



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Evaluación de macrófagos asociados a tumor en ratones isotransplantados
con células 4T1 y tratados con extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Hugo César Sánchez Rivera

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Laura Cobos Marín
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

COMITÉ TUTOR:

María Isabel Gracia Mora
Facultad de Química. UNAM

Laura Patricia Romero Romero
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

Ciudad de México. Agosto 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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias al financiamiento y la colaboración entre el Departamento de Microbiología e Inmunología, el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), y de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química.

Dedicatorias

A mi madre Guillermina Rivera M. por todo el cariño, amor, dedicación y esfuerzo.

A mi hermano Alex

A mis padrinos Gisela y Carlos por su cariño, amor y apoyo.

A mis abuelos Gilafira y Darío

Agradecimientos

A la vida

A mis asesores, la Dra. Laura Cobos, la Dra. Isabel Gracia y la Dra. Laura Romero; por su paciencia, dedicación y enseñanzas.

A mi querida Dra. Laura Cobos, quien es un ejemplo de superación y dedicación. Gracias por todas sus enseñanzas, consejos y amistad.

A la Dra Isabel Gracia por su compromiso y accesibilidad.

A la Dra Laura Romero por todo el apoyo brindado.

A la M.C Julia Díaz Cortez por la estandarización e implementación del modelo en ratón utilizado, así como todo su apoyo, paciencia y trabajo.

A Lucía Macias Rosales por sus enseñanzas sobre la inoculación de células tumorales en ratones, administración de tratamientos, registro datos y todo el apoyo brindado durante el proyecto. Gracias.

Al Dr. Pablo Hernández Peralta por sus enseñanzas en la técnica de perfusión y compartir sus experiencias con el estudio del cáncer. Una persona correcta y ejemplo a seguir. Muchas gracias.

A la histotecnóloga Karen J. Guiatareo por su apoyo durante los cortes de los tumores en el criostato.

A la MVZ Daniela Monroy y al MVZ Ajitzi David Espejo por su apoyo durante la administración de los tratamientos y registros de la medición de los tumores y pesos de los ratones.

A todo el equipo de la UNIPREC: Lucía Macias, Marisol Rivera, Francisco Sánchez, Mabel Tinoco, Héctor Rico, Mariano Garcia, Luis Romero.

A la Dra. Fabiola Gómez por todo su apoyo y cariño.

A la Dra. Grisel Anaya por sus enseñanzas, actitud positiva y amabilidad conmigo.

A mis compañeros, amigos y colegas del laboratorio de virología e inmunología de mi querida facultad: Pablo Peralta, Julia Díaz, Isabel Duarte, Daniela Monroy, Laura Gallegos, Marion Galindo, Ariadna Jimenez, Jose Becerra, Erika Martínez, Yolotzin Melquiades, Karen Rojas, Ajitzi Espejo.

A mis queridos amigos y pilares de vida; Esther, Ettean, Almen, César y Erika.

Resumen

Los macrófagos tienen plasticidad y un espectro de activación que depende de las citocinas y otros estímulos a su alrededor. Se pueden diferenciar en dos perfiles principales: los macrófagos activados de manera clásica o pro-inflamatorios (M1) con funciones antimicrobianas y generalmente anticancerígenas y los activados vía alternativa o antiinflamatorios (M2) con funciones de reparación y generalmente protumorales. En México y otros países se usan partes de plantas o sus derivados para tratar diversos tipos de padecimientos como desórdenes inflamatorios e incluso el cáncer. El *Agave mapisaga* es un tipo de Agavacea usada en la medicina tradicional Nãñhu. En ensayos *in vitro* con su extracto hidrosoluble, se ha demostrado un efecto citotóxico en células de cáncer de próstata y de mama. Además, disminuye la implantación de células PEC-*Src* de cáncer de próstata *in vivo*. El objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de macrófagos CD68+NOS2+ (“M1”) y CD68+CD206+ (“M2”) en cortes histológicos de cáncer de mama murino mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron 37 ratones hembra de la línea BALB/cAnNHsd de 6-8 semanas de edad, isotransplantadas con cien mil células de cáncer de mama murino 4T1 en el cojinete graso de la glándula mamaria y fueron tratadas con 25, 50, 100 ó 250 mg/kg del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, agua o cisplatino (Noveldexis®). En este trabajo no se encontró evidencia de que la administración diaria del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* a dosis de 25, 50, 100 ó 250 mg/kg aumente el porcentaje de macrófagos antitumorales (M1) en el microambiente tumoral. Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa para el volumen tumoral entre el grupo tratado con agua y los tratados diariamente con 25, 50, 100 ó 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* al día 27 post inoculación de cien mil células 4T1.

En conclusión, el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* no mostró un efecto modulador sobre los macrófagos presentes en el microambiente tumoral de cáncer de mama murino, ni logró disminuir el volumen tumoral.

Palabras clave: macrófagos, *Agave mapisaga*, cáncer de mama, 4T1

Abstract

Macrophages have plasticity and their activation spectrum that depends on the cytokines and other stimuli around them. They can be differentiated into two main profiles: classically or pro-inflammatory (M1) activated macrophages with antimicrobial and generally anti-cancer functions and those activated via alternative or anti-inflammatory (M2) with repair and generally pro-tumor functions.

In Mexico and other countries, plant components or their derivatives are used to treat various types of diseases such as inflammatory disorders and even cancer. *Agave mapisaga* is a type of agavaceous used in traditional Nãñhu medicine. In *in vitro* tests of its water-soluble extract, a cytotoxic effect on prostate and breast cancer cells has been demonstrated. In addition, it reduces the implantation of PEC-*Src* prostate cancer cells *in vivo*. The aim of this work was to determine the percentage of macrophages CD68+NOS2+ ("M1") and CD68+CD206+ ("M2") in histological sections of murine breast cancer by means of indirect immunofluorescence. Thirty-seven 6-8 weeks old female BALB/cAnNHsd mice were used and isotransplanted with one hundred thousand 4T1 murine breast cancer cells in the mammary gland fat pad and treated with 25, 50, 100 or 250 mg/kg of water-soluble *Agave mapisaga* extract, water or cisplatin (Noveldexis®). In this work, no evidence was found that the daily administration of the hydrosoluble extract of *Agave mapisaga* at doses of 25, 50, 100 or 250 mg/kg increases the percentage of antitumoral macrophages (M1) in the tumor microenvironment. No statistically significant difference was found for the tumor volume between the water-treated group and those treated daily with 25, 50, 100 or 250 mg/kg of water-soluble *Agave mapisaga* extract per day 27 post inoculation of one hundred thousand 4T1 cells.

In conclusion, the water-soluble extract of *Agave mapisaga* did not show a modulating effect on the macrophages present in the tumor microenvironment of murine breast cancer, nor did it succeed in decreasing the tumor volume.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA	15
1.2 CÁNCER DE MAMA	15
1.3 MODELO DE CÁNCER DE MAMA MURINO 4T1	16
1.4 MACRÓFAGOS.....	17
1.4.1 CD68.....	17
1.5 MACRÓFAGO M1	18
1.5.1 NOS2.....	18
1.6 MACRÓFAGO M2	19
1.6.1 CD206.....	19
1.7 MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMOR (TAMs).....	20
1.8 ORIGEN DE LOS MACRÓFAGOS EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL DE MAMA	21
1.9 POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS COMO ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER.....	21
1.10 PLANTAS Y SUS COMPUESTOS ANTICANCERÍGENOS.....	22
1.11 FAMILIA <i>AGAVACEAE</i>	22
1.11.1 <i>AGAVE MAPISAGA</i>	23
1.12 EFECTO DEL EXTRACTO HIDROSOLUBLE DE <i>AGAVE MAPISAGA</i> EN CÁNCER Y MACRÓFAGOS	23
1.13 SAPONINAS ESTEROIDALES	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO	26
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
5.1 EXTRACTO HIDROSOLUBLE DE AGAVE MAPISAGA	27
5.2 RATONES.....	27
5.3 CULTIVO DE CÉLULAS TUMORALES 4T1 <i>IN VITRO</i>	28
5.4 ISOTRANSPLANTACIÓN.....	28
5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
5.6 TOMA DE MUESTRAS	30
5.7 ANTICUERPOS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA	31
5.7.1 ANTICUERPOS PRIMARIOS.....	31
5.7.2 ANTICUERPOS SECUNDARIOS	31
5.8 INMUNOFLUORESCENCIA EN MACRÓFAGOS J774A.1 CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	31
5.9 BAZO Y MÚSCULO	32
5.10 TUMORES	34
5.10.1 PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS M1 Y M2 EN CORTES DE TUMOR PRIMARIO	34
5.11 ANÁLISIS DE MACRÓFAGOS A PARTIR DE CORTES DE TEJIDO POR INMUNOFLUORESCENCIA	34
5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35

6. RESULTADOS	36
6.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS 4T1.....	36
6.2 ISOTRANSPLANTACIÓN Y TRATAMIENTOS	37
6.3 EUTANASIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	39
6.4 TUMORES PRIMARIOS A LA NECROPSIA	40
6.5 TAMAÑO TUMORAL.....	41
6.6 INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS J774A.1 CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	42
6.7 INMUNOFLUORESCENCIA DE MACRÓFAGOS EN TEJIDO	43
6.7.1 BAZO	43
6.7.2 MÚSCULO.....	44
6.8 TUMORES.....	45
6.9 PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS M1 Y M2 EN CORTES DE TUMOR PRIMARIO	48
6.9.1 MACRÓFAGOS CD68+NOS2+.....	48
6.9.2 MACRÓFAGOS CD68+CD206+	52
6.9.2 PROPORCIÓN DE MACRÓFAGOS M1/M2	55
7. DISCUSIÓN.....	56
8. CONCLUSIÓN.....	61
9. REFERENCIAS	62
10. APÉNDICE.....	70
APÉNDICE 1. SOLUCIONES	70
APÉNDICE 2. CONSIDERACIONES METODOLOGICAS	71
ANEXO 1. DICTAMEN DEL CICUAL	74

Lista de Cuadros

CUADRO 1. NÚMERO DE RATONES QUE DESARROLLARON AL MENOS UNA NEOPLASIA PALPABLE DESPUÉS DE IMPLANTAR CIENTO MIL CÉLULAS 4T1 EN EL COJINETE GRASO DE LA GLÁNDULA MAMARIA IZQUIERDA.	37
CUADRO 2. PARÁMETROS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL EQUIPO IMAGEEXPRESS.	46
CUADRO 3. COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE MEDIAS DE DUNN PARA MACRÓFAGOS “M1” ENTRE GRUPOS.	49
CUADRO 4. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE DUNNETT PARA MACRÓFAGOS “M2” ENTRE GRUPOS.	53

Lista de Figuras

FIGURA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
FIGURA 2. CÉLULAS 4T1.....	36
FIGURA 3. RATONES BALB/C IMPLANTADOS CON CIEN MIL CÉLULAS 4T1 EN EL COGINETE GRASO DE LA GLÁNDULA MAMARIA IZQUIERDA AL DIA 25 POST-INOCULACIÓN.....	38
FIGURA 4. TOMA DE MUESTRAS PARA INMUNOFLUORESCENCIA..	39
FIGURA 5. TUMORES PRESENTADOS A LA NECROPSIA.....	40
FIGURA 6. VOLUMEN DE LOS TUMORES POR GRUPO A LOS 27 DPI.	41
FIGURA 7. INMUNOFLUORESCENCIA DE MACRÓFAGOS J774A.1 CULTIVADOS <i>IN VITRO</i>	42
FIGURA 8. INMUNOFLUORESCENCIA EN CORTES DE TEJIDO DE BAZO DE RATONES SANOS.....	43
FIGURA 9. INMUNOFLUORESCENCIA EN CORTES DE TEJIDO DE MÚSCULO DE RATONES SANOS.....	44
FIGURA 12. DISTRIBUCIÓN DE MACRÓFAGOS “M1” (CD68+NOS2+).....	48
FIGURA 13. PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS CD68+NOS2+ (PERFIL “M1”) EN LOS CORTES DE TUMOR PRIMARIO DE MAMA.	51
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE MACRÓFAGOS “M2” (CD68+CD206+).....	52
FIGURA 15. PORCENTAJE DE MACRÓFAGOS CD68+CD206+ (PERFIL “M2”) EN LOS CORTES DE TUMOR PRIMARIO ENTRE GRUPOS.....	54
FIGURA 16. PROPORCIÓN DE MACRÓFAGOS CD68+NOS2+ (PERFIL “M1”)/ CD68+CD206+ (PERFIL “M2”) EN LOS CORTES DE TUMOR PRIMARIO ENTRE GRUPOS.....	55

Abreviaturas y siglas utilizadas

ATCC	American Type Culture Collection
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
BALB/c	Cepa de ratón albino
CCL2	Ligando de quimioquinas 2
CD	Cluster of Differentiation
Células 4T1	Línea celular de cáncer de mama murino
CFU-GM	Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
Cm	Centímetro
Cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	Dióxido de carbono
CSF	Factor estimulante de colonias
CSF1-R	Receptor de factor estimulante de colonias 1
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DC	Células dendríticas
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Suero normal de burro
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FITC	Isotioscianato de fluoresceína
FIZZ1	Resistin-like molecule alpha or found in inflammatory zone protein
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición de masas
HRG	Glicoproteínas ricas en histidina
IDC	Carcinoma ductal invasivo
IL	Interleucina
INF	Interferón
IP	Intraperitoneal
kg	kilogramos
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófago
MCPs	Proteínas quimiotácticas de monocitos

mg	Miligramos
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
ml	Mililitro
MMR	Receptores de manosa
nm	Nanómetros
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS2	Óxido nítrico sintasa Inducible
°C	Grado Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PEC-3	Línea celular de cáncer de próstata murino
PFA	Paraformaldehído
PIGF	Factor de crecimiento placentario
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero Fetal Bovino
TAMs	Macrófagos asociados a tumor
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
Th	T helper cells
TNF	Factor de necrosis tumoral
UDIBI	Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UNEXA	Unidad de Experimentación Animal
UNIPREC	Unidad de Investigación Preclínica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
µg	Microgramo
µl	Microlitro

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial con 521,907 defunciones por año. Esta elevada mortalidad se debe a su diagnóstico en etapas tardías, cuando el cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo (metástasis) y existen menos alternativas de tratamiento. Cuando se detecta en etapas tempranas y se recibe atención médica, la tasa de supervivencia es de cinco años en un 80% de los pacientes. En América Latina es el tipo de neoplasia más común en mujeres, con una incidencia de 150,000 casos anuales. En México el número de casos se ha incrementado, en el año 2014 se registraron 11,300 casos nuevos y en el 2018 aproximadamente 27,283 (OMS, 2018). El grupo de edad más afectado se encuentra entre los 50 y 59 años con un 45% de todos los casos. En el año 2015 se registraron 6,252 defunciones en mujeres de más de 25 años por tumor maligno de mama y los estados con mayor mortalidad fueron: Sonora, Nuevo León, Coahuila, Ciudad de México y Sinaloa con una tasa de 28.6, 26, 24.8, 24.7 y 22.2, respectivamente (www.gob.mx, 2019). Debido a la importancia de esta enfermedad, se han encaminado esfuerzos para prevenir y detectar este tipo de cáncer en etapas tempranas, así como la investigación para aumentar la eficacia de los tratamientos actuales y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es un tipo de neoplasia del epitelio glandular que afecta la estructura y la función de la glándula mamaria. Los tumores de glándula mamaria tienen cuatro etapas descritas: la hiperplasia, el carcinoma ductal *in situ*, el carcinoma ductal invasivo y el carcinoma metastásico (Polyak, 2007). La hiperplasia se refiere a la multiplicación aberrante de las células epiteliales en la glándula mamaria, resultado de la alteración en sus mecanismos de regulación; las células entonces adquieren características ventajosas y se transforman en células

cancerosas (Hanahan and Weinberg, 2011). En el carcinoma ductal *in situ* (DCIS) las células neoplásicas están confinadas al ducto mamario y son las precursoras del carcinoma ductal invasivo (IDC). En el IDC se pierde la integridad de las células mioepiteliales y de la membrana basal (Shah *et al.*, 2015; Espina and Liotta, 2011) lo que permite a las células neoplásicas llegar a otros órganos a través de los vasos sanguíneos en un proceso conocido como metástasis, dando lugar al carcinoma metastásico. En el cancer de mama se encuentran macrófagos y al igual que el cancer de pulmón, el carcinoma hepatocelular y el carcinoma de células renales se correlacionan con un pronóstico desfavorable (Campbell *et al.*, 2011; Mahmoud *et al.*, 2012; Medrek *et al.*, 2012; Komohara *et al.*, 2011).

