

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias en
Ciencias de la Vida con orientación en
Biotecnología Marina**

**Interacciones entre los linfocitos T y
el microambiente de la metástasis ósea de cáncer de mama**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Danna Lyn Arellano Rodriguez

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por

Danna Lyn Arellano Rodriguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez



Dra. Clara Elizabeth Galindo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Danna Lyn Arellano Rodriguez © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta **Danna Lyn Arellano Rodriguez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Interacciones entre los linfocitos T y el microambiente de la metástasis ósea de cáncer de mama

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la población femenina y además es una de las principales causas de muerte en la población general. La letalidad es generalmente causada por la generación de metástasis, es decir, cuando el cáncer logra invadir órganos distantes, siendo uno de los principales sitios de metástasis el hueso. Lamentablemente, la metástasis ósea no tiene cura, por lo que es importante estudiar qué factores participan en este proceso para así poder sugerir nuevos tratamientos como la inmunoterapia, la cual consiste en incrementar la activación de los linfocitos T citotóxicos contra las células cancerosas. Sin embargo, se sabe que los linfocitos T tienen actividad osteoclastogénica en artritis reumatoide y que su actividad citotóxica puede ser inhibida por factores como TGF-beta y la hipoxia, ambos presentes en el microambiente de la metástasis ósea. El análisis de los linfocitos T en la metástasis ósea no ha sido explorado debido a que la mayoría de los modelos de metástasis ósea utiliza ratones inmunocomprometidos, los cuales carecen de linfocitos T, para permitir el desarrollo de células humanas. Por lo anterior en el siguiente trabajo se desarrolló una herramienta que permitirá detectar la actividad citotóxica de los linfocitos T citotóxicos además de comenzar a desarrollar un modelo murino singénico de metástasis ósea donde podrá la relación entre los linfocitos T y la metástasis ósea. Se probó la inoculación intracardiaca de células PyMT-R221A en ratón FVB:CIEA y se confirmó que no desarrollan metástasis ósea. Mientras que, la inoculación intratibial de células PyMT-R221A en ratones FVB desarrollo lesiones osteolíticas pero en solo el 23% de los ratones inoculados, por lo que se requieren futuras investigaciones. Por otro lado se transdujeron células de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A para que expresaran la enzima β -galactosidasa, enzima que se puede detectar en ensayos colorimétricos. Se comprobó su utilidad como herramienta para detectar actividad citotóxica al colar a las células PyMT- β gal en contacto con nanopartículas fotosensibles en un gradiente. Finalmente se aislaron linfocitos T citotóxicos de ratón FVB, se activaron *in vitro* y se comprobó su actividad citotóxica sobre las células PyMT- β gal.

Palabras clave: Linfocitos T, cáncer, mama, metástasis ósea, microambiente metástasis ósea, ensayo de citotoxicidad de linfocitos T

Abstract of the thesis presented by **Danna Lyn Arellano Rodriguez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation Marine Biotechnology

Interactions between T cells and the microenvironment of bone metastases of breast cancer

Abstract approved by:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Thesis Director

Breast cancer is the most frequent type of cancer among women while also being one of the main causes of death in the general population. Its lethality is generally caused by the generation of metastasis, when the cancer succeeds in distal organ invasion, being bone one of the main sites for this phenomenon. Regrettably, bone metastasis has no cure, which is why it is important to study which factors participate in this process so that we can propose new treatments like immunotherapy that can be designed to increase the activity of T cells against cancer cells. However it is known that T lymphocytes have osteoclastogenic activity in rheumatoid arthritis, which could increase the development of bone metastases, and that their cytotoxic activity can be inhibited by factors such as TGF- β and hypoxia, both present in the bone metastasis microenvironment. However the role of T cells in bone metastasis is not known since most of breast cancer and bone metastasis models rely on the use of immunosuppressed mice, which lack T lymphocytes. Thus, our investigation aimed to the development of a method to detect T lymphocyte cytotoxic activity while also initiating the development of a bone metastasis syngeneic murine model to analyze the relationship between T lymphocytes and bone metastasis. The successful intracardiac inoculation of murine breast cancer cells PyMT-R221A in FVB:CIEA mice confirmed that these cells do not develop bone metastasis through intracardiac inoculation. On the other hand, intratibial inoculation of PyMT-R221A cells in FVB mice led to osteolytic lesions in only 23% of mice inoculated leading to the requirement of further investigation. PyMT-R221A cells were transduced to express β -galactosidase enzyme allowing the detection of substrate hydrolysis for colorimetric assays. The enzyme's utility was demonstrated as a tool to detect cytotoxic activity when placing PyMT- β gal cells in contact with photosensitive nanoparticles in a gradient. Finally, FVB cytotoxic T lymphocytes were isolated, activated *in vitro* and their cytotoxic activity demonstrated on PyMT- β gal cells.

Keywords: T cells, cancer, breast cancer, bone metastases, T cell cytotoxic activity assay, bone metastasis microenvironment

Dedicatoria

A mi madre quien me ha enseñado que no debo tener miedo a los grandes retos, aunque veces solo ella creía en mí. Gracias mama eres mi mayor inspiración, mi amor eterno.

En memoria de mi Padre que me dio además de sus genes, su amor y un objetivo en la vida, gracias al cual descubrí mi amor por la biología y la investigación.

A mi tío Alfredo al cual le debo su apoyo fundamental para terminar el bachillerato y realizar mi licenciatura, hubiera sido imposible sin usted, muchas gracias.

A mi persona favorita Chipi, gracias a ti por ser mi compañero de vida y apoyarme en cada momento, limpiar mis lágrimas, alimentarme, traducirme todas las atenciones que pudiste darme. Por soportarme Kee Whun Leo Dan Ávila <3.

Agradecimientos

Agradezco a mi director Dr. Pierrick Fournier por sus enseñanzas y su apoyo incondicional. A mis sinodales la Dra. Rosa Mouriño y al Dr. Carlos Brizuela por su tiempo y consejos fundamentales para la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Christopher Wood y al Biol. Felipe Olvera Rodríguez, en el Instituto de Biotecnología, UNAM, quienes me apoyaron con la realización de las radiografías fundamentales para este proyecto.

A la Biol. Deyanira Rodarte Venegas por su apoyo en el desarrollo de análisis histológicos en la Facultad de Ciencias, UABC.

Al M. en C. Prakhar Sengar por permitirme probar las nanopartículas fotosensibles que diseñó para su Doctorado.

Gracias a mis compañeros P&P, Andrea, Prakhar, Fernando, Nayeli, Alejandra, Akhill, Monica, que me apoyaron en labores técnicas. A Rolando, experto en cuidados de ratones, gracias a ti lavar las cajas de ratones se tornaba en algo divertido. Especialmente a Florian quien me ha apoyado como un hermano mayor en la realización de diversas técnicas, por darme varios consejos, apoyo en presentaciones, etc. los cuales fueron muy importantes para el desarrollo experimental.

Gracias al Dr. Luis Donis por su amistad y apoyo incondicional personal y académicamente.

A mis mejores amigas, que no importa cuántos años pasen sé que seremos amigas siempre, Yessica, Alejandra, Cristina, Paloma, Alma y Lissvia.

Gracias a mis compañeros de cubos y laboratorios por transformar la sala de estudiantes y el laboratorio en un lugar cálido y cómodo: Briceida, Aime, Denise, Nayeli, Kee, Andrea, Daniela, Katherine, etc.

A los técnicos de la DIB por su apoyo en el laboratorio Johanna, Samanta y Ricardo.

Agradezco a CICESE por aceptarme como estudiante. Al Departamento de Biología Experimental Aplicada, en particular a la División de Innovación Biomédica por brindarme las herramientas, instalaciones y equipo que me permitieron realizar la Maestría en Ciencias. Agradecer a CONACYT por la beca de manutención con el número de registro 339998.

Tabla de contenido

Resumen.....	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.1.1 Cáncer	1
1.1.2 Cáncer de mama.....	2
1.1.3 Metástasis.....	2
1.1.4 Modelos de cáncer de mama y metástasis ósea	3
1.1.5 Las células de cáncer de mama se dirigen al hueso	4
1.1.6 La metástasis ósea y su ciclo vicioso	5
1.1.7 Linfocitos T en la inmunoterapia y la remodelación ósea	7
1.1.7.1 Inhibición de los linfocitos T	8
1.1.7.2 Linfocitos T en la remodelación ósea	9
1.1.7.3 Los linfocitos T son capaces de preparar nichos pre-metastásicos en el hueso	11
1.1.7.4 Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea	11
1.2 Justificación	12
1.3 Hipótesis	13
1.4 Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivo general	13
1.4.2 Objetivos particulares	14
Capítulo 2. Metodología.....	15
2.1 Reducción de linfocitos T CD4 y/o CD8 por medio de anticuerpos monoclonales	15
2.2 Preparación de células para citometría de flujo.....	15

2.3 Titulación de anticuerpo anti-CD4 PE-Cy5.5.....	16
2.4 Tinción con anticuerpos	16
2.5 Establecer un modelo singénico de metástasis ósea en ratones FVB.....	17
2.6 Cultivo celular	18
2.7 Inoculación intracardiaca de células cancerosas PyMT-R221A.....	20
2.8 Inoculación intratibial de células cancerosas PyMT-R221A	20
2.9 Prueba de la Placa Caliente	21
2.10 Mantenimiento y reproducción de ratones FVB	21
2.11 Colecta y fijación de tejidos.....	22
2.12 Células blanco: células cáncer de mama que expresan β -galactosidasa	22
2.13 Células efectoras: aislamiento de linfocitos T CD8+.....	24
2.13.1 Activación de los linfocitos T <i>in vitro</i>	25
2.13.2 Métodos para detectar la activación de los linfocitos T.....	25
2.13.3 Liberación de β -galactosidasa como método de detección de citotoxicidad no radioactivo.....	26
2.14 Ensayo de citotoxicidad de nanopartículas en células PyMT- β -gal.....	26
2.15 Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8+ en células PyMT- β gal.....	26
Capítulo 3. Resultados	28
3.1 Modelo de reducción de linfocitos T CD4 y/o CD8 por medio de anticuerpos monoclonales	28
3.1.1 Titulación de anticuerpo anti-CD4 PE-Cy5.5.....	28
3.1.2 Estandarización de citometría de flujo	29
3.1.3 Estrategia para identificar subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo	30
3.1.4 Cuantificación de subpoblaciones de Linfocitos T en ratones	31
3.2 Modelo singénico de metástasis ósea en ratones FVB	35
3.2.1 Mantenimiento y reproducción de ratones FVB	35
3.2.2 Cultivo celular	36
3.2.3 Experimento piloto I: inoculación intracardiaca de células PyMT-R221A.....	36
3.2.4 Experimento piloto II: inoculación intratibial de células PyMT-R221A	39
3.2.5 Experimento piloto III inoculación intratibial de células PyMT-R221A	41
3.2.6 Experimento Piloto IV Inoculación intratibial de células PyMT-R221A.....	44
3.2.7 Inoculación subcutánea de células PyMT-R221A en ratones FVB.....	45
3.3 Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T no radioactivo	46
3.3.1 Células blanco: células cáncer de mama que expresan β -galactosidasa	46
3.9.2 Células efectoras: aislamiento de linfocitos T CD8+.....	54

Capítulo 4. Discusiones..... 61

Capítulo 5. Conclusiones 66

Literatura citada 67

Lista de figuras

Figura 1 Ciclo vicioso de la metástasis ósea.....	6
Figura 2 Células progenitoras de ratón deficiente de RANKL (<i>opgl^{-/-}</i>).....	10
Figura 3 Área de osteólisis en Balb/c.....	12
Figura 4 PCR de colonia.....	23
Figura 5 Histograma de los diferentes concentraciones de anticuerpos.....	29
Figura 6 Diagrama de puntos.....	30
Figura 7 Estrategia de selección para la identificación de los linfocitos T CD8 ⁺	31
Figura 8 Cuantificación de linfocitos T CD4 ⁺	32
Figura 9 Cuantificación de linfocitos T CD8 ⁺	33
Figura 10 Cuantificación de linfocitos T CD4 ⁺	34
Figura 11 Cuantificación de linfocitos T CD8 ⁺	34
Figura 12 Tamaño de las camadas.....	35
Figura 13 Células PyMT-R221A.....	36
Figura 14 Pesos (g) de los ratones FVB que recibieron inoculación intracardiaca.....	37
Figura 15 Tiempo de latencia de la prueba del plato caliente.....	37
Figura 16 Supervivencia de los ratones FVB inoculados de manera intracardiaca.....	38
Figura 17 Rayos X de ratones inoculados intracardiaca.....	39
Figura 18 Peso de ratones FVB después de inoculación intratibial.....	40
Figura 19 Tiempo de latencia en pruebas de Placa caliente.....	40
Figura 20 Rayos X de ratones con inoculación intratibial.....	41
Figura 21 Pesos (g) de ratones FVB.....	42
Figura 22 Tiempo de latencia en la prueba de la placa caliente.....	43
Figura 23 Rayos X de ratones con inoculación intratibial.....	43
Figura 24 Peso de ratones inoculados con células PyMT-R221A.....	44

	x
Figura 25 Rayos X experimento piloto IV.....	45
Figura 26 Volumen de tumores subcutáneos de células PyMT-R221A.. ..	46
Figura 27 PCR de colonia.....	47
Figura 28 Fluorescencia de células transducidas.....	48
Figura 29 Porcentaje de las células con expresión de eGFP.	48
Figura 30 Transfección I de células MDA-MB-231.	49
Figura 31 pLJM1-LacZ presenta una mayor cantidad de beta-galactosidasa.	50
Figura 32 Transfección II: células PyMT-R221A.	51
Figura 33 Ensayo β -galactosidasa en PyMT-R221A.. ..	52
Figura 34 Curva cinética de β -galactosidasa.....	52
Figura 35 Diferencias en las poblaciones de células transducidas.. ..	53
Figura 36 Selección por puromicina (2g/mL).	54
Figura 37 Primer aislamiento de linfocitos T CD8+.....	54
Figura 38 Aislamiento de linfocitos T CD8+.....	55
Figura 39 Aislamiento de linfocitos CD8+.....	55
Figura 40 Aislamiento de linfocitos T CD8+.....	56
Figura 41 Activación <i>in vitro</i> de linfocitos T.....	57
Figura 42 Densidad óptica del ensayo MTT.. ..	57
Figura 43 Expresión relativa de IFN-gamma.....	58
Figura 44 Análisis de citotoxicidad, por liberación de β -galactosidasa y ensayo de viabilidad.....	59
Figura 45 Porcentaje de lisis celular.....	60

Lista de tablas

Tabla 1 Fluorocromos, longitud de onda de emisión y el filtro de Attune que lo captura.....	17
Tabla 2 Concentración de anticuerpos y porcentaje de células detectadas por citometría de flujo.	28
Tabla 3 Tabla de metástasis.....	38
Tabla 4 Grupos experimentales experimento piloto II	42

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

La metástasis ósea tiene grandes efectos perjudiciales en la salud de los pacientes y los únicos tratamientos disponibles en la actualidad son tratamientos paliativos, es decir que reducen los síntomas sin curar la enfermedad.

Los tratamientos con bifosfonatos y Denosumab (anticuerpo anti-RANKL) antiresortivos, con lo que se disminuyen la progresión de la metástasis ósea sin aumentar la supervivencia de los pacientes con metástasis ósea de cáncer de mama (Body *et al.*, 1998). Por lo tanto existe una necesidad de desarrollar de nuevas terapias que combatan la metástasis ósea. Una alternativa podría ser la inmunoterapia, ya que en otros tipos de cáncer ya tiene prometedores avances (Blattman y Greenberg, 2004).

La gran meta de la inmunoterapia del cáncer es restaurar o incrementar la habilidad del sistema inmune de reconocer y eliminar células de cáncer *in vivo* (Blattman y Greenberg, 2004). Las células cancerosas tienen la habilidad de esconderse o inhibir al sistema inmune. Por esta razón se requiere continuar con el estudio de las interacciones que se llevan a cabo entre el microambiente de la metástasis ósea y el sistema inmune, en la búsqueda de blancos terapéuticos.

1.1.1 Cáncer

El cáncer tiene gran relevancia en la salud mundial, para el año 2012 se reportaron 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes a causa de cáncer alrededor del mundo (Globocan, 2015). El cáncer es un grupo de enfermedades, en las cuales las células normales se transforman por diferentes causas y diferentes mecanismos moleculares. Sin embargo, las células cancerígenas comparten las siguientes características: el potencial ilimitado de proliferación, la insensibilidad a los inhibidores de crecimiento, la evasión de la muerte programada, la activación de la invasión y metástasis, evasión del sistema inmune, entre otras, son conocidos como los marcadores del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000).

1.1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo, con respecto a los casos nuevos de cáncer en 2012. Es por mucho el más frecuente entre las mujeres, con un estimado de 1.67 millones de casos, lo cual representa el 25% de los casos nuevos diagnosticados en el 2012 (Globocan, 2015).

En México, el cáncer de mama representa el 24.8% de los 82,445 casos nuevos de cáncer reportados en la población femenina, según las estadísticas publicadas en Globocan en 2012. Además, el cáncer de mama causó el 14.2% de las 40,053 muertes en mujeres por cáncer en México (Globocan, 2015). Un diagnóstico tardío, es decir, en etapas avanzadas se correlaciona con una tasa reducida de supervivencia. En países de Latinoamérica, como México, Colombia y Perú un alto porcentaje (entre el 40-50%) de los casos de cáncer de mama son diagnosticados en etapas metastásicas (en etapas III y IV) (Justo *et al.*, 2011). Mientras que en el Norte de Europa, los diagnósticos tardíos representan solo el 10% de los casos de cáncer de mama (Justo *et al.*, 2011).

1.1.3 Metástasis

Una característica de todos los tipos de cáncer en etapas avanzadas es que generan metástasis. La metástasis se define como la migración y proliferación de las células tumorales en órganos distantes. La causa responsable de la mayoría de las muertes por cáncer es la metástasis, incluso con mayor frecuencia que por tumor primario (Chambers *et al.*, 2002). El desarrollo de metástasis no es un proceso sencillo. La diseminación de las células de un tumor sólido hacia otros órganos del cuerpo es un proceso difícil e ineficiente para las células. Se estima que solo el 0.01% de las células cancerosas circulantes en sangre logran metastatizar a órganos distantes (Fidler, 1970). A pesar de que la diseminación de las células cancerosas puede ser ineficiente, ésta no es aleatoria, se estima que el 70% de pacientes con cáncer de mama progresivo y el 84% de pacientes con cáncer de próstata desarrollarán metástasis ósea (Coleman, 2001). Para el cáncer de mama, los principales sitios son hueso, pulmón y cerebro.

Desde el siglo XIX, Sir Stephen Paget observó la preferencia que existe por algunos órganos viscerales y los huesos como sitio de metástasis y formuló la teoría de “la semilla y el suelo”, la cual nos dice que las células cancerosas serán la semilla exitosa en el nuevo órgano (el suelo) solo si están propiamente adaptadas para este suelo (Paget, 1889). Esta teoría, basada en el análisis de más de 900 informes de autopsia, ha sido

reforzada por estudios que demuestran que las células tumorales adquieren un perfil específico de expresión genética, que definen la capacidad de las células cancerosas para metastatizar y proliferar a tejidos específicos como hueso, pulmones o cerebro (Kang *et al.*, 2003).

1.1.4 Modelos de cáncer de mama y metástasis ósea

Los modelos de metástasis ósea *in vivo* han tenido una gran importancia para la comprensión de este fenómeno y para el desarrollo de los tratamientos paliativos en la terapia para la misma (Wright *et al.*, 2016). A diferencia de la osteoporosis, enfermedad para la cual la experimentación *in vivo* se puede representar con un solo modelo aprobado por la FDA, en ratones o ratas ovariectomizadas (Thompson *et al.*, 1995), los modelos para metástasis ósea de cáncer de mama son variados y la selección del modelo dependerá de la pregunta que quiera resolver el investigador. Sin embargo, no existe un modelo murino perfecto que pueda representar todas las etapas de la enfermedad que se presenta en los pacientes con metástasis ósea de cáncer de mama. Sería un ratón con que desarrolla naturalmente un tumor mamario y que genera espontáneamente metástasis ósea sistemáticamente. Desafortunadamente éste modelo no existe. Existen modelos con ratones transgénicos que generan tumores mamarios espontáneamente, en ratones MMTV-PyMT o MMTV-Neu (Kim y Baek, 2010) y tumores de próstata en ratones LADY, pero no se desarrollan metástasis ósea en estos ratones o se desarrollan con incidencia muy baja (<10%) (Masumori *et al.*, 2001). La inoculación de células cancerosas (i.e., 4T1) en el tejido mamario puede representar la primera etapa partiendo del tumor primario. Sin embargo, por la cualidad metastática de estas células, generan metástasis viscerales, principalmente en pulmón con lo que la esperanza de vida del ratón se reduce considerablemente, y nos limita el tiempo experimental para un buen desarrollo de metástasis ósea (Pulaski *et al.*, 2001). Esta problemática se resolvió inoculando las células cancerosas por otra vía, ya sea intracardiaca, intravenosa o intratibial (Wright *et al.*, 2016).

