB1*, *FCER1A*, *FCER1G*, *FCER1B* y *CMA1* fueron mayor o específicamente expresados por mastocitos LAD-2, mientras que no se encontró ningún gen expresado únicamente por mastocitos HMC1. Aikaterini Detoraki y colaboradores evaluaron la expresión de varios miembros de la familia de VEGF y sus receptores [72]. *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, factor de crecimiento placentario (*PIGF*), *VEGFR1* y *VEGFR2*. Aunque éste estudio no fue cuantitativo, se pudo demostrar que la mayoría de las moléculas fueron encontrada en ambas líneas de mastocitos, siendo únicamente *PIGF* exclusivo de mastocitos HMC1. En acuerdo, nuestros datos apoyan niveles similares de la expresión de *VEGFA* en ambas líneas de mastocitos. La expresión de la familia de óxido nítrico sintasa (NOS) también ha sido previamente comparada en ambas líneas de mastocitos, nNOS (*NOS1*, neuronal), iNOS (*NOS2*, inducible) y eNOS (*NOS3*, endotelial) [101]. Los autores encontraron alta expresión de *NOS3* y la ausencia en la expresión de *NOS2* en ambas líneas de mastocitos, mientras *NOS1* fue únicamente expresado en células HMC1. Debido a la importancia de *NOS2* en las respuestas inmunes, el arreglo de expresión utilizado en este trabajo también lo evalúa. El análisis realizado demostró bajos niveles de su expresión en condiciones basales de ambas líneas de mastocitos. Recientemente varias firmas de expresión génica han sido utilizadas para caracterizar e identificar células

inmunes infiltradas en el estroma de varios tumores [80, 102-107]. Aunque en general estos estudios no han alcanzado un consenso en una firma característica de mastocitos, ellos coinciden en que éstas células comparten la expresión de *TPSAB1*, *CMA1*, *CTSG*, *CPA3*, *HDC*, *MS4A2* y *PRG2*. En este contexto, aunque pocos genes inflamatorios han sido evaluados, algunos de ellos son compartidos con los genes encontrados en nuestro análisis. Siendo algunos de ellos *PTGS1*, *IL1A* e *IL1B*, los cuales pertenecieron únicamente a mastocitos LAD-2. Lo anterior quizás refleja su mayor diferenciación, similar a lo observado en mastocitos que habitan el estroma tumoral. En resumen, estos estudios concuerdan con nuestros datos, apoyando que mastocitos HMC1 y LAD-2 a pesar de pertenecer a un mismo tipo celular, muestran diferencias significativas en sus niveles basales de expresión de genes que codifican para moléculas inflamatorias efectoras distintivas de este linaje celular.

Tras el estímulo de ambas líneas de mastocitos con la línea agresiva MDA-MB-231, nuestros resultados mostraron una regulación positiva de *KITLG* y una regulación negativa de *TGFB1*. En conjunto, la alta expresión de *KITLG* identificó mayor supervivencia en pacientes con CaMa. SCF es la molécula más importante para el desarrollo, supervivencia y activación de mastocitos. Recientemente, un análisis proteómico de muestras de plasma, encontró niveles más bajos de SCF en mujeres que posteriormente desarrollaron CaMa comparado con aquellas que permanecieron saludables. Los autores sostuvieron que SCF podría funcionar como un biomarcador de pronóstico en circulación y posiblemente como factor que incrementa los mecanismos de control tumoral a través de la quimiotracción y activación de mastocitos [108]. Por otro lado,  $TGF\beta$  ha sido principalmente asociado con el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM) [109], un programa embrionario en el cual las células pierden la expresión de proteínas adherentes y ganan la expresión de proteínas de movimiento. En el desarrollo y evolución de tumores, programas de TEM activos permiten procesos de invasión, metástasis y recaída, por lo que  $TGF\beta$  es generalmente considerado un marcador de mal pronóstico. De manera sorprendente, *TGFB1* no tuvo asociación con la supervivencia de pacientes con CaMa, esto puede explicarse a que múltiples

líneas de evidencia colocan a TGF $\beta$  como un factor supresor de tumores, particularmente como un inhibidor de proliferación e inmortalización celular, así como un promotor de apoptosis [110, 111]. Importantemente, TGF $\beta$  también ha sido implicado en la quimioatracción y activación de mastocitos humanos y murinos en el intestino [33, 112], posiblemente resultando en un equilibrio entre mecanismos pro- y anti-tumorales.

Parte de nuestros resultados también mostraron que todas las líneas de CaMa evaluadas indujeron la regulación positiva de *IFNG* en mastocitos HMC1 y la regulación negativa de *SPP1*, *IL17A* y *PDCD1* en las LAD-2. Mientras que *IFNG* y *PDCD1* se asociaron con un incremento en la supervivencia de pacientes con CaMa, *SPP1* fue asociado de manera opuesta. PD-1 es una proteína que funciona como punto de control para balancear la respuesta inmune y evitar una activación descontrolada [113]. Células cancerosas a menudo inducen la expresión de PD-1 para atenuar la inmunidad tumoral [114], por lo que su bloqueo a través de anticuerpos monoclonales ha sido continuamente utilizado en pacientes con cánceres como melanoma. A pesar de lo anterior, de acuerdo a nuestros datos, la expresión de *PDCD1* fue asociada con un incremento en la supervivencia de pacientes con CaMa. Una posible explicación para esta observación es que, a pesar de expresar PD-1, células T CD8 infiltrantes en los tumores de pacientes con CaMa, retengan su capacidad de producir citocinas efectoras como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , así como una proliferación y actividad citotóxica funcional [115]. En acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que el bloqueo de PD-1 activa una modesta respuesta en pacientes con CaMa, beneficiando únicamente una minoría de pacientes [116]. Aunque PD-1 no ha sido estudiado en mastocitos, la delección de *PDCD1* en células mieloides induce una inmunidad anti-tumoral en un modelo de cáncer en ratón [117].