1.3 Modelo de cáncer de mama murino 4T1

El carcinoma mamario 4T1 es una línea celular transplantable que fue aislada a partir de sublíneas de un tumor de cáncer de mama espontáneo en ratones BALB/c, pueden crecer en líneas de ratones BALB/c consanguíneas sin ser rechazadas debido a que comparten el mismo arreglo y expresión de genes (haplotipo) (Dexter *et al.*, 1978; Aslakson and Miller, 1992). Las células 4T1 pueden proliferar y crecer *in vitro* o en ratones BALB/cfC3H *in vivo*, por lo que son útiles para múltiples propósitos como evaluar el efecto de tratamientos antineoplásicos. El modelo de isotransplatación de células 4T1 en ratón es considerado adecuado para el estudio del cáncer de mama humano por dos principales características: 1) después de su implantación se desarrolla una neoplasia de manera ortotópica y una vez establecido el tumor primario, puede generar metástasis a nódulos linfáticos, sangre, hígado, pulmones, cerebro y hueso (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 1998); 2). Las células 4T1 tienen la capacidad de reclutar macrófagos y otras células inmunes al secretar factores quimiotácticos como CCL2 (Madera *et al.*, 2015) que en ratones inmunocompetentes generan un proceso neoplásico en el que se encuentran presentes células tumorales, células estromales y células del sistema inmune. En estos tumores los macrófagos tienen una relevancia particular, ya que

son las células inmunes más abundantes y son considerados como factor de pronóstico en cáncer de mama (Franklin *et al.*, 2014).

1.4 Macrófagos

Los macrófagos son monocitos reclutados, estimulados y diferenciados en tejidos y órganos. Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de una célula progenitora llamada unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM). Esta célula madre pluripotencial da origen a los monoblastos que producen promonocitos que a su vez se dividen para generar monocitos (Watowich *et al.*, 1996). Los monocitos migran fuera de la médula ósea hacia el interior del torrente sanguíneo donde permanecen en circulación hasta por 24 horas. Estos eventualmente dejan la circulación sanguínea para adentrarse en los tejidos donde se diferencian en macrófagos y cumplen funciones especializadas dependiendo de las señales en su entorno (Frantz *et al.*, 2005; Penna *et al.*, 2002). De no recibir estímulos estas células mueren por apoptosis (Xaus *et al.*, 2001; Celada and Nathan, 1994). Los macrófagos de ratón expresan CD11b, F4/80 y el receptor de factor estimulante de colonias 1 (CSF1-R) y no expresan Gr-1; por otro lado, los macrófagos de humano expresan CD68, CD163, CD16, CD312 y CD115 (Qian and Pollard, 2010).

1.4.1 CD68

CD68 es una glicoproteína transmembranal tipo 1 altamente glicosilada presente en compartimentos lisosomales y en la membrana de células fagocíticas mononucleares (Holness and Simmons, 1993). Se considera un marcador específico para células mieloides, pero es particularmente abundante en macrófagos (Betjes *et al.*, 1991). En ratones se le conoce como microsialín y se encuentra principalmente en el interior de los macrófagos (Kurushima *et al.*, 2000). CD68 se puede usar para discriminar macrófagos de células dendríticas (DC), ya que estas últimas no la expresan (Betjes *et al.*, 1991; Bobryshev, 2010). Además,

en combinación con marcadores para factores de transcripción como pSTAT-1, RBP-J y CMAF (Barros *et al.*, 2013) o marcadores para proteínas como NOS2 y CD206 se pueden identificar poblaciones polarizadas *in vitro* e *in vivo*. El término polarización de macrófagos se refiere a la expresión de diferentes marcadores en su superficie o dentro de ella, así como a mecanismos que se ponen en marcha como respuesta a una serie de estímulos como las citocinas u otros mediadores de señalización. Los macrófagos tienen un amplio espectro de factores para su activación, pero se pueden distinguir dos poblaciones principales: los activados de manera clásica (“M1”) y los de manera alternativa (“M2”) (Mills *et al.*, 2000; Mantovani *et al.*, 2008).

1.5 Macrófago M1

La activación de macrófagos hacia un perfil M1 es inducida por patógenos intracelulares, componentes de la pared bacteriana, lipoproteínas y diversas citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón gamma (INF γ) (Gordon, 2003). Estos macrófagos “M1” producen citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que son necesarios para la defensa contra patógenos extraños y para la eliminación de células cancerosas (Marcinkiewicz and Chain, 1993; Rosete *et al.*, 1999).

1.5.1 NOS2

En macrófagos la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (NOS2) sintetiza óxido nítrico (ON) a partir de la oxidación de la L-arginina, dando lugar a la formación de óxido nítrico y citrulina (Kröncke KD, Fehsel K, 1997). Esta enzima se expresa en respuesta a la acción de lipopolisacárido (LPS) bacteriano y algunas citocinas como la IL-1, INF γ y TNF; y está asociada a la producción de altos niveles de ON durante horas o días (Green S, Nancy C, 1991). El ON tiene efectos pleiotrópicos, sin embargo, se han demostrado funciones de citotoxicidad, microbicidas y tumorocidas (Rosete *et al.*, 1999). Los mecanismos de citotoxicidad no están completamente

definidos, pero se sabe que participan en diversas vías que llevan a las células a procesos apoptóticos o necróticos. Su citotoxicidad está relacionada con su capacidad de difundir a través de la membrana celular, a su autooxidación y a la reacción con superóxidos para formar peronitritos (ONOO-) (Lancaster, 1997).

1.6 Macrófago M2

La polarización de macrófagos hacia un perfil “M2” es inducida por hongos, parásitos, complejos inmunes, complemento, células apoptóticas, M-CSF, IL-4, IL-13, IL-10, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otras (Gordon, 2003). Estos macrófagos tienen una alta capacidad fagocítica, producen citocinas antiinflamatorias como IL-10, componentes de la matriz extracelular (ECM), factores quimiotácticos y angiogénicos; y están involucrados en la resolución de la inflamación y en la reparación de heridas. Se les conoce como macrófagos activados alternativamente y en muchos casos son considerados protumorales ya que disminuyen la respuesta inmune contra células cancerosas. Además estimulan la angiogénesis y el remodelamiento de la matriz extracelular que promueve el desarrollo tumoral y la metástasis (Huang and Feng, 2013). Los macrófagos “M2” expresan genes para la enzima arginasa 1, receptores de manosa (MMR) como CD206, proteínas ricas en cisteína (FIZZ1) y la proteína Ym1 (Raes *et al.*, 2002).

1.6.1 CD206

Los receptores de manosa (como por ejemplo CD206) son miembros de la familia de lectinas tipo C. Son glicoproteínas transmembranales tipo 1 expresadas en macrófagos y células dendríticas (DCs) pero no en monocitos. Es considerado un marcador de macrófagos activados alternativamente (M2) (Gordon, 2003; Taylor *et al.*, 2005; Azad *et al.*, 2015).

1.7 Macrófagos asociados a tumor (TAMs)

Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) son macrófagos polarizados a un perfil “M2” mediante la acción de factores de crecimiento, TGF- β e IL-10 producidos en el microambiente tumoral (Mantovani *et al.*, 2002). Los TAMs expresan niveles altos de lectinas tipo C, particularmente receptores de manosa como CD206 (Yunping Luo, 2006; Mills *et al.*, 2000).

Los macrófagos llegan al microambiente tumoral por una serie de elementos quimiotácticos que provocan la extravasación de los monocitos circulantes a las zonas de muerte celular y al pH ácido por señales de daño e inflamación. Una vez en este microambiente intentan “reparar” el tejido dañado mediante la generación de nuevos vasos sanguíneos, remodelación del tejido e inmunosupresión. Parte de esta inmunosupresión está dada por la IL-10 que regula negativamente la producción de IL-12 por parte de las células mieloides e indirectamente produce la diferenciación de linfocitos a un perfil Th2. Esto a su vez, incrementa IL-4 e IL-13, lo que promueve la generación de más TAMs y otras células supresoras (DeNardo *et al.*, 2009). Por otro lado, las células tumorales neoplásicas pueden producir factores quimiotácticos para los macrófagos. En cáncer de mama los factores quimiotácticos más estudiados son las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCPs), el factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF), el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Estos macrófagos llegan a ser la población de células inmunes más abundantes en estos tumores y su alta densidad se asocia con una elevada angiogénesis, metástasis y pobre pronóstico (Franklin *et al.*, 2014) .

1.8 Origen de los macrófagos en el microambiente tumoral de mama

El cáncer de mama tiene origen en las células epiteliales de los conductos lácteos en la glándula mamaria que se transforman y adquieren características especiales y ventajosas sobre las “normales”. Con el tiempo las células cancerosas aumentan en número y se relacionan con las células normales creando un microambiente complejo en el que existe una comunicación estrecha y continua entre las células tumorales, estromales e inmunes. Los macrófagos son reclutados a este “microambiente inmune tumoral” por una serie de citoquinas producidas por las células tumorales, estromales o por las células inmunes (Mantovani *et al.*, 2008)(Balkwill, Charles and Mantovani, 2005); y aunque se ha observado proliferación de TAMs en modelos de carcinomas mamarios humanos y de ratón, estos no son suficientes para mantener el número de TAMs en un tumor en crecimiento (Campbell *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2014). La mayoría de los TAMs se originan de monocitos y células supresoras mieloides monocíticas (M-MDSCs) que son reclutados al tejido tumoral donde la sub-regulación del factor de transcripción STAT3 permite la diferenciación de M-MDSCs a TAMs (Kumar *et al.*, 2016). En los tumores sólidos los macrófagos son las células inmunes más abundantes y son de particular importancia en su desarrollo y pronóstico (Franklin *et al.*, 2014), cumpliendo funciones protumorales o antitumorales dependiendo de su activación (Aras and Raza Zaidi, 2017; Noy and Pollard, 2014).

1.9 Polarización de macrófagos como alternativa para el tratamiento contra el cáncer

Los macrófagos aumentan el crecimiento, progresión y reincidencia de tumores de mama, e incluso modulan la eficacia de las terapias anticancerígenas (Qian *et al.*, 2007; Medrek *et al.*, 2012). Debido a la importancia de estas células en la progresión tumoral se han encaminado esfuerzos para generar herramientas para eliminarlos,

disminuirlos o redirigirlos a un perfil antitumoral (Yunping Luo, 2006; Noy and Pollard, 2014). Ronly y colaboradores han demostrado que el cambio de fenotipo de macrófagos M2 a macrófagos M1 por acción de glicoproteínas ricas en histidina (HRG) asociado a la disminución del factor de crecimiento placentario (PIGF), promueve la respuesta inmune antitumoral, reduce el crecimiento tumoral y la metástasis a pulmón, y además incrementa la sensibilidad a la quimioterapia en diversos modelos de cáncer, incluyendo el modelo de isotransplatación 4T1 en el que el tumor se redujo un 36% (Rolny *et al.*, 2011).

1.10 Plantas y sus compuestos anticancerígenos

Las plantas y sus derivados son usados en la medicina tradicional debido en parte a sus propiedades biológicas y terapéuticas (Popoca *et al.*, 1998; Shukla and Mehta, 2015). La investigación de los compuestos que son responsables de estas propiedades deriva en el desarrollo de nuevos fármacos en distintas áreas de la medicina. En el caso particular del cáncer, compuestos como los flavonoides y saponinas esteroidales han mostrado efectos anticancerígenos atribuidos a un amplio espectro de mecanismos de acción que incluyen: arresto del ciclo celular, inducción de la apoptosis, antioxidante, e inhibición de la angiogénesis (Haridas *et al.*, 2001; Batra and Sharma, 2013; Patil and Masand, 2018; Man *et al.*, 2010). Los agaves contienen polifenoles, flavonoides y saponinas esteroidales con potencial anticancerígeno (Cervantes Dueñas Aleydis, 2016).

1.11 Familia *Agavaceae*

La familia *Agavaceae* comprende ocho géneros: *Yucca*, *Hesperaloe*, *Furcraea*, *Beschorneria*, *Agave*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*. El género *Agave* está constituido de al menos 166 especies de las cuales 125 están presentes en México (Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000).

1.11.1 *Agave mapisaga*

El *Agave mapisaga* es una planta de la familia *Agavaceae*, su clasificación taxonómica es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliales

Orden: Arparageles

Familia: *Agavaceae*

Género: *Agave*

Especie: *mapisaga*, var Trel.



Agave mapisaga var Trel

Es una rosetófila con inflorescencia de cinco metros de altura y 18 ramas; la hoja más larga mide 60 cm de largo con ramificación cuaternaria. Su nombre común es: “Penca larga”, “Maguey Blanco” o “Maguey Bueno”. Se aprovecha para la extracción de aguamiel y obtención de fibras de ixtle. En medicina tradicional se refiere como antiinflamatorio en lesiones musculares, articulares y heridas (Instituto de Biología, UNAM, 2010).

1.12 Efecto del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* en cáncer y macrófagos

Recientemente se demostró que el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* tiene efecto citotóxico en células de cáncer de mama murino 4T1 *in vitro* y disminuye la implantación de células PEC-Src de cáncer de próstata *in vivo*. En el estudio realizado por Hernández-Peralta se utilizó un modelo de cáncer de próstata murino implantando células PEC-Src en ratones machos de la línea FVB y se observó que la administración diaria durante 35 días de 50 mg/kg de extracto hidrosoluble de

Agave mapisaga generó una menor implantación tumoral con respecto del testigo sin tratamiento (Hernández-Peralta, 2016). Por otro lado, Diaz-Cortés demostró que el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* es citotóxico en células 4T1 a concentraciones de 0.5 mg/ml y que en ratones BALB/c hembras isotransplantadas con células 4T1 y tratadas con 250 mg/kg, reduce la permeabilidad vascular y disminuye la metástasis a bazo y pulmón (Diaz Cortés, 2020). En el caso de macrófagos, Gallegos-Ibarra demostró que el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* a una concentración de 0.5 mg/100 µl disminuye el 100% de la viabilidad de macrófagos J774A.1 en 48 horas y con una concentración de 1 mg /100 µl disminuye el 80% la viabilidad en 24 horas (Gallegos Ibarra, 2018).

1.13 Saponinas esteroidales

La composición química completa del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* no está completamente definida. Hernández-Peralta determinó la presencia de la aglicona hecogenina mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC). Esta aglicona sugiere la presencia de agavósido C que pertenece a una familia amplia de saponinas esteroidales. Las saponinas esteroidales se encuentran en un gran número de plantas y tienen efectos sobre la permeabilidad de membranas, son inmunoestimulantes, hipocolesterolémicas y tienen propiedades anticarcinogénicas (Francis *et al.*, 2002). Existe una gran complejidad en la estructura de las saponinas, debido a la variabilidad de sus moléculas de aglicona, así como a la posición y acoplamiento de sus cadenas (Man *et al.*, 2010).

Las saponinas esteroidales presentes en plantas son consideradas un sistema de defensa contra los insectos y su contenido depende de su edad fisiológica, medio ambiente y factores agronómicos (Yoshiki Y, Kudou S, 1998). Tienen la capacidad de lisar glóbulos rojos y formar espuma en solución; y junto con otros compuestos se les han atribuido funciones inmunomoduladoras, antiinflamatorias, citotóxicas y

anticancerígenas. Las saponinas aisladas de diferentes plantas inhiben el crecimiento de células cancerosas *in vitro* (Konoshima T, 1988; Mimaki *et al.*, 1998).

Los adyuvantes basados en saponinas han mostrado la habilidad de estimular el sistema inmune mediado por células y aumentar la producción de anticuerpos (Barr, Sjölander and Cox, 1998). Se ha reportado que las saponinas inducen la producción de citocinas e interferones que podrían mediar sus efectos inmunoestimulantes (Jie, Cammisuli and Baggiolini, 1984). Las saponinas son capaces de prevenir algunas reacciones no específicas como la inflamación (Cabral de Oliveira *et al.*, 2001; Haridas *et al.*, 2001) y la proliferación de monocitos (Delmas *et al.*, 2000; Yui *et al.*, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

Los macrófagos determinan el desarrollo, pronóstico y reincidencia del cáncer de mama debido a sus funciones antitumorales o protumorales, son las células inmunes más preponderantes en el microambiente tumoral y son posibles blancos terapéuticos debido a su plasticidad; estudios recientes en modelos de isotransplatación *in vivo* en ratones han demostrado que el tratamiento con extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* reduce la implantación de células de cáncer de prostata y la metástasis de células de cáncer de mama, dos procesos en que los macrófagos tienen una participación activa en el microambiente inmune tumoral. Por lo anterior, es necesario conocer el efecto del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* sobre los macrófagos en el microambiente tumoral para poder sustentar su uso como coadyuvante durante el proceso neoplásico.