Con una inoculación intracardiaca nos permite analizar procesos como la migración, el establecimiento, la proliferación en ciertos tejidos y las interacciones entre las células cancerosas y las células normales. Mientras que con una inoculación intratibial nos permite analizar solamente la proliferación y la interacción entre tumor y hueso, ambos representan estados avanzados de la metástasis ósea.

Los modelos también pueden variar, si las células de cáncer de mama provienen de humano sería un modelo xenógrafo y si las células de cáncer de mama provienen de ratón (de una cepa endogámica) sería

un modelo Singénico. Los modelos xenógrafos son ratones que tienen un sistema inmune deficiente (ratones desnudos, SCID, Rag1^{-/-}, Rag2^{-/-}, o NOD SCID IL2Rg^{-/-}), para que esto permita el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama de humano (MDA-MB-231). Mientras que un modelo singénico son ratones normales, con un sistema inmune funcional, los cuales son inoculados con células de cáncer de mama de ratón de la misma cepa de la que se aislaron. Por ejemplo, la línea celular de cáncer de mama 4T1 fue aislada de un ratón Balb/c y se inoculan y forman tumores en ratones Balb/c, o la línea celular de cáncer de mama PyMT que fue aislada de un ratón FVB. Ambos modelos permiten analizar diferentes etapas de la metástasis ósea de cáncer de mama. Una ventaja que brindan los modelos singénico es que permiten observar la interacción de un sistema inmune normal con las células tumorales en el hueso (Wright *et al.*, 2016).

1.1.5 Las células de cáncer de mama se dirigen al hueso

Estos modelos hicieron posible identificar los factores del 'suelo', hipotetizados por Paget, responsables por el alojamiento preferencial de líneas celulares de cáncer de mama hacia tejidos como pulmón y nódulos linfáticos; que tiene moléculas quimio atrayentes órgano-específicas (Moore, 2001; Müller *et al.*, 2001). Una molécula quimio atrayente es la citocina CXCL12, la cual es expresada en nódulos linfáticos, pulmón, hígado y medula ósea, órganos en los cuales el cáncer de mama metastatiza frecuentemente (Müller *et al.*, 2001). El receptor de ésta citocina es el CXCR4 que se encuentra altamente expresado en células malignas de cáncer de mama. La expresión del receptor CXCR4 por las células de cáncer de mama se relaciona con la eficiente migración e invasión inducida por CXCL12, es concebible que las interacciones CXCL12/CXCR4 contribuyan a la infiltración de las células de cáncer de mama a la medula ósea (Müller *et al.*, 2001). En ratones deficientes para CXCL12 o con células tumorales que no expresan CXCR4, se comprobó que la cantidad de metástasis se redujo. Por lo tanto las interacciones CXCR4/CXCL12 son vitales para la metástasis a medula ósea (Müller *et al.*, 2001). Sin embargo, la sola inhibición de estos quimio receptores *in vivo*, no es suficiente para bloquear totalmente el comportamiento metastásico de las células de cáncer de mama (Müller *et al.*, 2001).

RANKL que se encuentra altamente expresado en el ambiente del hueso podría ser uno de los factores del 'suelo', que favorece la migración de las células cancerosas al hueso (Lacey, 1998; Jones *et al.*, 2006). Jones y colaboradores (2006) reportaron haber detectado una marcada expresión del receptor RANK en un gran número de muestras de tumores primarios de mama, en células cancerosas presentes en metástasis de

los nódulos linfáticos y también en líneas celulares de cáncer de mama y próstata humanas, que preferencialmente metastatizan ahueso. Por lo que se sugiere que RANKL tiene un papel importante induciendo un comportamiento metastásico en las células cancerosas, activando la migración celular y la metástasis tejido-específico (Jones *et al.*, 2006).

1.1.6 La metástasis ósea y su ciclo vicioso

Una vez que las células de cáncer de mama metastatizan a hueso, ellas provocan el desbalance de la remodelación ósea, causando diversas complicaciones como lo son: fracturas patológicas, dolor, o compresión de los nervios de discos lumbares, entre otros (Coleman, 2001).

El metabolismo óseo se caracteriza por estar en constante remodelación, el cual normalmente se mantiene en un ajustado balance entre la resorción del hueso viejo o dañado y la formación de hueso nuevo (Christenson, 1997). Se estima que en los humanos, es remodelado ~10% del total de masa ósea al año (Theill *et al.*, 2002). Estos procesos se llevan a cabo por dos tipos de células: los osteoblastos y los osteoclastos, los cuales provienen de diferentes linajes celulares y procesos de maduración. Los osteoclastos se diferencian a partir de células madres hematopoyéticas y son los responsables de la resorción ósea degradación de hueso. Por otro lado los osteoblastos provienen de células madres mesenquimales y están encargados de la síntesis de matriz ósea o producción de hueso (Ross, 2000; Roodman, 1999).

La metástasis ósea puede causar dos tipos de lesiones: lesiones osteoblásticas o lesiones osteolíticas. Las lesiones osteoblásticas son características de cáncer de próstata. Éstas lesiones son causadas por el exceso de actividad de los osteoblastos que genera una formación anormal del hueso (Kozlow y Guise, 2005). En cáncer de mama las lesiones osteolíticas se caracterizan por un incremento en la actividad de los osteoclastos y consecuentemente la destrucción del hueso (Kakonen *et al.*, 2003; Kingsley *et al.*, 2007). En cáncer de mama las lesiones osteolíticas se encuentran en el 80% de los pacientes con enfermedad metastática en etapa IV (etapa avanzada, cuando ya invadió otros tejidos) (Kozlow y Guise, 2005). Ésta diferenciación es de los dos extremos de las lesiones óseas, ya que existen análisis morfológicos que han revelado que la mayoría de los pacientes con metástasis ósea presentan los dos tipos de lesiones (Mundy, 2002).

El desbalance en la remodelación ósea puede surgir a partir de una gran variedad de causas, entre ellas se encuentran los cambios hormonales o perturbaciones en los factores de crecimiento y factores inflamatorios (Theill *et al.*, 2002). La resorción ósea depende de la activación de los osteoclastos, la cual está mediada por RANKL y su receptor RANK. RANKL es un factor crítico para la diferenciación de los osteoclastos y es altamente expresado en el ambiente de la medula ósea (Lacey, 1998).

Las células de cáncer de mama pueden liberar factores como la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Yin *et al.*, 1999), RANKL (Van Poznak *et al.*, 2006), IL-8 (Singh *et al.*, 2007), IL-11 (Kang *et al.*, 2005), que contribuyen al aumento de la resorción ósea. El hueso es una fuente de TGF- β ya que es altamente producido por los osteoblastos y se encuentra embebido en la matriz ósea (Korpal *et al.*, 2009). Es liberado y activado en el microambiente de la metástasis ósea, la cantidad de TGF- β es más alta en lesiones osteolíticas comparadas con lesiones no osteolíticas (Korpal *et al.*, 2009). Además de TGF- β (Gorsch *et al.*, 1992), también son liberados el factor de crecimiento insulínico uno y dos (IGF-I/-II) (Jackson *et al.*, 2001) (Figura 1). Estos factores favorecen la proliferación de las células cancerosas y promueve un fenotipo más agresivo (Kingsley *et al.*, 2007) que incrementa la resorción ósea, generando un ciclo vicioso. Por lo tanto los factores que favorecen la resorción ósea directa e indirectamente favorecen la metástasis ósea.

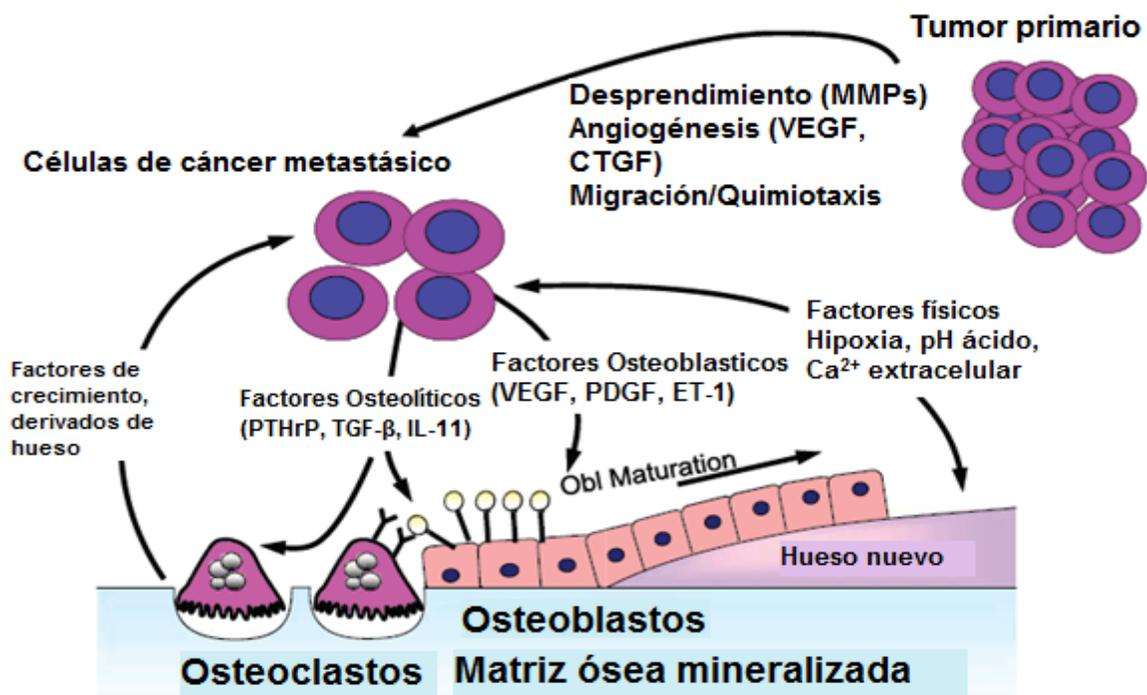


Figura 1 Ciclo vicioso de la metástasis ósea. Una vez que las células metastatizan a hueso, liberan factores osteolíticos y osteoblásticos, favoreciendo la resorción ósea liberando factores de crecimiento que promueven el desarrollo de las células cancerosas.

Los tratamientos que se utilizan en pacientes con metástasis ósea son quimioterapias, radioterapias y tratamientos anti-resortivos, es decir que inhiben la resorción ósea para prevenir la liberación de factores de la matriz ósea. Rompiendo así el ciclo vicioso. Un ejemplo de tratamiento anti-resortivo es el uso de bifosfonatos entre ellos el clodronato y el ácido zoledrónico, debido a su estructura química se fijan en la matriz ósea donde son internalizados por los osteoclastos, causando alteraciones en los procesos bioquímicos de la resorción ósea (Rogers *et al.*, 1997). Otro tratamiento anti-resortivo es el anticuerpo monoclonal anti-RANKL, Denosumab, que funciona inactivando el RANKL, de esta manera impiden la diferenciación y activación de los osteoclastos (Stopeck *et al.*, 2010). Lamentablemente se han reportado efectos adversos con el uso de tratamientos anti-resortivos, como la hipocalcemia y la presencia de necrosis en la mandíbula (Marx *et al.*, 2003; Stopeck *et al.*, 2010).

Al disminuir la resorción ósea, se disminuye la pérdida ósea y las complicaciones asociadas a la metástasis ósea. Sin embargo, este es un tratamiento paliativo, no es una cura, las células cancerosas siguen en el hueso y se tratan solo los síntomas. Debido a esto es importante comenzar a buscar nuevas rutas terapéuticas, por ejemplo la inmunoterapia con la cual se han logrado grandes avances en otros tipos de cáncer como melanoma (Callahan y Wolchok, 2013). La inmunoterapia consiste en el uso de las células del sistema inmune del paciente como los linfocitos T, para eliminar las células cancerosas. Sin embargo, las células cancerosas y el microambiente tumoral pueden inhibir a los linfocitos T y la respuesta inmune. Además algunos estudios demuestran que los linfocitos T son capaces de activar la resorción ósea y así incrementar la metástasis ósea.

1.1.7 Linfocitos T en la inmunoterapia y la remodelación ósea

Los linfocitos T son parte del sistema inmune adaptativo y cumplen diferentes funciones de protección. Pueden separarse en dos subpoblaciones caracterizadas por la presencia de las proteínas de clúster de diferenciación en CD4 o CD8. Los linfocitos T CD4⁺ o cooperadores, que dependiendo del antígeno presentado con Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II pueden expresar diferentes citocinas que pueden generar diversas respuestas: como activación de macrófagos, inducir la inflamación o la activación de otros linfocitos T o B. Los linfocitos CD8⁺ o citotóxicos se activan al unirse a una célula que presente MHC de clase I, en respuesta a patógenos intracelulares o aberraciones y su función es inducir muerte celular en la célula infectada (Abbas y Lichtman, 2012).

1.1.7.1 Inhibición de los linfocitos T

Las células cancerosas acumulan diversas mutaciones presentando neoantígenos que el sistema inmune y los linfocitos T podrían reconocer. Sin embargo, una de las características que permite el desarrollo del cáncer es la evasión del sistema inmune (Blank *et al.*, 2016). Por lo tanto la inmunoterapia en cáncer debe atacar a las estrategias que utiliza el cáncer contra el sistema inmune. Esto puede variar entre tipos de cáncer y entre pacientes, por ejemplo, algunos tumores no presentan mutaciones suficientes para generar nuevos antígenos y una activación importante del sistema inmune, mientras que otros tumores son capaces de inhibir activamente a los linfocitos T antitumorales, por lo que las estrategias terapéuticas deben adaptarse a cada caso, siendo el último fin, la activación de los linfocitos T (Blank *et al.*, 2016).

Para que un tumor sea reconocido como ajeno por el sistema inmune requiere la presentación de antígenos en el MHC de clase I y II. La presentación de neoantígenos, se debe a la síntesis de proteínas aberrantes o neoantígenos producto de proteínas mutantes o virales. Los linfocitos T reconocerán éstos antígenos gracias a su Receptor de células T (TCR), induciendo su activación y teóricamente la eliminación de las células cancerosas. Sin embargo, la activación de los linfocitos T está modulado por “checkpoints” uno de ellos es el antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) o la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) (Blank *et al.*, 2016). Las células cancerosas son capaces de usar éstos “checkpoints” para prevenir la activación de los linfocitos T. Por ésta razón la inmunoterapia en cáncer cuenta con la estrategia del bloqueo de éstos “checkpoints” (Callahan y Wolchok, 2013). El primero fue el Ipilimumab, anticuerpo monoclonal específico, cuya función es inhibir al CTLA-4, éste tratamiento fue aprobado en 2010 por la FDA de los Estados Unidos de América, por presentar un aumento en la supervivencia a largo plazo del 18% de los pacientes con melanoma metastásico que sobrevivieron por más de dos años (Pardoll, 2012).

También se debe considerar el metabolismo tumoral, las células cancerosas modifican sus rutas metabólicas produciendo altas cantidades de ácido láctico, el cual se relaciona con un bajo pH local, generando un microambiente que es capaz de inhibir las funciones de los linfocitos T, en este caso se puede detectar altas cantidades de lactato deshidrogenasa (LDC) en suero sanguíneo de pacientes con melanoma y se relaciona con un mal pronóstico para el tratamiento con bloqueadores de los inhibidores CTLA-4 y PD-1 (Blank *et al.*, 2016).

Otra posible barrera contra la inmunoterapia es la interacción que existe entre el área tumoral con otras células del sistema inmune. Las células mieloides inmunosupresoras son un componente importante para

que el cáncer logre evadir la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ (Corzo *et al.*, 2010). Otro factor es la variabilidad que existe entre pacientes, por ejemplo un estudio en ratones demostró que el efecto del bloqueo del CTLA-4 depende de la microbiota. Los tumores de ratones libres de gérmenes o bajo el uso de antibiótico no responden a la inhibición del CTLA-4, pero este efecto se restauró tras la inmunización con polisacáridos de diferentes especies de *Bacteroidales* (Vétizou *et al.*, 2015). A pesar de que la inmunoterapia en cáncer tiene grandes avances, las células cancerígenas tienen diversas estrategias para inhibir o protegerse del sistema inmune, por esta razón se requiere más investigación en la relación del sistema inmune con el cáncer en metástasis ósea antes de considerar a la inmunoterapia como terapia para la metástasis ósea.

1.1.7.2 Linfocitos T en la remodelación ósea

Está reconocido que puede haber pérdida local de huesos asociada con infección, inflamación y trastornos autoinmunes. Sin embargo, recientemente se reconocieron a los linfocitos T y sus productos como reguladores clave de la formación, activación y esperanza de vida de los osteoclastos y los osteoblastos (Weitzmann y Pacifici, 2005). Antes se pensaba que los linfocitos T no afectaban en el metabolismo óseo, demostrado en los ratones que no tienen linfocitos T (desnudos) y tienen huesos normales. Sin embargo, han surgido nuevos estudios que han demostrado que los linfocitos T pueden afectar el hueso en condiciones patológicas.

In vitro, los linfocitos T de ratones que fueron ovariectomizados producen un incremento en la cantidad de factor de necrosis tumoral (TNF) e incrementa la formación de osteoclastos mediada por RANKL (Roggia *et al.*, 2001). Un modelo *in vivo* de osteoporosis con ratones que fueron ovariectomizados presentan pérdida ósea (Roggia *et al.*, 2001), lo cual no ocurre en ratones desnudos, deficientes de linfocitos T, pero se restaura la pérdida ósea al transferirles linfocitos T de ratones *tipo silvestre*.

Kong y colaboradores (2000) señalan que los linfocitos T activos, pueden directamente disparar la osteoclastogénesis por medio de la expresión de RANKL. Ambos tipos de RANKL, soluble y asociado a membrana es producido por linfocitos T activados tanto CD4+ como CD8+. Compararon la capacidad de RANKL soluble o en membrana para inducir osteoclastogénesis *in vivo*. Con células precursoras hematopoyéticas extraídas de la médula ósea de un ratón tipo silvestre fueron co-cultivadas con linfocitos T CD4+ activados, fijados con paraformaldehído o cultivados con el sobrenadante de los cultivos de linfocitos T activados. Ambos RANKL soluble o asociado a membrana favoreció la osteoclastogénesis *in vitro* (Kong *et al.*, 2000). La osteoclastogénesis fue bloqueada en ambos casos por la presencia de OPG inhibidor de RANKL. Los linfocitos T de un ratón *tipo silvestre* inducen la formación de osteoclastos positivos para fosfatasa ácido tartrato resistente (TRAP+) en células progenitoras de ratones que carecen de RANKL (*opgl*^{-/-}) (Kong *et al.*, 2000)

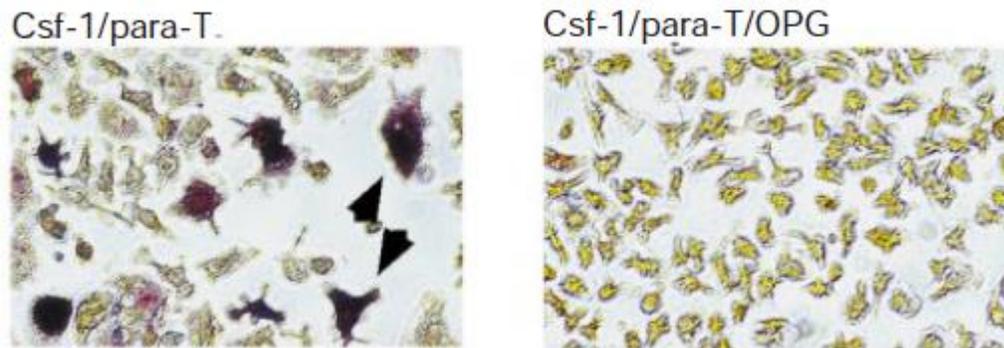


Figura 2 Células progenitoras de ratón deficiente de RANKL (*opgl*^{-/-}), (izquierda) cultivadas con factor estimulador de colonias (Csf-1) y con linfocitos T CD4+ fijados con paraformaldehído (para-T) positivos para TRAP indicado con flechas negras y células de ratón *opgl*^{-/-} en presencia de linfocitos T fijados y OPG (inhibidor de RANKL) Fuente: Kong *et al.*, 2000).

El efecto osteoclastogénico de los linfocitos T puede también ser indirecto, a través de la producción de IL-17. La IL-17 fue detectada en pacientes de artritis reumatoide como un potente estimulador de osteoclastogénesis (Kotake *et al.*, 1999). La IL-17 facilita la inflamación local, reclutando y activando las células del sistema inmune, que genera una abundancia de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 (Dong, 2006; Weaver *et al.*, 2006). La IL-1, y el TNF- α estimulan la expresión del gen RANKL en osteoblastos (Hofbauer *et al.*, 1999). Los osteoblastos que expresen RANKL son capaces de activar a los osteoclastos.

