



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la**  
**Producción y de la Salud Animal**

**Evaluación de los macrófagos M1 y M2 en el microambiente tumoral en  
un modelo de isotransplatación de células cancerosas de próstata:  
diferencias entre dos núcleos de producción de ratones C57BL/6**

**TESIS**

**Que para optar por el grado de:**

**Doctor en Ciencias**

**Presenta**

**Pablo Hernández Peralta**

**Tutor principal:**

**Dr. Rommel Chacón Salinas.**

**Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN**

**Miembros del Comité Tutor:**

**Dra. Gloria Soldevila Melgarejo.**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Dr. José Moreno Rodríguez.**

**Hospital Juárez de México**



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.

### **“¿Quién dijo que todo está perdido? ...”**

Estamos en el año 2023 y en nuestro país --como desde hace décadas--, más de 50 millones de personas viven en la pobreza y más de 30 millones cuentan en las filas del rezago educativo. Es común escuchar que, para disminuir la pobreza el camino principal es la educación, cuando en realidad la pobreza ocasiona la falta de educación. El asunto central es que, la pobreza es producto de la desigualdad. Los niños y niñas que no desayunan, no aprenden siete de cada diez elementos que se les enseñan; las y los adolescentes cuyos tutores trabajan de 10 a 12 horas diarias para ganar el salario mínimo --escenario de 19 millones de personas--, y no tienen tiempo de acompañar su formación, presentan cuatro veces más probabilidad de abandonar la educación secundaria o el bachillerato; las y los jóvenes que no pueden pagar educación privada o cursos de preparación para el ingreso a la educación superior pública, tienen el 85% de rechazo. Por lo que, en la mayoría de los casos, la educación deja de ser un derecho de la población y obligación del Estado, para convertirse en un privilegio de élite, mientras la pobreza prevalece y se expande.

Las cualidades y capacidades son insuficientes cuando las condiciones son inequitativas de origen y el verdadero contexto que conduce a una mayor probabilidad de desarrollo y éxito, es el nicho socioeconómico en el que se nace y ocasionalmente la suerte. “Echarle ganas” -remedio esgrimido por la élite privilegiada- ha pasado de ser absurdo, a una insultante evidencia de ignorancia. Las condiciones en las que se reproduce la vida de la mayoría de las personas que habitan el país y el mundo, las obliga a “echarle ganas” desde que nacen... Pero ante la desigualdad, solamente les alcanza para sobrevivir... Por lo que los privilegiados que emiten su vacía propuesta de *emancipación humana* desconocen su significado.

Este trabajo está dedicado a esos millones de personas que, desde su pobreza, pagan con su esfuerzo e impuestos este y miles de otros “proyectos de ciencia” que rara vez llegarán a representar algún tipo de beneficio para ellas y ellos. Ya que, en su lugar, la mayoría de las investigaciones se subordinan a un sistema de ciencia que simula filantropía, pero cuyo objetivo real se ha vuelto la maquila y publicación de artículos que frecuentemente no leen ni sus equipos de trabajo, pero que si aumentan los ingresos de los investigadores y las onerosas revistas. Se ha establecido una ciencia que se mira el ombligo con el cobijo de aplausos entre pares - de porras entre porristas-, investigaciones y planteamientos tan sesudos como ociosos, que reposan inertes en la antesala de la devastación socioecológica. Este sistema sigue pariendo generaciones científicas que son progenie de la ignorancia ilustrada, personas que aparentemente saben casi de todo de un tema, pero que desconocen escandalosamente su entorno y la vida colectiva, de la que hablan con tanta petulancia como ceguera. Se producen hordas de postgraduados capacitados para presentar en congresos, elaborar carteles, interpretar figuras, realizar experimentos, manejar sofisticados equipos y software, todas maravillosas y útiles herramientas pero que no mejoran la realidad social al estar desnudos de pensamiento, de crítica, de sensibilidad, de generosidad, de sentido colectivo y de humanismo, que son algunos de los elementos necesarios para resolver los problemas de esta realidad descarnada.

Para contribuir a un escenario diferente, es urgente que las universidades, en especial las públicas y principalmente la UNAM, tengan un funcionamiento que se parezca más al mundo de justicia al que aspiramos y no al inequitativo que ya hay. Empecemos por equilibrar los ingresos y el trabajo entre las y los integrantes de su planta académica, ya que, por ejemplo: “Las y los diez profesores peor pagados, incluyendo en sus ingresos los bonos de despena, estímulos de asistencia, antigüedad, número de horas trabajadas y antes de impuestos, reciben en promedio \$2,145.80 pesos al mes. En contraste, los siete profesores y las tres profesoras mejor pagadas en la UNAM reciben en promedio \$258,175.50 pesos al mes.” Lo que significa que, “el profesor emérito que *se supone* da una clase, gana 125 veces más que la profesora *ayudante* que realmente la imparte (por lo que esta, tendría que trabajar 125 años, para ganar lo que el otro gana en un solo año); “el 10% de los profesores mejor pagados reciben en total, ingresos mensuales por más de \$422 millones de pesos, mientras que la suma del ingreso total del 80% de los profesores con menores salarios es de tan sólo \$380 millones. El 1% mejor pagado de la UNAM es un grupo de 415 académicos, que concentran más presupuesto de la UNAM que los 12,775 profesores peor pagados.” (Solares Israel, 2021). Lo anterior posiciona a la máxima casa de estudios en un índice de desigualdad (coeficiente de Gini) sólo comparable al de Nigeria.

Sin pretender desahuciar ni aceptar con resignación o amargura el escenario descrito, sostengo que, es fundamental partir del piso de realidad en el que estamos, para volver justas las condiciones institucionales y sociales. Esta premisa de justicia es lo que debemos aprender, enseñar y ejecutar desde las universidades. Aunque no son la mayoría, también es real que sí existe investigación, docencia y trabajo administrativo que rema a contracorriente y con valentía, frente a la soberbia institucional, el machismo estructural, el amiguismo y nepotismo. Ejemplo de ello son las profesoras que participaron en el presente trabajo, quienes generan bienes y servicios palpables que atienden a las necesidades de la población. Además, la Universidad también cuenta con la digna rebeldía y la sabiduría de las y los estudiantes.

Es totalmente posible, pues todo lo que conocemos fue construido en algún momento por alguien y se puede rehacer. Se puede y debe desechar el modelo social de falsa superioridad académica; se pueden escuchar las voces de la comunidad y ejecutar las propuestas que emanen de ella; se pueden dar salarios dignos y justos; se puede abolir el acoso y el hostigamiento sexual, entre otras violencias asociadas al género; se pueden tener servicios e infraestructura adecuados para el estudiantado y el profesorado; se puede invalidar la falsa meritocracia que imponen jefes y directivos; se puede llevar la universidad al pueblo y el pueblo a la universidad; se puede poner la técnica y la ciencia al servicio del equilibrio social; se puede, debe y necesita hacer una universidad y un país que sea la casa de todos y todas, y no el palacio de algunos y el yugo de la mayoría.

Para quienes estuvieron, están y vienen en camino, ofrezco mi pensamiento, mis manos y mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) a cargo de la maestra Isabel Gracia Mora, por la aportación de equipo y reactivos

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por la provisión de los animales de experimentación.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por facilitar el uso de instalaciones y materiales.

A la doctora Laura Cobos Marín por su coordinación y provisión de materiales y reactivos

A la doctora Isabel Gracia Mora por su coordinación y provisión de materiales, equipo y reactivos

A la doctora Alma Delia Chávez Blanco y al doctor Luis Alberto Medina Velázquez del Instituto Nacional de Cancerología por su participación en el desarrollo del proyecto.

## Resumen

Los modelos murinos son críticos para la investigación en inmunología, se han utilizado como el principal modelo animal para la investigación biomédica del microinmunoambiente tumoral. Para evaluar el efecto de diferentes núcleos reproductores de ratones C57BL/6 en el desarrollo de cáncer de próstata, así como el número y distribución de macrófagos tumorales se realizó un experimento de isotransplatación. Se emplearon dos núcleos de crianza de ratones C57BL/6: BL/6nA y BL/6nB, se les trasplantaron células de adenocarcinoma prostático TRAMP-C1 por vía subcutánea en la región interescapular, se documentó el crecimiento tumoral y se midieron los macrófagos intratumorales mediante inmunofluorescencia tisular en múltiples regiones tumorales. El grupo BL/6nB mostró una implantación tumoral del 54% y el proceso de crecimiento de 69 días, mientras que el grupo BL/6nA, la implantación fue del 100% y el proceso de crecimiento tumoral de 28 días. Ambos grupos mostraron mayor población promedio de macrófagos en las regiones superior e inferior del tumor (43.5%) en contraste con el promedio de las regiones centrales (17.5%). En la distribución de perfiles M1 y M2 los valores de M2 fueron del 50 % a 88% del total de macrófagos en ambos grupos de ratones. Sin embargo, los tumores BL/6nB presentaron alrededor del doble de perfil M1 (11% - 27%) que BL6nA (4% - 15%), así como una menor concentración de macrófagos no polarizados. La proporción promedio M2/M1 fue de 8/1 para el grupo A y de 4.2/1 para el grupo B. Nuestros resultados indican que el uso de diferentes núcleos de reproducción afecta la progresión tumoral asociada con el perfil de macrófagos dentro del microambiente tumoral. La información generada en este estudio señala la importancia de la renovación de las fuentes animales para el control de variables en el estudio de modelos murinos de cáncer.

## **Abstract**

Mouse models are critical for oncoimmunology research as they have been used as the preferred animal model for biomedical research of tumor immune environment. To assess the effect of different breeding nuclei of C57BL/6 mice in prostate cancer development and tumor macrophage numbers and distribution, an isotransplantation experiment was performed. Two breeding nuclei C57BL/6 mice were employed: BL/6nA y BL/6nB. Prostate adenocarcinoma TRAMP-C1 cells were transplanted subcutaneously, tumor growth was monitored and intratumoral macrophages were measured by tissue immunofluorescence staining at multiple tumoral regions. BL/6nB showed a tumoral implantation of 54% and growth process of 69 days, Meanwhile BL/6nA implantation reached 100% and tumor growth process was 28 days. Both groups displayed higher average macrophage populations at top and bottom regions of the tumor (43.5%) in contrast with average of central regions (17.5%), in M1 and M2 profile distribution, M2 values were from 50% to 88% of total macrophages in both mice groups. Nevertheless, BL/6nB tumors present around twice the amount of M1 profile (11% - 27%) than BL6nA (4% - 15%) and lower amounts of non-polarized macrophages. M2/M1 average ratio was 8/1 for A group and 4.2/1 for B. Our results indicate the use of different breeding nuclei affect tumoral progression associated with macrophage profile within tumoral microenvironment. The data obtained in this study shows the relevance of animal sources renewing for a better control of murine cancer model variables.

*Key words: Oncoimmunology, mouse, microenvironment, cancer, immunofluorescence, macrophage polarization*

# Contenido

<b>Lista de cuadros</b> .....	8
<b>Índice de figuras</b> .....	8
<b>Abreviaturas</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	11
<i>Epidemiología del cáncer</i> .....	11
<i>Cáncer en México</i> .....	12
<i>Fisiopatología del cáncer</i> .....	13
<i>Cáncer de próstata</i> .....	14
<i>Respuesta inmune al cáncer</i> .....	15
<i>Microambiente tumoral inmunitario</i> .....	18
<i>Macrófagos</i> .....	19
<i>Macrófagos en los procesos neoplásicos</i> .....	19
<i>El ratón como modelo experimental</i> .....	21
<i>El ratón como modelo de estudio del cáncer</i> .....	21
<i>Modelo de isotransplatación</i> .....	22
<i>La cepa C57BL/6 en el estudio de la inmunología y el cáncer</i> .....	22
<i>Diversidad en los ratones C57BL/6</i> .....	23
<b>Justificación</b> .....	24
<b>Hipótesis</b> .....	25
<b>Objetivo general</b> .....	25
<b>Objetivos particulares</b> .....	25
<b>Material y métodos</b> .....	25
Implementación del modelo de isotransplatación tumoral.....	26
Animales .....	26
Cultivo celular.....	26
Inducción tumoral .....	27
<b>Evaluación de los macrófagos en el microambiente tumoral</b> .....	27
<i>Obtención y procesamiento de las muestras</i> .....	27

Anticuerpos empleados .....	28
Evaluación del microambiente tumoral .....	29
<i>Análisis estadístico</i> .....	29
Estrategia experimental.....	30
<b>Resultados</b> .....	31
<i>Isotransplatación y desarrollo tumoral</i> .....	31
<i>Evaluación de los macrófagos totales en el microambiente tumoral</i> .....	32
<i>Evaluación de los perfiles M1 y M2 en el microinmunoambiente tumoral</i> .....	34
<i>Comparación de los macrófagos M1, M2 y no polarizados por región tumoral</i> .....	35
<b>Discusión</b> .....	39
<b>Conclusiones</b> .....	45
<b>Prospectivas</b> .....	46
<b>Referencias</b> .....	47

## **Lista de cuadros**

Cuadro 1. Proporción M2/M1 por región tumoral	<b>38</b>
Cuadro 2. Resumen de la comparación en las variables observadas en el estudio	<b>38</b>

## **Índice de figuras**

Figura 1. Proceso de inmunoección del cáncer	<b>16</b>
Figura 2. Procedimiento de colección tumoral y segmentación por regiones	<b>25</b>
Figura 3. Estrategia experimental	<b>31</b>
Figura 4. Implantación y crecimiento tumoral de células de cáncer de próstata TRAMP-C1 en ratones C57BL/6 de dos núcleos reproductores	<b>32</b>
Figura 5. Detección de células CD68+ dentro del microinmunoambiente tumoral	<b>33</b>
Figura 6. Cuantificación de macrófagos M1 CD68+ iNOS+ y M2 CD68+ CD206+ en secciones de tumor de cáncer de próstata murino.	<b>35</b>
Figura 7. Población de macrófagos M1, M2 y no polarizados en las diferentes regiones tumorales.	<b>37</b>

## Abreviaturas

ADT: terapia de bloqueo de andrógenos

ANOVA: análisis de la varianza

AR: receptor a andrógenos

ATM: cinasa serina/treonina o ataxia-telangiectasia mutada

BRCA1: gen de cáncer de mama 1

BRCA2: gen de cáncer de mama 2

CD206: grupo de diferenciación 206

CD220: grupo de diferenciación 220

CD68: grupo de diferenciación 68

CDK4: cinasa dependiente de ciclina 4

CHEK2: proteína cinasa serina/treonina CHK2

CXCL12: quimiocina 12 de motivo C-X-C

DAPI: diamidino-2-fenilindol

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNS: suero normal de burro

DPI: días postimplantación

DR5: receptor de muerte 5

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidermal

H2A.Z: Histona H2A.Z

HER-2: receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2

HIF1 $\alpha$ : sub unidad alfa del factor inducible por hipoxia

I/TLS TIME: microinmunoambiente tumoral con infiltrado similar a órgano linfoide terciario

I-E TIME: microinmunoambiente tumoral con infiltrado excluido

IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN $\gamma$ : interferón gamma

I-I TIME: microinmunoambiente tumoral con infiltrado inflamado

IL-1: interleucina-1

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

IL-13: interleucina-13

IL-15: interleucina-15

IL-18: interleucina-18

IL-2: interleucina-2

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

KRAS: proteína Kristen Rat Sarcoma Virus

MAT: microambiente tumoral

MICA/B: antígenos A y B relacionados al MHC clase 1

MUC1: mucina variante corta S1

MYC: gen de myelocytomatosis

NCOA1/2: receptor nuclear coactivador 1 y 2

NCOR1/2: receptor nuclear correpresor 1 y 2

NF- $\kappa$ B: factor nuclear kappa B

NOS2: óxido nítrico sintasa 2

P53: fosfoproteína P53

PBS: solución amortiguadora de fosfatos

PD-L1: ligando 1 de muerte programada

PI: postimplantación

PSA: antígeno sérico prostático

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

RAD51D: RAD51 parálogo D

RAE: transcrito temprano 1 del ácido retinóico

SEM: error estándar de la media

sMICA/B: antígenos A y B relacionados al MHC clase 1 solubles

SICUAE: Subcomité para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación

TAMs: macrófagos asociados a tumor

TGFβ: factor de crecimiento transformante beta

TIME: microinmunoambiente tumoral

TLRs: receptores tipo toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TRAMP-C1: tumor de adenocarcinoma transgénico de próstata murina

ULB: proteína de unión a UL16

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

## **Introducción**

### *Epidemiología del cáncer*

El cáncer es uno de los problemas de salud pública más relevantes que se afrontará en el presente siglo y una línea de investigación prioritaria en el mundo. En los últimos años se han hecho evidentes las alteraciones genético-moleculares en múltiples neoplasias, permitiendo ahora encontrar nuevas alternativas para el diagnóstico temprano, la predicción de la conducta biológica de ciertos tipos de cáncer y el tratamiento de algunos otros.