*SPP1* y OPN han sido identificados como marcadores de progresión y baja supervivencia de pacientes con CaMa, promoviendo la proliferación de células tumorales, angiogénesis, migración y metástasis a hueso [118-120]. En acuerdo, la inhibición de OPN disminuye significativamente el crecimiento tumoral local y la

metástasis distante en un modelo de xenoinjerto múrido [121]. OPN también ha sido involucrada en el incremento de factores de transcripción relacionados a TEM como Twist, Snail y Slug en células de CaMa [122]. Además, un meta-análisis de diez estudios clínicos encontró una correlación entre la baja tasa de supervivencia de pacientes con CaMa y altos niveles de OPN en suero y en tumor [123]. Por otro lado, IFN $\gamma$  ha sido fuertemente asociado con la protección del hospedero en múltiples tipos de cáncer, tanto en modelos experimentales como en estudios pre-clínicos y clínicos [124, 125]. IFN $\gamma$  es capaz de activar un efecto citostático directo en células de cáncer [126], así mismo induce una respuesta citotóxica de células T CD8 y NK, quizás la actividad anti-tumoral inmune más importante [124]. Un estudio en el cual la vía de IFN $\gamma$ R se restauró a través de tecnología CRISPR, mostró un incremento en la eficacia de inmunoterapia. Esto se debió en gran medida al incremento en la función de células T CD8 y una mejor presentación de antígenos [127]. Además, en pacientes de CaMa, se ha mostrado que los niveles de IFN $\gamma$  en suero son asociados con una respuesta clínica favorable, antes y después de inmunoterapia combinada con anti-CTLA4 y anti-PD-1 [128].

Triptasa es la proteasa intracelular más abundante en mastocitos, constituyendo hasta el 50% de todas las proteínas intragranulares [129]. Aunque esta proteína no es completamente exclusiva de mastocitos, se ha encontrado únicamente en basófilos en niveles menores al 1% comparado con la triptasa expresada en mastocitos [130]. Debido a esto, triptasa es ampliamente utilizada en el reconocimiento de mastocitos en tejidos y en el estroma de varios tumores. Utilizando la expresión de triptasa como marcador de mastocitos en tumores de CaMa, pudimos demostrar que éstos parecen estar asociados a tumores luminales de buen pronóstico y una mayor supervivencia de pacientes con tumores mamarios. Aunque estos resultados corroboran trabajos previos, también contrastan con algunos otros. Las mayores limitantes de todos estos estudios son los pocos campos de tejido analizados y el uso de cortes menores a 150 pacientes, sin embargo, el análisis proteínico y la visualización directa de mastocitos fue de gran utilidad en su reconocimiento dentro del microambiente tumoral. Quimasa es otra proteasa de mastocitos, sin embargo, ésta sólo se

encuentra en una subpoblación que es reconocida como mastocitos triptasa y quimasa positivos (MC<sub>TC</sub>). Diferente a triptasa, los niveles de expresión de *CMA1* (quimasa) no estuvieron asociados a la supervivencia de pacientes con CaMa, sin embargo, sí se encontraron enriquecidos en tumores luminales A de buen pronóstico. Estos resultados podrían implicar que una mayor infiltración de mastocitos de subtipo triptasa positivos (MC<sub>T</sub>) más que MC<sub>TC</sub>, son asociados a buen pronóstico en pacientes con CaMa, quedando en acuerdo con datos proteínicos evaluados anteriormente [87].

## 9. CONCLUSIONES

Existen diferencias significativas en la transcripción basal de las líneas de mastocitos HMC1 y LAD-2 que pudieran reflejar los diferentes estadios de maduración que representan.

Los mastocitos son atraídos y activados por células de CaMa, particularmente en mayor medida por subtipos más agresivos. RANTES, SDF1, G-CSF, GM-CSF, MCP1, IL-8 y SCF participan en este reclutamiento de mastocitos, sin embargo, otros factores no identificados parecen también estar involucrados.

Tras la activación de mastocitos, hay una transcripción alterada de *KITLG*, *TGFB1*, *IFNG*, *SPP1*, *IL17A* y *PDCD1*, que está asociada con funciones anti-tumorales y una mayor supervivencia de pacientes con CaMa.

La correlación de los genes anteriores y el buen pronóstico en CaMa también se evidenció con datos transcripcionales de *TPSAB1*, una de las proteasas más características de mastocitos.

Finalmente, nuestros datos apoyan que, en el microambiente de tumores de CaMa, la respuesta de mastocitos y su presencia se asocia con un buen pronóstico de las pacientes.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO, World Health Organization [Internet]. [www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer), 2020.