3. HIPÓTESIS

La administración diaria de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* vía oral a ratones isotransplantados con células 4T1 de cáncer de mama murino aumenta el porcentaje de macrófagos con fenotipo M1 y disminuye el porcentaje de macrófagos con fenotipo M2 en el microambiente tumoral.

4. OBJETIVO

Demostrar el efecto modulador del tratamiento de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* sobre el porcentaje de macrófagos perfil M1 (CD68+NOS2+) y M2 (CD68+CD206+) presentes en el microambiente tumoral mamario de ratones isotransplantados con células 4T1 para considerarlo como un coadyuvante en el tratamiento contra el cancer.

4.1 Objetivos particulares:

- 1) Evaluar el efecto del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* sobre el tamaño de tumores mamarios inducidos por la inoculación de células 4T1 en ratones hembra BALB/c.
- 2) Evaluar el efecto del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* sobre el porcentaje de macrófagos M1 y M2 en el infiltrado tumoral mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó con base en los protocolos aprobados por el comité de cuidado y uso animal de la unidad de investigación preclínica (UNIPREC- UNAM).

5.1 Extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*

Se utilizó una alícuota de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* obtenido por rotoevaporación y mantenido en congelación a -70°C en alícuotas. La obtención del extracto se describe en el trabajo realizado por Hernández Peralta (Hernández-Peralta, 2016), en el que se obtuvo un kilogramo de pulpa en trozos libres de epidermis y se colocó en dos litros de agua para llevarla punto de ebullición, posteriormente se dejó reposar durante 24 horas. Después se colectó el líquido y se concentró en un roto evaporador a 70 RPM, 87 mbar y 58°C.

5.2 Ratones

Se utilizaron un total de 37 ratones hembra de la línea BALB/cAnNHsd de 6-8 semanas de edad con un peso promedio de 19.22 g obtenidos de laboratorios Envigo. Los ratones fueron colocados en grupos de cuatro, en cajas de barrera ventiladas con las siguientes características: 27 cm de largo x 16 cm de ancho x 12 cm de alto. Las cajas con los ratones se colocaron en un cuarto con temperatura

controlada con un fotoperiodo de 12 horas. Los ratones fueron alimentados con alimento comercial y agua *ad libitum*.

5.3 Cultivo de células tumorales 4T1 *in vitro*

Las células de carcinoma mamario murino 4T1 resistentes a 6-tioguanina fueron obtenidas de ATCC. Se cultivaron *in vitro* en cajas de cultivo celular tipo Roux utilizando medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, las cajas se mantuvieron en una incubadora de células a 37°C y 5% de CO₂. Cuando se alcanzaba una confluencia del 85%, las células adheridas eran desprendidas con 0.25% de tripsina y trasladadas a cajas nuevas.

5.4 Isotransplatación

A partir del séptimo pase, se desprendieron y separaron las células tumorales 4T1 del monoestrato por tratamiento con 0.25% de tripsina, se tiñeron con azul tripano al 0.12% (Sigma®), se contaron en cámara de Neubauer® y se realizó una suspensión de células en solución salina tamponada con fosfato (PBS)1X, a pH 7.4.

Posteriormente se inocularon 1X10⁵ células viables suspendidas en un volumen de 100 µl de solución de PBS 1x (pH7.4) en el cojinete graso mamario abdominal izquierdo de los ratones con una jeringa con aguja calibre 27.

El crecimiento tumoral fue evaluado morfométricamente al día 27 post inoculación usando un Vernier digital; y los volúmenes de los tumores fueron calculados de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen tumoral (Cm}^3\text{)} = \frac{(\text{Longitud en cm}) \times (\text{ancho en cm})^2 \times \pi}{6}$$

5.5 Diseño experimental

Los ratones inoculados con una suspensión de 1×10^5 células 4T1, fueron aleatorizados y se establecieron seis grupos:

- Agua (Testigos negativos, n=5): recibieron agua de bebida.
- Cisplatino (Testigos de tratamiento antineoplásico, n=5): se les administró 3.5 mg/kg de cisplatino (Noveldexis[®]) vía intraperitoneal (IP) cada cuatro días en tres ocasiones (q.d. 4 X 3).
- Agave 25 mg/kg (n=6): a los ratones se les administró diariamente 25 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*
- Agave 50 mg/kg (n=6): a los ratones se les administró diariamente 50 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*
- Agave 100 mg/kg (n=6): a los ratones se les administró diariamente 100 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*
- Agave 250 mg/kg (n=9): a los ratones se les administró diariamente 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*

Los extractos hidrosolubles de *Agave mapisaga* o agua fueron administrados diariamente durante el periodo de estudio (27 días) mediante una cánula esofágica para roedor 20G X 1.5" marca Cadence Science[®]. Los ratones en el grupo testigo antineoplásico tratados con Cisplatino (Noveldexis[®]) no se sondearon. El diseño experimental se muestra en la Figura 1.

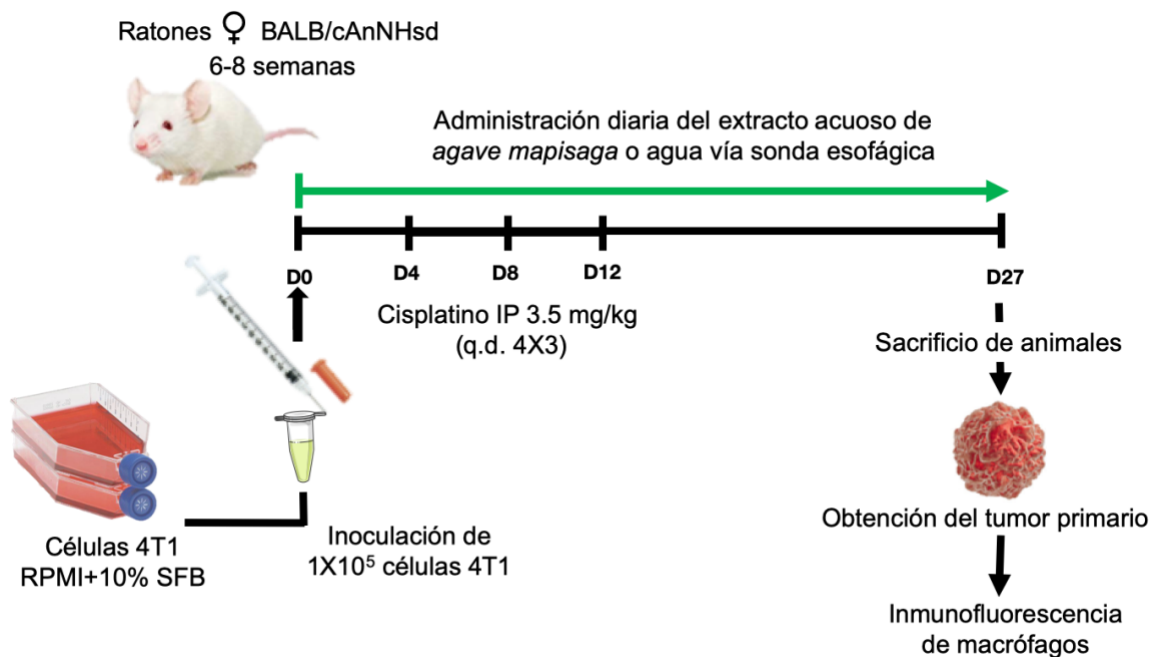


Figura 1. Diseño experimental

5.6 Toma de muestras

A los 27 días post inoculación se sacrificaron a todos los ratones de cada grupo para tomar las mediciones y las muestras del tumor primario. Los ratones fueron anestesiados con 120 mg/kg de ketamina y 24 mg/kg de xilacina en solución de cloruro de sodio al 0.9% como vehículo (Apendice 2). Se corroboró la anestesia profunda y se procedió a la perfusión completa con PBS 1x (pH 7.4) a 36°C y posteriormente con paraformaldeído (PFA) al 4% pH 7.4.

Los tumores y órganos obtenidos de cada ratón se colocaron por 24 horas en gradientes de 10%, 20% y 30% de sacarosa a una temperatura de 4°C. Se colocó una muestra representativa del tumor primario y de los órganos de cada ratón en Tissue-tek OCT® y guardados a -80°C hasta su procesamiento.

5.7 Anticuerpos utilizados en los ensayos de Inmunofluorescencia

5.7.1 Anticuerpos primarios

- Anticuerpo monoclonal IgG2a, anti CD68 de ratón, producido en rata. (Novusbio® #Cat. NBP2-33337)
- Anticuerpo policlonal IgG, anti NOS2 de ratón, producido en conejo. (Novusbio® #Cat. NB300-605).
- Anticuerpo policlonal IgG, anti CD206 de ratón, producido en cabra. (Novusbio® #Cat. AF2535).

5.7.2 Anticuerpos secundarios

- Anticuerpo policlonal IgG marcado con Alexa Fluor®-647 (Red), anti-IgG (H+L) de conejo, elaborado en burro (Jackson®, #Cat:711-605-152).
- Anticuerpo policlonal IgG marcado con Alexa Fluor®-488 (Green), anti-IgG (H+L) de rata, elaborado en burro (Jackson®, #Cat:712-545-150).
- Anticuerpo policlonal IgG marcado con CyT3M, anti-IgG (H+L) de cabra, elaborado en burro (Jackson®, #Cat:705-165-147).

5.8 Inmunofluorescencia en macrófagos J774A.1 cultivados *in vitro*

Con el fin de probar las condiciones de trabajo y la especificidad de los anticuerpos primarios y secundarios, se utilizaron macrófagos murinos cultivados *in vitro* bajo dos condiciones: estimulados con dexametasona o con LPS. Para ello se cultivaron macrófagos murinos J774A.1 (ATCC®) en cajas de cultivo celular tipo Roux de 75 cm³ utilizando medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las cajas se mantuvieron en una incubadora de células a 37°C y 5% de CO₂. Cuando se alcanzó una confluencia de células del 80% las células adheridas se desprendieron mecánicamente y se trasladaron a placas de cultivo (1x10⁴ células/pozo) para recibir un tratamiento con dexametasona (1mM) o

lipopolisacárido (LPS) de *S. enterica ser. Typhimurium* (300 ng/100 μ l) durante 48 horas.

Las células adheridas después de las 48 horas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (pH 7.4) y procesadas para inmunofluorescencia:

1. Bloqueo: se le agregó amortiguador de bloqueo (Protein blocker bioSB[®] con DNS 5%) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X (pH 7.4).
2. Marcaje: se agregaron los anticuerpos primarios diluidos 1/50 en la solución de incubación (Antibody diluent bioSB[®], 1% NDS, 0.3% de tritón) y se dejó incubar durante 24 h a 4°C en cámara húmeda, se realizaron tres lavados con solución de lavado 1x (Immuno/DNA washer[®] Cat. BSB0149) y tres con PBS 1x (pH 7.4). Se agregaron los anticuerpos secundarios diluidos 1/200 en solución de incubación (Antibody diluent bioSB[®], 1% NDS, 0.3% de tritón) y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min en obscuridad, se realizaron tres lavados con solución de lavado 1x y tres lavados con PBS 1X (pH 7.4).
3. Contratinción: se colocó solución de contratinción DAPI (1 μ g/ml) a temperatura ambiente, durante 15 min en obscuridad, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X (pH 7.4).
4. Se realizó la lectura de la placa en el equipo Imagexpress[®] en un tiempo no mayor de 2 h.

5.9 Bazo y músculo

Con el fin de probar las condiciones de trabajo y la especificidad de los anticuerpos en tejido, se usaron cortes de bazo y músculo de un ratón sano. Los testigos de tinción positiva fueron cortes de bazo teñidos con los tres pares de anticuerpos y como testigo de tinción negativa fueron teñidos sólo con los anticuerpos secundarios. Además, como un testigo adicional de tinción negativa se usaron

cortes de músculo con los tres pares de anticuerpos. Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

Se realizaron cortes de 20 micras por congelación en el equipo Slee cryostat MTC®, se montaron en laminillas de vidrio electrocargadas y se guardaron a -20°C por un máximo de 72 horas. Para su procesamiento:

1. Descongelamiento y rehidratación: se colocaron las laminillas a temperatura ambiente durante 20 minutos y se rehidrataron los tejidos en las laminillas con PBS 1x pH 7.4 durante 10 minutos.
2. Bloqueo: se le agregó amortiguador de bloqueo (Protein blocker bioSB® con DNS 5%) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X (pH 7.4).
3. Marcaje: se agregaron los anticuerpos primarios diluidos 1/50 en la solución de incubación (Antibody diluent bioSB®, 1% NDS, 0.3% de tritón) y se dejó incubar durante 24 h a 4°C en cámara húmeda, se realizaron tres lavados con solución de lavado 1x (Immuno/DNA washer® Cat. BSB0149) y tres con PBS 1x pH 7.4. Se agregaron los anticuerpos secundarios diluidos 1/200 en solución de incubación (Antibody diluent bioSB®, 1% NDS, 0.3% de tritón) y se incubó a temperatura ambiente durante 60 min en oscuridad, se realizaron tres lavados con solución de lavado 1x y tres lavados con PBS 1X (pH 7.4).
4. Contratinción: se colocó solución de contratinción DAPI (1 ug/ml) a temperatura ambiente, durante 15 min en oscuridad, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X (pH 7.4).
5. Conservación: se colocó un volumen de 100 µl de medio de montaje UltraCruz™ (#Cat. SC-24941) a cada una de las laminillas y se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio.
6. Análisis de las preparaciones: se hizo en el equipo Imagexpress® en un tiempo máximo de 72 h después de colocar el medio de montaje.

5.10 Tumores

Se realizaron cortes de 20 micras por congelación del ecuador del tumor primario 4T1 en el equipo Slee cryostat MTC®, se montaron en laminillas de vidrio electrocargadas y se guardaron a -20°C por un máximo de 72 horas. Para su procesamiento, según se describe en la sección de IF para bazo y músculo.

5.10.1 Porcentaje de macrófagos M1 y M2 en cortes de tumor primario

Para determinar la cantidad de macrófagos con marca CD68+NOS2+ (fenotipo “M1”) y CD68+CD206+ (fenotipo “M2”) presentes en el microambiente tumoral, se usaron cortes consecutivos de la región ecuatorial de los tumores primarios diseccionados al día 27 post-inoculación de todos los grupos experimentales. Las laminillas fueron procesadas como se describió previamente.

5.11 Analisis de macrófagos a partir de cortes de tejido por inmunofluorescencia

Se utilizó el programa Meta-Xpres® para realizar el análisis de las imágenes obtenidas en el equipo ImageXpress® con el objetivo 10x. Las laminillas fueron divididas en 35 regiones y de cada región se analizaron 16 campos. Se obtuvieron los porcentajes de macrófagos CD68+NOS2+ (M1) y CD68+CD206+ (M2) de 60 cortes de tejido por cada uno de los grupos tratados con agua, 25, 50 ó 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, 48 cortes de tejido para el grupo tratado con 100 mg/kg de *Agave mapisaga* y 28 cortes de tejido para el grupo tratado con 3.5 mg/kg de cisplatino. Las condiciones para la obtención y analisis de las imágenes se muestran en Anexo 2.

5.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron hechos en el programa R (versión 3.5.3). Las comparaciones estadísticas para los datos con distribución paramétrica se hicieron con DunnettTest. Para los datos con distribución no paramétrica se usó Kruskal-Wallis. Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Cultivo *in vitro* de células 4T1

En la Figura 2 se observa el monoestrato del cultivo de las células 4T1, estas células presentaron una morfología similar a la mostrada en los manuales de ATCC, indicando que el descongelamiento del cuarto pase y su cultivo hasta el séptimo pase no modificó su morfología, ni su velocidad de crecimiento.