A nivel mundial, el cáncer es un problema prioritario, en el año 2002 se cuantificaron 6.7 millones de muertes (1), 7.6 millones en 2008 (1); 8.2 en 2012; 9.6 en 2018 (2) y 9.9 en 2020 (3). Lo anterior permite visibilizar un incremento en la tasa de mortalidad por esta enfermedad, se prevé que la incidencia de cáncer puede aumentar en un 49.7% y su mortalidad en un 62.5% en los siguientes 20 años (2, 3). El tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial es el de mama con una incidencia de 11.7% del total de casos, seguido por el de pulmón, con 11.4%, en tercer lugar, se encuentra el cáncer colorectal con 10% y en cuarto puesto el cáncer de próstata con 7.3% (2). En la población masculina a nivel mundial el cáncer de pulmón encabeza la lista de incidencia con un 14.3%, seguido por el de próstata con 14.1% y en tercer lugar el colorectal con 10.6%. Mientras que en la población femenina

el cáncer de mama se encuentra en el primer puesto con 24.5% de los casos, seguido por el colorectal con 9.4% y el pulmonar con 8,4%(2).

### ***Cáncer en México***

La información oficial más reciente data del año 2012, en los que se reporta una incidencia de 161,164 casos nuevos: 65, 540 en hombres y 82,445 en mujeres, una mortalidad de 78,719, de los cuales 38,666 corresponden a defunciones de hombres y 40,053 a mujeres. Se estima que el 13.4% de los habitantes tendrán cáncer antes de los 75 años (2, 4, 5).

Los tres tipos de cáncer con mayor incidencia en hombres son el de próstata con 14,016 casos, pulmón con 5,471 y el colorectal con 4,656. Y los que contribuyen mayormente a la mortalidad por cáncer son el de próstata con 6 367 defunciones, el de pulmón con 4,945 y el de estómago con 3,368.

En las mujeres mexicanas, durante el 2012 los tres tipos de cáncer con mayor incidencia fueron el de mama con 20,444 casos, el cérvico-uterino con 13,960 y el colorectal con 3,995. Los de mayor mortalidad son el de mama con 5,680 defunciones, el cérvico-uterino con 4,769 y el de hígado con 3,149 defunciones (1).

Es importante señalar que México aparece a nivel mundial como uno de los países con menor incidencia-mortalidad de cáncer. Sin embargo, no se cuenta con cifras oficiales continuas dado que los sistemas de información nacionales referentes a esta patología dejaron de operar en el 2006, con lo que fue el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, un esfuerzo de que tenía la intención de evolucionar hacia un registro con base poblacional mediante el cual fuera posible conocer la magnitud real de la enfermedad; compromiso aún pendiente(6). En el 2012 se generó información con respecto a la presencia de la enfermedad a través de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición; sin embargo, no se trata de un sistema de monitoreo.

### *Fisiopatología del cáncer*

La palabra cáncer se utiliza para denominar a las neoplasias malignas. Esta entidad patológica, involucra diferentes alteraciones heredables a nivel celular como: mutaciones genéticas y cambios epigenéticos en protooncogenes, genes supresores de tumor, genes de reparación celular y microRNAs, que resultan en la destrucción de la sociedad celular a partir de la generación de características ventajosas, lo que le dan la capacidad de ser independiente, evadir la respuesta inmune y hacer metástasis (7). Estos eventos son causados por exposición a mutágenos endógenos y ambientales físicos, químicos y biológicos(8)

Recientemente se han investigado a mayor profundidad las modificaciones que adquieren las células alteradas para el desarrollo de las neoplasias, a partir de ello se han descrito diez capacidades adquiridas que permiten que suceda el cáncer: el mantenimiento de la señal proliferativa, la evasión de los factores supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la activación de la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la activación de la invasión y metástasis, la activación de plasticidad fenotípica, la generación de células senescentes, así como la reprogramación en el metabolismo energético y la evasión de la destrucción por el sistema inmune (8, 9). Para el establecimiento de estas características la célula neoplásica genera una compleja red de comunicación, señalización y síntesis de moléculas con las células presentes en su entorno tisular.

Existen incontables factores físicos, químicos y biológicos que se han definido como inductores o desencadenantes de la transformación neoplásica, mientras que para la generación de tumores malignos se han identificado y propuesto diferentes características habilitadoras o capacitadoras a nivel celular y molecular. Estas son: la inestabilidad genómica y mutación; la inflamación promotora de tumor; la reprogramación epigenética no mutacional y los microbiomas polimórficos (8, 9).

### ***Cáncer de próstata***

El cáncer de próstata es el cuarto más diagnosticado en el mundo y el quinto lugar como causa de muerte por cáncer entre los hombres (6.8%, 375 304) en 2020 (3). En los últimos 5 años la incidencia de casos ha aumentado significativamente en países desarrollados. En México, ocupa el primer lugar en incidencia (29.3% de los casos) y mortalidad (10.5% de los decesos) en los hombres (2, 3, 10). De 1990 al 2008 se observó una tendencia a la alta con tasas que van de 14.6 a 19.5 por 100,000 habitantes, lo que representó un incremento del 33.5% (1).

Esta entidad patológica es una neoplasia proveniente de las distintas células epiteliales de la próstata y que derivan en adenocarcinoma, carcinoma escamoso o carcinoma neuroendocrino, dependiendo del origen celular. En una próstata sana, el crecimiento y la supervivencia celular depende del estímulo constante de andrógenos, por ello, una característica relevante en las células transformadas es la respuesta a esta hormona. Uno de los primeros tratamientos es la terapia de bloqueo de andrógenos (ADT por sus siglas en inglés) para disminuir la señal proliferativa. Sin embargo, la eliminación del estímulo androgénico no es suficiente para detener el desarrollo tumoral cuando se trata de cáncer de próstata resistente a la castración o cáncer próstata metastático (11). En ocasiones, las variantes de cáncer que no responden al ADT provienen de carcinomas prostáticos que en un inicio fueron receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) positivo (AR+) o AR-low. y que debido al proceso de proliferación neoplásica se genera una marcada heterogeneidad con múltiples linajes celulares genéticamente distintos (12-14). Este tipo de cáncer genera metástasis principalmente a los linfonodos cercanos, el hígado, los pulmones y a huesos, se ha identificado a la señal de CXCL12 como una quimiocina central para en la ecotaxia de las células en transición epitelial mesenquimal (15).

Se han descrito más de 30 genes cuyas alteraciones están relacionadas con la generación del cáncer de próstata (14). Algunas de las más relevantes son las de los genes *BRCA1* y *2*, *ATM*, *CHEK2*, *RAD51D*, que codifican para proteínas de reparación del DNA, (16-18); el receptor de andrógenos a nivel de su activador *NCOA1/2* y de su represor *NCOR1/2*, inductores de la

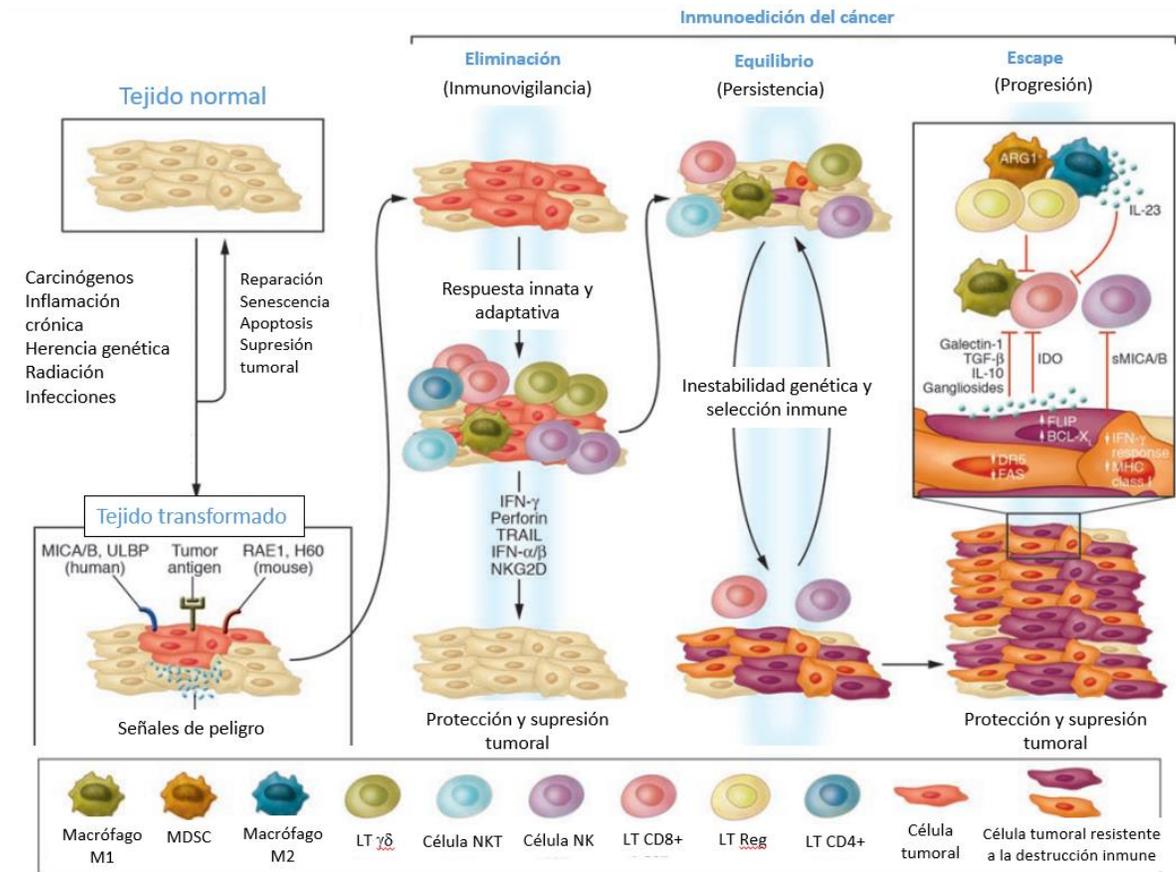
señal proliferativa y la diferenciación (19); el gen *MYC*, relacionado con la transformación hacia adenocarcinoma (20); *PTEN*, participante en la regulación de la sobrevivencia celular, la proliferación, y el metabolismo energético (21) y el de la ciclina D1b, relacionado con la señal proliferativa continua (22); así mismo, se han encontrado cambios epigenéticos como la modificación de la histona H2A.Z (23).

### ***Respuesta inmune al cáncer***

Durante la mayor parte del siglo XX se pensó que los procesos neoplásicos eran únicamente el resultado de alteraciones genéticas en las células de origen; sin embargo, en la últimas tres décadas se ha construido una estructura de conocimientos para la comprensión de los mecanismos que regulan el desarrollo, la progresión y la metástasis de los tumores. En el microambiente tumoral se da una interacción entre células neoplásicas, células del estroma tisular y células del sistema inmune, estas últimas significan posiblemente el elemento más crítico, ya que en múltiples estudios se señala que llevan a cabo una respuesta anómala relacionada con la aportación de elementos que promueven el crecimiento tumoral, tales como citocinas y otras moléculas proinflamatorias, factores de crecimiento y enzimas que remodelan la matriz extracelular (24-27). De manera que su presencia y actividad se vincula con la progresión del tumor, la angiogénesis, la señal proliferativa, la inmortalidad replicativa, la invasión y la metástasis (7, 9). Sin embargo, también se ha demostrado que una respuesta inmune exitosa de inmunovigilancia, puede inducir la remisión de los procesos neoplásicos. En cualquier escenario existe la presencia de un diverso infiltrado de células de la respuesta inmune del que forman parte todos los leucocitos y cuya relevancia depende del tipo de cáncer (7).

En la relación sistema inmune-cáncer se ha descrito un proceso denominado inmunoección que consiste en tres fases: la primera es la eliminación, en ésta, a través del éxito en sus mecanismos de vigilancia, el sistema inmune es capaz de eliminar las células neoplásicas. De no eliminarse, se da paso a la segunda fase que es la de equilibrio, en la que las células cancerosas adquieren capacidades producto de la presión de selección ejercida por la

respuesta inmune, que le permiten evadir parcialmente el sistema inmune e incluso emplear mecanismos de éste para evitar su eliminación, lo que da paso a la tercera etapa: la de escape, en la que las variantes de las células tumorales subordinan a los mecanismos inmunológicos impidiendo su eliminación por parte de estos, el último escenario es el que lleva a la manifestación clínica de las neoplasias y a la metástasis (28, 29) Figura 1.



**Figura 1.** Tomada y modificada de: Swann, *et al. the journal of clinical investigation*, 2007(29). **Proceso de inmunoección del cáncer.** Las células de los tejidos sanos, influidas por estímulos carcinogénicos e incapaces de llevar a cabo mecanismos de reparación o control de la proliferación dan origen a células transformadas. Frente a ello, la respuesta inmune lleva a cabo la fase e eliminación mediante la inmunovigilancia con la posibilidad de eliminación en caso de presentar mecanismos eficaces como la acción de macrófagos M1, células NK, células NKT, linfocitos T  $\gamma\delta$ , linfocitos TCD4+ y TCD8+. En caso de que las células neoplásicas no sean eliminadas pasarán a un estado de equilibrio con los mecanismos de la respuesta inmune, durante esta fase, la presión de selección ejercida por los mecanismos inmunes, en compañía de la inestabilidad genómica de las células tumorales traerán consigo la generación de células tumorales con la capacidad de modular la respuesta y escapar a la eliminación. DR5, receptor de muerte 5; IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; MICA/B,

antígenos A y B relacionados al MHC clase 1; RAE, transcrito temprano 1 del ácido retinóico; sMICA/B, MICA/B solubles; ULB, proteína de unión a UL16.