2. WHO, World Health Organization. *International agency for research on Cancer*, **2020**: p. <https://gco.iarc.fr/today/home>.
3. Taherian-Fard, A., S. Srihari, and M.A. Ragan, Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. *Brief Bioinform*, **2015**. 16(3): p. 461-74.
4. Tsang, J.Y.S. and G.M. Tse, Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol*, **2020**. 27(1): p. 27-35.
5. Zeng, X., C. Liu, J. Yao, H. Wan, G. Wan, Y. Li, and N. Chen, Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications. *Pharmacol Res*, **2021**. 163: p. 105320.
6. Curtis, C., S.P. Shah, S.F. Chin, G. Turashvili, O.M. Rueda, M.J. Dunning, D. Speed, A.G. Lynch, S. Samarajiwa, Y. Yuan, et al., The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, **2012**. 486(7403): p. 346-52.
7. Jackson, H.W., J.R. Fischer, V.R.T. Zanotelli, H.R. Ali, R. Mechera, S.D. Soysal, H. Moch, S. Muenst, Z. Varga, W.P. Weber, et al., The single-cell pathology landscape of breast cancer. *Nature*, **2020**. 578(7796): p. 615-620.
8. Tekpli, X., T. Lien, A.H. Rossevoid, D. Nebdal, E. Borgen, H.O. Ohnstad, J.A. Kyte, J. Vallon-Christersson, M. Fongaard, E.U. Due, et al., An independent poor-prognosis subtype of breast cancer defined by a distinct tumor immune microenvironment. *Nat Commun*, **2019**. 10(1): p. 5499.
9. Wagner, J., M.A. Rapsomaniki, S. Chevrier, T. Anzeneder, C. Langwieder, A. Dykgers, M. Rees, A. Ramaswamy, S. Muenst, S.D. Soysal, et al., A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. *Cell*, **2019**. 177(5): p. 1330-1345 e18.
10. Sadeghalvad, M., H.R. Mohammadi-Motlagh, and N. Rezaei, Immune microenvironment in different molecular subtypes of ductal breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, **2021**. 185(2): p. 261-279.
11. Goff, S.L. and D.N. Danforth, The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, **2021**. 21(1): p. e63-e73.
12. Chimal-Ramirez, G.K., N.A. Espinoza-Sanchez, and E.M. Fuentes-Panana, Protumor activities of the immune response: insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. *J Oncol*, **2013**. 2013: p. 835956.
13. Arneth, B., Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)*, **2019**. 56(1).
14. Guo, Q., Z. Jin, Y. Yuan, R. Liu, T. Xu, H. Wei, X. Xu, S. He, S. Chen, Z. Shi, et al., New Mechanisms of Tumor-Associated Macrophages on Promoting Tumor Progression: Recent Research Advances and Potential Targets for Tumor Immunotherapy. *J Immunol Res*, **2016**. 2016: p. 9720912.
15. Linde, N., M. Casanova-Acebes, M.S. Sosa, A. Mortha, A. Rahman, E. Farias, K. Harper, E. Tardio, I. Reyes Torres, J. Jones, et al., Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat Commun*, **2018**. 9(1): p. 21.

16. Ushach, I. and A. Zlotnik, Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*, **2016**. 100(3): p. 481-9.
17. Bonapace, L., M.M. Coissieux, J. Wyckoff, K.D. Mertz, Z. Varga, T. Junt, and M. Bentires-Alj, Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature*, **2014**. 515(7525): p. 130-3.
18. Keser, S.H., N.O. Kandemir, D. Ece, G.G. Gecmen, A.E. Gul, N.O. Barisik, S. Senu, C. Buyukuysal, and F. Barut, Relationship of mast cell density with lymphangiogenesis and prognostic parameters in breast carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*, **2017**. 33(4): p. 171-180.
19. Byrne, A., P. Savas, S. Sant, R. Li, B. Virassamy, S.J. Luen, P.A. Beavis, L.K. Mackay, P.J. Neeson, and S. Loi, Tissue-resident memory T cells in breast cancer control and immunotherapy responses. *Nat Rev Clin Oncol*, **2020**. 17(6): p. 341-348.
20. Dieci, M.V., F. Miglietta, and V. Guarneri, Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells*, **2021**. 10(2).
21. Mehraj, U., A.H. Dar, N.A. Wani, and M.A. Mir, Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2021**. 87(2): p. 147-158.
22. Aragon-Sanabria, V., G.B. Kim, and C. Dong, From Cancer Immunoediting to New Strategies in Cancer Immunotherapy: The Roles of Immune Cells and Mechanics in Oncology. *Adv Exp Med Biol*, **2018**. 1092: p. 113-138.
23. Sagnella, S.M., L. Yang, G.E. Stubbs, E. Boslem, E. Martino-Echarri, K. Smolarczyk, S.L. Pattison, N. Vanegas, E. St Clair, S. Clarke, et al., Cyto-Immuno-Therapy for Cancer: A Pathway Elicited by Tumor-Targeted, Cytotoxic Drug-Packaged Bacterially Derived Nanocells. *Cancer Cell*, **2020**. 37(3): p. 354-370 e7.
24. Gurish, M.F. and K.F. Austen, Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*, **2012**. 37(1): p. 25-33.
25. Abraham, S.N. and A.L. St John, Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol*, **2010**. 10(6): p. 440-52.
26. Dahlin, J.S. and J. Hallgren, Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol*, **2015**. 63(1): p. 9-17.
27. Schmetzer, O., P. Valentin, M.K. Church, M. Maurer, and F. Siebenhaar, Murine and human mast cell progenitors. *Eur J Pharmacol*, **2016**. 778: p. 2-10.
28. Krystel-Whittemore, M., K.N. Dileepan, and J.G. Wood, Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*, **2015**. 6: p. 620.
29. Dahlin, J.S., M. Ekoff, J. Grootens, L. Lof, R.M. Amini, H. Hagberg, J.S. Ungerstedt, U. Olsson-Stromberg, and G. Nilsson, KIT signaling is dispensable for human mast cell progenitor development. *Blood*, **2017**. 130(16): p. 1785-1794.
30. Frossi, B., F. Mion, R. Sibilano, L. Danelli, and C.E.M. Pucillo, Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev*, **2018**. 282(1): p. 35-46.
31. De Leo, B., A. Esnal-Zufiaurre, F. Collins, H.O.D. Critchley, and P.T.K. Saunders, Immunoprofiling of human uterine mast cells identifies three