1.1.7.3 Los linfocitos T son capaces de preparar nichos pre-metastásicos en el hueso

Monteiro y colaboradores (2013) observaron que los linfocitos T aislados de ratones con tumores de células 4T1 (cáncer de mama murino) aumentan la formación de osteoclastos y la resorción ósea. Para determinar cómo los linfocitos T afectan la osteoclastogénesis, utilizaron *short hairpin* RNA (shRNA) específicos para silenciar la expresión de RANKL e IL-17F en linfocitos T que fueron colectados de nódulos linfáticos de ratón con tumor de células 4T1. Cuando se silenció RANKL pero no IL-17F, se redujo la osteoclastogénesis, indicando que RANKL derivado de los linfocitos T tiene un papel mayor en el proceso (Monteiro *et al.*, 2013). Las células de cáncer de mama pueden activar a linfocitos T. Una vez activados los linfocitos T generan un nicho pre-metastásico, por medio de la secreción de RANKL, al aumentar la resorción ósea y así favorecen el establecimiento de las células cancerosas en el hueso (Monteiro *et al.*, 2013).

1.1.7.4 Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea

De acuerdo a los antecedentes, los linfocitos T incrementan la resorción ósea, por lo tanto podrían favorecer el desarrollo de la metástasis ósea. En un experimento preliminar, el cual constó de la inoculación de células de cáncer de mama 4T1 en ratones Balb/c y Balb/c SCID (inmunodeficientes), las células desarrollaron metástasis ósea, con lesiones osteolíticas detectables por radiografías (Datos no publicados). Al compararse por radiografía el desarrollo de metástasis ósea en ratones normales Balb/C con Balb/C SCID, se muestra que los ratones Balb/C tienen un aumento en la destrucción ósea (Figura 3a) y una diferencia significativa ($P < 0.001$) de osteoclastos en la interface entre el tumor y el hueso (Figura 3c).

Debido a que los ratones SCID carecen de linfocitos T y B, se probó entonces si la reducción específica de linfocitos T tenía un efecto similar. Los ratones Balb/c que recibieron un tratamiento de anticuerpos anti CD4 y anti CD8 generaron una reducción de linfocitos T exitosa y éstos presentaron un área de osteólisis menor, en comparación con los ratones del grupo control (Figura 3b). Estos resultados sugieren que los linfocitos T contribuyen al incremento de la metástasis ósea.

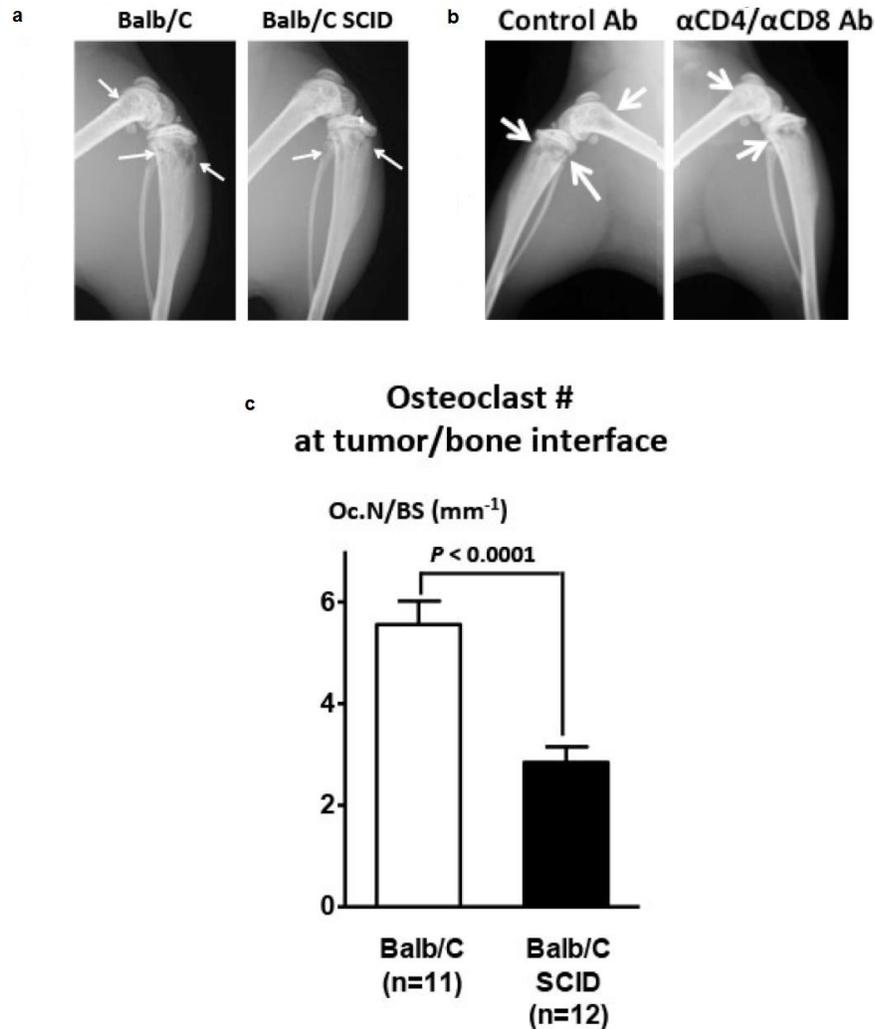


Figura 3 Mayor osteólisis en Balb/c. (a) RX metástasis ósea Balb/c vs Balb/c SCID. (b) Lesiones óseas de Balb/c reducción de linfocitos CD4 y CD8 o control. (c) Gráfica de cantidad de osteoclastos en área tumoral de Balb/c y Balb/c SCID. Fuente: Datos no publicados, Fournier PGJ.

1.2 Justificación

El tratamiento actual para la metástasis ósea es muy limitado, es por eso que se requiere el esfuerzo en el análisis de los mecanismos celulares con el fin de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas como la inmunoterapia. De igual manera que es crítico comprender de qué manera los linfocitos T pueden afectar a la metástasis ósea, y entender el efecto del microambiente de la metástasis ósea sobre los linfocitos T. Para de esta manera determinar si el microambiente de la metástasis ósea podría afectar la eficiencia de la inmunoterapia.

Los linfocitos T pueden incrementar la osteoclastogénesis en patologías, por lo tanto puede incrementar la metástasis ósea. La mayoría de los modelos de metástasis ósea estudian células humanas en ratones inmunodeficientes (i.e. atímico *nu/nu*, ratón SCID con severa inmunodeficiencia) por lo que estos modelos son inapropiados para el estudio del papel de los linfocitos T (Fournier *et al.*, 2006). Por lo que el uso de modelos singénicos con ratones inmunocompetentes permitirán analizar un modelo *in vivo* más representativo de la interacción entre los linfocitos T y la metástasis ósea que ocurre en pacientes con cáncer de mama.

De acuerdo a nuestros antecedentes, la metástasis ósea podría afectar la función de los linfocitos T, y los linfocitos T podrían favorecer la metástasis ósea por lo que se requiere más investigación para considerar qué efectos podría tener la inmunoterapia en la metástasis ósea. Para conocer el efecto que tiene la metástasis ósea en la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8, es importante generar herramientas no radioactivas para poder realizarlo en las condiciones presentes en el laboratorio del Departamento de Innovación Biomédica.

1.3 Hipótesis

La inoculación de células de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A en ratones FVB generará metástasis ósea, constituyendo un buen modelo singénico para estudiar el efecto de los linfocitos T CD8 y CD4 en la metástasis ósea.

La liberación de la enzima β -galactosidasa por las células cancerosas PyMT-R221A es una buena alternativa no radioactiva para evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Desarrollar y evaluar un método de eliminación de linfocitos T en un modelo singénico de metástasis ósea y un método no radioactivo de análisis de citotoxicidad de linfocitos T.

1.4.2 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones para la reducción de linfocitos T CD4+ y CD8+ por medio de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 en ratón FVB.
- Establecer un modelo singénico de metástasis ósea en ratones FVB por inoculación de células de cáncer de mama PyMT-R221A.
- Establecer las condiciones para realizar un ensayo de citotoxicidad de linfocitos T, generando un método no radioactivo, para analizar los efectos de la metástasis ósea en la capacidad citotóxica de los linfocitos T.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Reducción de linfocitos T CD4 y/o CD8 por medio de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8

La reducción *in vivo* de linfocitos T CD4+ y/o CD8+ se realizó por medio de tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD4 de hibridoma de rata GK1.5 (IgG2b) y anti-CD8 proveniente de hibridoma de rata 2.43 (Kruisbeek, 2001). Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 100µg o 75µg de anti-CD4 y anti-CD8 y uno con anticuerpo control (IgG2). La reducción puede verificarse por medio de citometría de flujo. La condición de reducción es mantenida por medio de inyecciones de anticuerpos monoclonales con intervalos de tres días (Kruisbeek, 2001).

Dos días previos al tratamiento se les extrajo sangre periférica por medio de punción retroorbital para analizar las cantidades normales de linfocitos T. Se inyectaron tres ratones FVB adultos intraperitonealmente con 100 µg o 75 µg de ambos anticuerpos (anti-CD4 y anti-CD8) o con el anticuerpo control. Posteriormente se colectaron muestras de 75 µL aprox. de sangre periférica, por medio de punción retroorbital (los días +2,+4, +7 y +15) y células de la medula ósea de fémur y tibia (el día +15). La técnica de reducción de linfocitos (CD4 y/o CD8) se considera exitosa si en el análisis se obtiene una reducción >95% cuantificada por citometría de flujo.

2.2 Preparación de células para citometría de flujo

Al obtener muestras frescas de sangre, bazo, se mantuvieron en hielo y se realizó una suspensión celular. Se eliminaron los eritrocitos por medio de una solución de lisis de eritrocitos (155mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 1mM EDTA), la cual fue neutralizada dos minutos después con solución amortiguadora de aislamiento (PBS 1X, BSA 0.1%, EDTA 2mM). Se centrifugó (350 g, 8 min, 4°C) y se resuspendió el paquete celular en un volumen pequeño de solución amortiguadora de aislamiento.

2.3 Titulación de anticuerpo anti-CD4 PE-Cy5.5

Se realizó la titulación de anticuerpo anti-CD4-PE-Cy5.5 para determinar la cantidad mínima necesaria para observar a la población de linfocitos T CD4⁺. Las células de bazo, el tejido fue macerado en 2 mL de solución amortiguadora de aislamiento y se continuó de acuerdo al protocolo previo. Se colocaron 500,000 células en 5 tubos distintos. A los cuales se les agregaron diferentes concentraciones de anticuerpos, la que se utiliza actualmente es 64.5ng para 10⁶células. Así que comenzamos con 32.25 ng para medio millón de células, y se continuó con diluciones seriadas, la siguiente fue 15.6 ng, 7.8 ng y la más baja 3.9 ng.

2.4 Tinción con anticuerpos

La técnica de inmunofenotipado nos permitirá diferenciar a los linfocitos por la presencia en proteínas de membrana específicas para cada subpoblación, por ejemplo todos los linfocitos T son positivos para CD3 y los linfocitos T CD4 son positivos para CD3, CD4 y CD8 negativos (CD3+, CD4+, CD8-). Mientras que los linfocitos T CD8 son CD3 positivos, CD4 negativos y CD8 positivos (CD3+, CD4-, CD8+). La cantidad de linfocitos T CD4+ y CD8+ será cuantificada por citometría de flujo con un Attune Acoustic Focusing Cytometer (LifeTechnologies).

Se utilizan anticuerpos monoclonales de rata anti CD16/32, para evitar una unión inespecífica, bloqueando la interacción entre los receptores CD16/32 con la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos. Se agrega suero de rata a la reacción para bloquear uniones no específicas a los anticuerpos de rata.

Cuando se utilizan más de dos fluorocromos en la misma muestra, se requiere hacer una compensación, donde se coloca una muestra con solo uno de los anticuerpos unidos a fluorocromo por tubo, en este caso uno para APC, uno para FITC y otro para PE Cy5.5.

Tabla 1 Fluorocromos, longitud de onda de emisión y el filtro de Attune que lo captura.

Fluorocromos	Emisión (nm)	Filtro de Attune (nm)
FITC (Isocianato de fluoresceína)	520	530/30
APC (Aloficocianina)	662	660/20
PE Cy5.5 (Ficoeritrina)	695	690/50

Debido a la escasa interferencia que hay entre estos fluorocromos se escogió la combinación: Anti-CD3-APC, que se unirá a los linfocitos T de ratón. Anti-CD4-PE Cy5.5, que se unirá a linfocitos T CD4 positivos. Anti-CD8-FITC, que se unirá a los linfocitos T CD8 positivos.

Una vez preparadas las células para citometría se llevó a cabo la tinción con los anticuerpos, se incubaron por 40 min a 4°C, después se lavaron con solución amortiguadora de aislamiento y el paquete celular se resuspendió en 300 µL de solución amortiguadora de aislamiento.

2.5 Establecer un modelo singénico de metástasis ósea en ratones FVB por inoculación de células de cáncer de mama PyMT-R221A

La línea celular PyMT-R221A se deriva de tumor mamario de un ratón FVB transgénico. El cual presentó tumores espontáneos en las mamas, por medio de la expresión de antígeno medio T de Poliomavirus (PyMT Polyomavirus Middle T Antigen) bajo el control del promotor del virus del tumor mamario de ratón (mouse mammary tumor virus MMTV). Esta línea es un modelo de tumorigénesis mamario en el cual antígeno medio T actúa como un potente oncogén en el epitelio mamario y las células cancerosas que lo expresan poseen un potencial metastásico (Guy *et al.*, 1992). Las células de cáncer de mama PyMT-R221A fueron aisladas de un ratón FVB transgénico MMTV-PyMT. Se reporta que la inoculación intratibial de células PyMT en ratones de la misma cepa FVB generan metástasis (Thiolloy *et al.*, 2012). No se ha reportado desarrollo de metástasis ósea por medio de inoculación intracardiaca con células PyMT-R221A.

2.6 Cultivo celular

El material utilizado para trabajar con líneas celulares debe ser esterilizado y el equipo utilizado debe ser estéril o limpiado bajo condiciones de asepsia. Se cultivaron en un medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con alta glucosa (4.5g/L), sin piruvato de sodio (Corning) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), y 1% de la mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y antimicótico (anfotericina b). Las células se incubarán a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ (Thiolloy *et al.*, 2012). Cambiando el medio tres veces por semana. Siempre se trabaja con ellas dentro de la campana de flujo laminar (Purifier CalssClass II Biosafety Cabinet, LABCONCO).

La línea celular de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A (cortesía de Dr. Conor Lynch, Moffitt Cancer center, USA) derivadas de un tumor mamario de un ratón FVB MMTV-PyMT. Las células 293T (ATCC CRL-3216) que derivan de riñón embrionario humano.

2.6.1 Activación de células

Las células se recibieron en un vial congelado a -80°C perteneciente al pase 12 con fecha de junio del 2010. Los viales de células congeladas fueron descongelados rápidamente en agua templada y limpiados con etanol (70%). En el interior, de una campana de flujo laminar activada, la suspensión celular fue diluida en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), se centrifugó (800g, 5min, Temperatura ambiente (TA)) y se descartó el sobrenadante para remover el crioprotector dimetil sulfoxido (DMSO). El paquete celular fue resuspendido en medio DMEM suplementado y transferido a cajas de cultivo celular. Veinticuatro horas después, se cambió el medio para remover las células muertas.

2.6.2 Tripsinización

Cuando la monocapa celular está confluyente o subconfluyente se lava con PBS 1X y es resuspendida usando solución que contiene 0.05% de tripsina y 0.53 mM EDTA, se incuba a 37°C por 3-5 min. La tripsina es neutralizada al agregar medio suplementado DMEM. La suspensión celular fue homogenizada y distribuida en diferentes cajas de cultivo celular para mantener el cultivo.

2.6.3 Criopreservación celular

Para la criopreservación, se tripsiniza una monocapa celular confluyente como se describió previamente y fue centrifugada (800 g, 5 min, TA). Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 1.5 mL de medio suplementado (por cada caja de 10 cm) y se agregó crioprotector DMSO a una concentración final de 5% (v/v). La suspensión celular fue transferida en crioviales, se colocaron en un contenedor para congelar que contiene isopropanol (para alcanzar el rango de enfriamiento muy cercano a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y es transferido a -80°C . Veinticuatro horas después los crioviales se transfirieron a criocajas normales.

2.6.4 Prueba del Suero Fetal Bovino

Las células PyMT-R221A se cultivan en medio DMEM suplementado con SFB, debido a los distribuidores y a los trámites de importación no podremos obtener SFB de la marca Atlanta Biologicals, por lo que se realizó la prueba para determinar si las células pueden crecer con SFB de otras marcas: Biowest South America (51343951810), Biowest México (5132885160), Corning USDA (35010119), Corning USDA (35010128) y Thermo HyClone CA/USA (35010128).

Al tener una monocapa celular confluyente se tripsinizaron las células de acuerdo al protocolo, se realizaron 6 alícuotas en tubos de 15 mL, se centrifugaron (800 g, 5 min, TA). El paquete fue resuspendido en 6 mL de medio. Se prepararon seis placas de 6 pozos y se realizaron diluciones seriadas, siendo la concentración más alta 640 con un volumen final de 2.5 mL en cada pozo. El medio se cambió tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Al obtener colonias de células se fijaron con 1% paraformaldehído, y se tiñeron con cristal violeta para poder comparar las colonias.

2.6.5 Preparación de células PyMT-R221A para inoculación

Una monocapa celular confluyente se tripsiniza de acuerdo al protocolo, una vez que se obtiene una suspensión celular se transfiere a un tubo de 50 mL y se agregan 4 volúmenes de PBS 1X frío. Esta suspensión se mantiene en hielo para evitar la agregación celular, se centrifuga (200 g, 10 min, 4°C) y se

lavó dos veces en PBS 1X. El paquete celular se resuspendió en un pequeño volumen de PBS 1X ajustado a una concentración final de 4×10^6 u 8×10^6 células/mL dependiendo el experimento.

2.7 Inoculación intracardiaca de células cancerosas PyMT-R221A

Se preparó una suspensión celular con concentración de 10^6 células/mL. Se anestesiaron hembras FVB (6-9 semanas de edad) por inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (100 mg/kg) y Xilazina (10 mg/Kg), cuando estuvieron dormidos se les depilo el pecho y se limpió la zona con propanol-2 (70%). El ratón se fijó de espaldas usando cinta adhesiva para mantenerlo en posición extendida y simétrica. Se sujetó el esternón con la mano izquierda y con la mano derecha se inyectó la suspensión celular en el ventrículo izquierdo del corazón. Se utilizaron agujas nuevas para cada uno de los ratones. Después de la inyección se pasaron a un tapete térmico para evitar la pérdida de calor corporal y se monitorearon constantemente hasta que despertaron de la anestesia, observando cualquier anomalía. Cada uno recibió PBS 1X a temperatura ambiente para evitar la deshidratación y se unto solución oftálmica () para evitar resequeidad ocular.

2.8 Inoculación intratibial de células cancerosas PyMT-R221A

Se prepararon suspensiones celulares de acuerdo al protocolo mencionado previamente con concentración final de 4×10^6 /mL y 8×10^6 /mL. Los ratones hembras FVB (entre 6 y 9 semanas de edad) recibieron una inyección de analgésico (Buprenex), después fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (100 mg/kg) y Xilazina (10 mg/Kg). Cuando surtió efecto la anestesia se depilaron las patas traseras y se inocularon 25 μ L de PBS 1X o células en suspensión en ambas tibias. Fueron trasladados a un tapete térmico, y se mantuvieron en observación hasta que despertaron de la anestesia. Cada uno recibió una inyección intraperitoneal de PBS 1X a temperatura ambiente y se les untó solución oftálmica. Recibieron inyección de analgésico (Buprenex) cada doce horas por 24 horas post-inoculación.

2.9 Prueba de la Placa Caliente

Para medir si existió un incremento a la respuesta nociceptiva se realizó la prueba de placa caliente. Se ajustó la placa a 55°C y se colocó cada ratón, cuando se observó una respuesta nociceptiva (lamerse las patas traseras), se retiró y registró el tiempo de latencia. Previamente se estableció como tiempo máximo 30 segundos. Se repitió el proceso para cada ratón.

2.10 Mantenimiento y reproducción de ratones FVB

Ratones FVB/CIEA machos y hembras (1-2 meses de edad) fueron obtenidos de la UPEAL-CINVESTAV. Fueron trasladados a un sistema Optimice® (AnimalCare Systems) dentro de cajas de 484 cm² y con un máximo de 5 ratones por caja. En un cuarto con aire acondicionado y temperatura estable a 22°C y con ciclo de luz-oscuridad de 12:12. Los ratones reciben agua potable y comida (Harlan Teklad) *ad libitum*. El lecho de las cajas (madera triturada Aspen; Harlan Teklad) fue cambiada cada 14 días. Para enriquecer del ambiente, los ratones fueron provistos de material de anidación (pañuelos desechables) y material de refugio dentro de la caja (tubo de cartón). Los ratones fueron inspeccionados dos veces a la semana en búsqueda de signos de estrés, incomodidad o enfermedad.

Con fines reproductivos, se utilizó un sistema de harem donde se coloca un macho con 2 o 3 hembras en una caja. Diecinueve días después de cohabitar, el macho se remueve de la caja y las hembras con síntomas de embarazo se separan en cajas independientes. Los ratones se inspeccionan diariamente alrededor de la fecha de dar a luz, para conocer la fecha exacta del nacimiento. Los cachorros son destetados y separados de la madre 3 semanas después de su nacimiento, después de confirmar que son capaces de alimentarse por sí mismos (incremento en el consumo del alimento peletizado en la caja). Se mantienen en cajas separadas por sexo y por camadas. Nunca cohabitan ratones de diferentes camadas, solo con fines reproductivos.