La respuesta inmune al cáncer se estructura con la participación tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. En el primer grupo tenemos los mecanismos moleculares como los interferones tipo 1 y tipo 3 (30, 31), péptidos catiónicos (32) y citocinas como el TNF, IL-2, IL-15, IL-21 e IL-12 (31, 33, 34). Con respecto a las células, encontramos la presencia de células NK (35, 36), células dendríticas (37, 38), células cebadas (39), macrófagos (40, 41) y neutrófilos (42). El ciclo básico que describe la actividad exitosa por parte de la respuesta inmune adaptativa se centra en la generación de neo antígenos por parte de las células tumorales, tales como productos proteicos anómalos derivados de P53 (43), KRAS (44),  $\beta$  catenina (45) y CDK4 (46) entre otros, o bien la sobreexpresión de moléculas como MUC1 (47), HER-2 (48), alfafetoproteína (49), gonadotropina coriónica humana (50) y el antígeno prostático (46). Los neoantígenos pueden ser procesados por células presentadoras de antígenos como las células dendríticas y llevados a los órganos linfoides secundarios o terciarios para la inducción de la respuesta por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que darán origen a poblaciones efectoras capaces de infiltrarse en el microinmunoambiente tumoral para la eliminación de las células tumorales (7, 51, 52).

Todas estas células inicialmente juegan un papel en la respuesta anti-tumoral, pero durante la fase de escape, se asocian a condiciones de inmunosupresión establecidas por las células tumorales en asociación con células estromales como los fibroblastos o adipocitos asociados a tumor que las dirigen hacia perfiles que favorecen la progresión tumoral. El establecimiento del tumor y su proliferación celular descontrolada favorece la aparición de condiciones de hipoxia, lo que induce la continua liberación de factores de crecimiento promotores de angiogénesis como el VEGF y EGF por parte de los macrófagos y fibroblastos asociados al tumor (8, 53, 54). Los macrófagos asociados al tumor también juegan un papel central en la liberación de metaloproteinas como la MMP9 que remodela la matriz extracelular y facilita el desplazamiento de las células tumorales en estado de transición epitelial mesenquimal quienes mediante la sub expresión de la E-caderina y sobreexpresión de N-caderina (55, 56)

pueden invadir tejidos vecinos o realizar la intravasación como inicio de su traslado vía sanguínea o linfática a órganos distantes con lo que se configura la metástasis(8, 57). El órganotropismo de las células tumorales se ha explicado en primera instancia las mediante las interacciones mecánico-anatómicas que ocurren cuando las células o conglomerados celulares detienen su tránsito en órganos con microvascularización que favorezca la extravasación hacia el parénquima mediante factores como uniones ligando-receptor y quimiocinas (58), también se han descrito programas genéticos en las células tumorales que les confieren especificidad preponderante de migración hacia órganos determinados, lo anterior mediado por el envío de señales como citocinas y exosomas desde las células presentes en el microambiente tumoral del tumor primario hacia células endoteliales, inmunes y estromales del órgano receptor, lo que prepara y facilita la extravasación de las células tumorogénicas en el órgano blanco (59-62). Es importante señalar que la metástasis es la principal causa de muerte en pacientes oncológicos (62).

### ***Microambiente tumoral inmunitario***

Se ha demostrado que el establecimiento y la progresión del proceso neoplásico depende de la interacción de las células tumorales con otras no transformadas pero con actividad alterada, como las mesenquimales (63), vasculares (64), adipocitos (63, 65, 66), fibroblastos (54, 67) y, de manera muy importante, las células de la respuesta inmune innata y de la adaptativa (7, 24, 68), que en conjunto, juegan un papel central en el control o la progresión del proceso neoplásico (7, 24, 68-70). A este conjunto de relaciones celulares heterotípicas que conforman la neoplasia se le ha denominado el microambiente tumoral inmunitario (TIME por sus siglas en inglés) (24, 71, 72). Se ha descrito que la composición y organización celular dentro del TIME, está relacionada con la eficacia de la respuesta inmunológica antitumoral así como con el éxito de terapias inmunomoduladoras (7, 24). En los tumores malignos se configura frecuentemente un compartimento inmunosupresor, en el que contribuyen perfiles reguladores de leucocitos como linfocitos T (73) y B (74), linfocitos innatos (75), macrófagos (76), neutrófilos (77), células dendríticas (78) y células NK (79). Los esfuerzos de muchos

de grupos de investigación tienen por objetivo explicar la participación de estas células y contribuir en el diseño de inmunoterapias que contrarresten las funciones protumorales e inmunosupresoras de estas poblaciones.

### ***Macrófagos***

Los macrófagos son células de origen mieloide distribuidas en casi todos los tejidos del organismo, éstos poseen capacidad fagocítica, son células presentadoras de antígenos e importantes productores de citocinas. Se han descrito una gran variedad de subtipos según el sitio donde se encuentren y la función que desempeñen (80). Son considerados como las células del sistema inmune más plásticas del organismo, contribuyen en la organogénesis, la homeostasis de los tejidos y regulan el equilibrio entre las respuestas pro y antiinflamatorias. Para llevar a cabo lo anterior, los macrófagos son ampliamente heterogéneos y son capaces de adoptar diferentes estados de activación como respuesta a las circunstancias del microambiente en el que se encuentren (26).

### ***Macrófagos en los procesos neoplásicos***

La evidencia acumulada demuestra que los macrófagos participan en todas las fases del proceso del cáncer. Estas células son elementos fundamentales en la carcinogénesis asociada a la inflamación, participan en la inmunovigilancia de los tumores y están relacionados con el fenómeno de la invasión y metástasis. Dentro de los tumores se les ha nombrado macrófagos asociados a tumores (TAMs por sus siglas en inglés). Debido a la relevancia que tienen en el mantenimiento de los procesos neoplásicos se han vuelto objetivo de nuevas terapias en la búsqueda de modificar el micro ambiente tumoral y con ello detener el desarrollo tumoral (26).

Los macrófagos tienen una participación clave en la biología del desarrollo de los tumores, actúan en la inmunovigilancia de las neoplasias a través de su actividad fagocítica y oxidativa, aunque también lo pueden hacer en su progresión, pues son proveedores de señales de crecimiento celular, remodelación de la matriz extracelular, angiogénesis, intravasación,

invasión y metástasis (25, 57, 81-83). En múltiples tipos de cáncer las poblaciones de macrófagos igualan o superan a la de las células neoplásicas (25) y su actividad está inducida por la presencia de citocinas, alarminas, metabolitos y hormonas, entre otras moléculas de señalización provenientes de células neoplásicas, células del estroma tumoral y otras células del sistema inmune. Dependiendo de la combinación de señales los macrófagos son conducidos a múltiples fases y fenotipos, se han caracterizado dos poblaciones principales: los clásicos inflamatorios M1, que se diferencian al ser estimulados a través de receptores tipo toll (TLRs) y producen citocinas como IL-1, IL6, TNF, IL-12, así como altas cantidades de óxido nítrico a través de la enzima óxido nítrico sintasa 2 (NOS2 o iNOS) (80, 84), y los macrófagos M2 que se diferencian al ser estimulados por IL-4 e IL-13 y producen IL-10 y factor beta de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ), éstos se caracterizan por la expresión en su superficie del receptor CD220, CD206 así como por la presencia de la enzima arginasa de manera intracelular (76). Las poblaciones de macrófagos generan un microambiente dinámico que puede ser de utilidad para algunos tipos de cáncer en diferentes etapas del desarrollo de la patología. Al inicio de la proliferación celular en el cáncer, las citocinas del M1 favorecen la vascularización y el crecimiento de los tumores, al momento de hacer metástasis se requiere de una supresión inmune, por lo que el fenotipo M2 facilita la salida de las células tumorales (80, 83, 85).

### ***Macrófagos en el cáncer de próstata***

Las células mieloides juegan un papel central en el desarrollo de cáncer de próstata, de estas, los macrófagos han demostrado ser importantes participantes de la progresión tumoral, metástasis y resistencia a la inmunoterapia. En los seres humanos se sabe que la presencia de macrófagos en microambiente tumoral (MAT) se correlaciona con mayores títulos de antígeno sérico prostático (PSA), mayor valor en la escala de Gleason, Mayor riesgo de recurrencia bioquímica, la promoción de la metástasis a través de la ruta CCL22-CCR4 y un pronóstico reservado (86-89). Los macrófagos fenotipo M1 son productores de IL-6, la cual se relaciona con un aumento en la expresión del receptor de andrógenos AR y la resistencia a la castración inducida por la sobreexpresión del BMP6 en las células cancerosas(90), por lo que se proyectan como blancos terapéuticos para inmunoterapia dirigida a evitar la

resistencia a la terapia de bloqueo de andrógenos(91). La prevaecía de M2 en el MAT se ha relacionado con una mayor extensión tumoral y un peor pronóstico (92).

### ***El ratón como modelo experimental***

El ratón (*mus musculus*) posee sistemas metabólicos e inmunológicos similares a los del ser humano (93), por ello y aunado a su facilidad de manejo, crianza, periodo de gestación y costo, es la especie animal mamífera en la que se ha desarrollado más ampliamente la investigación biomédica, siendo empleados como modelos para el estudio de innumerables sistemas y mecanismos funcionales de los animales, así como para la descripción de la biología de muchas enfermedades.

Las cruza endogámicas en los ratones se han realizado desde hace más de 60 años y su objetivo inicial fue el de generar animales con homogeneidad y estabilidad genética suficiente para reproducir fenómenos biológicos bajo las mismas condiciones experimentales. De esta manera, las empresas productoras de animales de experimentación han provisto de animales a grupos de investigación alrededor de todo el mundo; sin embargo, a pesar de contar (en muchos de los casos) con un origen común, las cepas murinas han tenido mutaciones traducidas en cambios fenotípicos observadas entre las casa productoras, a las que se les ha denominado subcepas (94).

### ***El ratón como modelo de estudio del cáncer***

En el estudio del cáncer, se han establecido modelos murinos que permiten describir el microinmunoambiente tumoral y su relación con otros fenómenos como la metástasis. Entre estos se encuentran los inducidos medioambientalmente a través de radiación, químicos, infecciones virales y bacterianas (70, 95-98); los de animales transgénicos capaces de desarrollar distintos tipos de neoplasias; los de xenotransplatación en el que se emplean ratones inmunodeficientes capaces de aceptar células tumorales humanas y desarrollar la neoplasia correspondiente, este último tiene el inconveniente de que al utilizar animales inmunodeficientes, carecen de la participación de los elementos de la respuesta inmune adaptativa en el TIME. Un modelo adecuado para el estudio del TIME es el de

isotransplatación, que consiste en la implantación de células tumorales de origen murino cuyo haplotipo sea afín al de la cepa de ratones receptores (99, 100).

### ***Modelo de isotransplatación***

El modelo de isotransplatación permite evaluar el desarrollo tumoral, así como los efectos de tratamientos antineoplásicos en animales inmunocompetentes, a estos se les implantan células que darán origen a un proceso carcinogénico. Para llevar a cabo el procedimiento, se implantan células transformadas con capacidad carcinogénica o bien provenientes de algún tumor, en un animal que posea el mismo haplotipo que las células a implantar. La similitud en el haplotipo evita que las células sean rechazadas (y con ello el tumor) por el individuo receptor. De manera habitual se implanta un mínimo de  $1 \times 10^6$  células y las vías empleadas son la subcutánea, la intraperitoneal y la intracardiaca. La aparición del proceso neoplásico depende de la vía y el tipo celular. Se reportan tumores subcutáneos perceptibles al tacto a los 3 días postimplantación (99, 100). Cuando las células se implantan en el órgano o tejido con el que comparten origen se le conoce como isotransplatación ortotópica, cuando esta se realiza en un tejido distinto se le denomina isotransplatación heterotópica. En el primer escenario el modelo posee similitudes con eventos neoplásicos de tumor primario, mientras que, en el segundo, puede pensarse como eventos semejantes a metástasis (101).

### ***La cepa C57BL/6 en el estudio de la inmunología y el cáncer***

La cepa C57BL/6 de ratones de experimentación, conocida también como BL6 o B6 es la más empleada a nivel mundial. Fue la cepa usada en el proyecto de secuenciación del genoma de ratón por su caracterización fenotípica y su trasfondo genético (102, 103). Se trata también de la cepa más utilizada en los modelos de estudio del sistema inmune y de cáncer, uso que se le dio desde las etapas tempranas del desarrollo de la cepa (104). En el campo de la inmunología, a partir del uso de los ratones B6 se han hecho aportaciones en los tópicos de inflamación (105-107), estudios hematológicos (108, 109), descripción de vías y rutas inmunometabólicas (110), respuesta inmune ante la infección (111-113) y oncoinmunología (104), entre otras.

La aportación de las cepas C57BL/6 a los modelos para el entendimiento y la terapéutica del cáncer han sido medulares y en tiempos recientes destacan modelos en cáncer de mama (114, 115), de colon y recto (116, 117), pulmón (118), hígado (119, 120), estómago (121, 122), de próstata (123, 124) entre muchos otros. A través de estos modelos, el estudio del cáncer se ha podido cruzar con otras áreas del conocimiento biomédico y nos ofrece panoramas cada vez más amplios de interacción entre la oncología y la oncoinmunología, con aspectos neurológicos, hormonales, genéticos, del microbioma, entre otras líneas de investigación. Estas interacciones pueden significar la construcción de alternativas terapéuticas que consideren múltiples caras de un mismo desafío.

### ***Diversidad en los ratones C57BL/6***

La cepa C57BL/6 es conocida por la posibilidad de llevar a cabo mutaciones espontáneas o inducidas. Hasta el 2021 se documentaron más de 2,939 ratones C57BL/6 genéticamente modificados, de los cuales el 21% provino del cruzamiento entre subcepas o de ratones de subcepa desconocida (125).

En múltiples centros de investigación alrededor del mundo existe desconocimiento con respecto de las subcepas que emplean, incluso en animales genéticamente modificados en los que el control genético debería de ser más riguroso. Se ha señalado que de los ratones de experimentación B6 empleados en países desarrollados como Alemania y Austria, entre el 26 y el 70% provienen de la mezcla de subcepas o se desconoce cuáles fueron empleadas (126) y un 39% de los investigadores de Finlandia no lo considera de importancia (127). La mayoría de los artículos publicados en revistas indizadas en las que se utilizaron ratones transgénicos, no refieren o validan el fondo genético de las subcepas empleadas. Aunque las diferencias fenotípicas entre las subcepas en muchas ocasiones pasan desapercibidas, consorcios internacionales y grupos de investigación en genómica han señalado la relevancia de tener control de ello por su potencial alteración en los resultados experimentales (128).

Se han reportado diferencias genéticas entre las subcepas de BL6 que derivan cambios en la conducta (129, 130), rutas metabólicas en múltiples sistemas (131-135), sensibilidad a compuestos (136), anomalías inmunológicas (130, 137) susceptibilidad a enfermedades (132, 138, 139), cambio en apariencia, entre otras variables (140). Se ha demostrado que existen diferencias entre ratones de las subcepas J, N y Ha de B6 en el modelo de oncogénesis de inducción de cáncer colorectal(141). También se ha demostrado una diferencia entre las subcepas N y J con respecto de la resistencia a la implantación heterotópica de células de adenocarcinoma mamario, en la que se encontró que la subcepa N posee una resistencia mayor al proceso neoplásico relacionado con las poblaciones de macrófagos M1 y una mayor síntesis de óxido nítrico(142). Por otra parte, existe evidencia de diferencias entre las subcepas Hsd y J en mecanismos de la respuesta inmune que pueden alterar la calidad de la respuesta antitumoral, como es el caso de la mutación en el gen *Dock2* para la cepa Hsd que afecta la citocinesis, altera las poblaciones de linfocitos T CD8+, la síntesis de interferones tipo 1 y la respuesta humoral(137, 143).

Para minimizar la deriva génica compañías productoras han buscado implementar el programa de estabilidad genética, aunque frecuentemente no se trata de una práctica común en las instalaciones animales de las instituciones de investigación. Para asegurar la reproducibilidad experimental y evitar resultados parciales, es importante que los investigadores identifiquen las diferencias fenotípicas derivadas del uso de subcepas desconocidas.