- phenotypes and expression of ERbeta and glucocorticoid receptor. *F1000Res*, **2017**. 6: p. 667.
32. Bischoff, S.C., G. Sellge, A. Lorentz, W. Sebald, R. Raab, and M.P. Manns, IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**. 96(14): p. 8080-5.
  33. Gebhardt, T., A. Lorentz, F. Detmer, C. Trautwein, H. Bektas, M.P. Manns, and S.C. Bischoff, Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor beta1. *Gut*, **2005**. 54(7): p. 928-34.
  34. Lawrence, I.D., J.A. Warner, V.L. Cohan, W.C. Hubbard, A. Kagey-Sobotka, and L.M. Lichtenstein, Purification and characterization of human skin mast cells. Evidence for human mast cell heterogeneity. *J Immunol*, **1987**. 139(9): p. 3062-9.
  35. Cildir, G., H. Pant, A.F. Lopez, and V. Tergaonkar, The transcriptional program, functional heterogeneity, and clinical targeting of mast cells. *J Exp Med*, **2017**. 214(9): p. 2491-2506.
  36. da Silva, E.Z., M.C. Jamur, and C. Oliver, Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*, **2014**. 62(10): p. 698-738.
  37. Theoharides, T.C., D. Kempuraj, M. Tegen, P. Conti, and D. Kalogeromitros, Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev*, **2007**. 217: p. 65-78.
  38. Huber, M., A.C.B. Cato, G.K. Ainooson, M. Freichel, V. Tsvilovskyy, R. Jessberger, E. Riedlinger, C.P. Sommerhoff, and S.C. Bischoff, Regulation of the pleiotropic effects of tissue-resident mast cells. *J Allergy Clin Immunol*, **2019**. 144(4S): p. S31-S45.
  39. Varricchi, G., M.R. Galdiero, S. Loffredo, G. Marone, R. Iannone, G. Marone, and F. Granata, Are Mast Cells MASTers in Cancer? *Front Immunol*, **2017**. 8: p. 424.
  40. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, The development of allergic inflammation. *Nature*, **2008**. 454(7203): p. 445-54.
  41. Dudeck, J., S.M. Ghouse, C.H. Lehmann, A. Hoppe, N. Schubert, S.A. Nedospasov, D. Dudziak, and A. Dudeck, Mast-Cell-Derived TNF Amplifies CD8(+) Dendritic Cell Functionality and CD8(+) T Cell Priming. *Cell Rep*, **2015**. 13(2): p. 399-411.
  42. Tsuge, K., T. Inazumi, A. Shimamoto, and Y. Sugimoto, Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. *Int Immunol*, **2019**. 31(9): p. 597-606.
  43. Dudeck, A., M. Koberle, O. Goldmann, N. Meyer, J. Dudeck, S. Lemmens, M. Rohde, N.G. Roldan, K. Dietze-Schwonberg, Z. Orinska, et al., Mast cells as protectors of health. *J Allergy Clin Immunol*, **2019**. 144(4S): p. S4-S18.
  44. Branco, A., F.S.Y. Yoshikawa, A.J. Pietrobon, and M.N. Sato, Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm*, **2018**. 2018: p. 9524075.
  45. Huang, B., Z. Lei, G.M. Zhang, D. Li, C. Song, B. Li, Y. Liu, Y. Yuan, J. Unkeless, H. Xiong, et al., SCF-mediated mast cell infiltration and activation exacerbate the inflammation and immunosuppression in tumor microenvironment. *Blood*, **2008**. 112(4): p. 1269-79.