2.11 Colecta y fijación de tejidos

Inmediatamente después del sacrificio o la muerte del ratón se colectaron los huesos, la tibia, el fémur, ambos brazos. Posteriormente se realizó una necropsia en búsqueda de metástasis a otros órganos. Se colectó pulmones, riñones, ovario, y tumores musculares. Todos los tejidos se transfirieron a recipientes con formalina, donde permanecieron por 48 h a 4°C. Después se lavaron con PBS dos veces y se traspasaron a etanol (70%).

Los huesos extraídos se enviaron al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (Instituto de Biotecnología, Cuernavaca), donde se realizaron radiografías por medio de un sistema in-Vivo Xtreme (Bruker). Los huesos se recibieron de vuelta y recibirán tratamiento de descalcificación para realizar análisis histológicos.

2.12 Células blanco: células cáncer de mama que expresan β -galactosidasa

El plásmido pLJM1-eGFP (regalo de David Sabatini, Addegene plásmido #19319) fue linearizado por medio de las endonucleasas NheI y EcoRI se removió el gen eGFP. La secuencia codificante LacZ se obtuvo del plásmido pcDNA-LacZ (Life Technologies), se amplificó usando los oligonucleótidos: (Forward) 5'ttagtgaaccgtcagatccgctagcACCATGATAGATCCCGTC-3' y (Reverse) 5'-ccatttgctcgaggctcgagaattctcaTTTTTGACACCAGACCAAC-3'. Estos oligonucleótidos están diseñados de tal manera que al amplificar el inserto, le sean agregados 28 pares de bases (pb), que son complementarios con el vector (pLJM1).

Una vez amplificado nuestro inserto, se realizó la subclonación de LacZ en pLJM1 por medio de Gibson assembly kit, el cual contiene exonucleasa 5', polimerasa y ligasas, el inserto LacZ se colocó en proporción 10:1 con respecto al vector pLJM1, en una concentración total de 0.0169 pmol en 2 μ L, una vez terminada la reacción se generó el plásmido de interés pLJM1-LacZ.

Se utilizaron 0.5 μ L del producto de la subclonación para transformar 12.5 μ L de bacterias competentes *E. coli* NEB 5 α , y se cultivaron en placas de medio LB con carbenicilina, se obtuvieron 9 colonias, de bacterias transformadas con el plásmido pLJM1-LacZ. Para confirmar la presencia del plásmido se utilizó una

combinación de dos pares de cebadores, de tal manera que si el inserto estaba en la posición correcta esperaríamos dos fragmentos uno de 171 pb y otro de 590 pb (Figura 4).

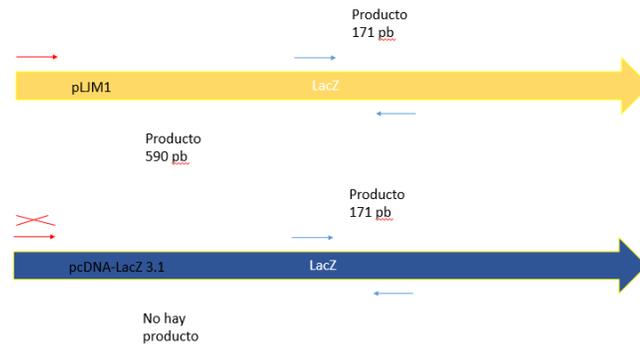


Figura 4 PCR de colonia para identificar inserto de interés. Pares de cebadores y dos fragmentos esperados; en dos áplásmidos pLJM1-LacZ y pcDNA-LacZ3.1

2.12.1 Producción de partículas lentovirales

Por medio de una transfección de células 293T con 125 ng de cuatro plásmidos pLP1, pLP2, pMDG.2 y pLJM1-eGFP o pLP1, pLP2, pMDG.2 y pLJM1-LacZ, mezclados con un agente transfectante FUGENE[®], para cada pozo de una placa de 24 pozos. Se cultivaron en condiciones normales y se cosecharon las partículas lentivirales en el medio, a las 48 y 72 h posteriores a la transfección.

2.12.2 Transducción de células de cáncer de mama por medio de partículas lentovirales

Por medio de las partículas lentivirales se transducieron células MDA-MB-231, a las 24 y 48 horas se confirmó la transducción por medio de observación de la fluorescencia en el microscopio de fluorescencia (Floyd Cell Imaging Station, Life Technologies) en las células transducidas con pLJM1-eGFP.

2.12.3 Curva de muerte con Puromicina

El plásmido pLJM1 incluye un gen de resistencia al antibiótico de amplio espectro Puromicina. Ésta característica nos permitió hacer una selección de las células que contienen el plásmido. La resistencia a Puromicina varía entre diferentes líneas celulares. Por lo tanto, se probaron diferentes concentraciones de Puromicina en el medio 0.6 µg/mL, 0.7 µg/mL, 0.8 µg/mL, 0.9 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL y 5 µg/mL. Esto con el fin de detectar la concentración suficiente para reducir a las células PyMT-R221A. Para seleccionar a las células PyMT-R221A que fueron exitosamente transducidas con pLJM1-LacZ o pLJM1-eGFP.

2.12.4 Ensayo de β-galactosidasa

Una manera de comprobar que nuestro plásmido de interés funciona es directamente con un ensayo de β-galactosidasa. A las 48 h se realizó un ensayo de β-galactosidasa, para lo que se lisaron las células por medio de buffer de lisis y tres ciclos de congelamiento (5 min a -80°C) y descongelamiento (3 min en baño maría a 37°C). Se agrega el buffer de cleavage, y el o-finitrofenil β-D-iagalactopiranosida (ONPG) se prosigue con un periodo de incubación a 37°C. El ONPG es incoloro, pero en presencia de β-galactosidasa es hidrolizado liberando a o-nitrofenol que tiene color amarillo y β-galactosa. Se detiene la reacción al observarse un color amarillo y se procede a detectar la densidad óptica a 420 nm en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, Biotek).

2.13 Células efectoras: aislamiento de linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8+ fueron aislados por selección negativa por medio de Dynabeads, perlas magnéticas unidas a anticuerpos utilizando un kit de Invitrogen (11417D). El primer paso fue la obtención del bazo de un ratón recién sacrificado, se colocó en 3 mL de PBS, y se maceró el tejido, se llevó a cabo un ciclo de lisis de eritrocitos. Se realizaron dos lavados, y se mantuvo a las células en solución, posteriormente se agregó un mix de anticuerpos que se unieron a todas las células que no deseamos. Se lavaron y se agregaron las perlas magnéticas. Después de un periodo de incubación los tubos se colocan en un magneto el cual

atraerá a las perlas magnéticas unidas a las células no deseadas dejando a los linfocitos T CD8⁺ en el sobrenadante. Los resultados se demostraron por citometría de flujo.

2.13.1 Activación de los linfocitos T *in vitro*

Una vez que los linfocitos T CD8⁺ fueron aislados se cultivan en medio RPMI suplementado con 10% SFB, 1% Ab/Am y β -mercaptoetanol 0.01 M, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂. La activación de los linfocitos T CD8⁺ *in vitro* se lleva a cabo por medio de un tratamiento con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. El anticuerpo anti-CD3 se coloca en concentración de 5 μ g/mL en PBS por una noche en la placa de cultivo, para que se adhieran a la placa. Una vez que se agregan los linfocitos T en la placa tratada con anti-CD3 éste se unen al receptor de linfocito T (TCR), se agregó al medio anti-CD28 soluble (5 μ g/mL) éste al unirse al CD28 de los linfocitos T funciona como un co-estimulador. En sinergia el anti-CD3 y el anti-CD28 aumentan la activación y proliferación de los linfocitos T (Nijhuis *et al.*, 1990).

2.13.2 Métodos para detectar la activación de los linfocitos T

Se realizó un ensayo para detectar la proliferación celular por medio de la reducción del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2, bromuro de 5-difeniltetrazolio] de color amarillo, cuando es reducido por las células metabólicamente activas, a formasa de color púrpura, el cual puede detectarse por espectrofotometría a 570 nm.

Se realizó un PCR cuantitativo de IFN- γ como un método indirecto para determinar si los linfocitos T fueron activados. Esto basado en que los linfocitos T una vez activados son capaces de expresar interferon- γ (IFN- γ) ésta expresión se comparó con la expresión de la β -mioglobulina que es expresada constitutivamente. Para esto se llevó a cabo la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por medio de la transcriptasa reversa.

2.13.3 Liberación de β -galactosidasa como método de detección de citotoxicidad no radioactivo

Las células de cáncer de mama de ratón PyMT- β gal expresan la enzima β -galactosidasa de manera intracelular, una vez que las células son lisadas por lisis o por agentes citotóxicos, se libera la enzima β -galactosidasa al sobrenadante, si se conoce la cantidad máxima de enzima puede obtenerse de las células y la cantidad que se libera espontáneamente es posible calcular el porcentaje de lisis utilizando la siguiente formula: Porcentaje de lisis = $100 * (\text{Liberación experimental}) / (\text{Liberación total})$.

2.14 Ensayo de citotoxicidad de nanopartículas en células PyMT- β -gal

Se sembraron células de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A (4,000 células/50 μ L) en placa de 96 pozos, se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ con atmosfera húmeda, por 24 h. Se agregaron las nanopartículas YAGPR@FA@PpIX en diferentes concentraciones 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12.5 μ g/mL, 6.25 μ g/mL diluciones en medio DMEM y un control negativo DMEN. Se cultivaron dos placas una sin irradiación de UV y otra con irradiación de UV con una cámara Crosslinker BLX-365 (Vilber Lourmat). La dosis de radiación se midió con radiómetro VLX 3W (Vilber Lourmat) las células recibieron una dosis de irradiación de 0.5 J/cm². Se realizó un lavado con PBS 1X, se agregó medio nuevo, DMEN, se cultivaron por 24 h en las mismas condiciones. Posteriormente se tomaron 50 μ L de sobrenadante. Para utilizar 39 μ L en un ensayo de β -galactosidasa, de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente.

2.15 Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8+ en células PyMT- β gal

Los ensayos de citotoxicidad de linfocitos T, se llevan a cabo ex vivo, al colocarse en co-cultivo con las células de cáncer de mama que expresan β -galactosidasa. Para esto colocó el mismo número de células blanco en una placa de cultivo de 96 pozos, posteriormente se agregan en co-cultivo los linfocitos T CD8+ (las células efectoras) (B:E). En diferentes proporciones (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, 1:40, 1:50) por seis horas. Siendo las células blanco, células de cáncer de mama de ratón PyMT, que expresan la enzima β -galactosidasa, una vez que las células blanco son lisadas por las células efectoras es decir, los linfocitos T activados, la enzima β -galactosidasa es liberada al medio de cultivo. El medio de cultivo se analiza para

detectar la actividad de la β -galactosidasa en presencia de ONPG, detectando la densidad óptica después de la incubación de acuerdo al protocolo mencionado previamente.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Modelo de reducción de linfocitos T CD4 y/o CD8 por medio de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8

3.1.1 Titulación de anticuerpo anti-CD4 PE-Cy5.5

Se realizó la titulación de anticuerpo anti-CD4-PE-Cy5.5 para determinar la cantidad mínima necesaria para obtener los resultados deseados. Se observó que la intensidad de la señal del anti-CD4-PE-Cy5.5 está en la misma zona entre 500,000 y 1'000,000, pero con diferentes cantidades de células que está representado en el eje Y (Figura 6). Se presentan los porcentajes de las células que fueron detectadas en las diferentes concentraciones y se ve que no hay gran diferencia entre 31.25 ng que permite la detección del 30.4% de las células con respecto a la concentración 15.6 ng se detecta el 28.4%, por lo tanto se utilizó esta concentración reduciendo el uso a la mitad de la cantidad de anticuerpo.

Tabla 2 Concentración de anticuerpos y porcentaje de células detectadas por citometría de flujo.

Concentración de anticuerpo CD4-PE-Cy5.5	Porcentaje de células +
31.25 ng	30.4
15.6 ng	28.4
7.8 ng	2.7
3.9 ng	1.9

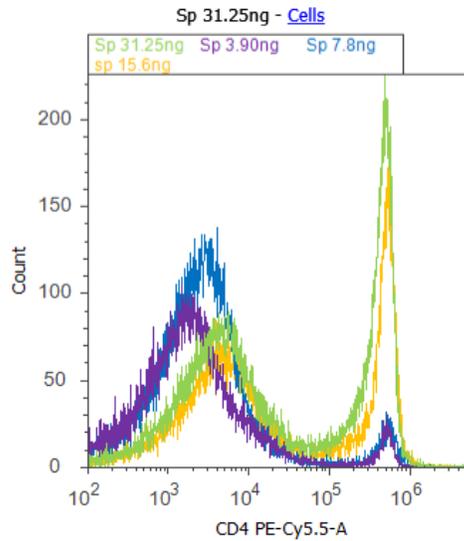


Figura 5 Histograma de los resultados de los diferentes concentraciones de anticuerpos, verde 31.25 ng, amarillo 15.6 ng, azul 7.8 ng, morado 3.9 ng.

3.1.2 Estandarización de citometría de flujo

Se analizaron muestras de 50 μ L de sangre de ratones hembras FVB, las células sanguíneas fueron preparadas de acuerdo al protocolo mencionado previamente. Para detectar las diferentes poblaciones de linfocitos T, se utilizaron tres anticuerpos unidos a fluorocromos el anti-CD3-APC, el anti-CD4-PECy5.5 y el anti-CD8-FITC. En la sangre de ratón FVB se detectó el 41.5% de las células como linfocitos T. Dentro de ésta población celular se detectaron las subpoblaciones con los porcentajes de 16.4% para linfocitos T CD8+ y 73.2% para linfocitos T CD4+. Utilizando esta combinación de anticuerpos es posible diferenciar a las subpoblaciones de linfocitos T.

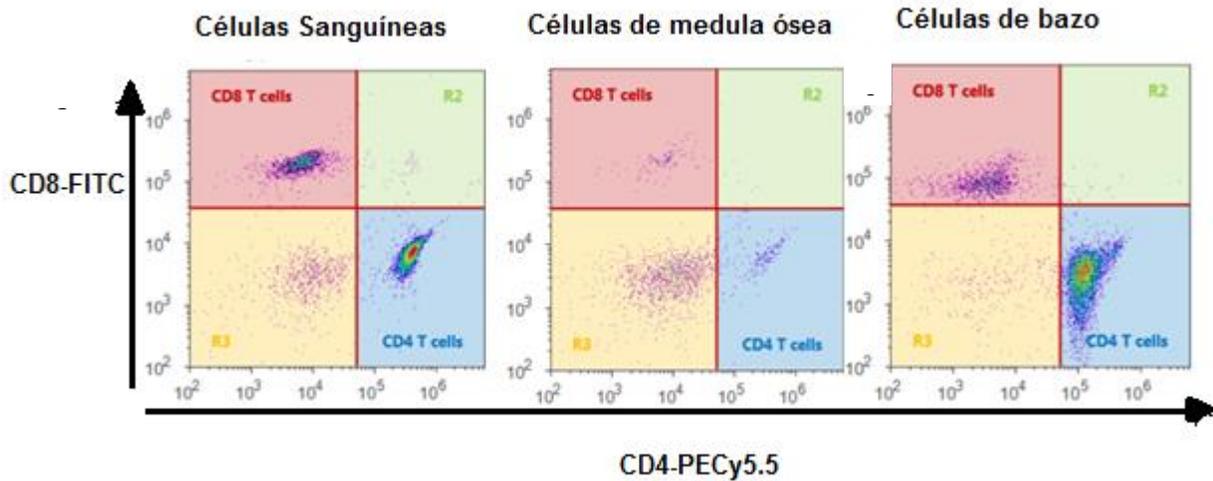


Figura 6 Diagrama de puntos, con un cuadrante que permite diferenciar a las células por inmunofenotipado a los linfocitos T CD8⁺ en el recuadro superior izquierdo y a los linfocitos T CD4⁺ en el recuadro inferior derecho. Se presentan los resultados la sangre, medula ósea y de bazo (de izquierda a derecha).

Se analizaron células extraídas de medula ósea y se encontró que solo el 8.4% de las células son linfocitos T, coincidiendo con el resultado esperado. Se analizaron las células del bazo de las cuales los linfocitos T representan el 33.8%. Dentro de éstos los linfocitos T CD8⁺ representan el 51.5% y los CD4⁺ el 75%.

3.1.3 Estrategia para identificar subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo

Los linfocitos T CD8⁺ son identificados por medio de citometría de flujo usando la siguiente estrategia de parámetros: por tamaño y complejidad, para detectar a los eventos individuales, y la detección por medio de los anticuerpos. De acuerdo a lo que se observa en la figura 8, primero se seleccionaron las células individuales, basados en tamaño determinado por la detección de la dispersión frontal (Forward Scatter, FSC) y por complejidad ésta determinada por la detección de la dispersión lateral (Side scatter, SSC). Dentro del grupo de células individuales se seleccionan las células mononucleares de acuerdo a su tamaño (FSC) y complejidad (SSC). Dentro de éstas por medio de marcadores podemos identificar a los linfocitos T, siendo positivas para CD3-APC. Los linfocitos T CD4⁺, siendo las células positivas tanto para CD3-APC como para CD4-PEy5.5, y los linfocitos T CD8⁺, siendo las células positivas para CD3-APC y para CD8-FITC. Con lo que nos permitió detectar 54.6% de linfocitos T, dentro de éstos el 45.6% pertenecían a la

subpoblación de linfocitos T $CD4^+$ y el 8.9% pertenecían a la subpoblación de linfocitos T $CD8^+$. Por lo anterior, se demuestra que es una buena técnica y se utilizó en todas las muestras.

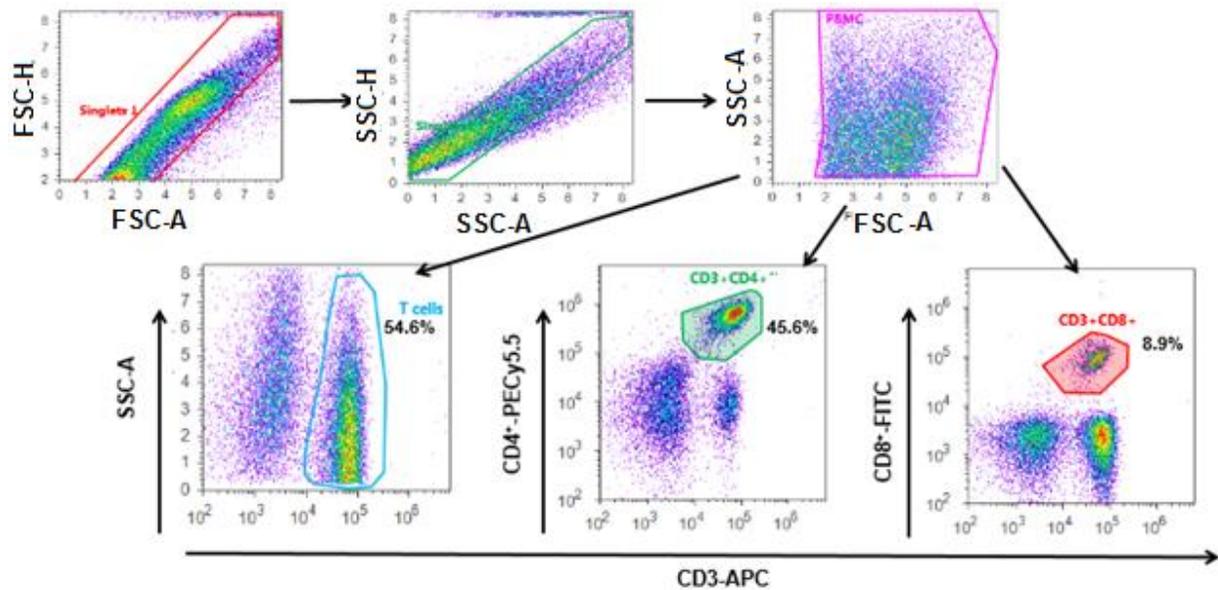


Figura 7 Estrategia de selección para la identificación de los linfocitos T $CD8^+$.

3.1.4 Cuantificación de subpoblaciones de Linfocitos T en ratones con tratamiento de anticuerpos monoclonales

Los ratones recibieron tres tratamientos diferentes, uno recibió 75 μ g de anti-CD4, y 75 μ g de anti-CD8, otro recibió 100 μ g de anti-CD4 y 100 μ g de anti-CD8, y el tercero recibió anti-IgG un anticuerpo control de isotipo, se obtuvo sangre por medio de punción retroorbital, en diferentes días y se compararon.

Se cuantificaron los linfocitos T $CD4^+$ y se compararon con la cantidad de linfocitos T en el ratón que recibió el anticuerpo control y se observó una reducción del 97% y 99% desde el día dos, y el ratón que recibió 100 μ g de anticuerpos fue el que mantuvo una reducción de 99% hasta el día 7. Por lo tanto se decidió darles una segunda dosis de anticuerpos y se analizó el día 15, confirmando una reducción del 93% en el ratón que recibió 75 μ g de anticuerpos y de 97% para el ratón con tratamiento de 100 μ g de anticuerpos.