## **Justificación**

El estudio del microinmunoambiente tumoral requiere de modelos estables de experimentación animal, conocer el efecto del núcleo de reproducción murina sobre la implantación, progresión y las poblaciones de macrófagos en el microinmunoambiente tumoral, puede aportar evidencia de alteraciones derivadas de fallas en el control genético de las cepas murinas y demostrar la importancia de su seguimiento.

## **Hipótesis**

Dadas las diferencias observadas en la composición del sistema inmune entre subcepas de C57BL6. se espera que el desarrollo del cáncer de próstata será diferente entre los núcleos de producción de esta cepa, asociado a cambios en las poblaciones de macrófagos presentes en el microambiente tumoral.

## **Objetivo general**

Evaluar la diferencia en el desarrollo tumoral y las poblaciones de macrófagos presentes microinmunoambiente tumoral entre dos núcleos de producción de ratones C57BL/6, a través del desarrollo de un modelo de isotransplatación de células cancerosas de próstata y el estudio por inmunofluorescencia de las poblaciones macrofágicas, para conocer el efecto de variabilidad de las líneas murinas sobre un modelo de estudio de cáncer.

## **Objetivos particulares**

1. Implementar y evaluar el desarrollo de un modelo de isotransplatación tumoral en ratones C57BL/6 de dos núcleos de producción.
2. Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia en cortes histológicos de los tumores para determinar la cantidad, los perfiles y la localización de los macrófagos M1 y M2.

## **Material y métodos**

## **Implementación del modelo de isotransplatación tumoral**

### *Animales*

Se utilizaron 28 ratones machos C57BL/6 de 6 a 8 semanas provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (IIB, UNAM); 6 de ellos pertenecían al núcleo de producción A (BL/6nA) y 22 al núcleo B (BL/6nB). Fueron alojados individualmente en jaulas de polisulfonato con las siguientes dimensiones: 27 cm de largo x 16 cm de ancho x 12 cm de alto. Recibieron alimento y agua *ad libitum*. El manejo se realizó posterior a un periodo de adaptación de 3 días. El procedimiento experimental fue aprobado por el Subcomité para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, protocolo número SICUAE DC-2019/2-4.

### *Cultivo celular*

Se empleó la línea celular TRAMP-C1 (ATCC® CRL 2730) de adenocarcinoma epitelial de próstata murino, estas se cultivaron en DMEM (Gibbco®) con 4 mM de *L*-glutamina ajustado a 1.5 g/L de bicarbonato de sodio y 4.5 g/L de glucosa, suplementado con 0.005 mg/ml de insulina bovina (Sigma-Aldrich), 10 nM de dehidroisoandosterona (Sigma-Aldrich), 5% de suero fetal bovino y 5% de Nu-serum IV Corning®, fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se cultivaron en cajas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> y al encontrarse a una confluencia de 90% se despegaron con 3 ml de tripsina al 0.5% con 0.5 mM de EDTA. Posteriormente se centrifugaron a 1500 revoluciones y lavaron en dos ocasiones con PBS a pH de 7.4 para ser colocadas en un tubo para centrifuga de 50 ml. La cuantificación se hizo con una cámara de Neubauer a 40 µl del stock celular con 40 µl de una solución de azul de tripano al 0.4% (Gibbco®).

### *Inducción tumoral*

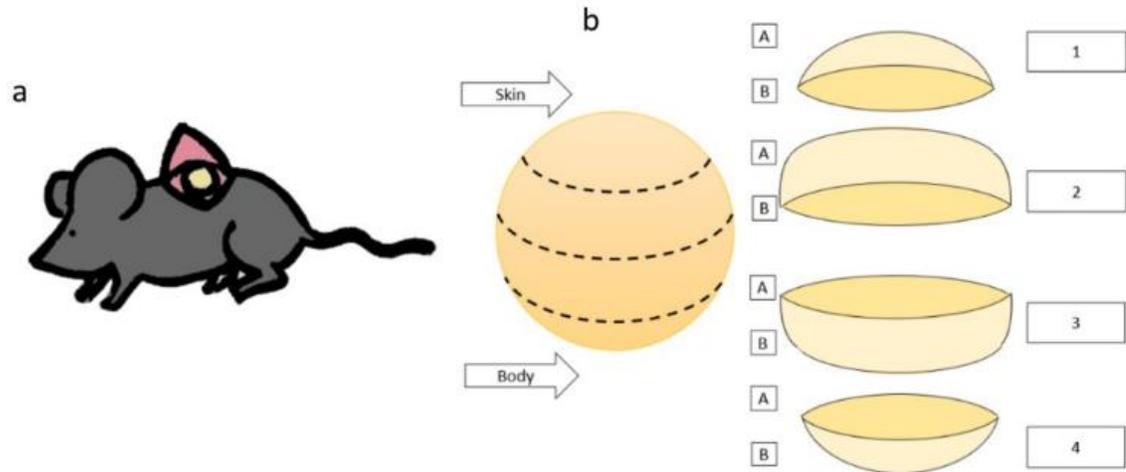
Se implantaron  $3 \times 10^6$  células TRAMP-C1 en un volumen de 100  $\mu$ l de solución isotónica de NaCl. Para lo anterior se llevó a cabo la sujeción del animal colocándolo en decúbito ventral y se administró el inóculo por vía subcutánea en la piel laxa de la región interescapular, el día de la inoculación de las células fue considerado el día cero del experimento. Se realizó la medición diaria con un vernier y se calculó el volumen tumoral conforme a la fórmula  $\frac{[(\text{largo en mm}) \times (\text{ancho en mm})^2 \times \pi]}{6}$  (144). Se practicó la eutanasia de acuerdo a los criterios de bienestar animal, la determinación del punto final se realizó conforme a la presencia de al menos uno de los siguientes eventos: obtención de un diámetro tumoral de 9 a 13 mm de diámetro promedio, pérdida del 20% del peso corporal, hipotermia, debilidad o ataxia, conducta espontánea o falta de respuesta a los estímulos (145, 146).

### **Evaluación de los macrófagos en el microambiente tumoral**

#### *Obtención y procesamiento de las muestras*

Previa anestesia con la mezcla ketamina (100mg/kg) y xilacina (5mg/kg), el animal fue perfundido con solución salina isotónica de NaCl con paraformaldehído al 4% vía intracardiaca para la fijación completa de los tejidos y la obtención de las masas tumorales. Los tumores fueron deshidratados siendo colocados de manera progresiva en tres soluciones de sacarosa (10%, 20% y 30%) 10 min en cada una. Una vez deshidratados fueron cortados en 4 regiones denominadas 1, 2, 3 y 4 siendo 1 la región tumoral en contacto con la piel y 4 la de contacto con el cuerpo del ratón, de cada segmento se obtuvieron cortes de las dos caras disponibles, porciones A y B (Figura 2). Los cortes tumorales fueron colocados en placas de 24 pozos incluidos de manera individual en compuesto OCT Tissue Plus<sup>®</sup> para su criopreservación a  $-75^{\circ}\text{C}$ , a partir de éstos se realizaron cortes de 10  $\mu$ m para fijarse en laminillas electrocargadas Superfrost<sup>™</sup> slides<sup>®</sup>. Cada laminilla se configuró con las dos

caras de cada una de las regiones del tumor, las laminillas con los tejidos se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta el momento de realizar las tinciones de inmunofluorescencia.



**Figura 2. Procedimiento de colección tumoral y segmentación por regiones.** a. Representación del sitio de implantación tumoral subcutánea a nivel interescapular. b. Esquema de segmentación de las regiones tumorales para la obtención de cortes.

#### *Anticuerpos empleados*

Se estandarizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de poblaciones intratumorales de macrófagos. Para la determinación de macrófagos totales se emplearon los anticuerpos Rat anti-mouse CD68 (NBP2-33337 Novusbio<sup>®</sup>) y Donkey anti-rat IgG antibody Alexa Fluor 488<sup>®</sup> (Jackson ImmunoResearch), para la determinación de la subpoblación M1 se adicionaron los anticuerpos Rabbit anti-mouse iNOS antibody (NB300-605 Novusbio<sup>®</sup>) y el anticuerpo Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647<sup>®</sup> antibody (Jackson ImmunoResearch<sup>®</sup>). Para la subpoblación M2 se utilizaron los anticuerpos goat anti-mouse antibody CD206 (AF2535 Novusbio<sup>®</sup>) seguido por el anticuerpo donkey anti-Goat IgG Cy3 antibody (Jackson ImmunoResearch<sup>®</sup>). Por lo que las poblaciones del perfil M1 fueron CD68+iNOS+CD206-, las del perfil M2 CD68+iNOS-CD206+ y los macrófagos no polarizados CD68+iNOS-CD206-.

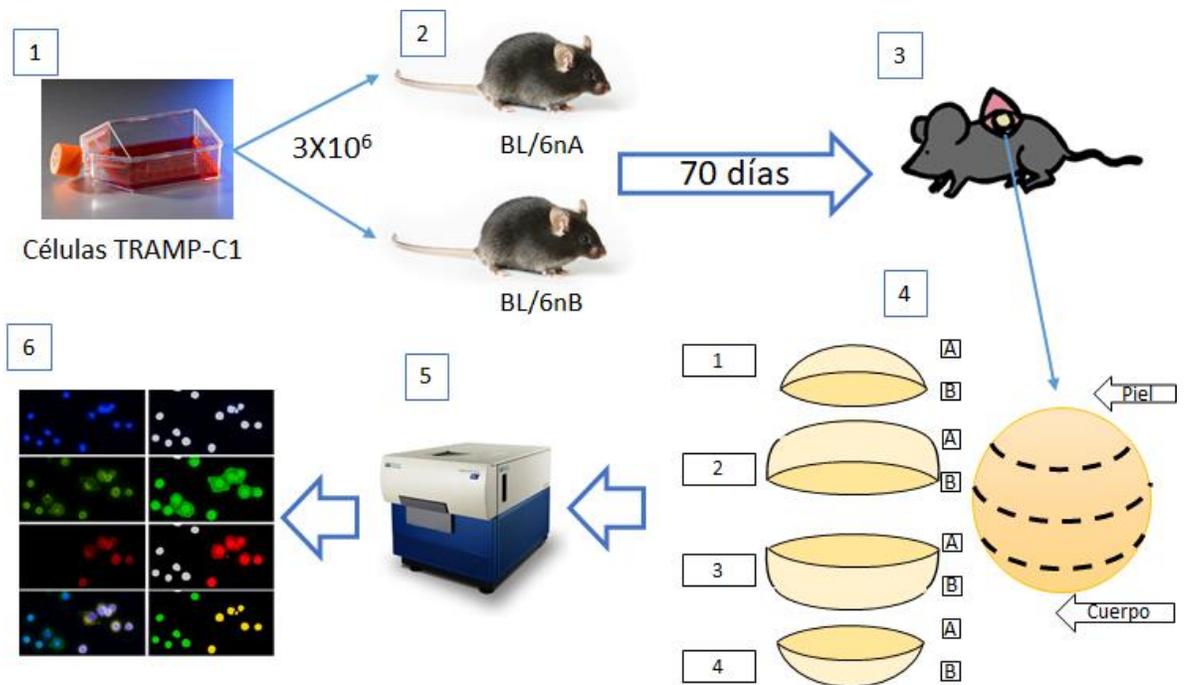
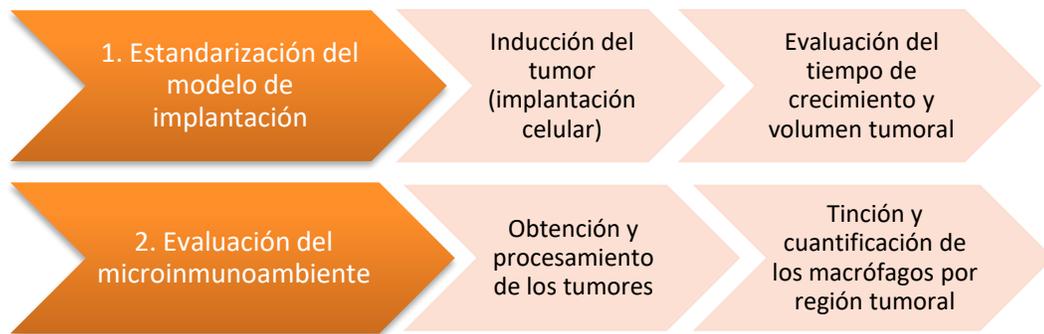
### *Evaluación del microambiente tumoral*

Para la inmunofluorescencia, las laminillas con los cortes tumorales se colocaron a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se rehidrataron con 100 µl de PBS 1X durante 10 min, al término se incubaron con 100µl de la solución de bloqueo Immunodetector protein blocker/antibody diluent (BIO SB<sup>®</sup>) con 5% de Donkey Normal Serum (DNS) (Jackson ImmunoResearch<sup>®</sup>) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con la solución Immunodna wash 1X (BIO SB<sup>®</sup>) y se incubaron con 100 µl del anticuerpo primario diluido la solución de incubación Immunodetector protein blocker/antibody diluent (BIO SB<sup>®</sup>) adicionada con 1% de DNS y 0.3% de tritón X-100 (Sigma-Aldrich) durante 18-24 horas a 4 °C. Después se realizaron tres lavados con la solución de lavado Immunodna wash 1X (BIO SB<sup>®</sup>) y se añadió el anticuerpo secundario en la solución de incubación previamente señalada y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Al final de este periodo se realizaron tres lavados con la solución Immunodna wash 1X (BIO SB<sup>®</sup>) y se añadieron 80 µl de una solución a una concentración de 1 µg/ml de diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) en PBS 1X y se incubó durante 15 minutos en oscuridad, después de tres lavados con PBS 1X, se agregó una gota de DAKO Fluorescence Mounting Medium (Agilent<sup>®</sup>) y se cubrió con un cubreobjetos. Los controles negativos recibieron todo el procesamiento y los amortiguadores en ausencia del anticuerpo primario y como testigo de detección de macrófagos se integró un corte histológico de bazo. Las laminillas se leyeron en el microscopio Molecular Device<sup>®</sup> Imageexpress<sup>®</sup>. Se obtuvieron las lecturas de 12 a 16 campos de cada sección de tejido y se procesaron las imágenes con el programa Metaxpress<sup>®</sup> para la cuantificación de las poblaciones de macrófagos.

### *Análisis estadístico*

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico IBM SPSS Statistics® utilizando la prueba ANOVA y comparación de medias de Tukey como prueba paramétrica y la prueba de Wilcoxon para variables no paramétricas. Para la implantación del tumor se realizó la prueba de Chi-cuadrada en cuadros de contingencia. Los gráficos se realizaron con el software Graph pad Prism 7®.