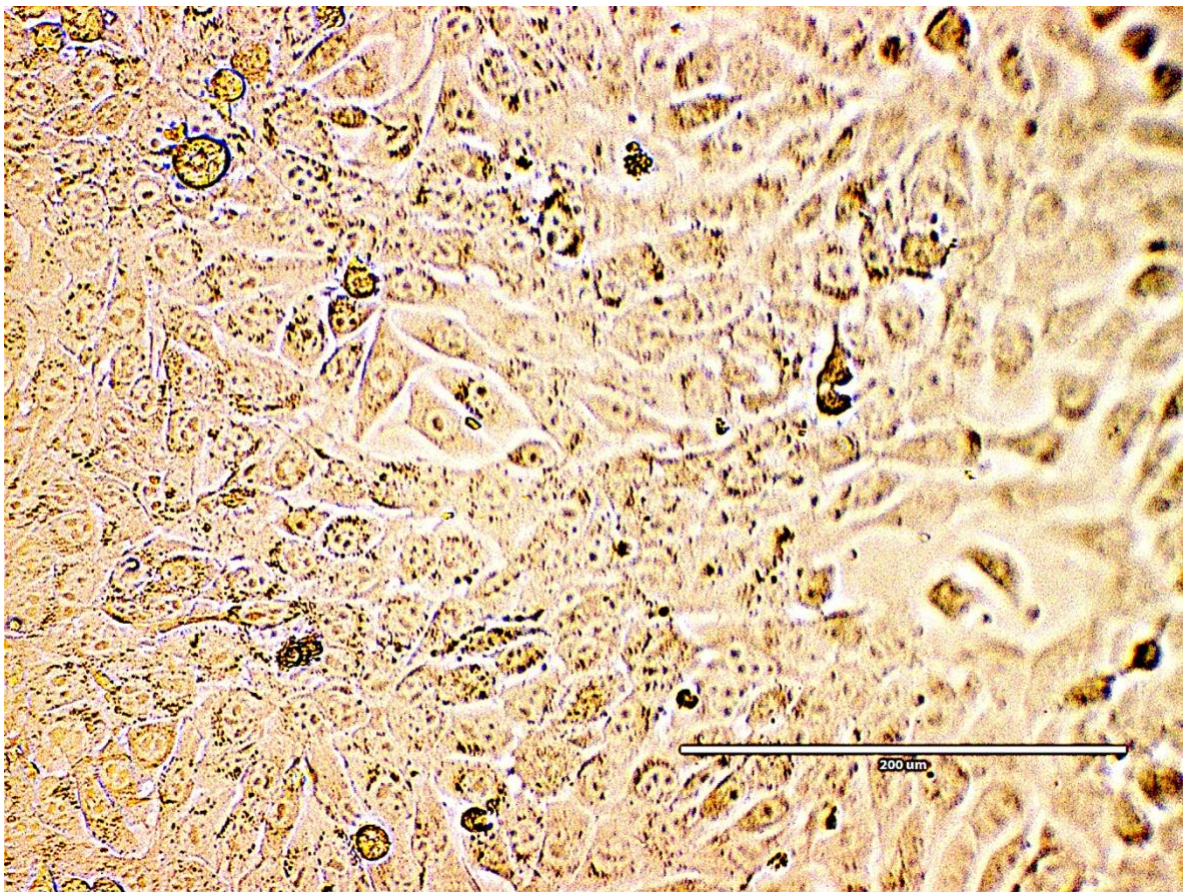


Figura 2. Células 4T1 cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino sin antibióticos 24 horas antes de la implantación 10x.

6.2 Isotransplantación y tratamientos

El Cuadro 1 muestra que todos los ratones de los grupos tratados con agua o extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* (25,50,100 y 250 mg/kg) desarrollaron al menos una neoplasia palpable antes de los 8 días post-inoculación de cien mil células 4T1, mientras que en el grupo tratado con cisplatino en el mismo tiempo no presentaron ninguna neoplasia palpable. En el grupo tratado con cisplatino hubo regresión de la neoplasia en dos ratones al día 5 post inoculación y uno al día 9. Un ratón del grupo de cisplatino murió al día 21 sin presentar tumor a la necropsia.

Cuadro 1. Número de ratones que desarrollaron al menos una neoplasia palpable después de implantar cien mil células 4T1 en el cojinete graso de la glándula mamaria izquierda.

Tratamiento	Días post-inoculación									
	0	5	6	7	8	9	10	12	15	25
Cisplatino	0/6	2/6	0/6	0/6	0/6	2/6	1/6	2/6	4/6	4/5
Agua	0/5	3/5	4/5	4/5	5/5					
Agave										
25 mg/kg	0/6	4/6	5/6	6/6						
50 mg/kg	0/6	3/6	3/6	6/6						
100 mg/kg	0/6	4/6	4/6	6/6						
250 mg/kg	0/9	4/9	6/9	8/9	9/9					

Todos los ratones de los grupos tratados con diferentes concentraciones del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* y los tratados con agua mostraron volúmenes tumorales y áreas de necrosis similares al día 25 post-inoculación de cien mil células 4T1; mientras que en los tratados con cisplatino la necrosis fue menos evidente (Figura 3).

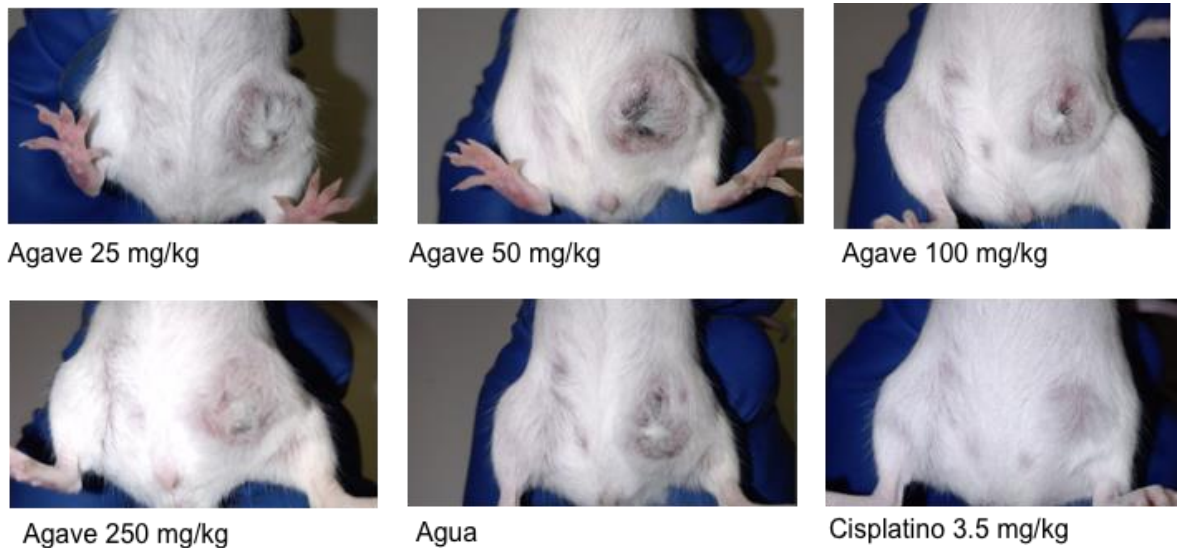


Figura 3. Ratones BALB/c implantados con cien mil células 4T1 en el coginete graso de la glándula mamaria izquierda al día 25 post-inoculación.

6.3 Eutanasia y obtención de muestras

Los ratones fueron anestesiados como se describió en la sección de material y métodos para perfundirlos con paraformaldehído al 4% pH 7.4, dicha perfusión se corroboró por el aclaramiento del hígado y el retorno de la solución por el atrio derecho del corazón (Figura 4 A). Posteriormente, se diseccionaron todos los tumores y se cortaron en la zona ecuatorial (Figura 4 B).

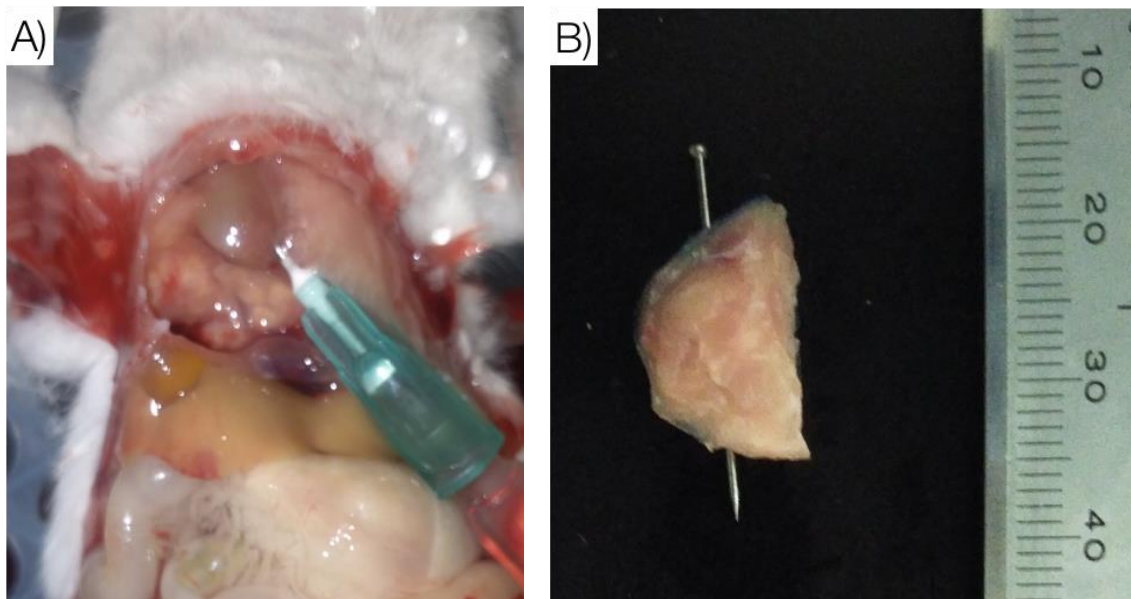


Figura 4. Toma de muestras para inmunofluorescencia. Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilacina y se perfundieron con paraformaldehído al 4%, pH 7.4 (Figura 4 A). Los tumores diseccionados posteriormente fueron cortados en la zona ecuatorial y deshidratados con gradientes de sacarosa (10, 20 y 30% durante 24 horas); para finalmente ser conservados en congelación a -80°C en medio Tissuetek OCT hasta su procesamiento (Figura 4 B).

6.4 Tumores primarios a la necropsia

A la necropsia se corroboró que los ratones de los grupos tratados con agua o diferentes concentraciones del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* tenían el tumor y que uno de los ratones del grupo tratado con cisplatino no presentó tumor (Figura 5).

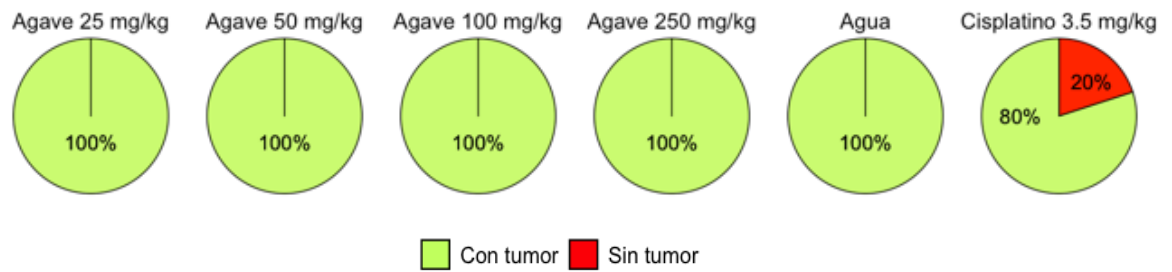


Figura 5. Tumores presentados a la necropsia 27 días después de la isotransplatación y del tratamiento con *Agave mapisaga*, agua o cisplatino.

6.5 Tamaño tumoral

Los tumores obtenidos durante la necropsia del grupo tratado con 3.5 mg/kg de cisplatino vía intraperitoneal (q.d. 4 x 3) tuvieron un menor volumen en comparación con los grupos tratados con extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* o el grupo testigo tratado con agua, con diferencia estadísticamente significativa para la prueba de Dunnett'test ($p < 0.05$). Los grupos tratados con agua o diferentes dosis de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* no mostraron diferencia estadísticamente significativa para su volumen tumoral ($p > 0.05$) (Figura 6).

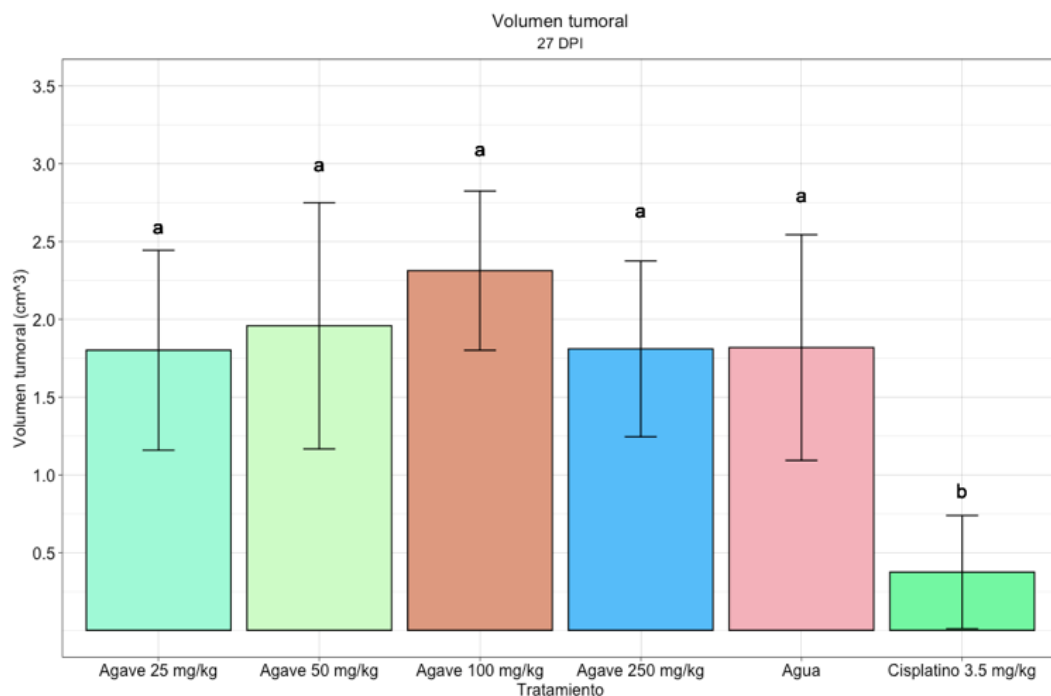


Figura 6. Volumen de los tumores por grupo a los 27 DPI y tratados con diferentes dosis de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, cisplatino o sin tratamiento (agua). La grafica muestra que el grupo tratado con 3.5 mg/kg de cisplatino disminuyó significativamente el volumen tumoral en comparación con los otros grupos Dunnett'test ($p < 0.05$).

6.6 Inmunofluorescencia en células J774A.1 cultivadas *in vitro*

Los macrófagos estimulados con LPS mostraron un perfil CD68+NOS2+ (fenotipo de macrófago “M1”; Figura 7A) mientras que los estimulados con dexametasona mostraron un perfil CD68+CD206+ (fenotipo de macrófagos “M2”; Figura 7B)

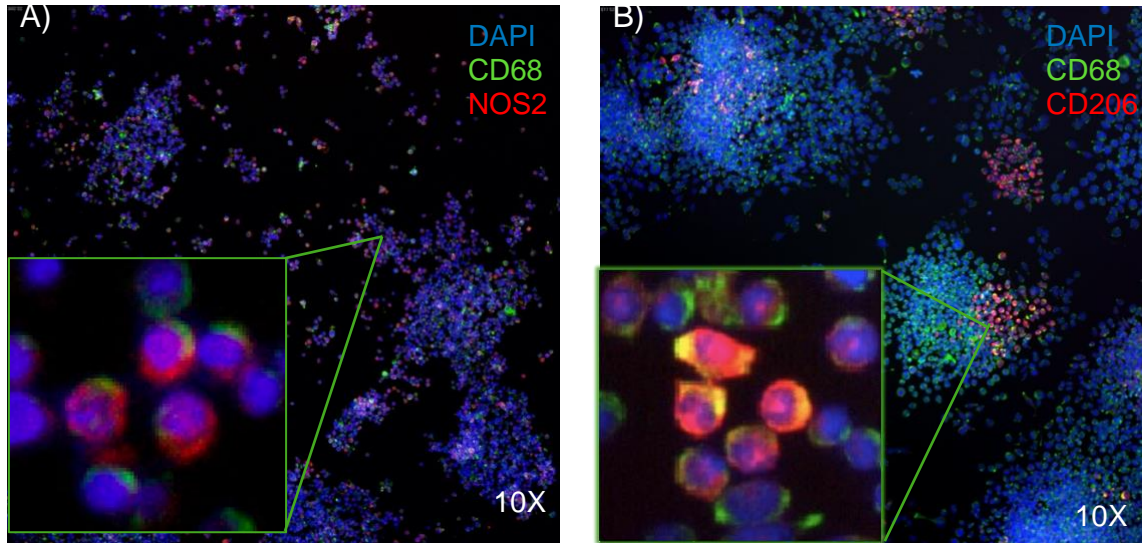


Figura 7. Inmunofluorescencia de macrófagos J774A.1 cultivados *in vitro* y estimulados durante 48 h con LPS de *S. enterica* ser. Typhimurium o dexametasona. En la Figura 7A se muestran las marcas positivas colocalizadas de CD68 y NOS2. En la Figura 7B se muestran macrófagos estimulados con LPS con marca positiva colocalizada para CD68 y CD206.