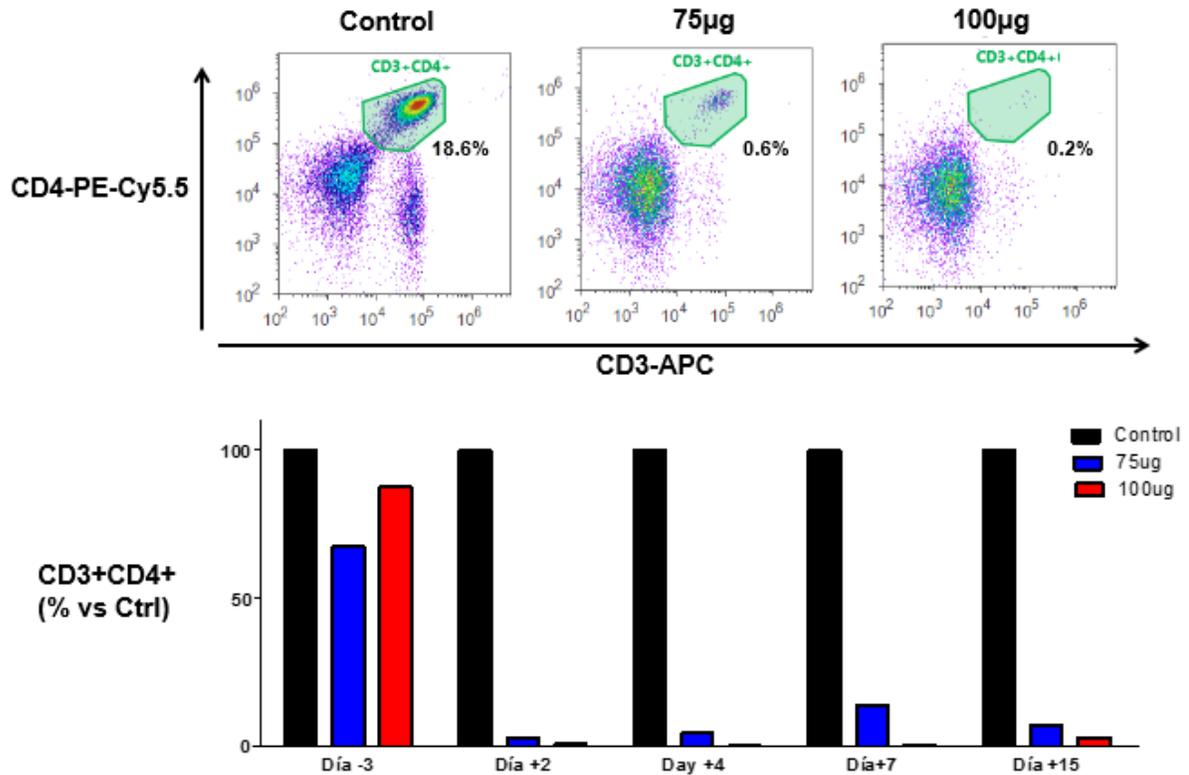


Figura 8 Cuantificación de linfocitos T CD4⁺ por medio de citometría de flujo en la parte superior. Porcentaje de reducción de linfocitos T CD4⁺ con respecto al control parte inferior.

De la misma manera fueron cuantificados los linfocitos T CD8⁺ en el ratón control representan el 3.5% de las células mononucleares, mientras que en los ratones con tratamiento de 75 µg y 100 µg de anticuerpos solo representan el 0.1% (Figura 9), lo que significa una reducción del 97% desde el día 2 para ambos tratamientos, para el día 7 se tenía el 90% y 99% de reducción para el tratamiento de 75 µg y de 100 µg, respectivamente. El día 15 se obtuvo una reducción del 88% y del 96% para el tratamiento de 75 µg y de 100 µg respectivamente.

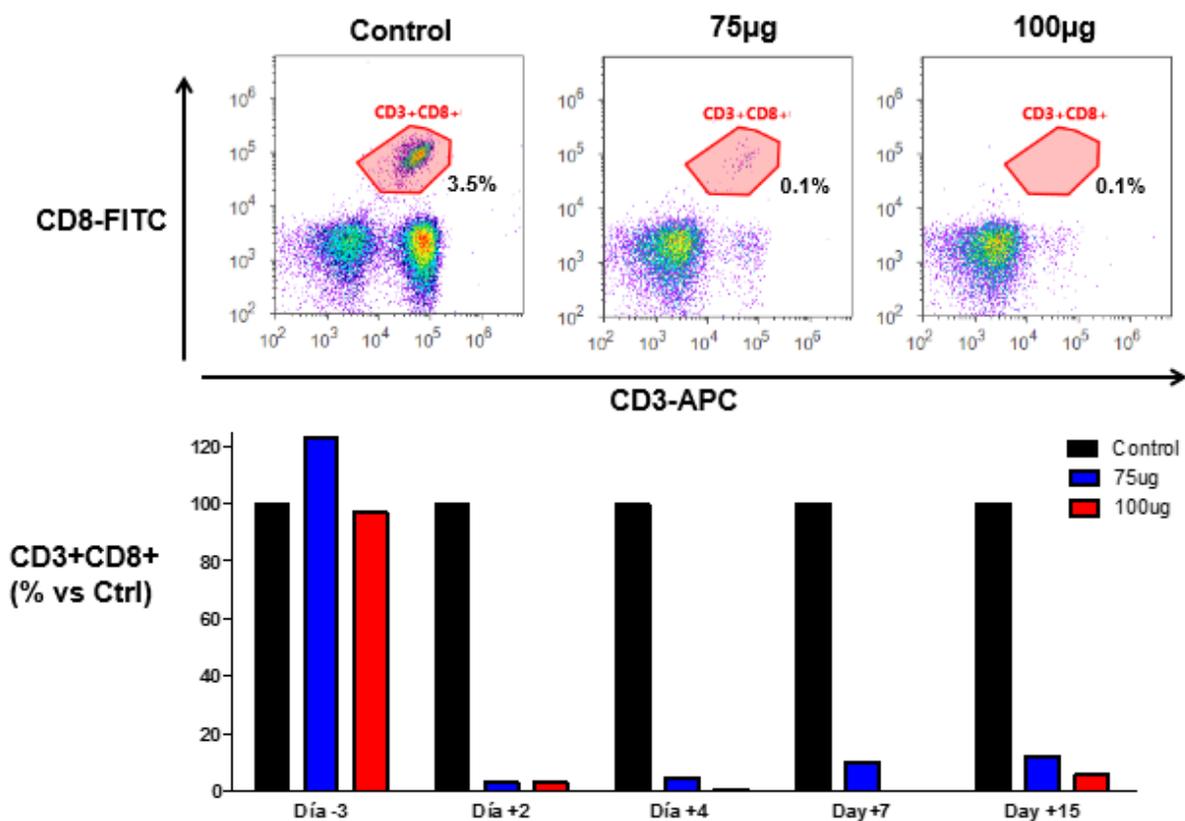


Figura 9 Cuantificación de linfocitos T CD8+ por medio de citometría de flujo en la parte superior. Porcentaje de reducción de linfocitos T CD8+ con respecto al control parte inferior.

El día 15 se realizó la eutanasia del ratón y se extrajo la médula ósea, y se cuantificaron los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ y se compararon con la cantidad presente en el ratón control. Se confirmó que existe una reducción de estas poblaciones a nivel medula ósea, donde para los linfocitos T CD4⁺ hubo una reducción del 84% y del 92%. Mientras que para los linfocitos T CD8⁺ se detectó una reducción de 80% y de 91% para los ratones con tratamiento de 75 µg y de 100 µg, respectivamente.

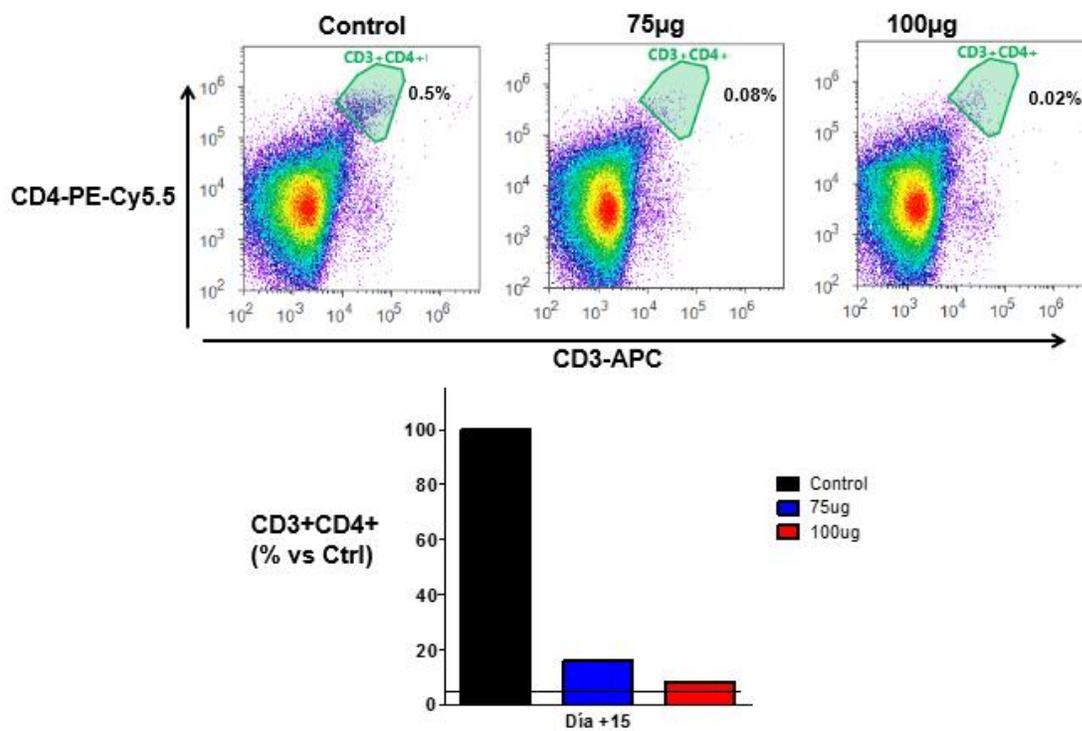


Figura 10 Cuantificación de linfocitos T CD4+ en medula ósea por citometría de flujo, porcentaje de reducción de linfocitos T CD4+ con respecto al control.

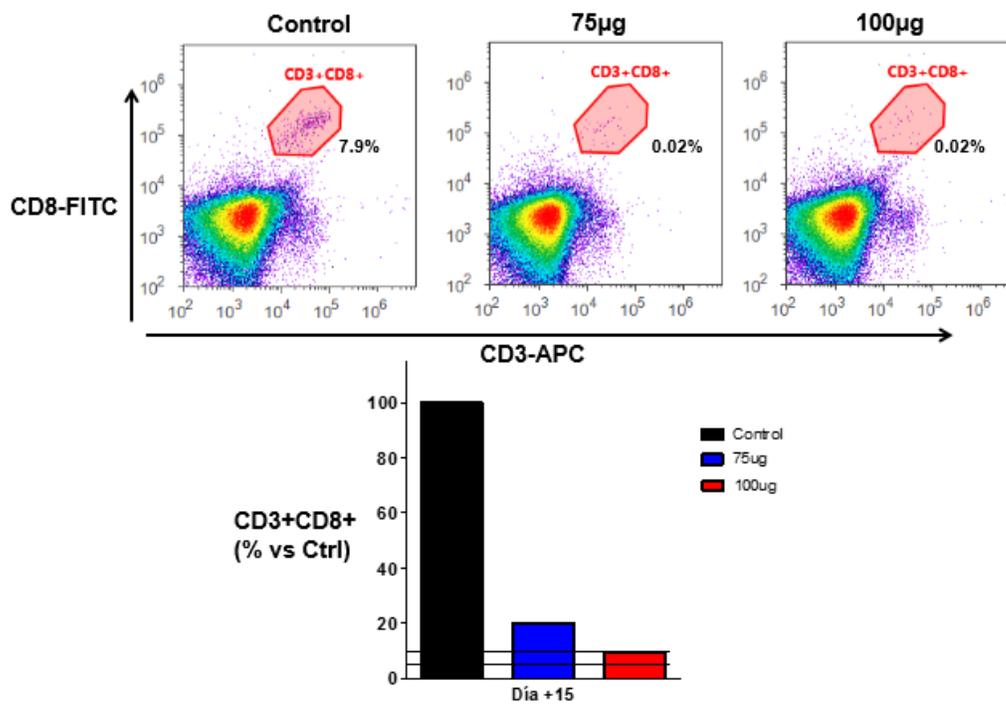


Figura 11 Cuantificación de linfocitos T CD8+ en medula ósea por citometría de flujo, porcentaje de reducción de linfocitos T CD8+ con respecto al control.

3.2 Modelo singénico de metástasis ósea en ratones FVB por inoculación de células de cáncer de mama PyMT-R221A en ratón FVB.

3.2.1 Mantenimiento y reproducción de ratones FVB

De las 6 hembras que se utilizaron para reproducción, solo el 83% tuvo crías en la primera cruce. El tamaño de las camadas fue variable entre 11 y 4 (Figura 12), con un promedio de 6.5 crías por camada. Este valor es menor al esperado ya que se reportan >12 crías por camada para ratones FVB (Manual, n.d.), esto podría deberse al estrés por ruido.

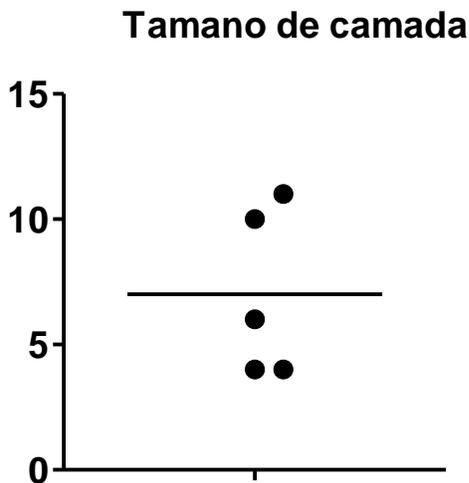


Figura 12 Tamaño de las camadas, cada punto representa el número de crías que se obtuvieron en diferentes camadas.

La razón de sexo que se obtuvo fue de hembras con 45% (15/35), valor menor al esperado (50%), para el experimento principal se requieren solo hembras por lo que se requirió aumentar el número de hembras reproductoras. En el experimento principal se necesitaron 4 grupos experimentales, cada uno compuesto por 12 ratones, por lo que fueron necesarios 48 ratones hembras de 6 semanas de edad. Por lo que siguiendo este razonamiento se inició la crianza con 20 ♀ reproductoras de las cuales 17 tuvieron crías que sobrevivieron a la fecha de destete, en total se obtuvieron 120 crías de los cuales 65 fueron hembras.

3.2.2 Cultivo celular

Se cultivó la línea celular PyMT-R221A exitosamente, se expandió el cultivo, y se almacenaron a -80°C . PyMT-R221A presentó una morfología alargada y tuvo un crecimiento en monocapa (Figura14).

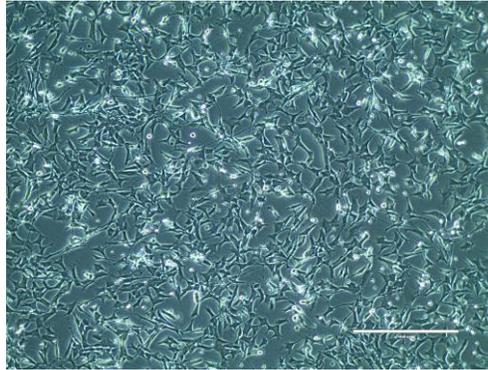


Figura 13 Células PyMT-R221A. Células en pase 15, 42% luz. Barra de escala = 400 μm .

3.2.3 Experimento piloto I: inoculación intracardiaca de células PyMT-R221A

Para inoculación intracardiaca se tuvo un grupo de 10 ratones, uno se dejó como control negativo que fue anestesiado y depilado para tener el estrés del procedimiento. Se inocularon 9 ratones con 100,000 células en 100 μL de PBS, de los cuales solo despertaron 7 de la anestesia. Debido a que no estaba publicado un modelo de metástasis ósea por este método se seleccionó esperar 4 semanas después del tratamiento para sacrificar a los ratones. Los ratones que se sometieron a eutanasia en fechas previas a la establecida, fue por que presentaban síntomas de dolor, como problemas para respirar, pérdida de peso o mayor sensibilidad. De acuerdo al análisis ANOVA de una vía donde se comparó el peso promedio del grupo inicial con los siguientes pesos, no se encontraron diferencias significativas, a pesar de que los animales presentaron síntomas como dificultades respiratorias. Los ratones FVB que recibieron inoculación intracardiaca mantuvieron un peso promedio estable (Figura 14), no sufrieron pérdida de peso como se reporta en otros modelos de metástasis ósea como con ratones BALB/c con células 4T1.

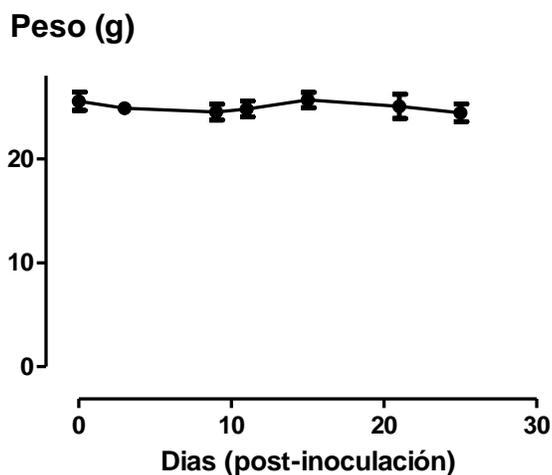


Figura 14 Gráfica del promedio de los pesos (g) de los ratones FVB que recibieron inoculación intracardiaca. Se realizó ANOVA de una vía y no se encontraron diferencias significativas entre el peso inicial con respecto a los pesos en días posteriores al tratamiento.

Se realizó la prueba del plato caliente para determinar si los ratones que habían sido inoculados intratibialmente presentaban una mayor sensibilidad al calor con respecto a ratones control, en la Figura 15 se muestra el tiempo de latencia donde no hubo diferencias significativas.

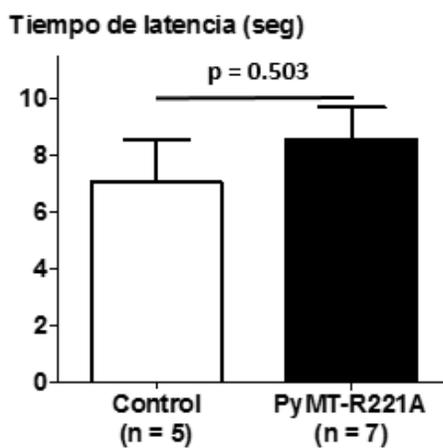


Figura 15 Gráfica de tiempo de latencia de la prueba del plato caliente. Se realizó un análisis de U de Mann-Whitney y no se encontraron diferencias significativas (P= 0.503503).

Aunque en el tiempo establecido para este experimento fue de 4 semanas después del tratamiento, 5/7 sobrevivió. Desde el día 21 después de la inoculación, comenzaron a morir o ser eutanizados como se puede observar en la Figura 16.

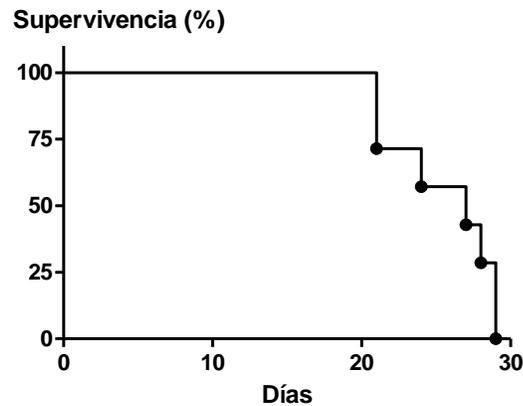


Figura 16 Gráfica de supervivencia de los ratones FVB inoculados de manera intracardiaca. Los ratones, comenzaron a fallecer desde el día 21 post-inoculación.

Se realizaron necropsias a los ratones en búsqueda de metástasis en órganos distantes. Encontrando tumores en pulmón, glándula adrenal, riñón, músculo, ovario, tejido adiposo, bazo y mandíbula en proporciones mencionadas en la Tabla 3.

Tabla 3 Tabla de metástasis, órganos donde fueron observados tumores y proporciones número de ratones en los que se observaron tumor(es)/ número total de ratones.

Órgano	Glándula Adrenal	Riñón	Músculo	Ovario	Tejido Adiposo	Bazo	Mandíbula
Razón de ratones	3/7	2/7	1/7	1/7	2/7	1/7	1/7

Análisis radiográficos de los huesos, podemos observar que no hay zonas de osteólisis en ratones que recibieron inoculación intracardiaca comparando con el ratón control (Figura 18).