*Estrategia experimental*

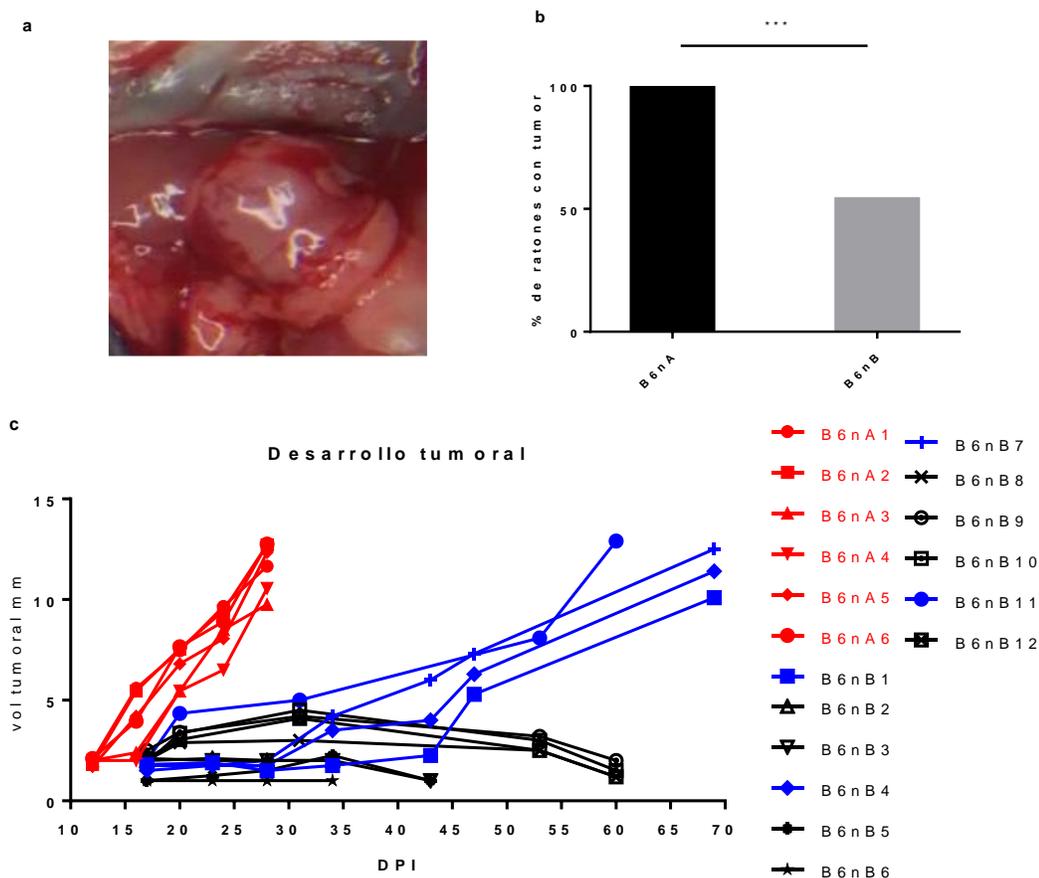


**Figura 3. Estrategia experimental.** 1. Cultivo de células de adenocarcinoma prostático TRAMP-C1. 2. Implantación de  $3 \times 10^6$  células por vía subcutánea en la región interescapular. 3. Periodo de crecimiento tumoral. 4. Obtención y segmentación de los tumores para la determinación de poblaciones de macrófagos y sus subtipos por inmunofluorescencia en cada región tumoral. 5. Cuantificación celular por inmunofluorescencia con el equipo automático Imagexpress®. 6. Análisis de la información.

## **Resultados**

### *Isotransplatación y desarrollo tumoral*

Los ratones del grupo B mostraron una menor implantación tumoral y el crecimiento fue más lento con respecto del grupo A. En el grupo BL/6nA la detección del tumor en el sitio de inoculación fue posible el día 12 postimplantación (PI) con una tasa de éxito del 100% (6/6), mientras que en los ratones del grupo BL/6nB la detección tumoral se observó a partir del día 17 PI y con una tasa de éxito del 54% de los animales (12/22) (Figura 4b). Todos los tumores obtenidos presentaron una forma elipsoidal (figura 4a). Los tumores implantados en los ratones BL/6nA mostraron un crecimiento homogéneo y alcanzaron su tamaño máximo permitido en el estudio el día 28 PI. De los 12 tumores implantados en los ratones BL/6nB, 4 alcanzaron su tamaño máximo en un periodo de 60 a 69 días PI y 8 remitieron entre los días 35-60 PI (figura 4c).

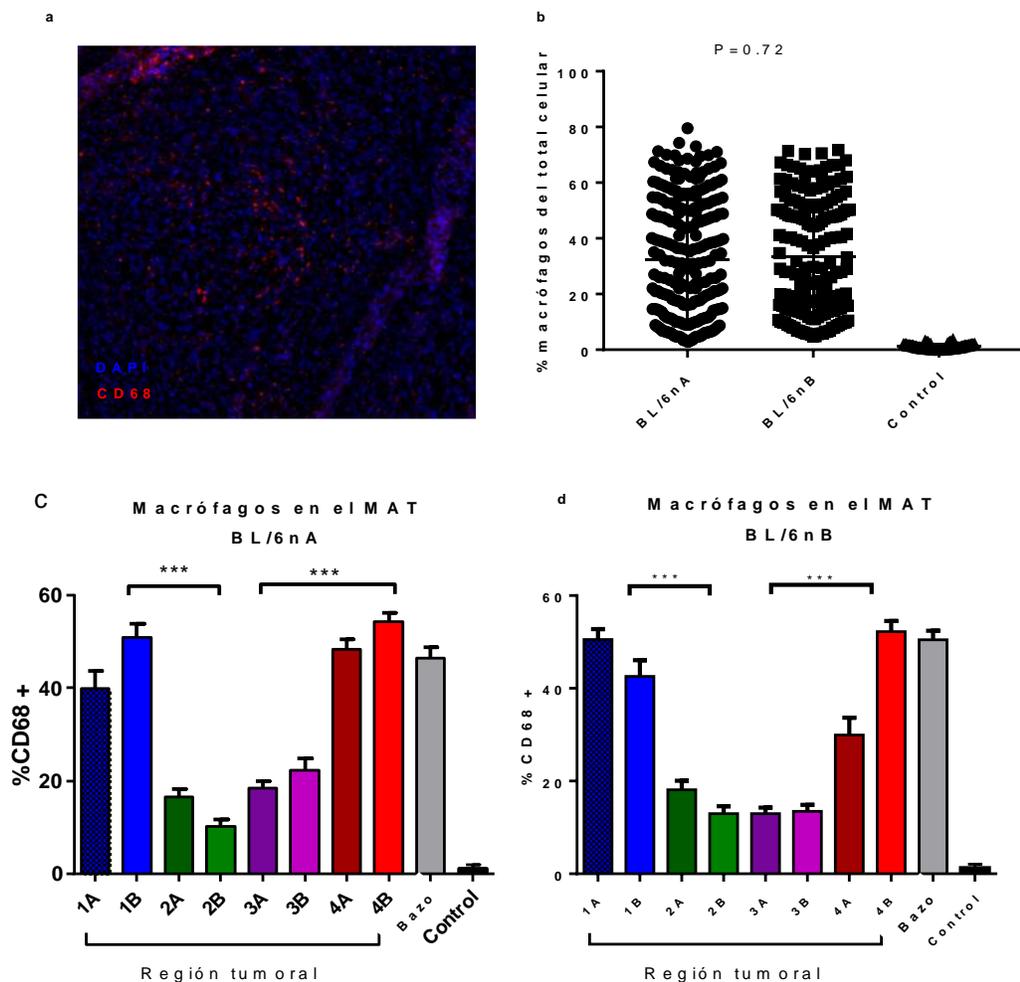


**Figura 4. Implantación y crecimiento tumoral subcutáneo de células de cáncer de próstata TRAMP-C1 en ratones C57BL/6 de dos núcleos reproductores.** a. Imagen representativa de los tumores obtenidos el día 28 (BL/6nA) y 70 (BL/6nB). b. Porcentaje de ratones con implantación exitosa del tumor (\*\*\*) $p < 0.0001$ ). c. Dinámica de crecimiento tumoral de tumores implantados mediante la evaluación del diámetro tumoral medio; en rojo, ratones BL/6 del núcleo A; en azul, ratones del núcleo B con implantación exitosa; en negro, ratones del núcleo B con remisión del tumor después de la implantación.

#### *Evaluación de los macrófagos totales en el microambiente tumoral*

La obtención de los tumores para la evaluación del microambiente tumoral se realizó el día 28 para el grupo BL/6nA y del día 60 al 69 PI para los animales del grupo BL/6nB. La presencia de macrófagos dentro del MAT se evaluó mediante la expresión de CD68 y se

midió con el analizador de imágenes metaxpress para la identificación célula por célula (Figura 5a) No se observaron diferencias en el porcentaje total de macrófagos (CD68+) del total de células entre los grupos ( $p=0.72$ ) (Figura 5b). Encontramos que la concentración de macrófagos cambia entre las regiones tumorales. Existe una diferencia significativa entre la concentración de macrófagos en las regiones superior e inferior (1 y 4) con valores promedio del 50% al 52% del total de macrófagos celulares, en comparación con las regiones centrales (2 y 3) que se encuentra entre el 12% y 20%. Esta distribución se observó tanto en los tumores obtenidos del grupo BL6/nA como en los del grupo BL/6nB (Figura 5c) (Cuadro1).

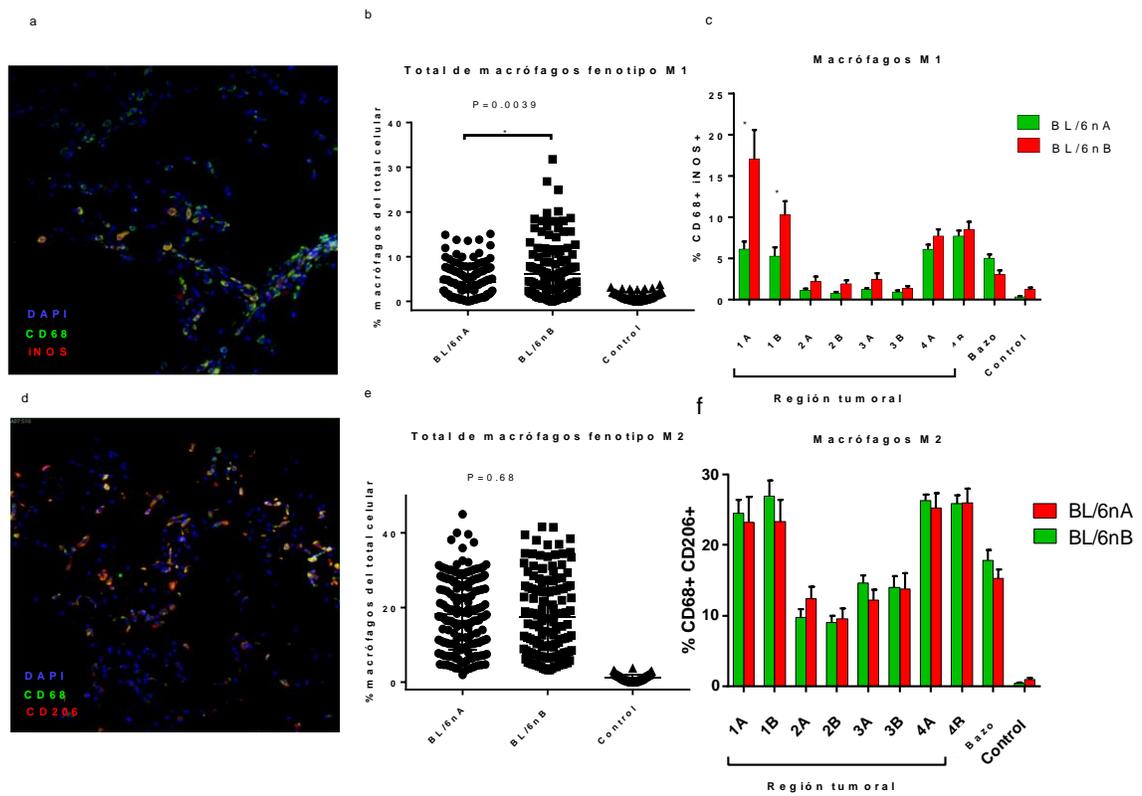


**Figura 5. Detección de células CD68+ dentro del microambiente tumoral.** a. Imagen representativa de los cortes de tejido tumoral marcadas con anti-CD68 para la identificación

de los macrófagos. b. Comparación de la concentración de macrófagos totales promedio entre los tumores obtenidos del grupo BL/6nA frente a los obtenidos del grupo BL/6nB. C. Comparación entre las poblaciones de macrófagos presentes en cada región tumoral para los grupos BL/6nA y BL/6nB. Bazo. Control de identificación de macrófagos en el bazo. \*\*\* $p < 0.001$

#### *Evaluación de los perfiles M1 y M2 en el microinmunoambiente tumoral*

Los macrófagos de fenotipo M1 fueron identificados y cuantificados mediante la expresión de CD68+ iNOS+ (Figura 6a), mientras que el fenotipo M2 se detectó mediante la expresión de CD68+ CD206+ (Figura 6d). En los tumores del grupo BL/6nB se observó mayor concentración de macrófagos de fenotipo M1 (Figura 6b), con marcada diferencia en las regiones tumorales 1A y 1B,  $p < 0.001$  (Figura 6c), no se observaron diferencias entre grupos con respecto al fenotipo M2 (Figuras 6e y 6f). En ambos grupos se observó una diferencia en la distribución de las subpoblaciones según la región tumoral, encontrando una mayor población del total celular en las regiones tumorales 1 y 4, (de 5,2% +/- 1,06 SEM a 17% +/- 3 para M1 y de 24.5 +/- 1.8 SEM a 26.9% +/- 2.2 SEM para M2) en comparación con las regiones centrales 2 y 3 (0.7% +/- 0.18 SEM a 2.4% +/- 0.7 SEM para M1 y 9.02 +/- 0.9 SEM a 14.6% +/- 1.0 SEM para M2) (Figura 6c y 6f) (Cuadro 1).

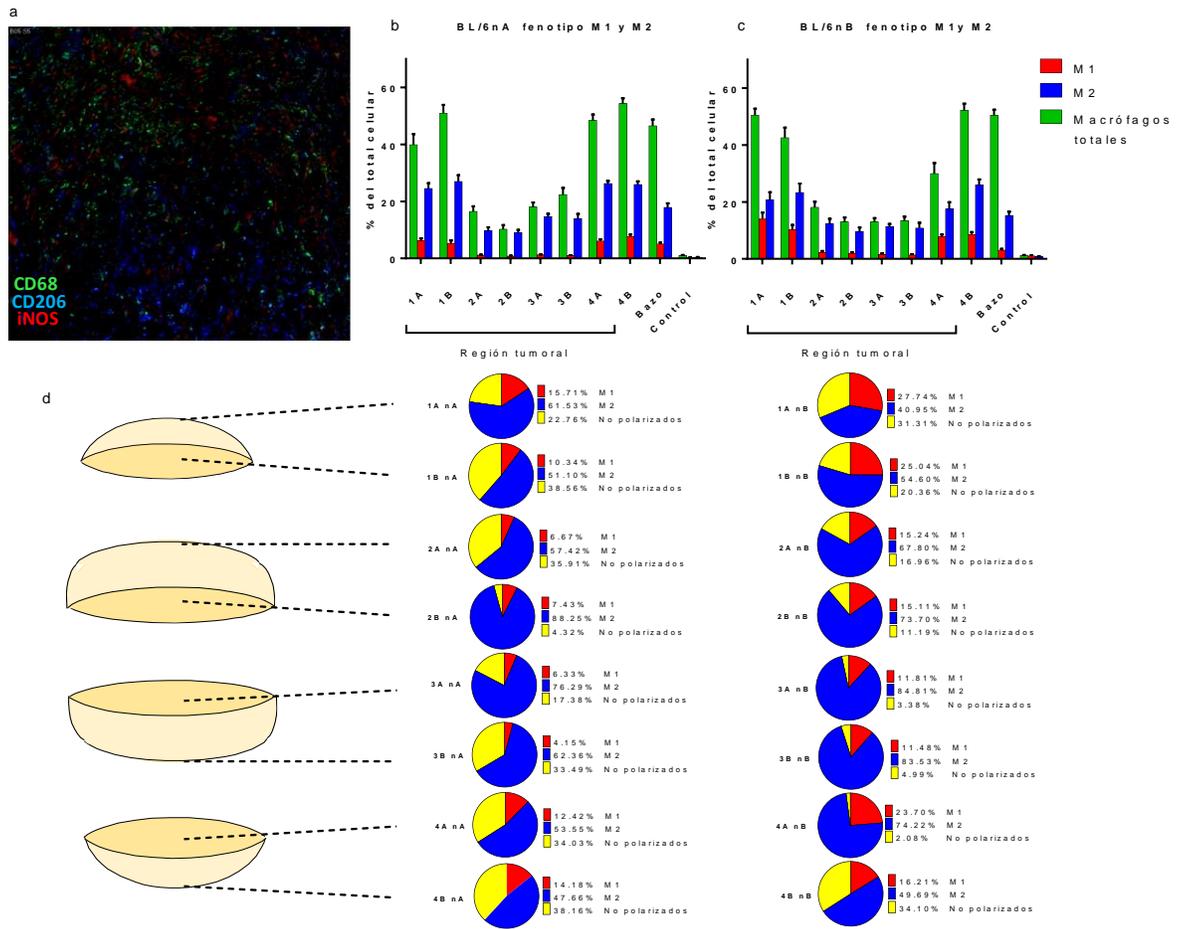


**Figura 6. Cuantificación de macrófagos M1 CD68+ iNOS+ y M2 CD68+ CD206+ en secciones de tumor subcutáneo de células de cáncer de próstata murino.** a. Imagen representativa de macrófagos M1 (DAPI+CD68+iNOS+) inmunofluorescencia de macrófagos en secciones de tumor de cáncer de próstata. b. Comparación de macrófagos M1 intratumorales totales entre ratones de núcleos BL/6nA y BL/6nB. C. Comparación de las subpoblaciones de macrófagos M1 por región entre los grupos BL/6nA y BL/6nB \*  $p < 0,001$ . d. Imagen representativa de macrófagos M2 (DAPI+ CD68+ CD206+) inmunofluorescencia de macrófagos en secciones de tumor de cáncer de próstata murino e. Comparación de macrófagos M2 intratumorales totales entre ratones de núcleos BL/6nA y BL/6nB. F. Comparación de subpoblaciones de macrófagos M2 entre regiones de estudio para cada grupo \*  $p < 0,001$ .