6.7 Inmunofluorescencia de macrófagos en tejido

6.7.1 Bazo

En la tinción para macrófagos del bazo se observó la zona de linfocitos B bien definida con respecto a la marca de los macrófagos CD68+CD206+ (Figura 8 A). Como testigo de tinción negativo se usaron sólo anticuerpos secundarios (Figura 8 B).

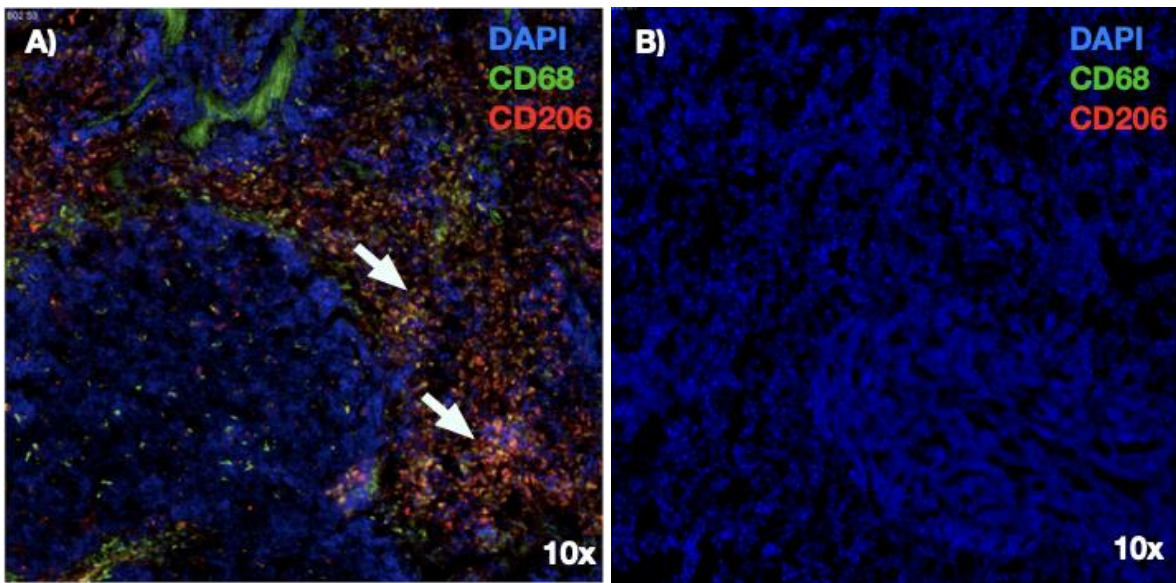


Figura 8. Inmunofluorescencia en cortes de tejido de bazo de ratones sanos. Tinción del bazo en la que se muestra la marca de los macrófagos CD68+CD206+ señalados con las flechas color blanco (Figura 8 A). Testigo de tinción negativo usando sólo anticuerpos secundarios (Figura 8 B).

6.7.2 Músculo

En los cortes de músculo del miembro pélvico no se observó tinción positiva para macrófagos (Figura 9 A). Además, se corroboró que no hay detección inespecífica para los núcleos (Figura 9 B), para CD68 (Figura 9 C), CD206 o NOS2 (Figura 9 D).

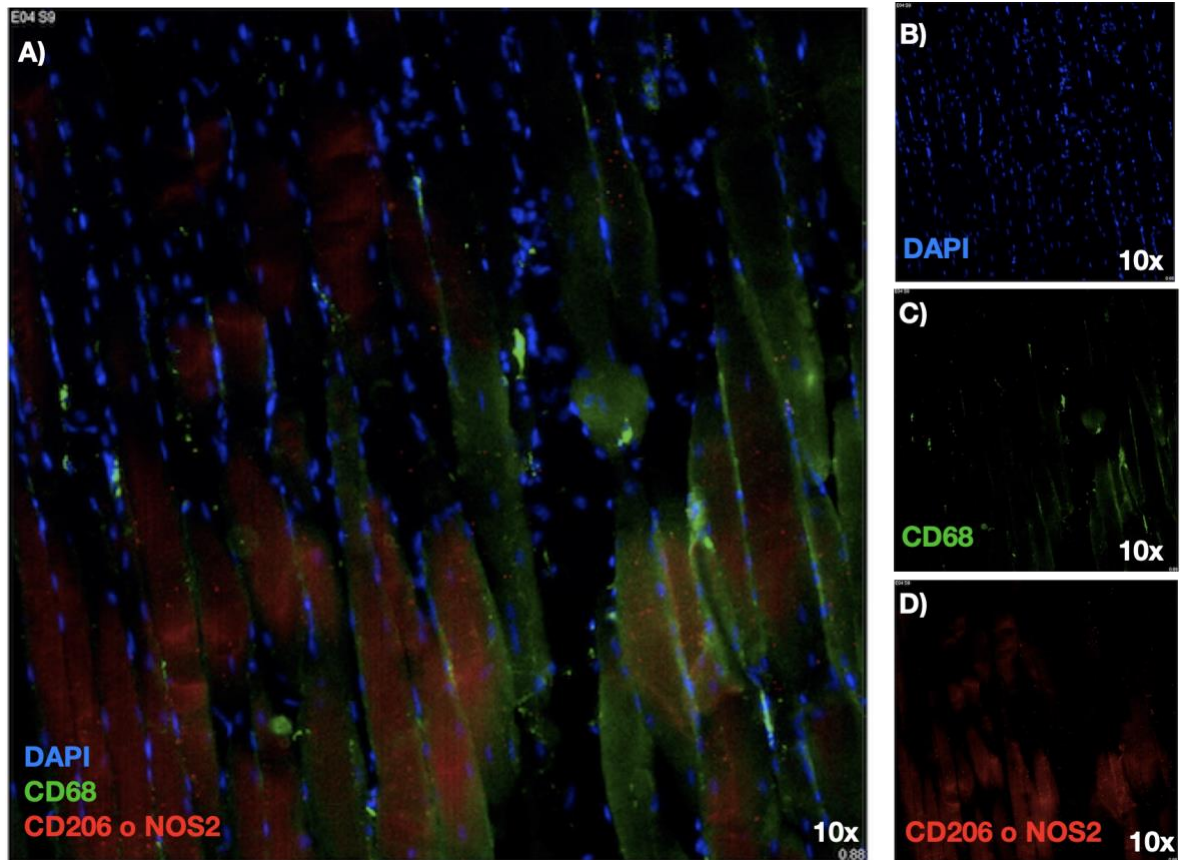


Figura 9. Inmunofluorescencia en cortes de tejido de músculo de ratones sanos. Cortes de músculo del miembro pélvico como testigo negativo de tinción (Figura 9 A). Se corroboró que no hay detección inespecífica para los núcleos (Figura 9 B), CD68 (Figura 9 c), CD206 o NOS2 (Figura 9 D).

6.8 Tumores

En la Figura 10 se muestra la tinción de macrófagos en los cortes de tumores primarios de mama. Los macrófagos M1 se señalan en el panel j (superposición de las imágenes g, h e i); mientras que los M2 se muestran en el panel ñ (superposición de las imágenes k, m, y n). Los tejidos teñidos solo con anticuerpos secundarios demuestran que no hay tinción inespecífica (páneos a-c); mientras que los páneles d, i y n corresponden a las tinciones de los núcleos.

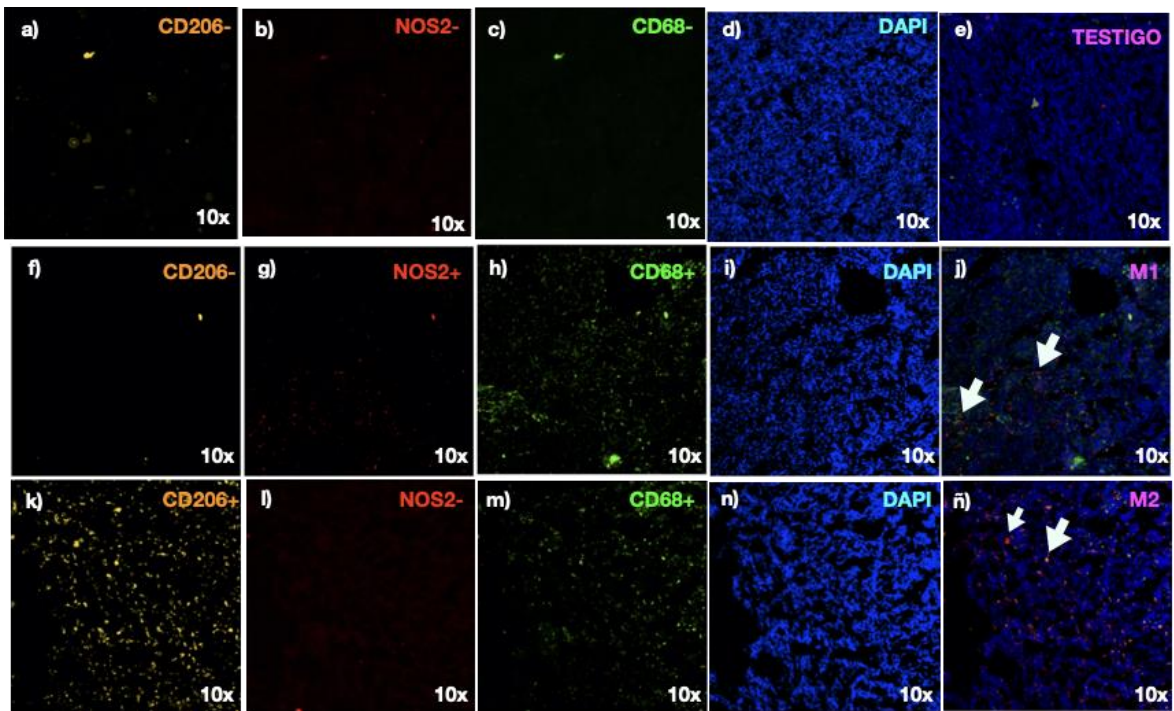


Figura 10. Testigos de tinción en cortes de tumor primario de mama. (a-c) corresponden a un corte de tumor mamario teñido solo con los anticuerpos secundarios en el que no se observa tinción inespecífica. (d, i y n) corresponde a la tinción de núcleos con DAPI. El panel (e) muestra la superposición de las imágenes (a-d). Los páneles f-h muestran las tinciones con los tres pares de anticuerpos para discriminar macrófagos M1 (panel j, que corresponde a la superposición de las imágenes: g, h e i). Los páneles k-m muestran las tinciones con los tres pares de anticuerpos para discriminar macrófagos M2 (panel ñ, que corresponde a la superposición de: k, m y n). Las flechas señalan a los macrófagos M1 (panel j) y a los M2 (panel ñ).

La configuración utilizada para la detección de los macrófagos se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Parámetros utilizados para la detección de macrófagos en el equipo ImageXpress.

	Nucleos	CD68	NOS2	CD206
Fluorocromo	DAPI	AF488 (FITC)	AF647 (Cy5)	Cy3
Tiempo de exposición	200 ms	300 ms	300 ms	300 ms
Área	Núcleo	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma
Anchura mínima	5 μm	5 μm	5 μm	5 μm
Anchura máxima	25 μm	20 μm	10 μm	7 μm
Área mínima teñida	NA	15 μm^2	20 μm^2	20 μm^2

En la Figura 11 se muestran macrófagos presentes en cortes de tumor primario de mama. A) macrófagos perfil M1 (CD68+NOS2+) y B) macrófagos perfil M2 (CD68+CD206+).

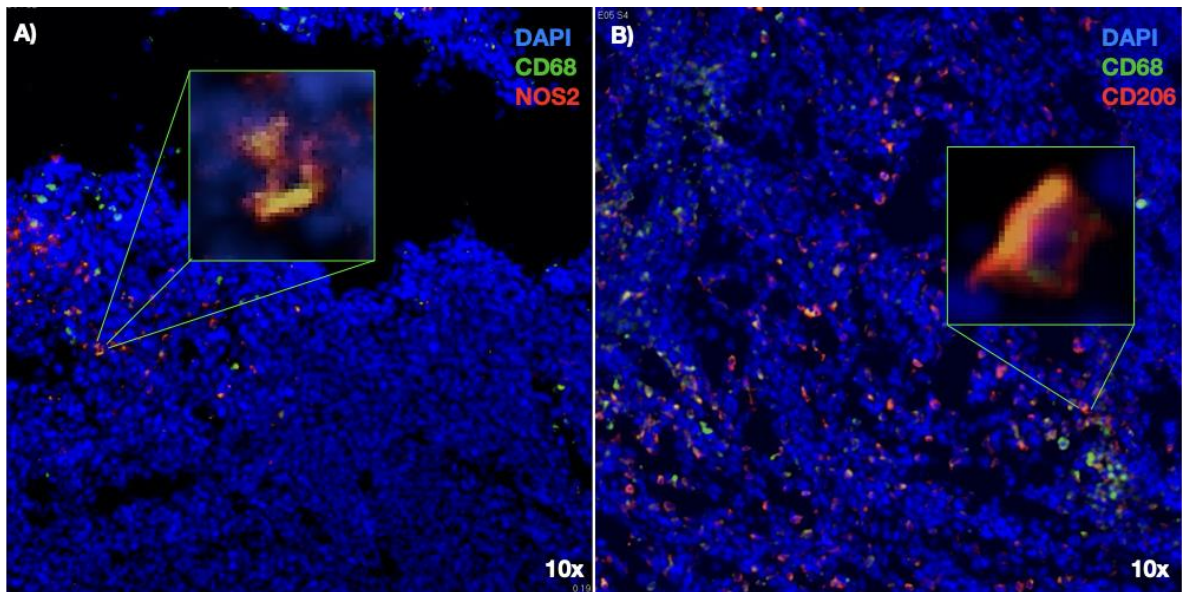


Figura 11. Macrófagos CD68+NOS2+ (M1) y CD68+CD206+ (M2) en cortes de tumor primario de mama.

6.9 Porcentaje de macrófagos M1 y M2 en cortes de tumor primario

6.9.1 Macrófagos CD68+NOS2+

La cantidad de macrófagos perfil "M1" (CD68+NOS2+) de los grupos experimentales no presentó una distribución normal en la prueba estadística de Shapiro-Wilk ($p= 2.314E-14$) (Figura 12).

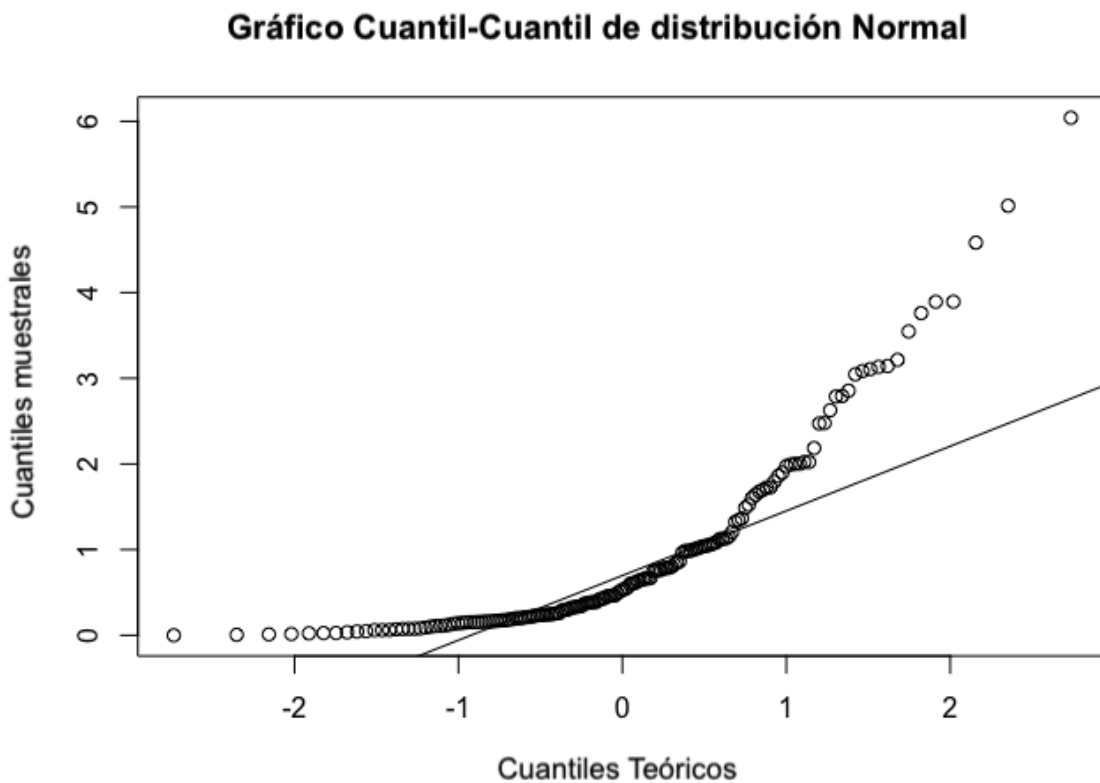


Figura 12. Distribución de macrófagos "M1" (CD68+NOS2+) en la región ecuatorial de cortes de tumor de mama primarios isotransplantados en ratones Balb/cAnHsd.