Figura 17 Rayos X de ratones inoculados intracardiamente. Lado izquierdo patas traseras de ratón control, lado derecho ratones con inoculación intracardiaca de células PyMT-R221A. No se observan lesiones osteolíticas en ningún ratón inoculado con células PyMT-R221A.

3.2.4 Experimento piloto II: inoculación intratibial de células PyMT-R221A

Se inocularon 4 ratones de manera intratibial, todos despertaron de la anestesia. Se determinó que el tiempo del experimento serían 12 días basados en un artículo que menciono que un lapso de 9 días es suficiente para generar un área de osteólisis (Halpern *et al.*, 2006).

Se monitorearon para determinar si existían síntomas de dolor y se midió el peso. No hubo diferencias en el peso de los ratones comparado con el peso inicial y 9 días después de la inoculación (**Figura 18**), extenderse por lo que se alargó experimento.

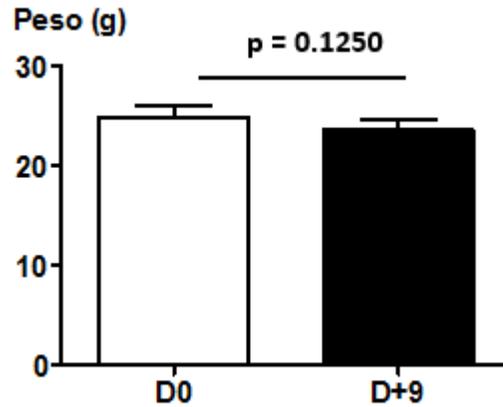


Figura 18 Gráfica de peso de ratones FVB después de inoculación intratibial. Comparando el peso del día 0 y de 9 días post-inoculación. (n=4) Se realizó un análisis no paramétrico prueba de U de Mann-Whitney y no existen diferencias significativas.

Basado en los resultados de la prueba de la placa caliente 6 días después de la inoculación los ratones tenían una mayor sensibilidad al calor, ya que sus tiempos de respuesta fueron menores ($P= 0.0159$) (Figura 19).

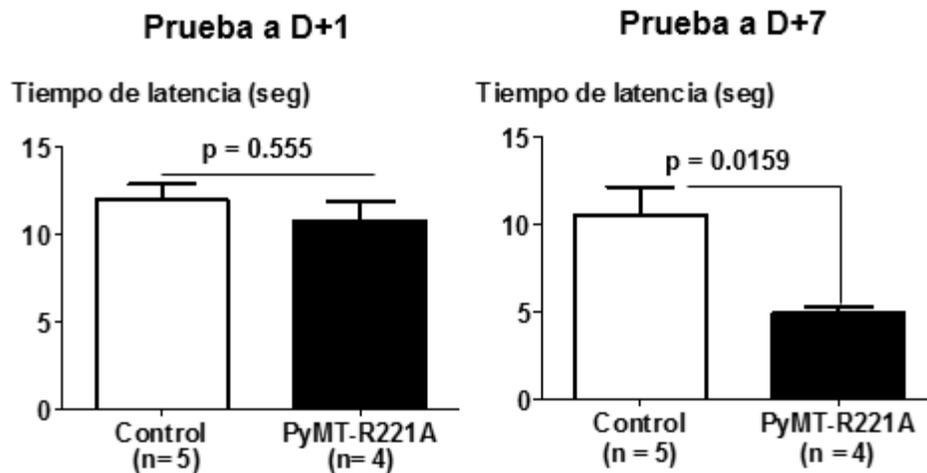


Figura 19 Gráficas de tiempo de latencia en pruebas de Placa caliente. (D+1) Un día después de la inoculación donde no se encontraron diferencias significativas ($P=0.5$) con respecto al control. Prueba de la placa caliente (D+7) 7 días después de la inoculación donde se observa una diferencia significativa ($P= 0.01$). Se analizaron con la prueba de U de Mann-Whitney.

En el análisis radiográfico de los huesos, se puede observar la presencia de osteólisis (flecha) en organismos que recibieron inoculación intratibial comparado con el ratón control (Figura 20), demostrando que el modelo de inoculación intratibial de células de cáncer de mama murino PyMT-R221A son capaces de inducir osteólisis, por lo que se eligió como el método para los experimentos.



Figura 20 Rayos X de ratones con inoculación intratibial. Lado izquierdo ratón control, lado derecho ratones con inoculación intratibial de PyMT-R221A flechas indican sitios de osteólisis. Se detectan pequeñas lesiones óseas en $\frac{2}{3}$ ratones inoculados.

3.2.5 Experimento piloto III inoculación intratibial de células PyMT-R221A

Se inocularon 16 ratones de manera intratibial, 15 despertaron de la anestesia. Se separaron en 4 grupos, para analizar dos variables: el tiempo post-inoculación y la cantidad de células de cáncer de mama. Para evaluar qué cantidad de células y cuánto tiempo es suficiente para generar osteólisis. Cada grupo tuvo 4 miembros, ratones excepto el grupo III, que tuvo 3 ratones, en cada grupo hubo un ratón control. Los tratamientos que recibieron tanto el número de células, el sitio de inoculación y el tiempo representan (Tabla 4).

Tabla 4 Grupos experimentales experimento piloto II. Incluye el número de células que se inocularon en 3 individuos, 2 en el caso del grupo III y un ratón control que fue inoculado con PBS por cada grupo.

	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
Tibia Derecha	200,000	PBS	200,000	PBS	200,000	PBS	200,000	PBS
Tibia Izquierda	100,000	PBS	100,000	PBS	100,000	PBS	100,000	PBS
Eutanasia	12 días	12 días	18 días	18 días	22 días	22 días	28 días	28 días

Los ratones se monitorearon para determinar si existían síntomas de dolor y se pesaron en diferentes tiempos. Los ratones siguieron subiendo de peso como se puede observar en la Figura 21 lo que se interpretó como un indicador de un buen estado de salud.

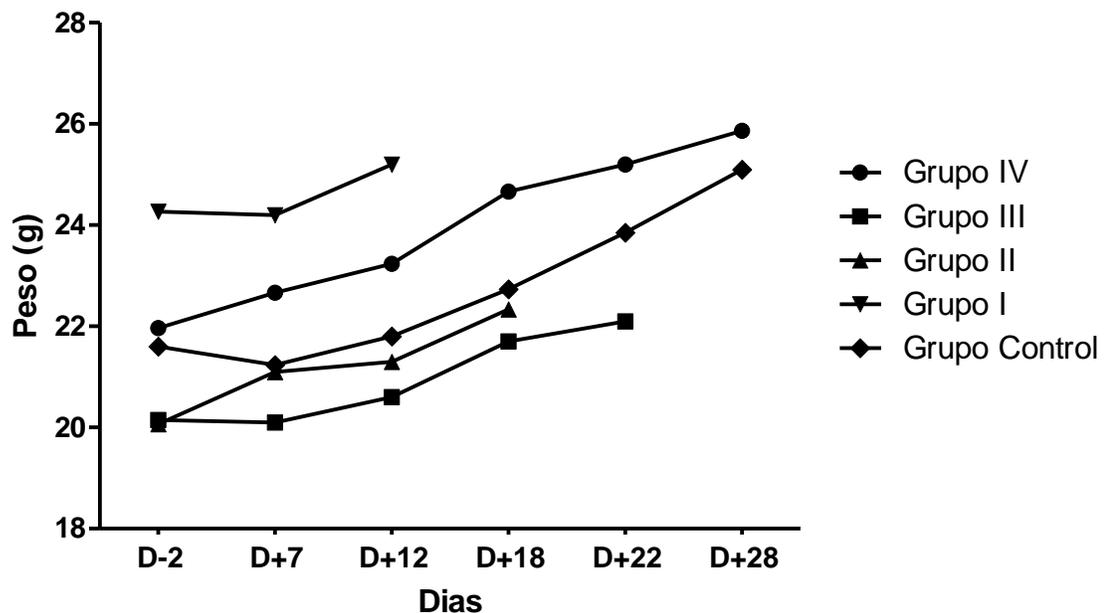


Figura 21 Ratones FVB siguen creciendo a pesar de la inoculación. Se pesaron en diferentes tiempos, se realizó ANOVA de una vía y no existen diferencias significativas.

Los resultados de la prueba de la placa caliente muestran una aparente disminución en el tiempo de respuesta, pero solo en los primeros grupos. En cada grupo, se realizó una prueba T de student entre el

tiempo de respuesta inicial contra el tiempo de respuesta al final. Solo el grupo II presentó una disminución significativa ($P < 0.011$) en el tiempo de respuesta, como se observa en la

Figura 22.

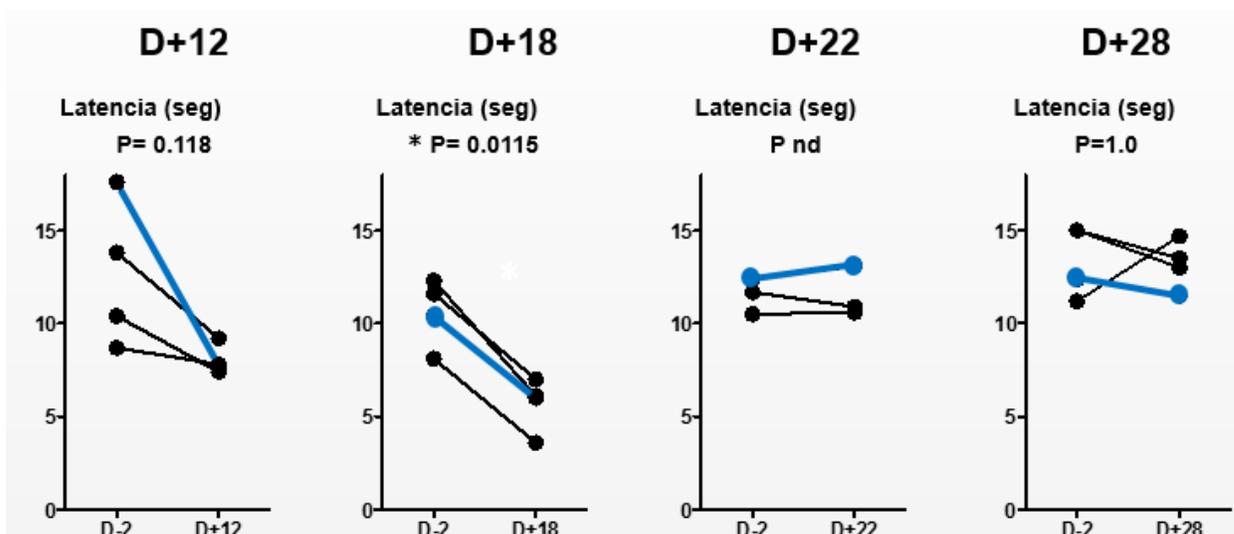


Figura 22 Tiempo de latencia en la prueba de la placa caliente. El grupo II es el único que muestra disminución significativa ($P < 0.011$) prueba T de student pareada. En color azul se observa el ratón control para cada grupo.

Las radiografías muestran un área de osteólisis en el grupo de 18 días post inoculación, que se puede observar en la

Figura 23.



Figura 23 Rayos X de ratones con inoculación intratibial, Control, día 12, día 18, día 22, día 28. Flecha indica área de osteólisis. Obtenidas por el sistema inVivo-Xtem, Bruker®, en el LNMA del IBT, UNAM, Cuernavaca.

3.2.6 Experimento Piloto IV Inoculación intratibial de células PyMT-R221A en hembras FVB de 6 semanas de edad

Se realizó un experimento piloto IV, donde los ratones de seis semanas de edad se inocularon de acuerdo al protocolo mencionado previamente. Se les observó en búsqueda de señales de enfermedad, y se pesaron a lo largo de 28 días, los ratones siguieron aumentando de peso. Pasados estos días los huesos fueron colectados y se enviaron al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada, en el Instituto de Biotecnología, de la UNAM.

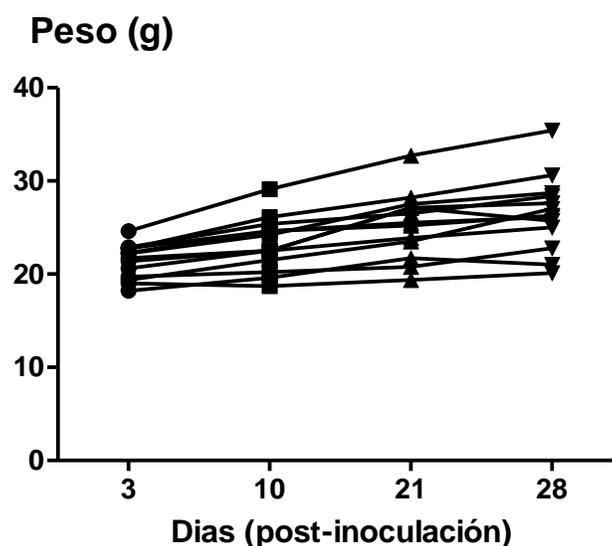


Figura 24 Peso de ratones inoculados con células PyMT-R221A. Peso (g) de ratones inoculados de 3-28 días post inoculación.

Los ratones continuaron incrementando su peso ligeramente conforme transcurrió el experimento a lo largo de los 28 días.



Figura 25 Rayos X experimento piloto IV. Izquierda fémur y tibia normales de ratón control, derecha ratones inoculados con células PyMT-R221A, las flechas indican lesiones osteolíticas. Lesiones ósteolíticas severas en 3/13 ratones inoculados con células PyMT-R221A.

En los ratones inoculados con células PyMT-R221A el 23% (3/13) presentó lesiones óseas, evidentes a los 28 días posteriores a la inoculación, el restante 77% de los ratones presentó lesiones óseas mínimas.

3.2.7 Inoculación subcutánea de células PyMT-R221A en ratones FVB

El 40% de los ratones que recibieron inoculación subcutánea de células PyMT-R221A desarrollaron tumores palpables, con un volumen variable entre 200 y 1,300 mm³.

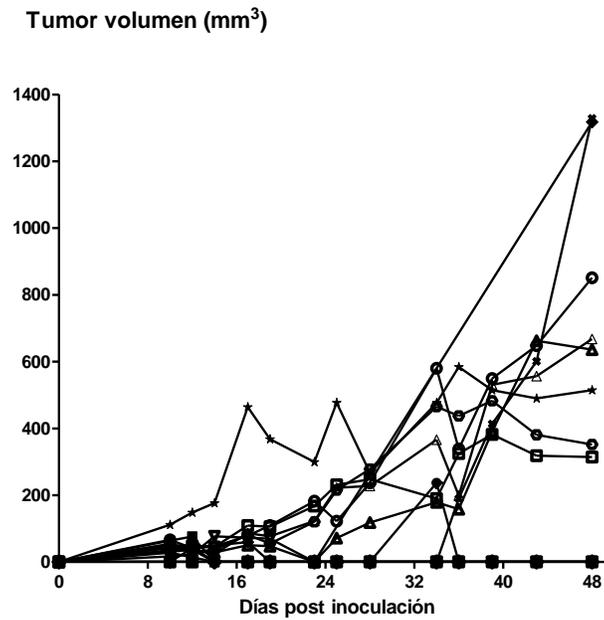


Figura 26 Volumen de tumores subcutáneos de células PyMT-R221A. Los tumores se midieron cada 3-4 días, por la misma persona a lo largo del experimento.

3.3 Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T no radioactivo

3.3.1 Células blanco: células cáncer de mama que expresan β -galactosidasa

3.3.1.1 Desarrollo de plásmido pLJM1-LacZ

La secuencia codificante del LacZ fue subclonada del plásmido pcDNA-LacZ (Life Technologies) en el plásmido linealizado pLJM1, utilizando el kit de Gibson assembly Master mix (NET). El plásmido pLJM1-eGFP (un regalo de David Sabatini, Addgene plasmid #19319), el cual fue linearizado por medio de las enzimas NheI y EcoRI para remover la secuencia de eGFP. El producto de la subclonación el plásmido pLJM1-LacZ se utilizó para la transformación de bacterias NEB5 α , como producto de esta transformación, se obtuvieron 9 unidades formadoras de colonia (CFU). Se expandió el cultivo de cada colonia, para generar un Stock de glicerol almacenado a -80°C y purificar el plásmido, por medio de una lisis alcalina. Previo a la purificación se realizó un PCR de colonia para determinar si el plásmido era el esperado, para

lo cual se usó la combinación de oligonucleótidos para amplificar dos fragmentos uno de 590pb y otro de 171pb en pLJM1-LacZ, mientras que en pcDNA-LacZ 3.1 solo un fragmento de 171pb. Las colonias 5, 6, y 7 presentaron una banda más definida y abundante como se observa en la Figura 27.

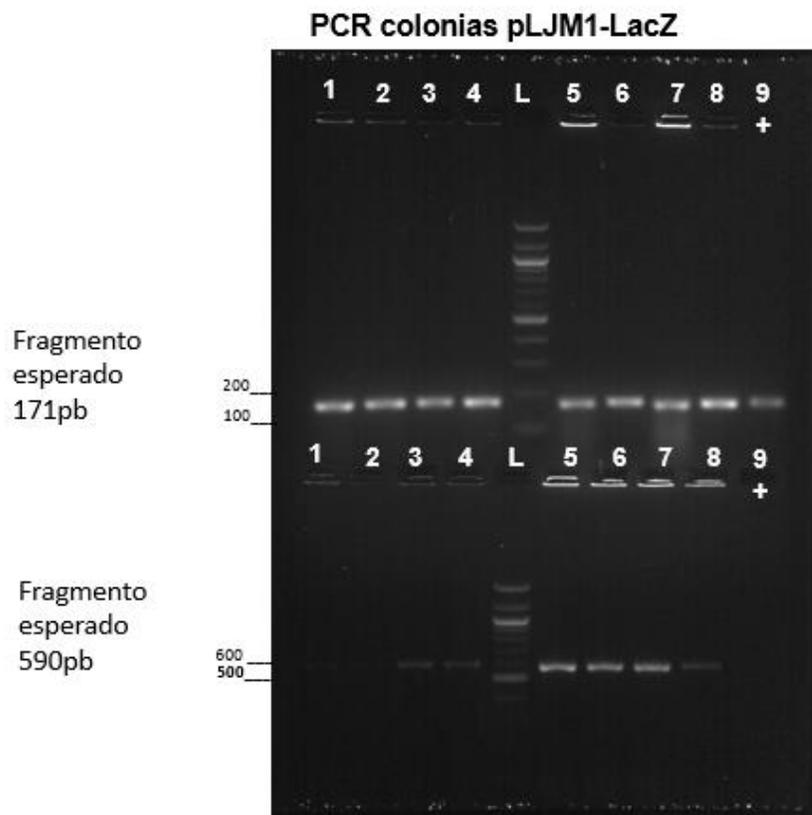


Figura 27 PCR de colonia, en presencia de pLJM1-LacZ se esperan dos fragmentos uno de 590pb y uno de 171pb. Se analizaron 8 de las 9 colonias que se obtuvieron en la transformación.

3.3.1.2 Transducción de células MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231 fueron transducidas con partículas lentivirales, que contienen las secuencias de los plásmidos pLJM1-eGFP o el pLJM1-LacZ. Las células que fueron transducidas con la secuencia de pLJM1-eGFP, expresaron expresan fluorescencia, 24 h, como se observa en la Figura 28. Con lo que se supone que las células que recibieron la secuencia de pLJM1-LacZ tuvo una transducción exitosa.

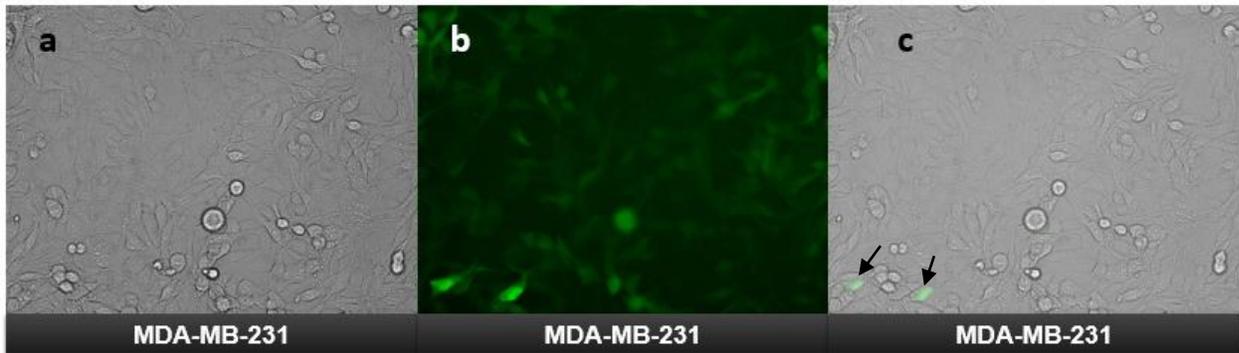


Figura 28 Fluorescencia de células transducidas con el plásmido pLJM1-eGFP, (a) luz blanca, (b) luz verde y con (c) imagen procesada.

Cuantificación de células transfectadas por citometría de flujo

La expresión de eGFP, permitió hacer un análisis cualitativo en el microscopio de fluorescencia y cuantitativo por medio del citometría de flujo. Los resultados mostraron que el 45% de las células fueron positivas para eGFP, comparados con el 0.003% de las células control como se observa en la Figura 29.