46. Rigoni, A., M.P. Colombo, and C. Pucillo, The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, **2015**. 8(3): p. 167-76.
47. Della Rovere, F., A. Granata, M. Monaco, and G. Basile, Phagocytosis of cancer cells by mast cells in breast cancer. *Anticancer Res*, **2009**. 29(8): p. 3157-61.
48. Sato, S., A. Kukita, and S.I. Sato, Phagocytosis and degradation of melanosomes by the mast cells. *J Invest Dermatol*, **1969**. 53(3): p. 183-6.
49. della Rovere, F., A. Granata, D. Familiari, G. D'Arrigo, B. Mondello, and G. Basile, Mast cells in invasive ductal breast cancer: different behavior in high and minimum hormone-receptive cancers. *Anticancer Res*, **2007**. 27(4B): p. 2465-71.
50. Shikotra, A., C.M. Ohri, R.H. Green, D.A. Waller, and P. Bradding, Mast cell phenotype, TNFalpha expression and degranulation status in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*, **2016**. 6: p. 38352.
51. Murata, T., K. Aritake, S. Matsumoto, S. Kamauchi, T. Nakagawa, M. Hori, E. Momotani, Y. Urade, and H. Ozaki, Prostaglandin D2 is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2011**. 108(49): p. 19802-7.
52. Siebenhaar, F., M. Metz, and M. Maurer, Mast cells protect from skin tumor development and limit tumor growth during cutaneous de novo carcinogenesis in a Kit-dependent mouse model. *Exp Dermatol*, **2014**. 23(3): p. 159-64.
53. Oldford, S.A., I.D. Haidl, M.A. Howatt, C.A. Leiva, B. Johnston, and J.S. Marshall, A critical role for mast cells and mast cell-derived IL-6 in TLR2-mediated inhibition of tumor growth. *J Immunol*, **2010**. 185(11): p. 7067-76.
54. Drobits, B., M. Holcman, N. Amberg, M. Swiecki, R. Grundtner, M. Hammer, M. Colonna, and M. Sibilgia, Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest*, **2012**. 122(2): p. 575-85.
55. Gounaris, E., S.E. Erdman, C. Restaino, M.F. Gurish, D.S. Friend, F. Gounari, D.M. Lee, G. Zhang, J.N. Glickman, K. Shin, et al., Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2007**. 104(50): p. 19977-82.
56. Yu, Y., B. Blokhuis, Y. Derks, S. Kumari, J. Garssen, and F. Redegeld, Human mast cells promote colon cancer growth via bidirectional crosstalk: studies in 2D and 3D coculture models. *Oncoimmunology*, **2018**. 7(11): p. e1504729.
57. Lv, Y.P., L.S. Peng, Q.H. Wang, N. Chen, Y.S. Teng, T.T. Wang, F.Y. Mao, J.Y. Zhang, P. Cheng, Y.G. Liu, et al., Degranulation of mast cells induced by gastric cancer-derived adrenomedullin prompts gastric cancer progression. *Cell Death Dis*, **2018**. 9(10): p. 1034.
58. Stoyanov, E., M. Uddin, D. Mankuta, S.M. Dubinett, and F. Levi-Schaffer, Mast cells and histamine enhance the proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*, **2012**. 75(1): p. 38-44.
59. Kabiraj, A., R. Jaiswal, A. Singh, J. Gupta, A. Singh, and F.M. Samadi, Immunohistochemical evaluation of tumor angiogenesis and the role of mast

- cells in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*, **2018**. 14(3): p. 495-502.
60. Micu, G.V., F. Staniceanu, L.C. Sticlaru, C.G. Popp, A.E. Bastian, E. Gramada, G. Pop, R.B. Mateescu, M. Rimbasi, B. Archip, et al., Correlations Between the Density of Tryptase Positive Mast Cells (DMCT) and that of New Blood Vessels (CD105+) in Patients with Gastric Cancer. *Rom J Intern Med*, **2016**. 54(2): p. 113-20.
  61. Wagner, W., A. Ichikawa, S. Tanaka, P. Panula, and W.A. Fogel, Mouse mammary epithelial histamine system. *J Physiol Pharmacol*, **2003**. 54(2): p. 211-23.
  62. Fakhrou, A., M. Naghavi-Behzad, V. Montazeri, F. Karkon-Shayan, L. Norouzi-Panahi, and R. Piri, The relationship between histologic grades of invasive carcinoma of breast ducts and mast cell infiltration. *South Asian J Cancer*, **2016**. 5(1): p. 5-7.
  63. He, L., Z. Zhu, S. Chen, Y. Wang, and H. Gu, Mammary tumor growth and metastasis are reduced in c-Kit mutant Sash mice. *Cancer Med*, **2016**. 5(6): p. 1292-7.
  64. Marech, I., M. Ammendola, R. Sacco, G.S. Capriuolo, R. Patruno, R. Rubini, M. Luposella, V. Zuccala, E. Savino, C.D. Gadaleta, et al., Serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density evaluation in early breast cancer patients: possible translational significance. *BMC Cancer*, **2014**. 14: p. 534.
  65. Dabiri, S., D. Huntsman, N. Makretsov, M. Cheang, B. Gilks, C. Bajdik, K. Gelmon, S. Chia, and M. Hayes, The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. *Mod Pathol*, **2004**. 17(6): p. 690-5.
  66. Glajcar, A., J. Szpor, A. Pacek, K.E. Tyrak, F. Chan, J. Streb, D. Hodorowicz-Zaniewska, and K. Okon, The relationship between breast cancer molecular subtypes and mast cell populations in tumor microenvironment. *Virchows Arch*, **2017**. 470(5): p. 505-515.
  67. Rajput, A.B., D.A. Turbin, M.C. Cheang, D.K. Voduc, S. Leung, K.A. Gelmon, C.B. Gilks, and D.G. Huntsman, Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res Treat*, **2008**. 107(2): p. 249-57.
  68. Samoszuk, M. and M.A. Corwin, Mast cell inhibitor cromolyn increases blood clotting and hypoxia in murine breast cancer. *Int J Cancer*, **2003**. 107(1): p. 159-63.
  69. Guhl, S., M. Babina, A. Neou, T. Zuberbier, and M. Artuc, Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells--drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines. *Exp Dermatol*, **2010**. 19(9): p. 845-7.
  70. Nilsson, G., T. Blom, M. Kusche-Gullberg, L. Kjellen, J.H. Butterfield, C. Sundstrom, K. Nilsson, and L. Hellman, Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol*, **1994**. 39(5): p. 489-98.
  71. Jemima, E.A., A. Prema, and E.B. Thangam, Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells. *Mol Immunol*, **2014**. 62(1): p. 19-28.