En la prueba de suma de rangos Kruskal Wallis se obtuvo una $p= 0.001543$ por lo que se realizó la prueba de Dunn de comparación múltiple. Esto arrojó una diferencia en el porcentaje de macrófagos M1 (CD68+NOS2+) entre el grupo tratado con cisplatino 3.5 mg/kg y los grupos tratados con agua o extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* a dosis de 50, 100 y 250 mg/kg con ($p<0.05$). Por otro lado, el grupo tratado con 25 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* tuvo un comportamiento similar con el grupo tratado con cisplatino (Cuadro 3, Figura 13).

Cuadro 3. Comparación múltiple de medias de Dunn para macrófagos “M1” entre grupos.

Grupos comparados	p
Agave 100 mg/kg - Agave 25 mg/kg	0.444
Agave 100 mg/kg - Agave 250 mg/kg	0.612
Agave 25 mg/kg - Agave 250 mg/kg	0.120
Agave 100 mg/kg - Agave 50 mg/kg	0.563
Agave 25 mg/kg - Agave 50 mg/kg	0.113
Agave 250 mg/kg - Agave 50 mg/kg	0.780
Agave 100 mg/kg - Agua	0.729
Agave 25 mg/kg - Agua	0.599
Agave 250 mg/kg - Agua	0.402
Agave 50 mg/kg - Agua	0.387
Agave 100 mg/kg – Cisplatino 3.5 mg/kg	0.008*
Agave 25 mg/kg – Cisplatino 3.5 mg/kg	0.074
Agave 250 mg/kg – Cisplatino 3.5 mg/kg	0.000*
Agave 50 mg/kg – Cisplatino 3.5 mg/kg	0.001*
Agua – Cisplatino 3.5 mg/kg	0.018*

El porcentaje de macrófagos perfil M1 en los grupos tratados con extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* fue de 1.36 para el grupo tratado con 25 mg/kg, 0.70 para el grupo tratados con 50 mg/kg, 0.71 para el grupo tratados con 100 mg/kg, 0.50 para el grupo tratados con 250 mg/kg; y 1.10 para el grupo tratado con agua y 2.85 para el grupo tratado con 3.5 mg/kg de Cisplatino. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para la cantidad de macrófagos CD68+NOS2+ (perfil M1) entre el grupo tratado con 3.5 mg/kg de cisplatino con los grupos tratados con extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* o agua. El grupo tratado con 3.5 mg/kg de cisplatino mostró la mayor cantidad de macrófagos perfil M1 (CD68+NOS2) con un máximo de 6% en comparación con los grupos tratados con diferentes dosis del extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* o agua (Figura 13).

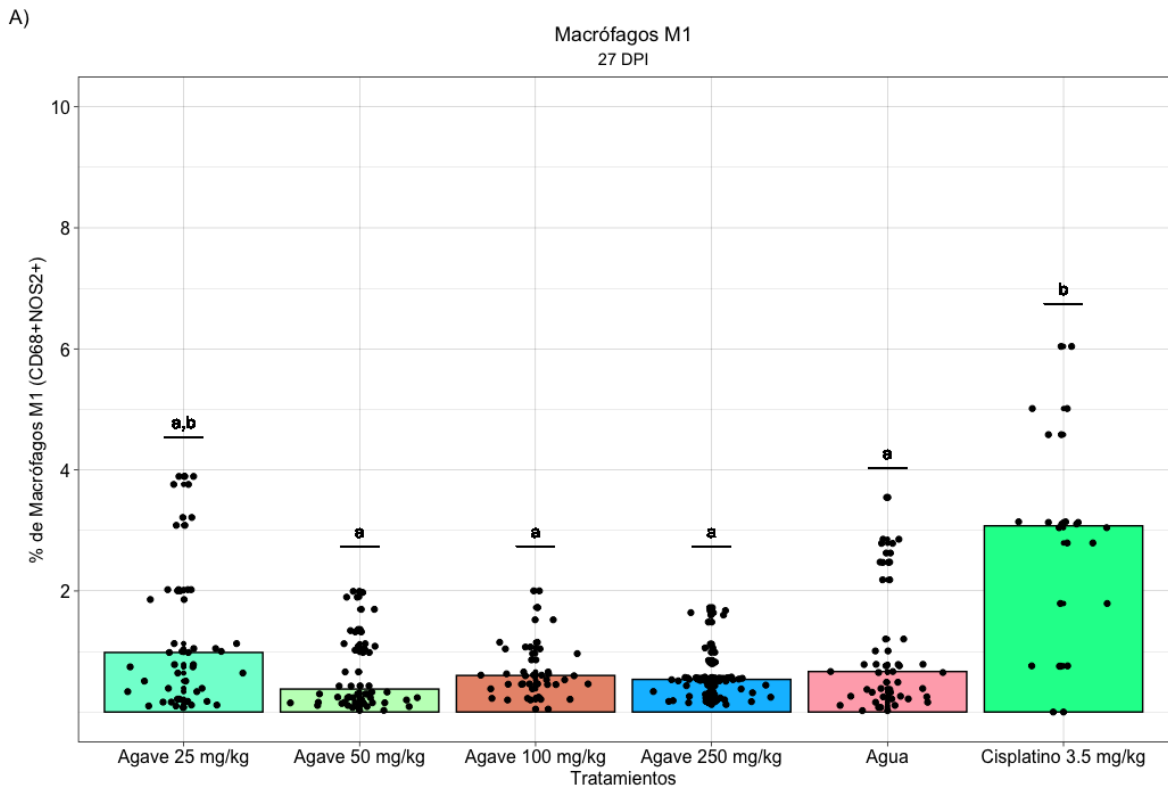


Figura 13. Porcentaje de macrófagos CD68+NOS2+ (perfil “M1”) en los cortes de tumor primario de mama. En la gráfica se muestran los porcentajes de macrófagos con perfil M1 CD68+NOS2+, de izquierda a derecha están los grupos tratados con 25, 50, 100, 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, agua o 3.5 mg/kg de cisplatino. La prueba de suma de rangos Kruskal Wallis se obtuvo una $p= 0.001543$ por lo que se realizó la prueba de Dunn de comparación múltiple.

Esto arrojó una diferencia significativa en la cantidad de macrófagos M1 (CD68+NOS2+) entre el grupo tratado con cisplatino 3.5 mg/kg y los grupos tratados con agua o extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* a dosis de 50, 100 y 250 mg/kg con ($p<0.05$). Sin embargo; no se encontró evidencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con 25 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* y el grupo tratado con cisplatino.

6.9.2 Macrófagos CD68+CD206+

La cantidad de macrófagos perfil “M2” (CD68+CD206+) de los grupos experimentales presentó una distribución normal en la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov ($P=0.5569$) (Figura 14).

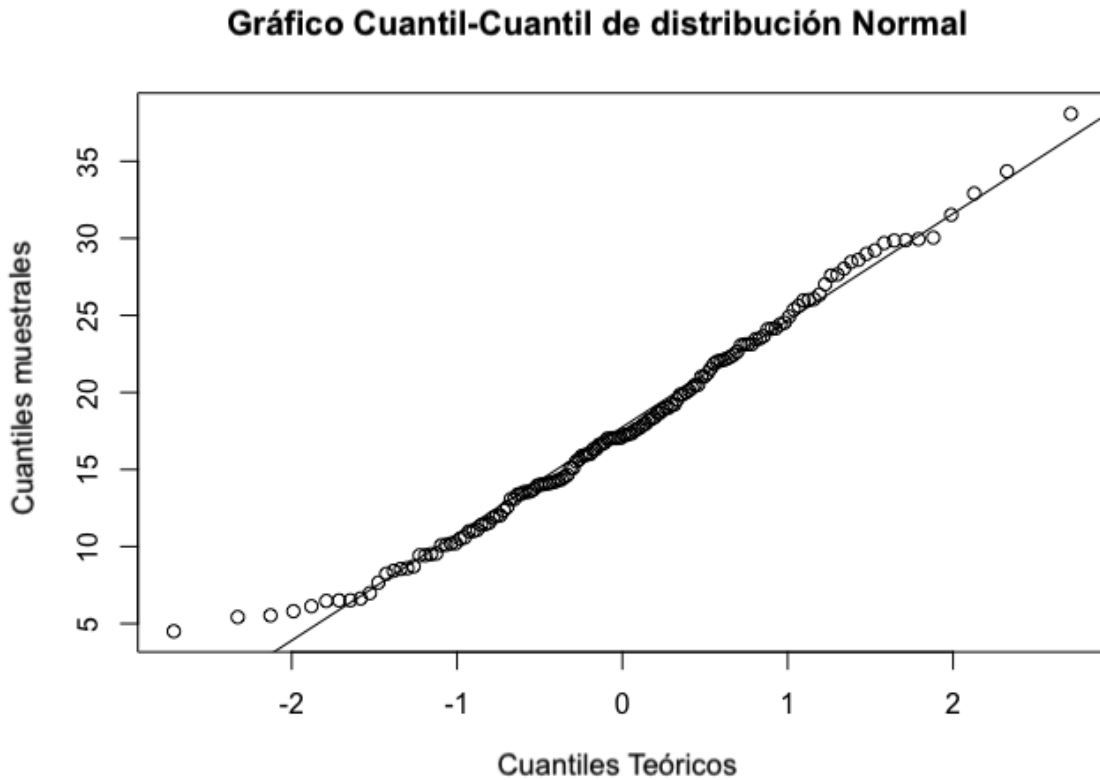


Figura 14. Distribución de macrófagos “M2” (CD68+CD206+)

Se utilizó el estadístico de Dunnett para comparar los tratamientos con diferentes dosis de *Agave mapisaga* y cisplatino tomando como control el grupo tratado con agua. No se encontró diferencia en los tratamientos con el grupo testigo tratado con agua en la prueba de Dunnett con $P>0.05$ (Cuadro 4, Figura 15).

Cuadro 4. Comparación de medias de Dunnett para macrófagos “M2” entre grupos.

Grupos comparados	p
Agave 25 mg/kg y Agua	0.1044
Agave 50 mg/kg y Agua	0.9613
Agave 100 mg/kg y Agua	0.7453
Agave 250 mg/kg y Agua	0.9636
Cisplatino 3.5 mg/kg y Agua	0.6793

El porcentaje de macrófagos perfil M2 en los grupos tratados con extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* fue de 14.07 para el grupo tratado con 25 mg/kg, 19.49 para el grupo tratado con 50 mg/kg, 16.23 para el grupo tratado con 100 mg/kg, 19.40 para el grupo tratado con 250 mg/kg; y 18.37 para el grupo tratado con agua y 16 para el grupo tratado con 3.5 mg/kg de Cisplatino. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para la cantidad de macrófagos CD68+CD206+ (perfil M2) entre los grupos tratados con extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, cisplatino o agua (Cuadro 4, Figura 15).

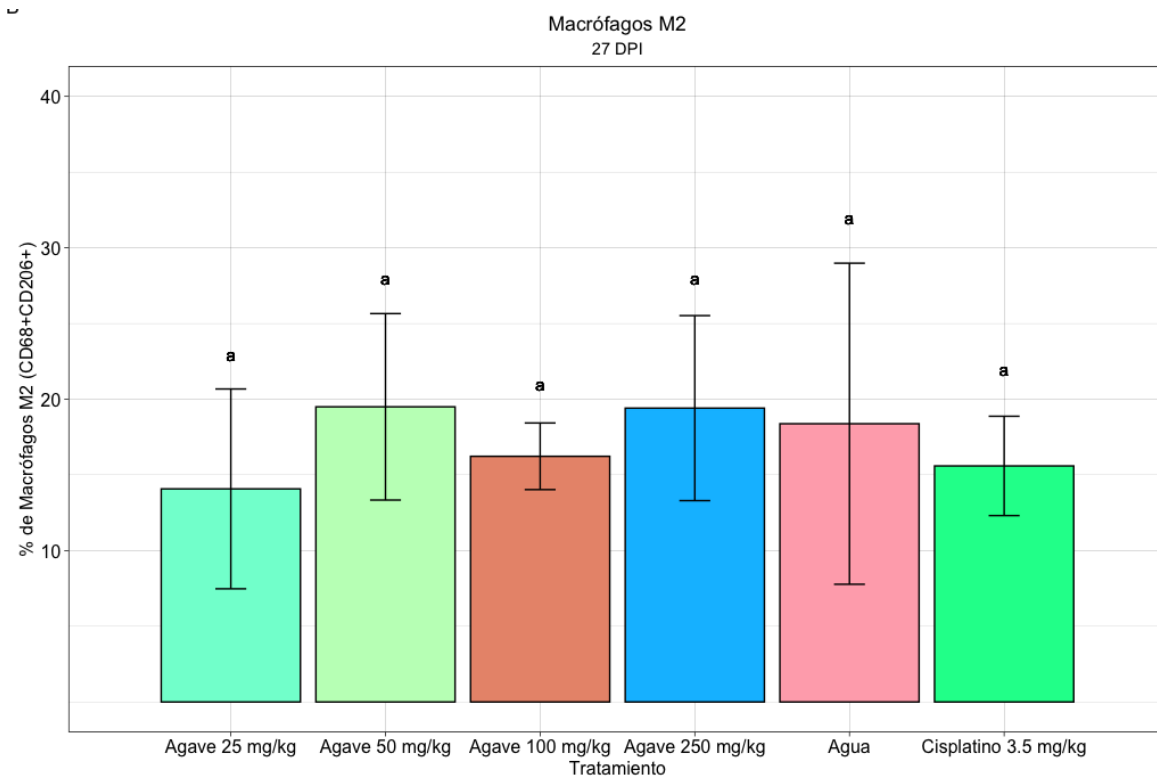


Figura 15. Porcentaje de macrófagos CD68+CD206+ (perfil “M2”) en los cortes de tumor primario entre grupos. En la gráfica se muestran los porcentajes de macrófagos con perfil M2 (CD68+CD206+), de izquierda a derecha están los grupos tratados con 25, 50, 100, 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, agua o 3.5 mg/kg de cisplatino. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para la cantidad de macrófagos CD68+CD206+ (perfil M2) entre los grupos tratados con diferentes dosis de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* y cisplatino con el grupo testigo de agua en la prueba de Dunnett con $P > 0.05$.

6.9.2 Proporción de macrófagos M1/M2

En la Figura 16 se muestra la proporción de macrófagos CD68+NOS2+ (M1) y CD68+CD206+ (M2) por grupo. El porcentaje de macrófagos CD68+CD206+ (M2) fue mayor que el porcentaje de macrófagos CD68+NOS2+ (M1) en todos los grupos experimentales. La proporción del porcentaje de macrófagos M1/M2 fue de 0.02 para el grupo tratado con 25 mg/kg de *Agave mapisaga*, 0.03 para el grupo tratado con 50 mg/kg de *Agave mapisaga*, 0.04 para el grupo tratado con 100 mg/kg de *Agave mapisaga*, 0.02 para el grupo tratado con 250 mg/kg de *Agave mapisaga*, 0.06 para el grupo tratado con Agua y 0.18 para el grupo tratado con 3.5 mg/kg de cisplatino.