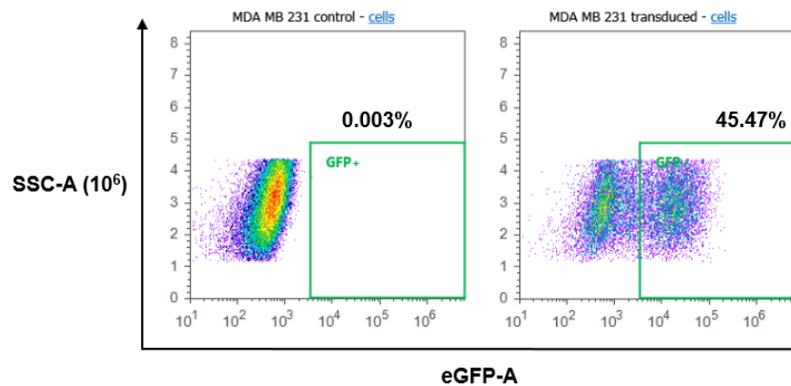


Figura 29 Porcentaje de las células con expresión de eGFP. El 45% de las células resulto positiva para eGFP.

Ensayo de β -galactosidasa

Para comprobar que la transducción fue correcta se utilizó el ensayo de β -galactosidasa. Sin embargo, los resultados no brindaron información relevante, debido a que existió mucha variación entre las muestras,

por lo que se propuso aumentar el tiempo de incubación (Sambrook, Joseph. Russell, David W. (David William), 2006).

Transfección de células MDA-MB-231

Para estandarizar la prueba de beta-galactosidasa se hizo la transfección con diferentes plásmidos pcDNA-LacZ, pLJM1-LacZ 5, pLJM1-eGFP para cada pozo. La transfección se realizó en células MDA-MB-231 sembradas en placas de 24 pozos. Se confirmó la presencia de fluorescencia en las células transfectadas con pLJM1-eGFP como se observa en la Figura 30.



Figura 30 Transfección I de células MDA-MB-231 con pLJM1-eGFP (a) Luz blanca (b) Luz verde (c) Procesada.

El ensayo de β -galactosidasa se llevó a cabo 48 horas después de la transfección. Comenzando por lisis, después se agregó el buffer de cleavage 1X. De cada pozo de la placa de 24 pozos se obtuvieron tres pozos de una placa de 96 pozos, donde se continuó con la reacción agregando el OPNG y se colocaron a incubar por 30 min y 2 h. Encontrando diferencias significativas en la densidad óptica entre los tiempos, como se observa en la Figura 31, se analizaron por ANOVA de dos vías, con prueba de Bonferroni. La OD de pLJM1-LacZ presentó diferencias significativas ($P < 0.001$) comparada con eGFP. pLJM1-LacZ presentó diferencias significativas con pcDNA-LacZ ($P < 0.001$). Con respecto al tiempo, para pLJM1-LacZ la densidad óptica (OD por sus siglas en inglés) se incrementó significativamente ($P < 0.001$) en 2 h comparado con la OD detectada a los 30 min. Entre la OD de pLJM1-eGFP a los 30 min y a las 2 h no hubo diferencias significativas. Se desconoce el motivo por el que pcDNA-LacZ no expresó la β -galactosidasa, ya que de este plásmido se tomó el gen de LacZ. Basados en estos resultados el tiempo mínimo de incubación recomendado es de 2 h.

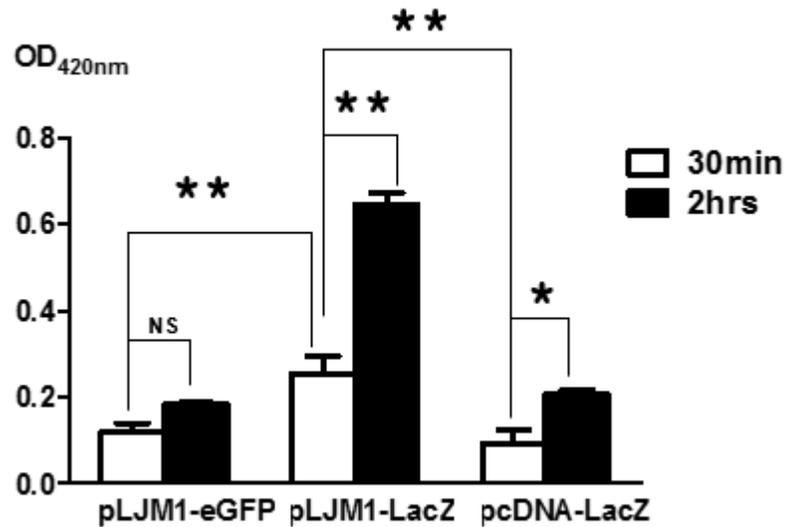


Figura 31 pLJM1-LacZ presenta una mayor cantidad de beta-galactosidasa en 30 minutos pLJM1-LacZ vs pLJM1-eGFP ** (P<0.01) pLJM1-LacZ vs pcDNA-LacZ (P<0.01) ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni. Estas diferencias entre 30min y 2hrs en pLJM1-LacZ *** (P<0.001) y pcDNA-LacZ * (P<0.05).

Transfección de células PyMT-R221A

Una vez establecido el tiempo de incubación, se continuó con la transfección en la línea celular de interés PyMT-R221A. Se probaron las diferentes clonas de pLJM1-LacZ 5, pLJM1-LacZ 6, pLJM1-LacZ 7. Se transfectó simultáneamente con la secuencia de pLJM-eGFP, para comprobar la transfección, por medio de la fluorescencia en PyMT-eGFP observada en la Figura 32 por medio de un microscopio de fluorescencia. Las células fueron lisadas en la placa de 24 pozos con un mayor volumen, pero con el mismo tratamiento, posteriormente se agregó el buffer de cleavage 1X y se separó el lisado: la mitad permaneció en hielo a 4°C, la otra mitad se pasó a tubos de 0.5 mL y se incubó a 50°C por 45 min en el Thermo block.

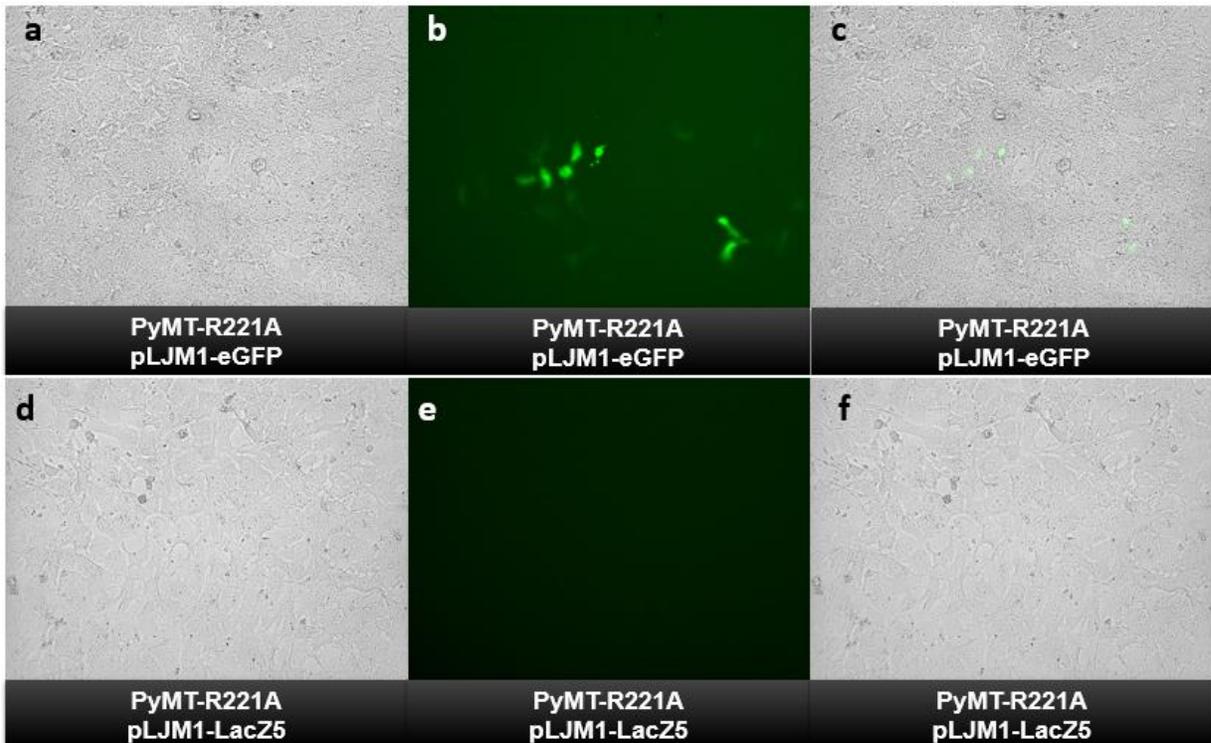


Figura 32 Transfección II: células PyMT-R221A con pLJM1-eGFP (a) Luz blanca (b) Luz verde (c) Procesada; células PyMT-R221A con pLJM1-LacZ 5 (d) Luz blanca (e) Luz verde (f) Procesada

De cada mezcla se realizaron triplicados en una placa de 96 pozos en las combinaciones que se observan en la Figura 36. Se agregó el ONPG y se incubaron a 37°C por 3 h, se detuvo la reacción y se leyó la observancia a 420nm.

El tratamiento de mantenerse a 50°C por 45 m en la línea celular PyMT-R221A generó el incrementó de la densidad óptica de pLJM1-LacZ5 con respecto a pLJM1-eGFP. La diferencia entre la la densidad óptica a 4°C fue 1.6 veces mayor, comparado con 50°C donde fue 4.2 veces mayor.

Las diferentes clonas de pLJM1-LacZ 5, 6 y 7 en la línea celular MDA-MB-231 no tuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$). Pero en PyMT-R221A pLJM1-LacZ 5 tuvo diferencias significativas con pLJM1-LacZ 6 ($P < 0.001$), y pLJM1-LacZ 5 con pLJM1-LacZ 7 también tuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$). Además de la diferencia entre las clonas pLJM1-LacZ 5 es el único que presentó diferencias significativas con pLJM1-eGFP ($P < 0.01$). Mientras que pLJM1-eGFP comparado con pLJM1-LacZ 6, pLJM1-LacZ 7, pcDNA-LacZ y las células no transfectadas no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$). Se realizó el análisis

estadístico por ANOVA de dos vías, y prueba de Bonferroni (Figura 36). Con estos resultados se decidió usar la clona se usará para PyMT-R221A será pLJM1-LacZ 5. El plásmido pcDNA-LacZ fue analizado por PCR para determinar si se obtienen los tamaños esperados. En el futuro todas las muestras se incubaran a 50°C por 45 minutos, ya que aparentemente los resultados varían entre líneas celulares.

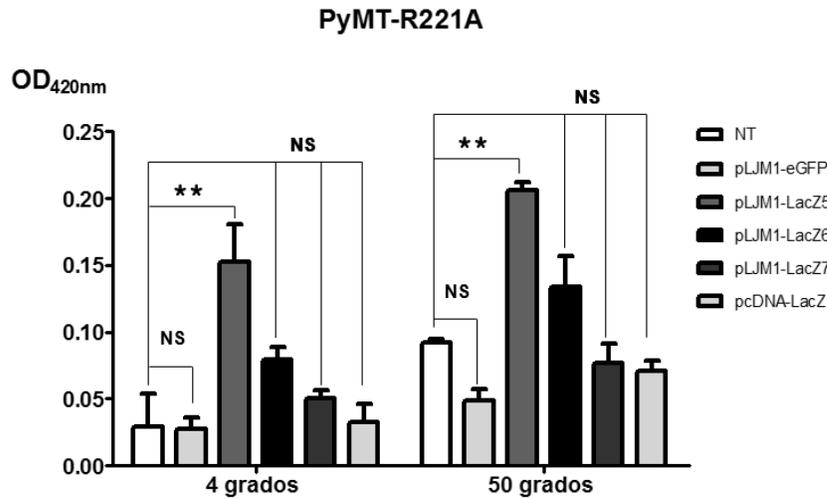


Figura 33 Ensayo β -galactosidasa en PyMT-R221A en diferentes temperaturas 4°C o 50°C, diferencias significativas entre las no transfectadas (NT) con pLJM1-LacZ 5 (** $P < 0.01$), NS (no significativa $P > 0.05$), ANOVA de dos vías y prueba de Bonferroni.

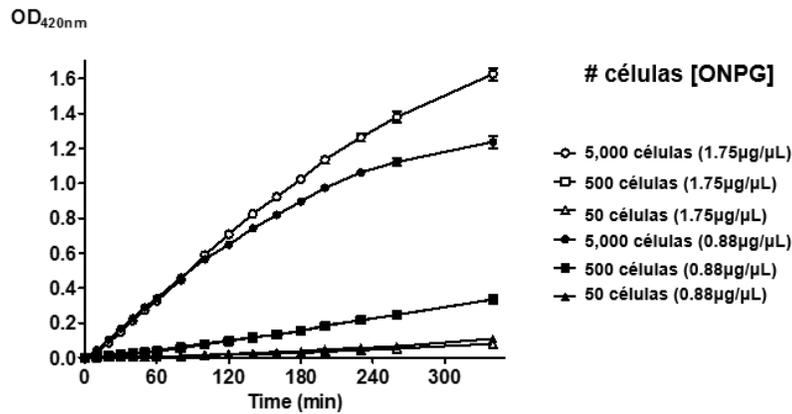


Figura 34 Curva cinética de β -galactosidasa, diferentes número de células y dos cantidades de ONPG (0.88 y 1.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Se realizó una curva cinética de β -galactosidasa con un número diferente de células, debido para el ensayo de citotoxicidad recomienda el uso de blanco, se evaluó si era un número suficiente para obtener valores de densidad óptica detectables. Se quería saber, cuál era el tiempo de incubación que permite observar diferencias entre las diferentes cantidades de células. También se probó duplicar la cantidad de ONPG

(1.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y no fueron muchas. Existe una gran diferencia. Sin embargo, con respecto a la cantidad de células, parecen seguir una relación lineal con la concentración 1.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ONPG.

Selección de células transducidas por puromicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Se realizó una selección de células transducidas por medio de puromicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las células recibieron tratamiento por 15 días, con lo que fue suficiente para generar un incremento en la población de células PyMT-eGFP, incrementando del 34% de al 97% de células positivas para eGFP. Debido a esto se esperaba que ocurriera lo mismo para las células PyMT- βgal . Esto se confirmó, por medio de un ensayo de β -galactosidasa, las células PyMT- βgal presentan un incremento significativo en la densidad con respecto al control, tal como se muestra en la Figura 36.

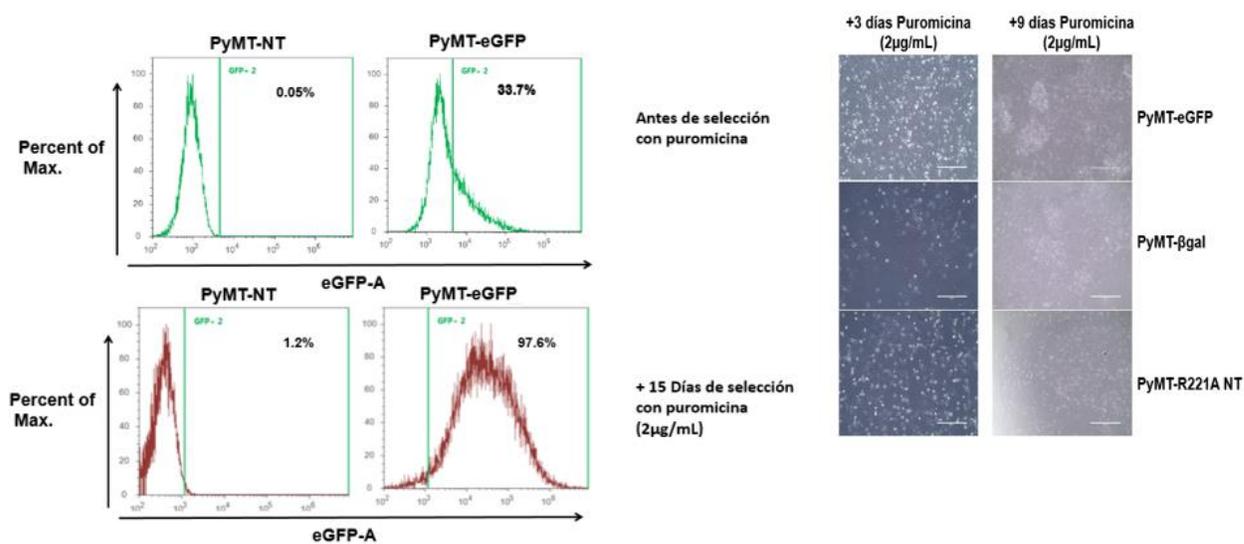


Figura 35 Diferencias en las poblaciones de células transducidas antes y después de la selección por puromicina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

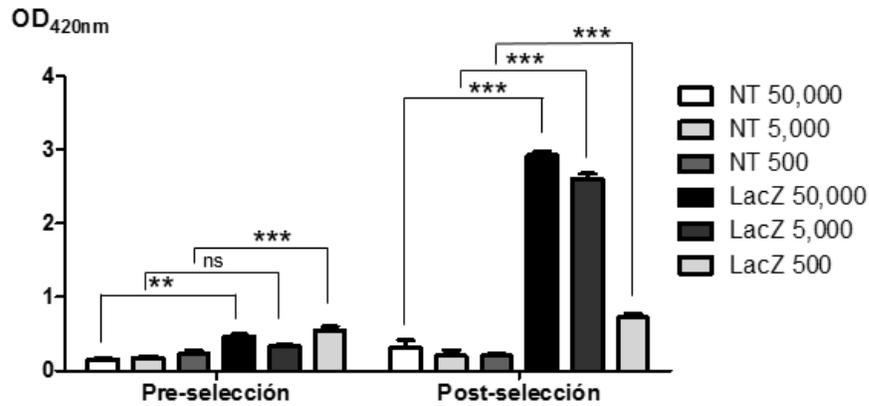


Figura 36 Selección por puromicina (2g/mL). Generó un incremento en la expresión de β -galactosidasa, analizado por medio de un Anova de dos vías y un test a posteriori de Bonferroni. Donde “ns” indica diferencias no significativas, “**” indica un $P < 0.01$ y “***” indica un $P < 0.0001$.

3.9.2 Células efectoras: aislamiento de linfocitos T CD8+

El aislamiento con las condiciones recomendadas por el proveedor usando las Dynabeads® (Untouched Mouse CD8⁺ T cells kit, Life Technologies) nos dio como resultado un 44.5% de linfocitos T CD8⁺ de las células producto de la selección negativa (Figura 37). Sin embargo, el porcentaje de otros linfocitos T es 7.7 mayor de lo que se esperaba, por lo tanto se realizan variaciones en el protocolo, duplicando y triplicando las cantidades de los reactivos, para determinar si los valores de otros linfocitos T disminuyen.

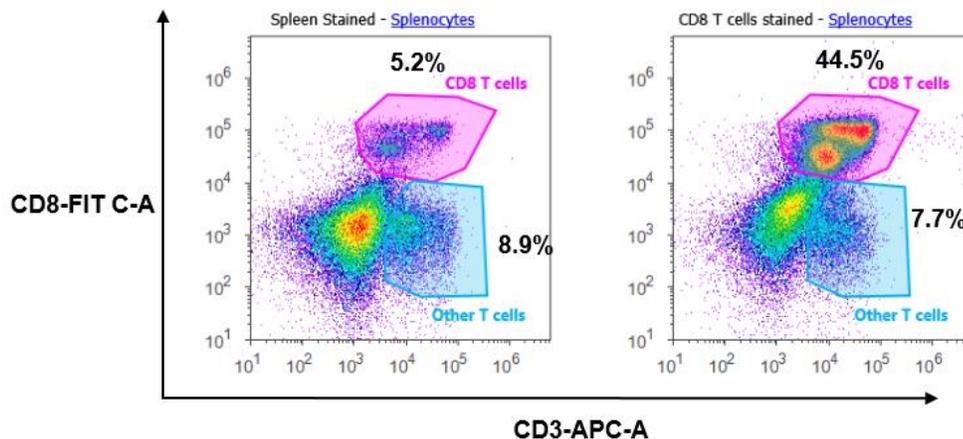


Figura 37 Primer aislamiento de linfocitos T CD8+. Usando CD8-FITC y CD3-APC-A, (izquierda) células de bazo (derecha) producto del aislamiento.