*Comparación de los macrófagos M1, M2 y no polarizados por región tumoral*

Para evaluar las subpoblaciones de macrófagos de manera simultánea se realizó una tinción triple de CD68, CD206 e iNOS (Figura 7a). En ambos grupos se observó que los macrófagos

de fenotipo M2 presentan un mayor porcentaje promedio del total de macrófagos en las regiones centrales (2 y 3), mientras que se observaron valores más bajos en las regiones superior e inferior (1 y 4) (Figura 7b y c). Sin embargo, en las regiones centrales 3A, 3B y 4A del grupo BL/6nB se encontró un aumento en la proporción, alcanzando valores de 84% +/- 1.8 SEM a 84% +/- 2.3 SEM del total de macrófagos (Figura 7d). Los macrófagos M1 presentaron una mayor concentración en los animales del grupo BL/6nB. Mientras que los porcentajes en las regiones centrales (2B, 3A y 3B) del grupo BL/6nA alcanzan valores entre 4.15% +/- 0.14 SEM y 7.43% +/- 0.18 SEM en los ratones del grupo BL/6nB se encuentran entre 11.48 % +/- 0.2 SEM y 15.24%. +/- 0.5 SEM. Asimismo, en el grupo BL/6nA, las regiones 1A, 1B y 2A mostraron porcentajes de 15.71% +/- 0.9 SEM, 10.34% +/- 1.0 SEM y 6.67% +/- 0.2 SEM, respectivamente, que contrastan con 27.74% +/- 2.1 SEM, 25.04 % +/- 1.6 SEM y 15.24 % +/- 0.5 SEM en las regiones equivalentes del grupo BL/6nB (Figura 7d). También se determinó la población de macrófagos no polarizados (CD68+CD206-iNOS-) para cada una de las regiones tumorales, en las regiones centrales 3A, 3B y 4A del grupo BL/6nA, porcentajes del 17.38% +/- 1.54 SEM, 33.49% +/- 2.41 SEM y 34.03% +/- 2.10 SEM respectivamente, frente a los valores 3.38% +/- 0.82 SEM, 4.99% +/- 1.92 SEM y 2.08% +/- 0.25 SEM de sus contrapartes en el Grupo BL/nB (Figura 7d). La relación promedio M2/M1 fue de 8/1 para el grupo A y de 4.2/1 para BL/6nB (Cuadros 1 y 2).



Cuadro 1. Proporción M2/M1 por región tumoral

<b>Región tumoral</b>	<b>BL/6nA</b>	<b>BL/6nB</b>
<b>1A</b>	3.91/1	1.47/1
<b>1B</b>	4.94/1	2.18/1
<b>2A</b>	8.60/1	4.44/1
<b>2B</b>	11.87/1	4.87/1
<b>3A</b>	12.05/1	7.18/1
<b>3B</b>	15.02/1	7.27/1
<b>4A</b>	4.31/1	3.13/1
<b>4B</b>	3.36/1	3.06/1
<b>Promedio</b>	<b>8/1</b>	<b>4.2/1</b>

Cuadro 2. Resumen de las diferencias observadas entre los dos núcleos de reproducción

	<b>C57BL/6nA</b>	<b>C57BL/6nB</b>
Tiempo de detección de la masa tumoral	Día 12 PI	Día 17 PI
Porcentaje de éxito en la implantación	100%	54%
Porcentaje de remisión	0%	66%
Tiempo de desarrollo tumoral	28 DPI	69 DPI
Macrófagos totales	33.1%	34.6%
Macrófagos M1	9.65%	18.29%
Macrófagos M2	62.27%	66.16%
Macrófagos no polarizados	28.07%	15.54%
Relación M2/M1	8/1	4.2/1

**Cuadro 2. Resumen de la comparación en las variables observadas en el estudio.** Valores promedio observados entre los grupos de estudio. Los valores de macrófagos totales, M1, M2, no polarizados y la relación M2/M1 corresponden al valor promedio de las regiones tumorales evaluadas por grupo de estudio.

## Discusión

En el presente estudio se observaron diferencias en el proceso de implantación y crecimiento tumoral entre dos grupos de ratones C57BL/6. Los animales de núcleos de crianza BL/6nB mostraron una menor implantación tumoral (54 % de los ratones), un período de crecimiento tumoral más lento (69 días) y remisión de los tumores en el 66% de los ratones con implantación. En cambio, el 100% los animales del grupo BL/6nA tuvieron una implantación exitosa y un crecimiento tumoral homogéneo que alcanzó su mayor tamaño en menor tiempo (28 días). Es posible atribuir las diferencias entre grupos a cambios en el fondo genético de los ratones, situación previamente descrita cuando se realiza la implantación de células TRAMP en ratones de subcepas diferentes, esta variación ha demostrado afectar el tiempo de desarrollo neoplásico, así como los tejidos diana de metástasis (147-149). Alrededor de 932 genes han mostrado una expresión diferencial dependiendo del contexto genético de los ratones en modelos de cáncer de próstata, muchos de ellos relacionados con el desarrollo neoplásico (149).

No se observó diferencia en la concentración de macrófagos totales entre los grupos experimentales, sin embargo, en ambos grupos se encontró una diferencia en las poblaciones de macrófagos totales entre las regiones tumorales. En las centrales encontramos valores de macrófagos de 15% a 20% del total celular de la masa tumoral, mientras que, en las regiones superior e inferior, correspondientes a las cercanas a la piel o al tórax se observaron valores de 30% a 57%, respectivamente. La información obtenida de estas últimas regiones coincide con lo descrito en diversos estudios que indican una alta proporción de macrófagos que componen la masa tumoral (27), estudios en los cuales incluso se han observado mayores concentraciones de macrófagos que de células tumorales (26, 40, 83). Con la información generada en el presente estudio es posible hipotetizar que la distribución de macrófagos en otros modelos podría variar dependiendo de la región tumoral, situación no observable cuando la técnica de cuantificación requiere la disgregación del tejido como ocurre en el caso de la citometría de flujo, siendo esta la técnica más ampliamente difundida en la cuantificación celular del microinmunoambiente tumoral. La diferencia en la concentración

de macrófagos puede encontrarse relacionada con el nivel de angiogénesis y la potencial migración celular, puesto que se conoce la participación de las células estromales adyacentes al tumor como importantes promotoras de la vascularización (150). Para orientar si existe esta relación sería necesario cuantificar la presencia de vasos sanguíneos en las distintas regiones del tumor, tarea pendiente para futuras investigaciones.

La abundancia de macrófagos en el MAT se ha relacionado con un mal pronóstico en el 80% de los estudios publicados (53). Ligada con su actividad proinflamatoria, estas células aportan citocinas y especies reactivas de oxígeno al MAT, lo que induce inestabilidad genómica útil para las células neoplásicas en la adquisición de características y habilidades que le permiten la progresión tumoral (8, 81); así mismo, la síntesis de citocinas, quimiocinas y proteasas contribuyen a la migración e intravasación de las células tumorales durante la metástasis (84). Se reportó que en un modelo murino de cáncer de mama knock-out para citocinas hematopoyéticas como el factor estimulante de colonias -1 (CSF-1 por sus siglas en inglés), en este modelo, se observó que a raíz de dicha mutación la población de macrófagos asociados al tumor disminuye, junto con una reducción en la proliferación de células neoplásicas y la metástasis (151).

Encontramos un patrón similar en las subpoblaciones M1 y M2: una mayor concentración de ambas poblaciones en las regiones superior e inferior en comparación con las centrales; sin embargo, el fenotipo M1 presenta poblaciones significativamente más bajas (de 4 a 27%) que M2 (40 a 84%). Esto se ha relacionado con la actividad inmunosupresora inducida por los macrófagos M2 en estadios avanzados del proceso neoplásico y la inmunomodulación ejercida por las células tumorales y estromales asociadas a tumores a través de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10 así como receptores de superficie como PD-L1 (40, 57, 152). La relación observada entre los dos perfiles de polarización del presente estudio, se puede explicar debido a que la dominancia del perfil M2 induce la conformación de un microambiente rico en citocinas supresoras como IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , lo que se traduce en la regulación del perfil M1 productor de IFN $\gamma$ , óxido nítrico, IL-12 e IL-18 (26, 80, 153). Este escenario se relaciona con los eventos de inmunoedición y escape, situaciones necesarias para el desarrollo tumoral, la invasión y la metástasis (28).

Los ratones del grupo BL/6nB presentaron alrededor del doble de la cantidad de macrófagos M1 y una reducción de los macrófagos no polarizados (CD68+ iNOS-CD206-) en todas las regiones tumorales, al observar la relación M2:M1 encontramos que el grupo BL/6nA presentó una relación promedio de 8/1 (M2/M1), mientras que en el grupo BL/6nB se presentó una proporción promedio de 4.2/1, lo que significa cerca del doble de macrófagos M2 por cada M1 en el grupo A con respecto del B.

Se ha descrito la presencia de ambas poblaciones de macrófagos en el microambiente tumoral y existe la propuesta de que éstos tienden a pasar del perfil M1 al M2 (41). En los tumores establecidos la señal inflamatoria de NF- $\kappa$ B se ve inhibida por la reconfiguración de éste en homodímeros de p50, lo cual lleva al macrófago M1 que expresa iNOS y TNF a cambiar su perfil hacia M2 (85), también se ha relacionado este cambio a la hipoxia existente en las regiones necróticas del tumor que induce el cambio hacia perfil M2 a través de la expresión del factor de transcripción HIF1 $\alpha$ .

En el cáncer de próstata se ha encontrado que una mayor cantidad de macrófagos totales en el microambiente tumoral se correlaciona con una mayor puntuación en la escala de Gleason y una menor sobrevida (154), también se observó que la presencia de macrófagos fenotipo M2 en colaboración con los fibroblastos asociados a tumor, son una de las características del microinmunoambiente para el establecimiento tumoral relacionadas con un pronóstico reservado, esta cooperación celular provee factores de crecimiento y citocinas necesarias para el reclutamiento de más macrófagos a su vez dirigidos hacia el perfil M2 y en conjunto favorecen la metástasis (76, 80). En pacientes con cáncer de próstata se ha encontrado una relación entre la proporción M2/M1 con el puntaje clínico, en la que un aumento en las poblaciones M2 con respecto de las M1 se traducen en un peor pronóstico (76), se tienen múltiples hallazgos de la participación de macrófagos principalmente los de fenotipo M2 relacionados con la progresión del cáncer y la metástasis (Cuadro 3). Por lo anterior podemos pensar que la mayor concentración de macrófagos M1 y la disminución en la relación M2/M1 observada en el grupo B de nuestro estudio, esté relacionada con la remisión tumoral y el retraso en el crecimiento tumoral encontrados en estos ratones durante el desarrollo del modelo. La disminución de macrófagos no polarizados en el grupo B podría interpretarse

como la polarización de estos hacia el perfil M1, considerando que la disminución de la primera población se observa acompañada de un incremento de la segunda, sin embargo, para demostrarlo son necesarios estudios posteriores.

Cuadro 3. Participación de los macrófagos en el cáncer de próstata

<b>Descripción</b>	<b>Modelo de estudio</b>	<b>Referencia</b>
Los macrófagos fenotipo M2 en compañía de los fibroblastos asociados a tumor facilitan la progresión tumoral y la metástasis.	Aislamiento de monocitos de origen humano para exposición <i>in vitro</i> a fibroblastos y células tumorales disgregadas de un carcinoma prostático.	Comito et al. 2014 (76)
Existe una correlación entre la cantidad de macrófagos del microambiente tumoral de carcinomas humanos de próstata con una menor sobrevida, una mayor angiogénesis y una mayor puntuación en la escala de Gleason.	Inmunohistoquímica a partir de tumores extraídos en pacientes humanos.	Lissbrant et al. 2000 (154)
Se observó una mayor concentración de macrófagos en las áreas hipóxicas, avasculares y perinecroticas	Xenotransplante de línea humana de cáncer de próstata PC3 en ratones desnudos.	Murdoch et al. 2004 (155)
La inoculación intratumoral de macrófagos transducidos con el gen la IL-12 aumentan la expresión de MHC-I y MHC-II, suprimen el crecimiento tumoral, disminuyen los eventos de metástasis espontánea y aumentan la infiltración de linfocitos TCD4+ y TCD8+.	Isotransplante ortotópico de la línea de cáncer de próstata 178-2 BMA en ratones 129/Sv.	Satoh et al. 2003 (156)
Una disminución de en las poblaciones totales de macrófagos en el microambiente tumoral se correlacionan con mayor positividad en linfonodos bajo el sistema TNM, mientras que una mayor concentración en los sitios específicos de células tumorales se correlacionan positivamente con un mayor valor en la escala de Gleason	Inmunohistoquímica en tumores prostáticos extraídos de pacientes humanos.	Shimura et al. 2000 (157)
Hay un aumento de 1.6 y de 1.87 veces las poblaciones de macrófagos CD68+ en T <sub>≥3</sub> y Gleason $\geq$ 8 respectivamente	Inmunohistoquímica en tumores prostáticos extraídos de pacientes humanos.	Nonomura et al. 2010 (87)
Existe un aumento de 1.7 veces de células CD163+ en tumores con valores $\geq$ a 8 en la escala de Gleason	Inmunohistoquímica con análisis digital sobre tumores extraídos de pacientes	Lundholm et al. 2015 (158)
Se ha demostrado una relación entre mayores cantidades de macrófagos CD68+ productores de catepsina S en el microambiente tumoral con fenotipos tumorales resistentes a la castración.	Ratones B/6 TRAMP y tumores de pacientes, medición por Inmunohistoquímica.	Lindahl et al. 2009 (159)