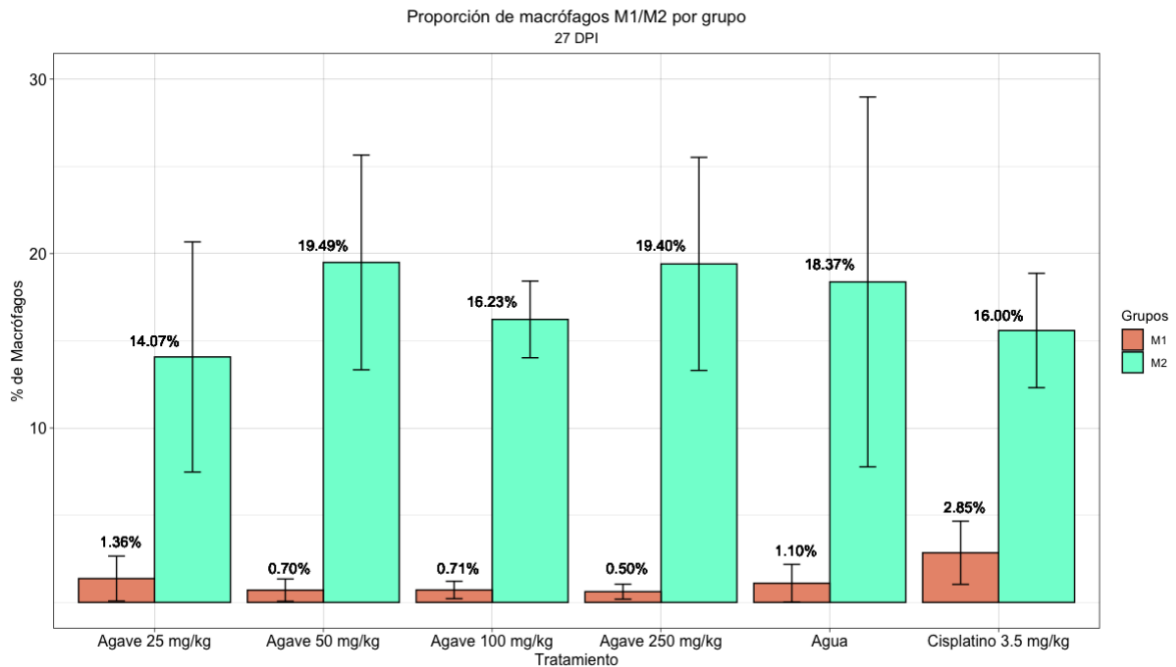


Figura 16. Proporción de macrófagos CD68+NOS2+ (perfil “M1”)/ CD68+CD206+ (perfil “M2”) en los cortes de tumor primario entre grupos. En la gráfica se muestra la proporción de macrófagos M1/ M2, de izquierda a derecha se muestran los grupos tratados con 25, 50, 100, 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, agua o 3.5 mg/kg de cisplatino.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo no se encontró evidencia estadísticamente significativa para demostrar que el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* module las poblaciones de macrófagos en cáncer de mama murino.

La cantidad de macrófagos polarizados hacia un perfil M2 fue similar en todos los grupos experimentales (Figura 15) y no mostró diferencia estadísticamente significativa. El proceso carcinogénico es dinámico e involucra la participación de múltiples estirpes celulares que varían en tipo y función a través del tiempo. Los tumores producen factores de crecimiento y supervivencia para los macrófagos y granulocitos: M-CSF, GM-CSF, y G-CSF (también conocidos como CSF-1, CSF-2 y CSF-3, respectivamente (Gabrilovich, Ostrand-Rosenberg and Bronte, 2012), y señales quimiotácticas como CCL-2, CCL12, VEGFA y semaphorin (SEMA3A) para estimular el reclutamiento local de macrófagos (Mantovani *et al.*, 2008; Balkwill, Charles and Mantovani, 2005; Bonapace *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2007; Takanori, Bin-Zhi and Jeffrey W., 2015). Estos factores quimiotácticos también activan programas transcripcionales que contribuyen al cambio de macrófagos hacia fenotipos específicos (Kitamura *et al.*, 2015). En particular, el CSF-1 actúa como señal de supervivencia y polarización de macrófagos; y conduce la diferenciación de TAMs hacia un fenotipo inmunosupresor y protumoral M2 (Noy and Pollard, 2014; Pyonteck *et al.*, 2013). Por otro lado, las células 4T1 son capaces de producir CCL-2 (Madera *et al.*, 2015), que también podría tener una participación relevante en la polarización de macrófagos a un perfil inmunosupresor en el cáncer de mama murino 4T1; y a pesar de que se ha demostrado que algunas saponinas eteroidales son capaces de inhibir la proliferación de monocitos (Delmas *et al.*, 2000; Delmas *et al.*, 2000) este efecto probablemente no se ve reflejado por la agresividad de la línea celular 4T1 y explicaría la gran cantidad de macrófagos M2 encontrados en este trabajo.

La mayor cantidad de macrófagos con perfil M1 se encontró en el grupo tratado con cisplatino (Figura 13) mientras que, en los grupos tratados con agua o con diferentes dosis de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, no se encontró diferencia estadísticamente significativa respecto a esta población celular (Cuadro 3). El cisplatino es un compuesto platinado citotóxico antitumoral usado ampliamente como quimioterapéutico en distintos tipos de cáncer, su principal mecanismo de acción se basa en la formación de puentes entre las bases nitrogenadas del ADN que bloquean la replicación y/o previenen la transcripción, provocando la muerte por apoptosis y necrosis de células con alto índice mitótico (Cepeda *et al.*, 2008; Dasari and Bernard Tchounwou, 2014). Las células tumorales muertas liberan señales para la activación de células del sistema inmune contra las células neoplásicas restantes. Sin embargo, la actividad antineoplásica del sistema inmune depende de la citotoxicidad de células NK, LT CD8+ y la correcta presentación de antígenos. Los TAM's con perfil inmunosupresor producen citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 (Hesse *et al.*, 2001) y una hidrolasa que controla el catabolismo de la L-arginina llamada arginasa 1 (Doedens *et al.*, 2010) que impide las funciones de estas células limitando la disponibilidad del aminoácido L-arginina (Rodríguez *et al.*, 2004). La L-arginina también es el sustrato de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) que es requerida para producir óxido nítrico, un mediador crucial para la citotoxicidad de las células mieloides (incluido el macrófago). Los macrófagos M2 encontrados en este trabajo podrían estar compitiendo por el sustrato L-arginina limitando así la cantidad y función de los macrófagos M1 en el microambiente tumoral; esto explicaría la escasa presencia de macrófagos antitumorales en el presente estudio.

El volumen tumoral de los grupos tratados con diferentes dosis de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*, no mostró diferencia entre tratamientos, ni con el grupo testigo tratado con agua (Figura 6). Sin embargo, la administración de cisplatino mostró un potente efecto antitumoral (Figura 6) y, a pesar de que no se encontró diferencia estadísticamente significativa para la cantidad de macrófagos

antitumorales CD68+NOS2+ (perfil M1), en este grupo se encontraron en mayor cantidad, lo que sugiere que los macrófagos proinflamatorios M1 podrían ser en parte responsables de su actividad antineoplásica (Figura 16).

El fenotipo de los TAMs varía significativamente entre los tumores y aun entre las diferentes áreas de el mismo tumor (Ruffell *et al.*, 2012; Movahedi *et al.*, 2010). El modelo clásico de Mills sugiere una dicotomía rígida entre macrófagos positivos a NOS2 (proinflamatorios/M1) y macrófagos positivos a ARG1 (antiinflamatorios/M2), siendo macrófagos anti-patógenos y de reparación respectivamente. Sin embargo, los macrófagos pueden expresar ARG1 y NOS2 simultáneamente en muchos escenarios, y la regulación de ambos genes muestran tener mayor complejidad. No se puede contar con un modelo dualístico simple para tal complejidad, y la noción de dos tipos de macrófagos ha sido remplazado por un modelo de espectro en el que los macrófagos previamente descritos como M1 y M2 representan dos finales opuestos de una continuidad (Hofseth *et al.*, 2003) (Aras and Raza Zaidi, 2017).

La reprogramación funcional de TAMs de protumorales a antitumorales es una estrategia atractiva para la terapia contra el cáncer. En modelos de cáncer de mama de ratón los TAMs son la principal fuente de IL-10, una citocina con efectos antiinflamatorias e inmunosupresoras; pero la inhibición de su señalización aumenta significativamente la eficacia de la quimioterapia con paclitaxel y carboplatin (Ruffell *et al.*, 2014). El *Agave mapisaga* ha sido usado tradicionalmente por la comunidad Ñañhu en el Estado de Hidalgo México para el tratamiento de tumefacciones y como antiinflamatorio; sin embargo, hacen falta estudios para caracterizar sus componentes y verificar su actividad antiinflamatoria, para después utilizarse como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

En este trabajo no se encontró diferencia estadísticamente significativa para el porcentaje de macrófagos CD68+CD206+ en los tumores primarios de ratones isotransplantados con cáncer de mama murino 4T1 y tratados con diferentes dosis de *Agave mapisaga*, agua o cisplatino (Figura 15). Sin embargo, se observó un

menor volumen tumoral y necrosis en el grupo tratado con cisplatino en comparación con los grupos tratados con diferentes dosis de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* o agua (Figura 3 y 6). La diferenciación de monocitos inflamatorios de ratón a TAMs depende de RBPJ (un regulador transcripcional de la señalización Notch), y la eliminación genética de esta proteína en TAMs reduce el peso tumoral en un modelo de cáncer de mama murino, indicando una función no redundante de TAMs en el crecimiento tumoral (Franklin *et al.*, 2014). Los macrófagos protumorales (M2) tienen la capacidad de producir factores angiogénicos que contribuyen a incrementar el volumen tumoral y posteriormente la metástasis. Los tumores se desarrollan rápidamente debido a la alta capacidad mitótica y genera zonas de hipoxia que a su vez aumenta la angiogénesis y produce factores quimiotácticos para monocitos (Qian *et al.*, 2007). El microambiente tumoral formado es típicamente hipóxico y caracterizado por altas concentraciones de lactato. Los altos niveles de ácido láctico en los tumores se deben al “efecto Warburg”, llamado así por el cambio metabólico que ocurre en células con altos índices de proliferación que convierten la glucosa a lactato aún en presencia de oxígeno (glucólisis aeróbica) (Hodge and Apkarian, 1990). El “efecto Warburg”, en cáncer condiciona directamente el fenotipo de los TAMs, el ácido láctico induce la expresión de genes protumorales *Vegf* y *Arg1* en macrófagos (Colegio OR, *et al.*). La expresión de *Vegf* en los tumores es típicamente controlado por HIF1 α , un factor de transcripción que es estabilizado en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno (Semenza and Semenza, 2013), así la expresión de ARG1 puede ser activada por HIF1 α bajo condiciones hipóxicas (Duque-Correa *et al.*, 2014). La expresión de ARG1 en TAMs tiene un potente efecto promotor de tumor, mientras que la eliminación de *Arg1* en células mieloides reduce significativamente el crecimiento tumoral (Colegio OR, *et al.*, 2014). Este efecto depende de las funciones inmunosupresoras de ARG1, pero también se puede deber a la habilidad de ARG1 para estimular la proliferación celular mediante la producción de L-ornitina, un precursor de poliaminas. De acuerdo con lo anterior, la presencia de cantidades

similares de macrófagos M2 en todos los grupos experimentales sugiere que es independiente del volumen tumoral pero su actividad no, esto explicaría la relación entre el volumen tumoral y la necrosis observada en este trabajo.

En este sentido Diaz-Cortes demostró que la administración de 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* durante 27 días vía oral reduce la permeabilidad vascular y disminuye la metástasis a bazo y pulmón (Diaz Cortés, 2020). En futuros estudios se podría determinar la presencia de arginasa, VEGF o HIF1 para conocer la relación de los tratamientos con diferentes concentraciones de *Agave mapisaga* con el volumen tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Asimismo, se podría probar el efecto del extracto con otras vías de administración como la intratumoral.

Los TAMs en carcinomas mamarios de ratón expresan pobremente genes característicos de un perfil “M2” como *Chi3l3* (también conocido como *Ym1*), *Retnla* (*Fizz1*), o *Mrc1*, y no dependen de la señalización de IL-4; en cambio, la vía de señalización Notch es requerida para el desarrollo de TAMs (Ruth Franklin *et al.*, 2012). Los TAMs con fenotipo proinflamatorio son frecuentemente encontrados en tumores tales como el tumor estromal gastrointestinal (GIST) (Pesce *et al.*, 2009). Si bien el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* no mostró efecto en los macrófagos de cáncer de mama, su administración oral en cáncer gastrointestinal podría ser evaluada en futuros trabajos debido a que la microbiota puede controlar las funciones de los TAMs en este tipo de cáncer (Sears and Garrett, 2014). Además; metabolitos como el n-butilato o propionato han demostrado controlar la actividad de macrófagos intestinales como el desarrollo de células Treg durante la homeostasis (Nicholas A, *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014).

El estudio de los macrófagos y su relevancia en la progresión del cáncer de mama es un desafío debido a su gran plasticidad y su amplio espectro de activación. En este trabajo se usaron cortes de tejido de tumores primarios de cáncer de mama

4T1 para determinar los porcentajes de macrófagos polarizados y así poder evaluar el efecto de diferentes dosis de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* sobre ellos. En otros trabajos se ha abordado la presencia de macrófagos M1 y M2 de manera indirecta: con la medición de la expresión de RNA mensajero de citocinas por PCR tiempo real para cada perfil de macrófago, sin demostrar su presencia *in situ* (Sadaf et al 2015) o usando bases de datos para evaluar su efecto clínico en cáncer de mama pero sin el uso de modelos *in vitro* o *in vivo* (Masanori et al; 2020).

8. CONCLUSIÓN

En conclusión la administración de 25, 50, 100 ó 250 mg/kg de extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga* administrado vía oral durante 27 días a ratones BALB/c isotransplantados con cien mil células 4T1, no mostró diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos CD68+NOS2 (M1) o CD68+CD206+ (M2), ni en el crecimiento tumoral comparado con los ratones no tratados.

9. REFERENCIAS

- Aras, S. and Raza Zaidi, M. (2017) 'TAMEless traitors: Macrophages in cancer progression and metástasis', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 117(11), pp. 1583–1591. doi: 10.1038/bjc.2017.356.
- Aslakson, C. J. and Miller, F. R. (1992) 'Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor', *Cancer Research*, 52(6), pp. 1399–1405.
- Azad, A. K. *et al.* (2015) ' γ -Tilmanocept, a New Radiopharmaceutical Tracer for Cancer Sentinel Lymph Nodes, Binds to the Mannose Receptor (CD206)', *The Journal of Immunology*, 195(5), pp. 2019–2029. doi: 10.4049/jimmunol.1402005.
- Balkwill, F., Charles, K. A. and Mantovani, A. (2005) 'Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease', *Cancer Cell*, 7(3), pp. 211–217. doi: 10.1016/j.ccr.2005.02.013.
- Barr, I. G., Sjölander, A. and Cox, J. C. (1998) 'ISCOMs and other saponin based adjuvants', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32(3), pp. 247–271. doi: 10.1016/S0169-409X(98)00013-1.
- Barros, M. H. M. *et al.* (2013) 'Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages', *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0080908.
- Batra, P. and Sharma, A. K. (2013) 'Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives', *3 Biotech*, 3(6), pp. 439–459. doi: 10.1007/s13205-013-0117-5.
- Betjes, M. G. H. *et al.* (1991) 'Monoclonal Antibody EBM11 (Anti-CD68) Discriminates between Dendritic Cells and Macrophages after Short-Term Culture', *Immunobiology*, 183(1–2), pp. 79–87. doi: 10.1016/S0171-2985(11)80187-7.
- Bobryshev, Y. V. (2010) 'Dendritic cells and their role in atherogenesis', *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 90(7), pp. 970–984. doi: 10.1038/labinvest.2010.94.
- Bonapace, L. *et al.* (2014) 'Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metástasis by promoting angiogenesis', *Nature*. Nature Publishing Group, 515(7525), pp. 130–133. doi: 10.1038/nature13862.
- Cabral de Oliveira, A. C. *et al.* (2001) 'Protective effects of Panax ginseng on muscle injury and inflammation after eccentric exercise', *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 130(3), pp. 369–377. doi: 10.1016/S1532-0456(01)00262-9.

- Campbell, M. J. *et al.* (2011) 'Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome', *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(3), pp. 703–711. doi: 10.1007/s10549-010-1154-y.
- Celada, A. and Nathan, C. (1994) 'Macrophage activation revisited', *Immunology Today*, 15(3), pp. 100–102. doi: 10.1016/0167-5699(94)90150-3.
- Cepeda, V. *et al.* (2008) 'Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity', *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7(1), pp. 3–18. doi: 10.2174/187152007779314044.
- Cervantes Dueñas Aleydis (2016) 'Presencia de saponinas en Agave spp de Mexico', *Bioz*, 1, p. 3. Available at: <http://editorial.uaie.uaz.edu.mx/index.php/bioz/article/viewFile/108/80>.
- Chang, P. V. *et al.* (2014) 'The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), pp. 2247–2252. doi: 10.1073/pnas.1322269111.
- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, M. R. (2014) 'Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid', *Nature*, 513, pp. 559–563. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Dasari, S. and Bernard Tchounwou, P. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 740, pp. 364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Delmas, F. *et al.* (2000) 'Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, α -hederin, β -hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured in vitro', *Planta Medica*, 66(4), pp. 343–347. doi: 10.1055/s-2000-8541.
- DeNardo, D. G. *et al.* (2009) 'CD4⁺ T Cells Regulate Pulmonary Metástasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages', *Cancer Cell*. Elsevier Ltd, 16(2), pp. 91–102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.018.
- Dexter, D. L. *et al.* (1978) 'Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor', *Cancer Research*, 38(10), pp. 3174–3181.
- Diaz Cortés (2020) 'Evaluación de tumor primario y metástasis en ratones isotransplantados con cáncer de mama y tratados con el extracto hidrosoluble de Agave mapisaga.', p. 104.
- Doedens, A. L. *et al.* (2010) 'Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 α suppresses T-

cell function and promotes tumor progression', *Cancer Research*, 70(19), pp. 7465–7475. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439.