72. Detoraki, A., R.I. Staiano, F. Granata, G. Giannattasio, N. Prevete, A. de Paulis, D. Ribatti, A. Genovese, M. Triggiani, and G. Marone, Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *J Allergy Clin Immunol*, **2009**. 123(5): p. 1142-9, 1149 e1-5.
73. Strik, M.C., P.J. de Koning, M.J. Kleijmeer, B.A. Bladergroen, A.M. Wolbink, J.M. Griffith, D. Wouters, Y. Fukuoka, L.B. Schwartz, C.E. Hack, et al., Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. *Mol Immunol*, **2007**. 44(14): p. 3462-72.
74. Carvalho, R.F., G. Nilsson, and I.T. Harvima, Increased mast cell expression of PAR-2 in skin inflammatory diseases and release of IL-8 upon PAR-2 activation. *Exp Dermatol*, **2010**. 19(2): p. 117-22.
75. Arock, M., G. Wedeh, G. Hoermann, S. Bibi, C. Akin, B. Peter, K.V. Gleixner, K. Hartmann, J.H. Butterfield, D.D. Metcalfe, et al., Preclinical human models and emerging therapeutics for advanced systemic mastocytosis. *Haematologica*, **2018**. 103(11): p. 1760-1771.
76. Kirshenbaum, A.S., Y. Yin, J.B. Sundstrom, G. Bandara, and D.D. Metcalfe, Description and Characterization of a Novel Human Mast Cell Line for Scientific Study. *Int J Mol Sci*, **2019**. 20(22).
77. Laidlaw, T.M., J.W. Steinke, A.M. Tinana, C. Feng, W. Xing, B.K. Lam, S. Paruchuri, J.A. Boyce, and L. Borish, Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and expresses functional FcepsilonRI. *J Allergy Clin Immunol*, **2011**. 127(3): p. 815-22 e1-5.
78. Saleh, R., G. Wedeh, H. Herrmann, S. Bibi, S. Cerny-Reiterer, I. Sadovnik, K. Blatt, E. Hadzijusufovic, S. Jeanningros, C. Blanc, et al., A new human mast cell line expressing a functional IgE receptor converts to tumorigenic growth by KIT D816V transfection. *Blood*, **2014**. 124(1): p. 111-20.
79. Hoermann, G., K. Blatt, G. Greiner, E.M. Putz, A. Berger, H. Herrmann, S. Cerny-Reiterer, K.V. Gleixner, C. Walz, K. Hoetzenecker, et al., CD52 is a molecular target in advanced systemic mastocytosis. *FASEB J*, **2014**. 28(8): p. 3540-51.
80. Barretina, J., G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A.A. Margolin, S. Kim, C.J. Wilson, J. Lehar, G.V. Kryukov, D. Sonkin, et al., The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, **2012**. 483(7391): p. 603-7.
81. Chen, E.Y., H. Xu, S. Gordonov, M.P. Lim, M.H. Perkins, and A. Ma'ayan, Expression2Kinases: mRNA profiling linked to multiple upstream regulatory layers. *Bioinformatics*, **2012**. 28(1): p. 105-11.
82. Clarke, D.J.B., M.V. Kuleshov, B.M. Schilder, D. Torre, M.E. Duffy, A.B. Keenan, A. Lachmann, A.S. Feldmann, G.W. Gundersen, M.C. Silverstein, et al., eXpression2Kinases (X2K) Web: linking expression signatures to upstream cell signaling networks. *Nucleic Acids Res*, **2018**. 46(W1): p. W171-W179.
83. Deshmane, S.L., S. Kremlev, S. Amini, and B.E. Sawaya, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, **2009**. 29(6): p. 313-26.