Se encontró un incremento significativo en la expresión de VEGF-A, MMP-9 y ARG-1 en los macrófagos presentes en tumores murinos relacionado con la producción de CFS-1 tras la administración de la terapia de bloqueo de andrógenos. Los macrófagos tratados con terapia antiandrogénica expresaron características de M2	Implantación subcutánea de 2X106 células Myc-CaP en ratones FVB, detección de poblaciones por inmunohistoquímica	Escamilla et al. 2015 (91)
En pacientes con valor en la escala de Gleason de 7 a 10 y tratados con anti PD-1, se observó un aumento de 10 veces en la expresión de PD-L1 en macrófagos CD68+ acompañados de una sobreexpresión de arginasa relacionada con un fenotipo M2	Prostectomía en pacientes humanos, determinación de poblaciones por citometría de flujo e inmunohistoquímica.	Gao et al. 2017 (160)
Los macrófagos juegan un papel central en la remodelación ósea asociado a la metástasis a hueso del carcinoma prostático, en la que favorece la liberación de factores de crecimiento. También participan en la preparación de nicho en la médula ósea para la recepción de células metastásicas provenientes del tumor primario de próstata.	Tejidos estudiados de pacientes humanos así como en modelos de investigación murinos	Lo et al. 2018 (161)

El presente trabajo aporta información con respecto a la distribución diferencial de los perfiles de macrófagos dependiendo de la región del tumor. Al tratarse de células plásticas capaces de modificar su comportamiento y actividad dependiendo de las señales que le sean provistas, se vislumbran como posibles blancos terapéuticos (84), conocer la disposición de las células en el microambiente tumoral puede significar el diseño de estrategias en la administración de tratamientos inmunomoduladores. A partir de observaciones en la localización de las células dentro del TIME se ha construido la propuesta de clasificación de microinmunoambientes tumorales como: de infiltrado excluido (I-E TIME, por sus siglas en inglés), caracterizados por ser pobremente inmunogénicos o “fríos”. En los que se observan macrófagos a la periferia de la neoplasia y una baja infiltración de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, en este escenario los tratamientos inmunomoduladores son poco efectivos. Otra descripción es de infiltrado inflamado (I-I TIME), considerados inmunológicamente “calientes”, los cuales presentan una mayor disposición central de macrófagos e infiltración de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, este tipo de microinmunoambiente muestra una mejor respuesta a tratamientos inmunomoduladores como bloqueadores de PD-1. Así mismo, se ha descrito la distribución del microinmunoambiente como infiltrado inflamado similar a órgano linfoide terciario (I-

I/TLS TIME), considerados los de mejor pronóstico frente a los tratamientos inmunomoduladores (24). En nuestro modelo, si bien no podemos clasificar el infiltrado según la clasificación anterior dado que no medimos otras poblaciones como CD8+, encontramos una importante migración de macrófagos y comprobamos la factibilidad de su cuantificación *in situ*, con lo que podemos proyectar la evaluación de tratamientos inmunomoduladores de macrófagos y conocer su acción en el MAT. Conocer la localización de las células y sus estadios o perfiles funcionales, puede ser información clave que contribuya al entendimiento del MAT y la manera de modularlo.

Los animales utilizados en el presente estudio provienen de núcleos de crianza bajo condiciones higiénicas y manejo de alta calidad genética. Sin embargo, a pesar del origen similar de los grupos, fue posible observar cambios en la implantación y progresión tumoral, así como diferencias en una de las poblaciones celulares más relevantes dentro del MAT. Se han documentado múltiples alteraciones derivadas de los programas de reproducción en las instituciones científicas, de lo anterior se conoce que la generación de subcepas de ratones C57BL/6 poseen alteraciones como cambios en el metabolismo de la glucosa y los glucocorticoides (134, 162, 163); cambios en la locomoción, memoria y ansiedad (164, 165); en la fertilidad (130); en la relación hembra: macho de las camadas (130, 166); en la visión (138); en la susceptibilidad a la cocaína y las anfetaminas (136), entre otras diferencias. También, se ha demostrado que las variaciones en el trasfondo genético se traducen en cambios de la respuesta inmune, entre los que se encuentran alteraciones en linfocitos T CD8+ de memoria, linfocitos B, Linfocitos Th, células NKT y células dendríticas plasmocitoides (137, 167). En nuestro estudio encontramos diferencias entre dos grupos de ratones cuya fuente documental refiere un trasfondo genético de C57BL/6J, sin embargo, es posible hipotetizar la generación de subcepas o bien la combinación de estas, en este sentido, pudiese existir la presencia de “contaminación” por genes de otros trasfondos genéticos como el C57BL/6hsd que ha demostrado alteraciones en poblaciones de la respuesta inmune derivadas de la mutación en el gen *DOCK2* relacionado con la citocinesis. Para identificarlo será necesaria la caracterización genética de los núcleos de reproducción murina.

Con la finalidad de tener un modelo murino de cáncer de próstata que ofrezca resultados más estables y repetibles, Se considera que los animales provenientes del núcleo A ofrecen un escenario de implantación y crecimiento más homogéneo, por lo que podrían ser empleados en modelos de desafío de fármacos u otros tratamientos antineoplásicos. Sin embargo, en los animales del núcleo B se observó un crecimiento más lento y en 8 animales implantados, el crecimiento tumoral remitió, por lo que los ratones provenientes de este núcleo podrían ser objeto de observaciones para conocer otros elementos relacionados con su resistencia a la implantación además de la mayor proporción M1 descrita en el presente estudio.

Para generar modelos de estudio estables y repetibles, es fundamental monitorear las variaciones entre generaciones y núcleos de reproducción. Esto establece la importante necesidad reemplazar de manera constante las colonias de ratones a través de la adquisición de pie de cría proveniente de las empresas productoras con programas de monitoreo y estabilidad genética.

## **Conclusiones**

- Se encontraron diferencias significativas en la implantación, el éxito en el desarrollo, el tiempo de crecimiento tumoral y en la relación de macrófagos M1/M2 del MAT entre los dos grupos:
  - Los ratones C57BL/6 del grupo B tuvieron una implantación tumoral del 54%, de los cuales el 66% remitieron entre el día 43 y el 60, el crecimiento tumoral se extendió a 69 días, mientras que los ratones C57BL /6 del grupo A tuvieron una implantación tumoral del 100%, el crecimiento tumoral fue homogéneo y alcanzó su máximo desarrollo el día 28 postimplantación.
  - Los ratones C57BL/6 del grupo B tuvieron una relación M2/M1 de 4.2/1 mientras que el grupo A presentó una relación 8/1.

- El porcentaje de los macrófagos totales en el microinmunoambiente tumoral no tuvo diferencia entre los grupos del estudio. En ambos se observó una concentración de macrófagos totales diferente entre las regiones tumorales centrales (12% - 20%) y las superior e inferior (50% - 52%)  $P=0.0018$ .
- Ambos perfiles de macrófagos son más abundantes en las regiones superior e inferior que en las centrales.
- Es fundamental asegurar la estabilidad genética de los modelos de experimentación mediante el constante ingreso de animales sometidos a programas de monitoreo y control que garanticen la homogeneidad y eviten variables en los procedimientos experimentales.

## **Prospectivas**

Será pertinente explorar los cambios genéticos presentes en las regiones genómicas que varían entre subcepas conocidas, en la búsqueda de identificar posibles alteraciones que se relacionen con el fenotipo observado entre ambos núcleos de reproducción.

Se proyecta llevar a cabo la revisión del microambiente de los tumores del núcleo B para la determinación de otras poblaciones de células de la respuesta inmune como linfocitos TCD8, células NK, linfocitos T reguladores que pudiesen estar relacionados con los fenómenos de remisión. Así como marcadores endoteliales para conocer si las subpoblaciones de macrófagos están relacionadas con el nivel de angiogénesis en las regiones tumorales.

## Referencias

1. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. 2012.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. 2021;149(4):778-89.
4. Khazaei Z, Sohrabivafa M, Momenabadi V, Moayed L, Goodarzi E. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide prostate cancers and their relationship with the human development index. *Advances in Human Biology*. 2019;9(3):245.
5. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Franco-Núñez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutiérrez JP, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud publica de Mexico*. 2013;55(suppl 2):S332-S40.
6. Reynoso-Noverón N, Mohar A. El cáncer en México: propuestas para su control. *salud pública de México*. 2014;56(5):418-20.
7. Shurin MR, Umansky V, Malyguine A, Scientist P. *The tumor immunoenvironment*: Springer; 2013.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
9. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*. 2022;12(1):31-46.
10. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69-90.
11. Bluemn EG, Coleman IM, Lucas JM, Coleman RT, Hernandez-Lopez S, Tharakan R, et al. Androgen receptor pathway-independent prostate cancer is sustained through FGF signaling. *Cancer cell*. 2017;32(4):474-89. e6.
12. Gudem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JM, Papaemmanuil E, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*. 2015;520(7547):353-7.
13. Zou M, Toivanen R, Mitrofanova A, Floch N, Hayati S, Sun Y, et al. Transdifferentiation as a mechanism of treatment resistance in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *Cancer discovery*. 2017;7(7):736-49.
14. Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development*. 2018;32(17-18):1105-40.
15. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer research*. 2002;62(6):1832-7.

16. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet*. 1994;343(8899):692-5.
17. Lee J, Ledermann J, Kohn E. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Annals of oncology*. 2013:mdt384.
18. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2016;375:443-53.
19. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell*. 2010;18(1):11-22.
20. Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R, et al. Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nature medicine*. 2016;22(4):369-78.
21. Pourmand G, Ziaee A-A, Salem S, Abedi AR, Mehrsai A, Alavi HA, et al. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urology journal*. 2007;4(2):95-100.
22. Augello MA, Den RB, Knudsen KE. AR function in promoting metastatic prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2014:1-13.
23. Dryhurst D, Ausió J. Histone H2A. Z deregulation in prostate cancer. Cause or effect? *Cancer and Metastasis Reviews*. 2014:1-11.
24. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature medicine*. 2018;24(5):541-50.
25. Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment. *Cell metabolism*. 2019;30(1):36-50.
26. Van Ginderachter JA. Macrophage Differentiation and Activation States in the Tumor Microenvironment. *The Tumor Immunoenvironment*: Springer; 2013. p. 405-30.
27. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(1):71.
28. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current opinion in immunology*. 2007;19(2):203-8.
29. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1137-46.
30. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(7):405-14.
31. Floros T, Tarhini AA, editors. *Anticancer cytokines: biology and clinical effects of interferon- $\alpha$ 2, interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12*. Seminars in oncology; 2015: Elsevier.
32. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*. 2009;30(3):131-41.

33. Huarte E, Fisher J, Turk MJ, Mellinger D, Foster C, Wolf B, et al. Ex vivo expansion of tumor specific lymphocytes with IL-15 and IL-21 for adoptive immunotherapy in melanoma. *Cancer letters*. 2009;285(1):80-8.
34. Ma H-L, Whitters MJ, Konz RF, Senices M, Young DA, Grusby MJ, et al. IL-21 activates both innate and adaptive immunity to generate potent antitumor responses that require perforin but are independent of IFN- $\gamma$ . *The Journal of Immunology*. 2003;171(2):608-15.
35. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Cursons J, Huntington ND. The emergence of natural killer cells as a major target in cancer immunotherapy. *Trends in immunology*. 2019;40(2):142-58.
36. Di Vito C, Mikulak J, Zaghi E, Pesce S, Marcenaro E, Mavilio D, editors. *NK cells to cure cancer*. *Seminars in immunology*; 2019: Elsevier.
37. Wylie B, Macri C, Mintern JD, Waithman J. Dendritic cells and cancer: from biology to therapeutic intervention. *Cancers*. 2019;11(4):521.
38. Wculek SK, Cueto FJ, Mujal AM, Melero I, Krummel MF, Sancho D. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(1):7-24.
39. Maciel TT, Moura IC, Hermine O. The role of mast cells in cancers. *F1000prime reports*. 2015;7.
40. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *American journal of translational research*. 2012;4(4):376.
41. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current opinion in immunology*. 2010;22(2):231-7.
42. Teixeira A, Garasa S, Ochoa MC, Villalba M, Olivera I, Cirella A, et al. IL8, Neutrophils, and NETs in a Collusion against Cancer Immunity and Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(9):2383-93.
43. Lo W, Parkhurst M, Robbins PF, Tran E, Lu Y-C, Jia L, et al. Immunologic recognition of a shared p53 mutated neoantigen in a patient with metastatic colorectal cancer. *Cancer immunology research*. 2019;7(4):534-43.
44. Tran E, Robbins PF, Lu Y-C, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, et al. T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(23):2255-62.
45. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(3):1185-92.
46. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer neoantigens. *Annual review of immunology*. 2019;37:173-200.
47. Horm TM, Schroeder JA. MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell adhesion & migration*. 2013;7(2):187-98.
48. Neve R, Lane H, Hynes N. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Annals of oncology*. 2001;12:S9-S13.

49. Zhang J-W, Li Y, Zeng X-C, Zhang T, Fu B-S, Yi H-M, et al. miR-630 overexpression in hepatocellular carcinoma tissues is positively correlated with alpha-fetoprotein. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2015;21:667.
50. Guo X, Liu G, Schauer IG, Yang G, Mercado-Uribe I, Yang F, et al. Overexpression of the  $\beta$  subunit of human chorionic gonadotropin promotes the transformation of human ovarian epithelial cells and ovarian tumorigenesis. *The American journal of pathology*. 2011;179(3):1385-93.
51. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *immunity*. 2013;39(1):1-10.
52. Tang S, Ning Q, Yang L, Mo Z, Tang S. Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. *International Immunopharmacology*. 2020;86:106700.
53. Bingle á, Brown N, Lewis C. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2002;196(3):254-65.
54. Monteran L, Erez N. The dark side of fibroblasts: cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1835.
55. Ye X, Weinberg RA. Epithelial–mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends in cell biology*. 2015;25(11):675-86.
56. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Current opinion in cell biology*. 2016;43:7-13.
57. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124(2):263-6.
58. Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(12):858-70.
59. Lorusso G, Rüegg C, editors. *New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. Seminars in cancer biology*; 2012: Elsevier.
60. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *International journal of cancer*. 2011;128(11):2527-35.
61. Arena GO, Forte S, Abdouh M, Vanier C, Corbeil D, Lorico A. Horizontal Transfer of Malignant Traits and the Involvement of Extracellular Vesicles in Metastasis. *Cells*. 2023;12(12):1566.
62. Sturgess V, Azubuike UF, Tanner K. Vascular regulation of disseminated tumor cells during metastatic spread. *Biophysics Reviews*. 2023;4(1).
63. Papaccio F, Paino F, Regad T, Papaccio G, Desiderio V, Tirino V. Concise review: cancer cells, cancer stem cells, and mesenchymal stem cells: influence in cancer development. *Stem cells translational medicine*. 2017;6(12):2115-25.
64. Virga F, Ehling M, Mazzone M. Blood Vessel Proximity Shapes Cancer Cell Metabolism. *Cell metabolism*. 2019;30(1):16-8.