Duque-Correa, M. A. *et al.* (2014) 'Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(38), pp. E4024–E4032. doi: 10.1073/pnas.1408839111.

Eguiarte, L. E., Souza, V. and Silva-Montellano, A. (2000) 'Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones', *Botanical Sciences*, 150(66), p. 131. doi: 10.17129/botsci.1618.

Espina, V. and Liotta, L. A. (2011) 'What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ?', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 68–75. doi: 10.1038/nrc2950.

Francis, G. *et al.* (2002) 'The biological action of saponins in animal systems: a review', *British Journal of Nutrition*. Universidad Nacional de Mexico (UNAM), 88(6), pp. 587–605. doi: 10.1079/bjn2002725.

Franklin, R. A. *et al.* (2014) 'The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages', *Science*, 344(6186), pp. 921–925. doi: 10.1126/science.1252510.

Frantz, S. *et al.* (2005) 'Innate immunity and angiogenesis', *Circulation Research*, 96(1), pp. 15–26. doi: 10.1161/01.RES.0000153188.68898.ac.

Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. and Bronte, V. (2012) 'Coordinated regulation of myeloid cells by tumours', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 12, p. 253. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri3175>.

Gallegos Ibarra, L. (2018) 'DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (NOS2) EN MACRÓFAGOS DE ORIGEN MURINO EXPUESTOS AL EXTRACTO HIDROSOLUBLE DE *Agave mapisaga*', p. 35.

Gordon, S. (2003) 'Alternative activation of macrophages', *Nature Reviews Immunology*, 3(1), pp. 23–35. doi: 10.1038/nri978.

Green S, Nancy C, M. M. (1991) 'Cytokine induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages. A protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogen', *J Luekoc Biol*, 50, pp. 93–103. doi: 10.1002/jlb.50.1.93.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: The next generation', *Cell*. Elsevier Inc., 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Haridas, V. *et al.* (2001) 'Avicin Apoptosis', pp. 1–6.

Hernández-Peralta (2016) *Evaluación anti-neoplásica e inmunomoduladora in vivo e in vitro del extracto hidrosoluble del Agave mapisaga en cáncer de próstata murino.*

Hesse, M. *et al.* (2001) 'Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of l-Arginine Metabolism', *The Journal of Immunology*, 167(11), pp. 6533–6544. doi: 10.4049/jimmunol.167.11.6533.

Hodge, C. J. and Apkarian, A. V. (1990) 'Understanding the Warburg effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation', *Science*, 5(4), pp. 363–397. doi: 10.1126/science.1160809.Understanding.

Hofseth, L. J. *et al.* (2003) 'Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), pp. 143–148. doi: 10.1073/pnas.0237083100.

Holness, C. L. and Simmons, D. L. (1993) 'Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins.', *Blood*, 81(6), pp. 1607–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680921>.

Huang, Y. C. and Feng, Z. P. (2013) 'The good and bad of microglia/macrophages: New hope in stroke therapeutics', *Acta Pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group, 34(1), pp. 6–7. doi: 10.1038/aps.2012.178.

Instituto de biología, UNAM, M. (2010) 'I. d. B. U. N. A. d. Vol. "Agave sp. - IBUNAM:MEXU:AGA7874"', 1.

Jie, Y. H., Cammisuli, S. and Baggiolini, M. (1984) 'Immunomodulatory effects of Panax Ginseng C.A. Meyer in the mouse', *Agents and Actions*, 15(3–4), pp. 386–391. doi: 10.1007/BF01972376.

Kitamura, T. *et al.* (2015) 'CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages', *Journal of Experimental Medicine*, 212(7), pp. 1043–1059. doi: 10.1084/jem.20141836.

Komohara, Y. *et al.* (2011) 'Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma', *Cancer Science*, 102(7), pp. 1424–1431. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01945.x.

Konoshima T, *et al.* (1988) 'Anti-tumor-promoting activity of majonoside-R2 from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* HAet GRUSHV. (I)', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 21(1),

pp. 834–838. doi: 10.1248/bpb.21.834.

Kröncke KD, Fehsel K, K.-B. V. (1997) 'No Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where?', *Nitric Oxide*, 1(2), pp. 107–20. doi: 10.1006/niox.1997.0118.

Kumar, V. *et al.* (2016) 'CD45 Phosphatase Inhibits STAT3 Transcription Factor Activity in Myeloid Cells and Promotes Tumor-Associated Macrophage Differentiation', *Immunity*. Elsevier Inc., 44(2), pp. 303–315. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.014.

Kurushima, H. *et al.* (2000) 'Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages', *Journal of Leukocyte Biology*, 67(1), pp. 104–108. doi: 10.1002/jlb.67.1.104.

Lancaster, J. R. (1997) 'A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide.', *Nitric Oxide*, 1(1), pp. 18–30. doi: 10.1006/niox.1996.0112.

Madera, L. *et al.* (2015) '4T1 murine mammary carcinoma cells enhance macrophage-mediated innate inflammatory responses', *PLoS ONE*, 10(7), pp. 1–25. doi: 10.1371/journal.pone.0133385.

Mahmoud, S. M. A. *et al.* (2012) 'Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer', *Journal of Clinical Pathology*, 65(2), pp. 159–163. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200355.

Man, S. *et al.* (2010) 'Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents', *Fitoterapia*. Elsevier B.V., 81(7), pp. 703–714. doi: 10.1016/j.fitote.2010.06.004.

Mantovani, A. *et al.* (2002) 'Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes', *Trends in Immunology*, 23(11), pp. 549–555. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02302-5.

Mantovani, A. *et al.* (2008) 'Cancer-related inflammation', *Nature*, 454(7203), pp. 436–444. doi: 10.1038/nature07205.

Masanori, O. *et al.* (2020) 'M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer', *Nature*, 10(16554), doi: 10.1038/s41598-020-73624-w

Marcinkiewicz, J. and Chain, B. M. (1993) 'Differential regulation of cytokine production by nitric oxide', *Immunology*, 80(1), pp. 146–150.

Medrek, C. *et al.* (2012) 'The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients', *BMC Cancer*, 12, pp. 1–9. doi: 10.1186/1471-2407-12-306.

Mills, C. D. *et al.* (2000) 'M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm', *The Journal of Immunology*, 164(12), pp. 6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

Mimaki, Y. *et al.* (1998) 'Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells', *Phytochemistry*, 48(3), pp. 485–493. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00036-3.

Movahedi, K. *et al.* (2010) 'Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes', *Cancer Research*, 70(14), pp. 5728–5739. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4672.

Nicholas Arpaia^{1, 2}, Clarissa Campbell^{1, 2}, Xiyang Fan^{1, 2}, Stanislav Dikiy^{1, 2}, Joris van der Veeken^{1, 2}, Paul deRoos^{1, 2}, Hui Liu³, Justin R. Cross³, Klaus Pfeffer⁵, Paul J. Coffey^{1, 6}, and A. Y. R. (2013) 'Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T cell generation', *J Autism Dev Disord*, 504(7480), pp. 451–455. doi: doi:10.1038/nature12726.

Noy, R. and Pollard, J. W. (2014) 'Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy', *Immunity*. Elsevier Inc., 41(1), pp. 49–61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
OMS (2018) *The Global Cancer Observatory*.

Patil, V. M. and Masand, N. (2018) *Anticancer Potential of Flavonoids: Chemistry, Biological Activities, and Future Perspectives*. 1st edn, *Studies in Natural Products Chemistry*. 1st edn. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-444-64179-3.00012-8.

Penna, G. *et al.* (2002) 'Cutting Edge: Differential Chemokine Production by Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 169(12), pp. 6673–6676. doi: 10.4049/jimmunol.169.12.6673.

Pesce, J. T. *et al.* (2009) 'Retnla (Relm α /Fizz1) suppresses helminth-induced Th2- type immunity', *PLoS Pathogens*, 5(4), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.ppat.1000393.

Polyak, K. (2007) 'Breast cancer: origins and evolution Find the latest version: Science in medicine Breast cancer: origins and evolution', 117(11), pp. 3155–3163. doi: 10.1172/JCI33295.group.

Popoca, J. *et al.* (1998) 'Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine', *Journal of Ethnopharmacology*, 59(3), pp. 173–177. doi: 10.1016/S0378-8741(97)00110-4.

Pulaski, B. A. and Ostrand-Rosenberg, S. (1998) 'Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II

and B7.1 cell-based tumor vaccines', *Cancer Research*, 58(7), pp. 1486–1493.

Pyonteck, S. M. *et al.* (2013) 'CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression HHS Public Access Author manuscript', *Nat Med*, 19(10), pp. 1264–1272. doi: 10.1038/nm.3337.

Qian, B. *et al.* (2007) 'CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis', 475(7355), pp. 1–9. doi: 10.1038/nature10138.CCL2.

Qian, B. Z. and Pollard, J. W. (2010) 'Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis', *Cell*, 141(1), pp. 39–51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.

Raes, G. *et al.* (2002) 'FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages', *Developmental Immunology*, 9(3), pp. 151–159. doi: 10.1080/1044667031000137629.

Rodriguez, P. C. *et al.* (2004) 'Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses', *Cancer Research*, 64(16), pp. 5839–5849. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0465.

Rolny, C. *et al.* (2011) 'HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF', *Cancer Cell*, 19(1), pp. 31–44. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.009.

Rosete, P. G. *et al.* (1999) 'Oxido nitrico, una molecula multifuncional', *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 12(4), pp. 300–304.

Ruffell, B. *et al.* (2012) 'Leukocyte composition of human breast cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), pp. 2796–2801. doi: 10.1073/pnas.1104303108.

Ruffell, B. *et al.* (2014) 'Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells', *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 26(5), pp. 623–637. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.006.

Ruth Franklin *et al.* (2012) 'Cellular and Molecular Origin of Tam', *Changes*, 29(6), pp. 997–1003. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

Sadaf Shiri *et al.* (2015) 'Dendrosomal Curcumin Suppresses Metastatic Breast Cancer in Mice by Changing M1/M2 Macrophage Balance in the Tumor Microenvironment'. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 16(9), 3917–3922. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.9.3917.

Sears, C. L. and Garrett, W. S. (2014) 'Microbes, microbiota, and colon cancer', *Cell Host and*

Microbe. Elsevier Inc., 15(3), pp. 317–328. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.007.

Semenza, G. L. and Semenza, G. L. (2013) 'HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations Find the latest version : Review series HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations', 123(9), pp. 3664–3671. doi: 10.1172/JCI67230.3664.

Shah, C. *et al.* (2015) 'Ductal carcinoma in situ of the breast : Evaluating the role of radiation therapy in the management and attempts to identify low-risk patients', *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 38(5), pp. 526–533. doi: 10.1097/COC.000000000000102.

Shukla, S. and Mehta, A. (2015) 'Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review', *Revista Brasileira de Botanica*, 38(2), pp. 199–210. doi: 10.1007/s40415-015-0135-0.

Takanori, K., Bin-Zhi, Q, and Jeffrey W., P. (2015) 'Immune cell promotion of metástasis', *Nature reviews Immunology*, 73(4), pp. 389–400. doi: 10.1530/ERC-14-0411.

Taylor, P. R. *et al.* (2005) 'Macrophage Receptors and Immune Recognition', *Annual Review of Immunology*, 23(1), pp. 901–944. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816.

Watowich, S. S. *et al.* (1996) 'Cytokine Receptor Signal Transduction and the Control of Hematopoietic Cell Development', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), pp. 91–128. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.91.

www.gob.mx (2019) *Información Estadística Cáncer de Mama*.

Xaus, J. *et al.* (2001) 'Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis', *Immunobiology*, 204(5), pp. 543–550. doi: 10.1078/0171-2985-00091.

Yoshiki Y, Kudou S, O. K. (1998) 'Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean', *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, pp. 2291–2299. doi: 10.1271/bbb.62.2291.

Yui, S. *et al.* (2001) 'Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*', *International Immunopharmacology*, 1(11), pp. 1989–2000. doi: 10.1016/S1567-5769(01)00126-6.

Yunping Luo, et al (2006) 'Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer', 116(8), pp. 2132–2141. doi: 10.1172/JCI27648.2132.

10. APÉNDICE

APÉNDICE 1. SOLUCIONES

PBS 10x

- NaCl 40.30 g
- KCl 1.10 g
- Na₂HPO₄ 5.75 g
- KH₂PO₄ 1.00 g
- dH₂O cbp 500 ml

Paraformaldheido 4%

- Paraformaldheido
- PBS 1x
- Hidroxido de sodio
- HCl

Solución de bloqueo

- PBS 1x pH 7.4

- Suero normal de burro (DNS) 5%

Solución de lavado

- PBS 1x pH 7.4
- Tween 20
- Azida de sodio
- H₂O_d

Solución de incubación

- PBS 1x pH7.6
- Albumina serica bovina
- Suero normal bovino
- Azada de sodio
- Triton X-100

Solución de contratincion

- DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol)
- PBS 1x

APÉNDICE 2. CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

Anestesia: Los ratones fueron anestesiados con 120 mg/kg de peso corporal de ketamina y 24 mg/kg de peso corporal de xilacina en una solución de 0.9% de cloruro de sodio como vehiculo. La mezcla anestésica se realizo de la siguiente manera:

Componente	Volumen por mililitro	Concentración final en la mezcla anestésica inyectada
100 mg/mL de Ketamina	0.2 ml	20 mg/ml
20 mg/mL de Xylazina	0.2 ml	4 mg/ml
0.9% de NaCl	0.6 ml	No aplica

Cada ratón recibió seis microlitros de la mezcla anestésica por cada gramo de peso corporal vía intraperitoneal.

Análisis morfométrico de macrófagos M1 y M2 en el equipo ImageXpress®

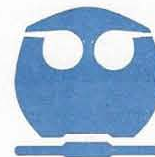
Condiciones para la obtención de imágenes para una laminilla electrocargada de 52 mm de largo en el equipo ImageXpress®

Número de filas	5					
Número de columnas	7					
Forma del área	Círculo					
	W.D (µm)	4500	C.S (µm)	6500	P.I (mm)	127.8
Laminilla de 52 000 µm	C.O (µm)	52000	R.S (µm)	4000	P.W (mm)	85.5
	R.O (µm)	52500	W.D (µm)	12610	P.H (mm)	14.3
Fixed N.S	X=47	Y=47				
Sitio/IZ	657.72	657.72				
Número de sitios totales	16					
Imagen	3.58	3.58				
Columnas	4	315				
Filas	4	315				
Autoenfoco: F.on plate	thickness					
DAPI W1 Exp (ms)	500/500					
W2 FITC Exp (ms)	400/500					
W3 Cy5 Exp (ms)	600/1000					
W4 Cy3 Exp (ms)	11/33000					

Condiciones de análisis de imagen en el programa Metaxpress®

	Núcleos	CD68	NOS2	CD206
Fluorocromo	DAPI	FITC	Cy5	Cy3
Tiempo de exposición	200 ms	300 ms	300 ms	300 ms
Área	Núcleo	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma	Núcleo y citoplasma
Anchura mínima	5 μm	5 μm	5 μm	5 μm
Anchura máxima	25 μm	20 μm	10 μm	7 μm
Área mínima teñida	NA	15 μm^2	20 μm^2	20 μm^2

ANEXO 1. DICTAMEN DEL CICUAL



FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/269/18
ASUNTO: DICTAMEN

M. en C. MARÍA ISABEL GRACIA MORA
UNIPREC
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
Presente(s)

Por éste medio les informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado su protocolo:

Evaluación del microambiente tumoral y metástasis mediante microscopía confocal en ratones isotransplantados con cáncer de mama y tratados con extracto hidrosoluble de Maguey Maxicano.

No. de animales empleados en el estudio: 75 ratones BALB/c hembras

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

Con una vigencia de: 1 año posterior a la fecha de aprobación.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
"POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Ciudad de México a 8 de febrero de 2018.

M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente

c.c.p. Dr. Felipe Cruz, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
c.c.p. Mtra. Patricia Santillán, Secretaría Administrativa, FQ.
c.c.p. Expediente CICUAL.