84. Draber, P., I. Halova, I. Polakovicova, and T. Kawakami, Signal transduction and chemotaxis in mast cells. *Eur J Pharmacol*, **2016**. 778: p. 11-23.
85. Halova, I., L. Draberova, and P. Draber, Mast cell chemotaxis - chemoattractants and signaling pathways. *Front Immunol*, **2012**. 3: p. 119.
86. Espinoza-Sanchez, N.A., E. Vadillo, J.C. Balandran, A. Monroy-Garcia, R. Pelayo, and E.M. Fuentes-Panana, Evidence of lateral transmission of aggressive features between different types of breast cancer cells. *Int J Oncol*, **2017**. 51(5): p. 1482-1496.
87. Kankkunen, J.P., I.T. Harvima, and A. Naukkarinen, Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer*, **1997**. 72(3): p. 385-8.
88. Kashiwase, Y., J. Morioka, H. Inamura, Y. Yoshizawa, R. Usui, and M. Kurosawa, Quantitative analysis of mast cells in benign and malignant breast lesions. Immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Int Arch Allergy Immunol*, **2004**. 134(3): p. 199-205.
89. Ranieri, G., M. Ammendola, R. Patruno, G. Celano, F.A. Zito, S. Montemurro, A. Rella, V. Di Lecce, C.D. Gadaleta, G. Battista De Sarro, et al., Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. *Int J Oncol*, **2009**. 35(1): p. 115-20.
90. Sang, J., D. Yi, X. Tang, Y. Zhang, and T. Huang, The associations between mast cell infiltration, clinical features and molecular types of invasive breast cancer. *Oncotarget*, **2016**. 7(49): p. 81661-81669.
91. Bowrey, P.F., J. King, C. Magarey, P. Schwartz, P. Marr, E. Bolton, and D.L. Morris, Histamine, mast cells and tumour cell proliferation in breast cancer: does preoperative cimetidine administration have an effect? *Br J Cancer*, **2000**. 82(1): p. 167-70.
92. Carpenco, E., R.A. Ceausu, A.M. Cimpean, P.N. Gaje, L. Saptefrati, V. Fulga, V. David, and M. Raica, Mast Cells as an Indicator and Prognostic Marker in Molecular Subtypes of Breast Cancer. *In Vivo*, **2019**. 33(3): p. 743-748.
93. Ribatti, D., N. Finato, E. Crivellato, D. Guidolin, V. Longo, D. Mangieri, B. Nico, A. Vacca, and C.A. Beltrami, Angiogenesis and mast cells in human breast cancer sentinel lymph nodes with and without micrometastases. *Histopathology*, **2007**. 51(6): p. 837-42.
94. Samoszuk, M., E. Kanakubo, and J.K. Chan, Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. *BMC Cancer*, **2005**. 5: p. 121.
95. Plotkin, J.D., M.G. Elias, M. Fereydouni, T.R. Daniels-Wells, A.L. Dellinger, M.L. Penichet, and C.L. Kepley, Human Mast Cells From Adipose Tissue Target and Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells. *Front Immunol*, **2019**. 10: p. 138.
96. Xiong, Y., L. Liu, Y. Xia, Y. Qi, Y. Chen, L. Chen, P. Zhang, Y. Kong, Y. Qu, Z. Wang, et al., Tumor infiltrating mast cells determine oncogenic HIF-2alpha-conferred immune evasion in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, **2019**. 68(5): p. 731-741.

97. Lv, Y., Y. Zhao, X. Wang, N. Chen, F. Mao, Y. Teng, T. Wang, L. Peng, J. Zhang, P. Cheng, et al., Increased intratumoral mast cells foster immune suppression and gastric cancer progression through TNF-alpha-PD-L1 pathway. *J Immunother Cancer*, **2019**. 7(1): p. 54.
98. Dvorak, A.M. and S. Kissell, Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. *J Leukoc Biol*, **1991**. 49(2): p. 197-210.
99. Vukman, K.V., A. Forsonits, A. Oszvald, E.A. Toth, and E.I. Buzas, Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin Cell Dev Biol*, **2017**. 67: p. 65-73.
100. Demitsu, T., T. Inoue, M. Kakurai, T. Kiyosawa, K. Yoneda, and M. Manabe, Activation of mast cells within a tumor of angiosarcoma: ultrastructural study of five cases. *J Dermatol*, **2002**. 29(5): p. 280-9.
101. Gilchrist, M., S.D. McCauley, and A.D. Befus, Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: effects on leukotriene production. *Blood*, **2004**. 104(2): p. 462-9.
102. Angelova, M., P. Charoentong, H. Hackl, M.L. Fischer, R. Snajder, A.M. Krogsdam, M.J. Waldner, G. Bindea, B. Mlecnik, J. Galon, et al., Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome Biol*, **2015**. 16: p. 64.
103. Charoentong, P., F. Finotello, M. Angelova, C. Mayer, M. Efremova, D. Rieder, H. Hackl, and Z. Trajanoski, Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. *Cell Rep*, **2017**. 18(1): p. 248-262.
104. Ghatalia, P., J. Gordetsky, F. Kuo, E. Dulaimi, K.Q. Cai, K. Devarajan, S. Bae, G. Naik, T.A. Chan, R. Uzzo, et al., Prognostic impact of immune gene expression signature and tumor infiltrating immune cells in localized clear cell renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer*, **2019**. 7(1): p. 139.
105. He, Y., Z. Jiang, C. Chen, and X. Wang, Classification of triple-negative breast cancers based on Immunogenomic profiling. *J Exp Clin Cancer Res*, **2018**. 37(1): p. 327.
106. Jerby-Arnon, L., P. Shah, M.S. Cuoco, C. Rodman, M.J. Su, J.C. Melms, R. Leeson, A. Kanodia, S. Mei, J.R. Lin, et al., A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell*, **2018**. 175(4): p. 984-997 e24.
107. Newman, A.M., C.L. Liu, M.R. Green, A.J. Gentles, W. Feng, Y. Xu, C.D. Hoang, M. Diehn, and A.A. Alizadeh, Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods*, **2015**. 12(5): p. 453-7.
108. Oktay, K., A. Santaliz-Casiano, M. Patel, N. Marino, A.M.V. Storniolo, H. Torun, B. Acar, and Z. Madak Erdogan, A Computational Statistics Approach to Evaluate Blood Biomarkers for Breast Cancer Risk Stratification. *Horm Cancer*, **2020**. 11(1): p. 17-33.
109. Imamura, T., A. Hikita, and Y. Inoue, The roles of TGF-beta signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. *Breast Cancer*, **2012**. 19(2): p. 118-24.