65. Chu D-T, Nguyen Thi Phuong T, Tien NLB, Tran D-K, Nguyen T-T, Thanh VV, et al. The effects of adipocytes on the regulation of breast cancer in the tumor microenvironment: an update. *Cells*. 2019;8(8):857.
66. Corrêa LH, Corrêa R, Farinasso CM, de Sant'Ana Dourado LP, Magalhães KG. Adipocytes and macrophages interplay in the orchestration of tumor microenvironment: new implications in cancer progression. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1129.
67. Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, et al. CD10+ GPR77+ cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness. *Cell*. 2018;172(4):841-56. e16.
68. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*. 2011;29:235-71.
69. Cobucci RNO, Saconato H, Lima PH, Rodrigues HM, Prudêncio TL, Junior JE, et al. Comparative incidence of cancer in HIV-AIDS patients and transplant recipients. *Cancer epidemiology*. 2012;36(2):e69-e73.
70. Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(4):251-65.
71. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell*. 2010;18(6):884-901.
72. Lyssiotis CA, Kimmelman AC. Metabolic interactions in the tumor microenvironment. *Trends in cell biology*. 2017;27(11):863-75.
73. Liu C, Workman CJ, Vignali DA. Targeting regulatory T cells in tumors. *The FEBS journal*. 2016;283(14):2731-48.
74. Michaud D, Steward CR, Mirlekar B, Pylayeva-Gupta Y. Regulatory B cells in cancer. *Immunological Reviews*. 2021;299(1):74-92.
75. An Z, Flores-Borja F, Irshad S, Deng J, Ng T. Pleiotropic role and bidirectional immunomodulation of innate lymphoid cells in cancer. *Frontiers in immunology*. 2020;10:3111.
76. Comito G, Giannoni E, Segura C, Barcellos-de-Souza P, Raspollini M, Baroni G, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*. 2014;33(19):2423-31.
77. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(7):431-46.
78. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *The Journal of Immunology*. 2015;194(7):2985-91.
79. Sungur CM, Murphy WJ. Positive and negative regulation by NK cells in cancer. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*. 2014;19(1-2).
80. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al., editors. *Macrophage polarization in tumour progression*. *Seminars in cancer biology*; 2008: Elsevier.
81. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell*. 2005;7(3):211-7.

82. Jeong H, Kim S, Hong B-J, Lee C-J, Kim Y-E, Bok S, et al. Tumor-associated macrophages enhance tumor hypoxia and aerobic glycolysis. *Cancer research*. 2019;79(4):795-806.
83. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;41(1):49-61.
84. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
85. Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, et al. p50 nuclear factor- $\kappa$ B overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer research*. 2006;66(23):11432-40.
86. Gannon PO, Poisson AO, Delvoye N, Lapointe R, Mes-Masson A-M, Saad F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *Journal of immunological methods*. 2009;348(1-2):9-17.
87. Nonomura N, Takayama H, Nakayama M, Nakai Y, Kawashima A, Mukai M, et al. Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *BJU international*. 2010;107(12):1918-22.
88. Gollapudi K, Galet C, Grogan T, Zhang H, Said JW, Huang J, et al. Association between tumor-associated macrophage infiltration, high grade prostate cancer, and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *American journal of cancer research*. 2013;3(5):523.
89. Maolake A, Izumi K, Shigehara K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, et al. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22–CCR4 axis. *Oncotarget*. 2017;8(6):9739.
90. Lee GT, Jung YS, Ha YS, Kim JH, Kim WJ, Kim IY. Bone morphogenetic protein-6 induces castration resistance in prostate cancer cells through tumor infiltrating macrophages. *Cancer science*. 2013;104(8):1027-32.
91. Escamilla J, Schokrpur S, Liu C, Priceman SJ, Moughon D, Jiang Z, et al. CSF1 Receptor Targeting in Prostate Cancer Reverses Macrophage-Mediated Resistance to Androgen Blockade Therapy. *Inhibitor of Macrophages Improves Androgen Blockade for Prostate Cancer*. *Cancer research*. 2015;75(6):950-62.
92. Lanciotti M, Masieri L, Raspollini M, Minervini A, Mari A, Comito G, et al. The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *BioMed research international*. 2014;2014.
93. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(9):654-8.
94. Enríquez JA. Mind your mouse strain. *Nature Metabolism*. 2019;1(1):5-7.
95. Kranen HJv, Gruiji FRd, Vries Ad, Sontag Y, Wester PW, Senden HC, et al. Frequent p 53 alterations but low incidence of ras mutations in UV-B-induced skin tumors of hairless mice. *Carcinogenesis*. 1995;16(5):1141-7.
96. Balmain A, Pragnell IB. Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogene. *Nature*. 1983;303(5912):72-4.

97. Cardiff RD, Kenney N. Mouse mammary tumor biology: a short history. *Advances in cancer research*. 2007;98:53-116.
98. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *The American journal of pathology*. 1995;147(1):217.
99. Sicoli D, Jiao X, Ju X, Velasco-Velazquez M, Ertel A, Addya S, et al. CCR5 Receptor Antagonists Block Metastasis to Bone of v-Src Oncogene–Transformed Metastatic Prostate Cancer Cell Lines. *Cancer research*. 2014;74(23):7103-14.
100. Ju X, Ertel A, Casimiro MC, Yu Z, Meng H, McCue PA, et al. Novel Oncogene–Induced Metastatic Prostate Cancer Cell Lines Define Human Prostate Cancer Progression Signatures. *Cancer research*. 2013;73(2):978-89.
101. Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer research*. 2004;64(6):2270-305.
102. Adams DJ, Doran AG, Lilue J, Keane TM. The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. *Mammalian Genome*. 2015;26(9):403-12.
103. Weitzman JB. The mouse genome. *Genome Biology*. 2002;3(1):1-3.
104. Song HK, Hwang DY. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory animal research*. 2017;33(2):119-23.
105. Barros S, Friedlanskaia I, Petricevich V, Kipnis T. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators of inflammation*. 1998;7(5):339-46.
106. Bancil AS, Sandall AM, Rossi M, Chassaing B, Lindsay JO, Whelan K. Food additive emulsifiers and their impact on gut microbiome, permeability, and inflammation: mechanistic insights in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2021;15(6):1068-79.
107. Lopez-Cantu DO, González-González RB, Sharma A, Bilal M, Parra-Saldívar R, Iqbal HM. Bioactive material-based nanozymes with multifunctional attributes for biomedicine: Expanding antioxidant therapeutics for neuroprotection, cancer, and anti-inflammatory pathologies. *Coordination Chemistry Reviews*. 2022;469:214685.
108. Kile BT, Mason-Garrison CL, Justice MJ. Sex and strain-related differences in the peripheral blood cell values of inbred mouse strains. *Mammalian genome*. 2003;14(1):81.
109. Li A, Dai X, Chen L, Liu L, Li C, Liu Y, et al. Immunogenicity and protective efficacy of an inactivated SFTS vaccine candidate in mice. *Biosafety and Health*. 2022;4(01):45-52.
110. Sellers R, Clifford C, Treuting P, Brayton C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Veterinary pathology*. 2012;49(1):32-43.
111. Brunetti J, Falciani C, Bracci L, Pini A. Models of in-vivo bacterial infections for the development of antimicrobial peptide-based drugs. *Current topics in medicinal chemistry*. 2017;17(5):613-9.

112. Li F, Wang Z, Hu F, Su L. Cell culture models and animal models for HBV study. *Hepatitis B virus infection*. 2020;109-35.
113. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. 2012;4(1):62-82.
114. Le Naour A, Rossary A, Vasson MP. EO771, is it a well-characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. *Cancer Medicine*. 2020;9(21):8074-85.
115. Firmino NS, Cederberg RA, Lee C-M, Shi R, Wadsworth BJ, Franks SE, et al. Germinal center hypoxia in tumor-draining lymph nodes negatively regulates tumor-induced humoral immune responses in mouse models of breast cancer. *Oncoimmunology*. 2021;10(1):1959978.
116. Bürtin F, Mullins CS, Linnebacher M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World journal of gastroenterology*. 2020;26(13):1394.
117. Leystra AA, Clapper ML. Gut microbiota influences experimental outcomes in mouse models of colorectal cancer. *Genes*. 2019;10(11):900.
118. Malya V, Paudel KR, Shukla SD, Donovan C, Wadhwa R, Pickles S, et al. Recent advances in experimental animal models of lung cancer. *Future Medicinal Chemistry*. 2020;12(7):567-70.
119. Lau JKC, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver diseases and its associated liver cancer. *Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer*. 2018:139-47.
120. Chyau C-C, Wang H-F, Zhang W-J, Chen C-C, Huang S-H, Chang C-C, et al. Antrodan alleviates high-fat and high-fructose diet-induced fatty liver disease in C57BL/6 mice model via AMPK/Sirt1/SREBP-1c/PPAR $\gamma$  pathway. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(1):360.
121. Hsu H-P, Wang C-Y, Hsieh P-Y, Fang J-H, Chen Y-L. Knockdown of serine/threonine-protein kinase 24 promotes tumorigenesis and myeloid-derived suppressor cell expansion in an orthotopic immunocompetent gastric cancer animal model. *Journal of Cancer*. 2020;11(1):213.
122. Tse J, Pierce T, Carli AL, Alorro MG, Thiem S, Marcusson EG, et al. Onco-miR-21 Promotes Stat3-Dependent Gastric Cancer Progression. *Cancers*. 2022;14(2):264.
123. Lückcrath K, Stuparu AD, Wei L, Kim W, Radu CG, Mona CE, et al. Detection threshold and reproducibility of 68Ga-PSMA11 PET/CT in a mouse model of prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018;59(9):1392-7.
124. Liu Z, Murphy SF, Huang J, Zhao L, Hall CC, Schaeffer AJ, et al. A novel immunocompetent model of metastatic prostate cancer-induced bone pain. *The Prostate*. 2020;80(10):782-94.
125. Mekada K, Yoshiki A. Substrains matter in phenotyping of C57BL/6 mice. *Experimental animals*. 2021:20-0158.
126. Dobrowolski P, Fischer M, Naumann R. Novel insights into the genetic background of genetically modified mice. *Transgenic research*. 2018;27(3):265-75.
127. Åhlgren J, Voikar V. Experiments done in Black-6 mice: what does it mean? *Lab animal*. 2019;48(6):171-80.
128. Fontaine DA, Davis DB. Attention to background strain is essential for metabolic research: C57BL/6 and the international knockout mouse consortium. *Diabetes*. 2016;65(1):25-33.

129. Freeman TL, Swartz TH. Targeting the NLRP3 inflammasome in severe COVID-19. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1518.
130. Fischer M, Kosyakova N, Liehr T, Dobrowolski P. Large deletion on the Y-chromosome long arm (Yq) of C57bl/6jbm1ac inbred mice. *Mammalian Genome*. 2017;28(1):31-7.
131. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*. 2013;340(6140):1567-70.
132. Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR. Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nature genetics*. 2003;35(1):21-3.
133. Specht CG, Schoepfer R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC neuroscience*. 2001;2(1):1-9.
134. Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, Cox RD. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 2006;55(7):2153-6.
135. Liron T, Raphael B, Hiram-Bab S, Bab IA, Gabet Y. Bone loss in C57BL/6J-OlaHsd mice, a substrain of C57BL/6J carrying mutated alpha-synuclein and multimerin-1 genes. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(1):371-7.
136. Kumar V, Kim K, Joseph C, Kourrich S, Yoo S-H, Huang HC, et al. C57BL/6N mutation in cytoplasmic FMRP interacting protein 2 regulates cocaine response. *Science*. 2013;342(6165):1508-12.
137. Mahajan VS, Demissie E, Mattoo H, Viswanadham V, Varki A, Morris R, et al. Striking immune phenotypes in gene-targeted mice are driven by a copy-number variant originating from a commercially available C57BL/6 strain. *Cell reports*. 2016;15(9):1901-9.
138. Mattapallil MJ, Wawrousek EF, Chan C-C, Zhao H, Roychoudhury J, Ferguson TA, et al. The Rd8 mutation of the *Crb1* gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(6):2921-7.
139. Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, et al. A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science*. 2008;319(5865):958-62.
140. Crawley JN. *What's wrong with my mouse?: behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*: John Wiley & Sons; 2007.
141. Diwan B, Blackman K. Differential susceptibility of 3 sublines of C57BL6 mice to the induction of colorectal tumors by 1, 2-dimethylhydrazine. *Cancer letters*. 1980;9(2):111-5.
142. Kalish S, Lyamina S, Chausova S, Kochetova L, Malyshev Y, Manukhina E, et al. C57BL/6N mice are more resistant to ehrlich ascites tumors than C57BL/6J mice: the role of macrophage nitric oxide. *Medical science monitor basic research*. 2015;21:235.

143. Purtha WE, Swiecki M, Colonna M, Diamond MS, Bhattacharya D. Spontaneous mutation of the Dock2 gene in *Irf5*<sup>-/-</sup> mice complicates interpretation of type I interferon production and antibody responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(15):E898-E904.
144. Euhus DM, Hudd C, Laregina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *Journal of surgical oncology*. 1986;31(4):229-34.
145. Workman P, Aboagye E, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin D, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British journal of cancer*. 2010;102(11):1555-77.
146. Council NR. Guide for the care and use of laboratory animals. 2010.
147. Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, et al. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer research*. 1996;56(18):4096-102.
148. Chiaverotti T, Couto SS, Donjacour A, Mao J-H, Nagase H, Cardiff RD, et al. Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. *The American journal of pathology*. 2008;172(1):236-46.
149. Bianchi-Frias D, Pritchard C, Mecham BH, Coleman IM, Nelson PS. Genetic background influences murine prostate gene expression: implications for cancer phenotypes. *Genome biology*. 2007;8(6):1-15.
150. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer research*. 2002;62(11):3298-307.
151. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *Journal of Experimental Medicine*. 2001;193(6):727-40.
152. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*. 2013;14(10):1014-22.
153. Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$ . *Science*. 2010;330(6005):827-30.
154. Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber J, Egevad L, Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *International journal of oncology*. 2000;17(3):445-96.
155. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. 2004;104(8):2224-34.
156. Satoh T, Saika T, Ebara S, Kusaka N, Timme TL, Yang G, et al. Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing interleukin 12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Research*. 2003;63(22):7853-60.
157. Shimura S, Yang G, Ebara S, Wheeler TM, Frolov A, Thompson TC. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer research*. 2000;60(20):5857-61.

158. Lundholm M, Hägglöf C, Wikberg ML, Stattin P, Egevad L, Bergh A, et al. Secreted factors from colorectal and prostate cancer cells skew the immune response in opposite directions. *Scientific reports*. 2015;5(1):15651.
159. Lindahl C, Simonsson M, Bergh A, Thysell E, Antti H, Sund M, et al. Increased levels of macrophage-secreted cathepsin S during prostate cancer progression in TRAMP mice and patients. *Cancer genomics & proteomics*. 2009;6(3):149-59.
160. Gao J, Ward JF, Pettaway CA, Shi LZ, Subudhi SK, Vence LM, et al. VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nature medicine*. 2017;23(5):551-5.
161. Lo CH, Lynch CC. Multifaceted roles for macrophages in prostate cancer skeletal metastasis. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:247.
162. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental animals*. 2009;58(2):141-9.
163. Huang T-T, Naeemuddin M, Elchuri S, Yamaguchi M, Kozy HM, Carlson EJ, et al. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Human molecular genetics*. 2006;15(7):1187-94.
164. Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA, et al. Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *Journal of neurogenetics*. 2008;22(4):315-31.
165. Matsuo N, Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K, Miyakawa T. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2010;4:29.
166. MacBride MM, Navis A, Dasari A, Perez AV. Mild reproductive impact of a Y chromosome deletion on a C57BL/6J substrain. *Mammalian Genome*. 2017;28(5):155-65.
167. Kajioka EH, Andres ML, Nelson GA, Gridley DS. Immunologic variables in male and female C57BL/6 mice from two sources. *Comparative medicine*. 2000;50(3):288-91.