110. Lebrun, J.J., The Dual Role of TGFbeta in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Mol Biol*, **2012**. 2012: p. 381428.
111. Tang, J., C.C. Gifford, R. Samarakoon, and P.J. Higgins, Deregulation of Negative Controls on TGF-beta1 Signaling in Tumor Progression. *Cancers (Basel)*, **2018**. 10(6).
112. Vitsky, A., J. Waire, R. Pawliuk, A. Bond, D. Matthews, E. Lacasse, M.L. Hawes, C. Nelson, S. Richards, P.A. Piepenhagen, et al., Homeostatic role of transforming growth factor-beta in the oral cavity and esophagus of mice and its expression by mast cells in these tissues. *Am J Pathol*, **2009**. 174(6): p. 2137-49.
113. Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, **2008**. 26: p. 677-704.
114. Schutz, F., S. Stefanovic, L. Mayer, A. von Au, C. Domschke, and C. Sohn, PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncol Res Treat*, **2017**. 40(5): p. 294-297.
115. Egelston, C.A., C. Avalos, T.Y. Tu, D.L. Simons, G. Jimenez, J.Y. Jung, L. Melstrom, K. Margolin, J.H. Yim, L. Kruper, et al., Human breast tumor-infiltrating CD8(+) T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. *Nat Commun*, **2018**. 9(1): p. 4297.
116. Page, D.B., H. Bear, S. Prabhakaran, M.E. Gatti-Mays, A. Thomas, E. Cobain, H. McArthur, J.M. Balko, S.R. Gameiro, R. Nanda, et al., Two may be better than one: PD-1/PD-L1 blockade combination approaches in metastatic breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, **2019**. 5: p. 34.
117. Strauss, L., M.A.A. Mahmoud, J.D. Weaver, N.M. Tijaro-Ovalle, A. Christofides, Q. Wang, R. Pal, M. Yuan, J. Asara, N. Patsoukis, et al., Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Sci Immunol*, **2020**. 5(43).
118. Rittling, S.R. and A.F. Chambers, Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer*, **2004**. 90(10): p. 1877-81.
119. Rudland, P.S., A. Platt-Higgins, M. El-Tanani, S. De Silva Rudland, R. Barraclough, J.H. Winstanley, R. Howitt, and C.R. West, Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res*, **2002**. 62(12): p. 3417-27.
120. Walaszek, K., E.E. Lower, P. Ziolkowski, and G.F. Weber, Breast cancer risk in premalignant lesions: osteopontin splice variants indicate prognosis. *Br J Cancer*, **2018**. 119(10): p. 1259-1266.
121. Mi, Z., H. Guo, M.B. Russell, Y. Liu, B.A. Sullenger, and P.C. Kuo, RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells. *Mol Ther*, **2009**. 17(1): p. 153-61.
122. Li, N.Y., C.E. Weber, Z. Mi, P.Y. Wai, B.D. Cuevas, and P.C. Kuo, Osteopontin up-regulates critical epithelial-mesenchymal transition transcription factors to induce an aggressive breast cancer phenotype. *J Am Coll Surg*, **2013**. 217(1): p. 17-26; discussion 26.
123. Hao, C., Z. Wang, Y. Gu, W.G. Jiang, and S. Cheng, Prognostic Value of Osteopontin Splice Variant-c Expression in Breast Cancers: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*, **2016**. 2016: p. 7310694.

124. Parker, B.S., J. Rautela, and P.J. Hertzog, Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **2016**. 16(3): p. 131-44.
125. Payne, K.K. and M.H. Manjili, Adaptive immune responses associated with breast cancer relapse. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **2012**. 60(5): p. 345-50.
126. Braumuller, H., T. Wieder, E. Brenner, S. Assmann, M. Hahn, M. Alkhaled, K. Schilbach, F. Essmann, M. Kneilling, C. Griessinger, et al., T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, **2013**. 494(7437): p. 361-5.
127. Manguso, R.T., H.W. Pope, M.D. Zimmer, F.D. Brown, K.B. Yates, B.C. Miller, N.B. Collins, K. Bi, M.W. LaFleur, V.R. Juneja, et al., In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature*, **2017**. 547(7664): p. 413-418.
128. Barak, V., I. Kalickman, B. Nisman, H. Farbstein, Z.G. Fridlender, L. Baider, A. Kaplan, S. Stephanos, and T. Peretz, Changes in cytokine production of breast cancer patients treated with interferons. *Cytokine*, **1998**. 10(12): p. 977-83.
129. Liu, X., J. Wang, H. Zhang, M. Zhan, H. Chen, Z. Fang, C. Xu, H. Chen, and S. He, Induction of Mast Cell Accumulation by Tryptase via a Protease Activated Receptor-2 and ICAM-1 Dependent Mechanism. *Mediators Inflamm*, **2016**. 2016: p. 6431574.
130. Jogie-Brahim, S., H.K. Min, Y. Fukuoka, H.Z. Xia, and L.B. Schwartz, Expression of alpha-tryptase and beta-tryptase by human basophils. *J Allergy Clin Immunol*, **2004**. 113(6): p. 1086-92.