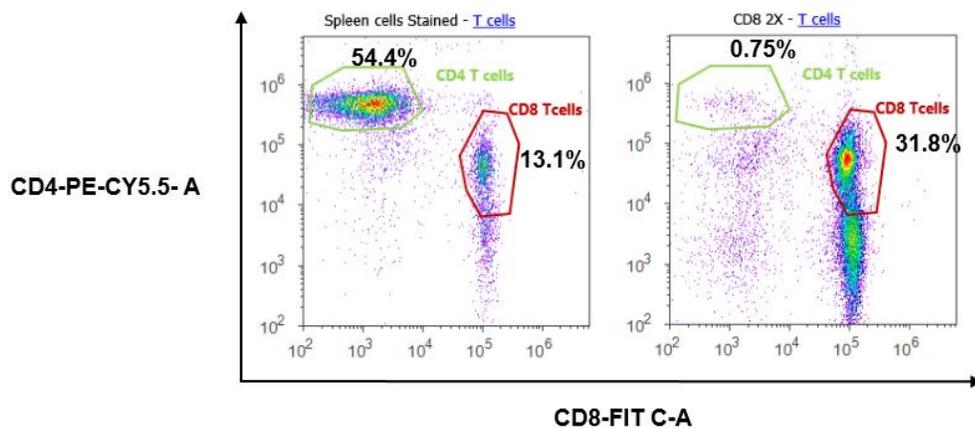


Figura 38 Aislamiento de linfocitos T CD8+ (derecha), comparado con células de bazo (izquierda). Utilizando los anticuerpos CD4-PE-CY5.5 y CD8-FITC.

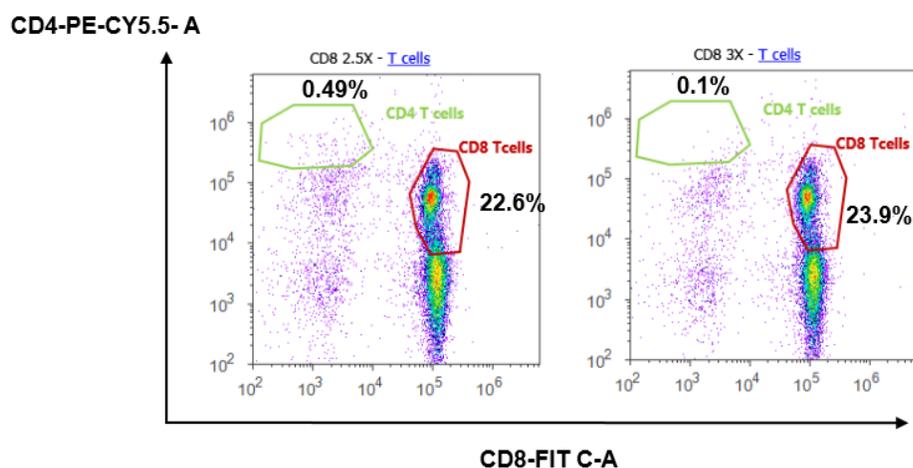


Figura 39 Aislamiento de linfocitos CD8+, utilizando 2.5 veces más reactivos (derecha) y usando tres veces más de las cantidades recomendadas (izquierda).

Se realizó un segundo aislamiento, pero esta vez los reactivos se multiplicaron por 2, 2.5 y por 3 veces lo recomendado y en los resultados que se muestran en la Figura 38 y Figura 39. Se obtuvieron buenos resultados con respecto a la disminución de los linfocitos T CD4+ que en las tres condiciones representaron menos del 1%, comparado con las células de bazo donde los linfocitos T CD4+ representan el 54% Figura 38. Sin embargo, el porcentaje de los linfocitos T CD8+ fue bajo comparado con el primer aislamiento

que fue el 45% (Figura 37), así que la siguiente estrategia será utilizar el kit para aislamiento de linfocitos T, y realizar el aislamiento de linfocitos T CD8⁺ en el producto.

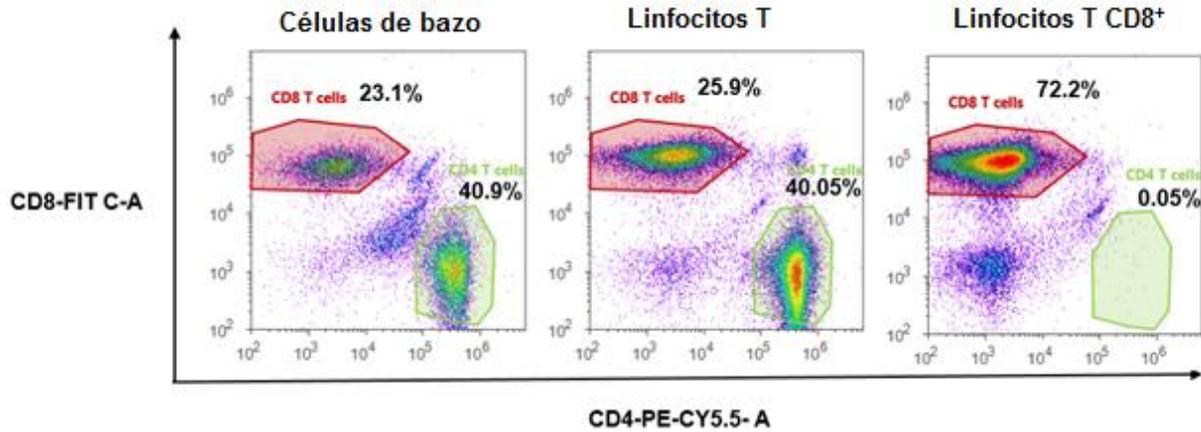


Figura 40 Aislamiento de linfocitos T CD8⁺, por selección negativa, (izquierda) bazo, (medio) aislamiento de linfocitos T y (derecha) aislamiento de linfocitos T CD8⁺. Detectados por los anticuerpos CD8-FIT C y CD4-PE-Cy5.5

Por último se hizo otra prueba esta vez purificando a los linfocitos T obteniendo la fracción 1 y posteriormente aislar a los linfocitos T CD8⁺ generando la fracción 2, los resultados fueron exitosos ya que la cantidad de linfocitos T CD4⁺ llegó a 0.05% y la cantidad de linfocitos CD8⁺ incrementó al 72%.

Linfocitos T CD8⁺ activados *in vitro*

Una vez que se obtuvieron los linfocitos T CD8⁺ se cultivaron en placas de 6 pozos, previamente tratadas con anti-CD3 (5µg/mL) o con PBS. Éstos a su vez recibieron diferentes tratamientos anti-CD3 (5µg/mL) y anti-CD28 (5µg/mL) en el medio. Los linfocitos T activados se observaron por microscopía óptica en búsqueda de cambios morfológicos; como lo sería un aumento de tamaño, o por agrupación celular (**Figura 41**).

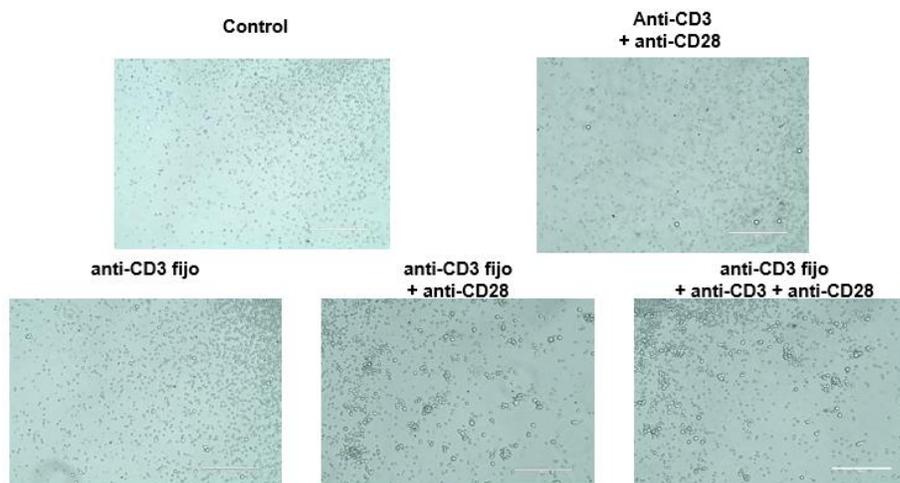


Figura 41 Activación *in vitro* de linfocitos T. Diferencias morfológicas entre linfocitos activados por medio de anti-CD3 y anti-CD28.

Proliferación celular de los linfocitos T activados

Se comparó la proliferación celular por medio del ensayo de MTT, comparando entre las diferentes condiciones.

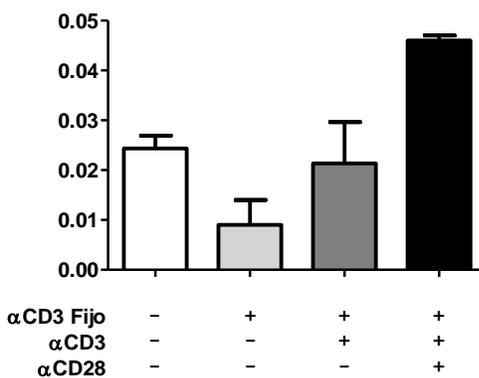


Figura 42 Densidad óptica del ensayo MTT. Color blanco representan a las células control, color gris claro representan a las células con anti-CD3 fijo, gris oscuro representan a las células solo anticuerpos solubles y negro representan a las células con anticuerpos fijos y solubles.

Expresión de IFN- γ en linfocitos activados por medio de (anti-CD3 y anti-CD28) con respecto a la β -2microglobulina.

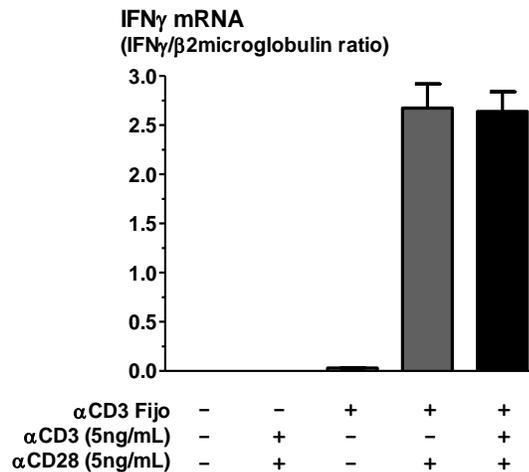


Figura 43 Expresión relativa de IFN-gamma. La expresión de IFN-gamma solo se detectó en los linfocitos que estuvieron en contacto con ambos anticuerpos.

Citotoxicidad de nanopartículas en células de cáncer de mama PyMT- β gal

Células de cáncer de mama de ratón PyMT- β gal se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de nanopartículas fotosensibles YMPS-PpIX (cortesía de Prakhar Sengar), se evaluaron 6.25 μ g/mL, 12.5 μ g/mL, 25 μ g/mL, 50 μ g/mL y 100 μ g/mL. Se sometieron a radiación UV 0.5 J y se compararon con las células sin contacto con radiación UV 0 J. Se analizó el sobrenadante para detectar la liberación de enzima β -galactosidasa, detectando la densidad óptica por una ensayo colorimétrico en las condiciones mencionadas previamente, se obtuvo el porcentaje de lisis celular. Se observa lo opuesto en el porcentaje de lisis, hay una relación directa con la concentración de las nanopartículas, solo en presencia de 0.5J UV. Por otro lado se realizó un ensayo de viabilidad con MTT, ésta molécula nos permite detectar células vivas y por medio del ensayo colorimétrico se obtuvieron los valores de densidad óptica (). Es posible observar una relación con respecto al número de células viables disminuye en las células que recibieron 0.5 J UV y con una relación directa a la concentración de las nanopartículas. Éstos resultados apoyan la hipótesis de que el método de liberación de β -galactosidasa es una herramienta útil para detectar citotoxicidad.

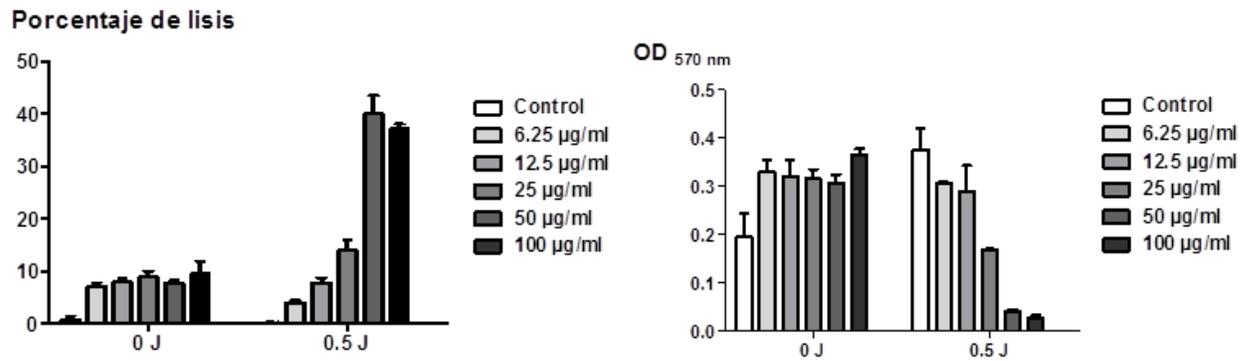


Figura 44 Análisis de citotoxicidad, por liberación de β -galactosidasa y ensayo de viabilidad. Porcentaje de lisis (Izquierda) y ensayo de viabilidad de células MTT (derecha). Comparando diferentes concentraciones y dos condiciones una con 0 J sin irradiación UV y una con irradiación UV de 0.5 J.

Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ activados

Se colocaron los linfocitos T CD8⁺ en co-cultivo con las células PyMT- β gal en diferentes proporciones. Los linfocitos activados recibieron un tratamiento con anti-CD3 (5 μ g/mL) y anti-CD28 (5 μ g/mL) en el medio, por siete días y se agregaron en 1:1, 5:1, 10:1, 25:1, 50:1 con respecto a las 5,000 células PyMT- β gal. Se mantuvieron en co-cultivo, por una noche. Posteriormente se analizó el sobrenadante generando los siguientes resultados, se observa una aparente correlación en la liberación de β -galactosidasa con una mayor proporción de linfocitos T CD8⁺.

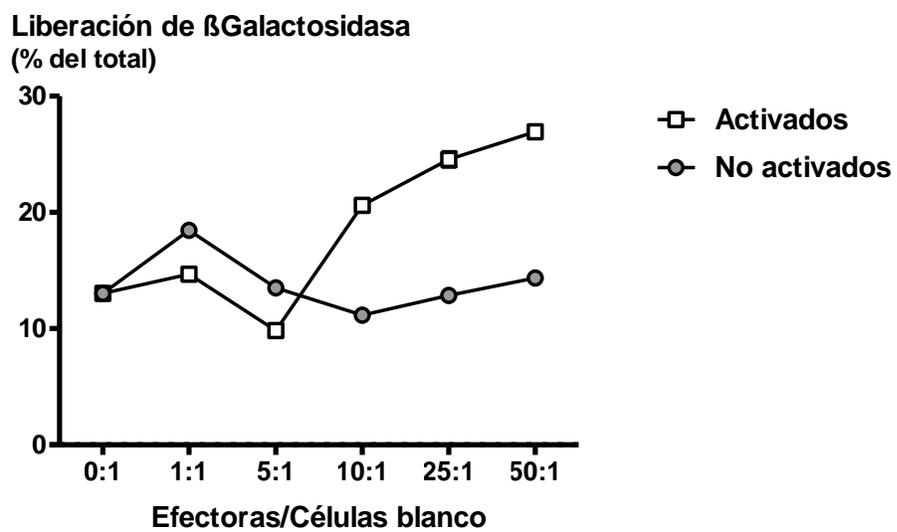


Figura 45 Porcentaje de lisis celular. La lisis de células incrementa con respecto a la proporción de linfocitos T con respecto a las células blanco.

Capítulo 4. Discusiones

No existe un tratamiento que pueda curar la metástasis ósea por lo tanto es importante considerar nuevas estrategias como la inmunoterapia. La inmunoterapia consiste en el uso o en la activación del sistema inmune del paciente en contra de sus células cancerosas y ha sido efectiva en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como melanoma. Representa una potencial y poderosa solución para la metástasis ósea. Sin embargo, sabemos que la eficiencia de estos tratamientos son mitigados por múltiples factores: las células cancerosas por sí mismas y por su capacidad de esconderse o inhibir la respuesta inmune, el microambiente tumoral por otro lado es capaz de funcionar como un escudo para las células cancerosas contra el sistema inmune (fibroblastos asociados a cáncer) o inhibir la respuesta inmune (con MDSC). Adicionalmente el tumor puede algunas veces usar al sistema inmune a su favor (como los macrófagos asociados a tumores que logran incrementar la angiogénesis) y si los linfocitos T aumentan la osteoclastogénesis en la metástasis ósea como lo pueden hacer en la osteoporosis o en la artritis reumatoide, ellos podrían favorecer el ciclo vicioso de la metástasis ósea e incrementarlo. Por lo tanto es crítico conocer las interacciones entre las células cancerosas y el sistema inmune en el hueso. De ahí nuestra necesidad de: estandarizar las condiciones para la eliminación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en ratones FVB. Establecer un modelo singénico de metástasis ósea por medio de la inoculación de células de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A en ratones FVB. Y adaptar un método no radioactivo para evaluar la citotoxicidad de los linfocitos T.

Existen ratones genéticamente modificados que carecen de linfocitos T CD4+ (ratón *Knockout* CD4 o MHC-II) o de linfocitos T CD8+ (ratón *knockout* CD8 o MHC-I). Sin embargo, la mayoría de los ratones *knockout/knockin/transgénicos* pertenecen a la cepa C57BL/6 o tienen una carga genética mixta lo cual no nos permitiría realizar una inoculación de las células de cáncer de ratón PyMT-R221A, las cuales fueron aisladas de un ratón FVB que se ha reportado que causan metástasis ósea con lesiones osteolíticas. Aunado a esto, los ratones transgénicos deficientes de linfocitos T CD4+ o CD8+ desde el nacimiento podrían tener algún comportamiento defectuoso o anormal de otras células del sistema inmune. Por ejemplo, los ratones que carecen del gen CD4 desarrollan una gran población de linfocitos T CD8+ que interacciona con el MHC-II, es decir que no se restringe solo a células con MHC-I (Tyznik *et al.*, 2004). En una familia de pacientes que portaban una mutación sin sentido en el gen CD8 α , existía una gran población de linfocitos T CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ + como compensación (de la Calle-Martin *et al.*, 2001).

Por lo tanto el uso de anticuerpos anti CD4 y CD8 representa una manera fácil y sencilla para eliminar a los linfocitos T CD4+ y CD8+ independientemente del fondo genético, dejando un corto periodo de tiempo para que afecte a otros componentes del sistema inmune.

Nuestros resultados muestran que con el tratamiento con anti-CD4 y anti CD8 se induce una eliminación rápida (tan temprano como 2 días después de la 1era. Inoculación) en la sangre periférica de ratón FVB que recibió una dosis de 75 o 100µg. Este efecto fue persistente y con una dosis del 100µg de anticuerpo anti-CD4 o anti-CD8, continuo una reducción exitosa por 7 días después del tratamiento. Además, el análisis de linfocitos T en medula ósea confirmó que había una eliminación eficiente dentro de los huesos. Por lo tanto una dosis semanal de 100µg de anti-CD4 o anti-CD8 nos debe de proveer de una eliminación eficiente, linfocitos T específicos para probar su efecto en el desarrollo de la metástasis ósea de células de cáncer de mama de ratón FVB en ratones FVB.

No existe un modelo donde el cáncer de mama pueda ser causado por agentes carcinogénicos o modificaciones genéticas en el ratón y que espontáneamente metastaticen a hueso, con una incidencia lo suficientemente alta para poder usarlos para estudiar los mecanismos de la metástasis ósea y su tratamiento. La inoculación intracardiaca de células cancerosas, en el ventrículo izquierdo del corazón es la mejor alternativa disponible para que las células cancerosas eviten los pulmones y los capilares donde podrían quedar atrapadas y causar una trombosis, o metástasis en los pulmones.

La cepa pura de ratón FVB tiene una larga y compleja historia, que comenzó en el Instituto Nacional de la salud (NIH por sus siglas en inglés) en 1935 y en 1990 diversos proveedores establecidos de ratones, establecieron y mantuvieron sus propias colonias para su distribución, incluyendo al Instituto Central de la Experimentación Animal (CIEA por sus siglas en inglés, Japón). Los ratones FVB han sido usados ampliamente para el desarrollo de ratones transgénicos (Takeito *et al.*, 1991). Hace un periodo de tiempo indeterminado, la UPEAL de CINVESTAV adquirió algunos ratones FVB de la CIEA, denominados FVB:CIEA y logran distribuir estos ratones en laboratorios de México. Los ratones FVB:CIEA fueron obtenidos del CINVESTAV y se mantuvieron en la DIB para propósitos experimentales.

La línea celular de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A derivó de un ratón MMTV-PyMT con un fondo genético de ratón FVB que espontáneamente desarrolla tumores mamarios. PyMT-R221A inoculada subcutáneamente en ratones FVB debería desarrollar tumores s.c. y cuando se inocularan en las tibias deberían formar metástasis ósea con lesiones osteolíticas. Para evaluar si éstas células eran capaces de desarrollar metástasis ósea a partir de inoculación intracardiaca, 8 ratones fueron inoculados con 100,000

células en el ventrículo izquierdo del corazón, posteriormente los huesos fueron colectados para análisis radiográfico. Sin embargo, a pesar de que pasó más de un mes después de la inoculación, no fue posible identificar áreas de osteólisis en los rayos X. Este resultado coincide con resultados previos donde otra línea celular derivada de un modelo MMTV-PyMT falló causando metástasis ósea en 5 de 20 ratones FVB inoculados intracardiamente (Werbeck *et al.*, 2014). Por lo tanto utilizamos inoculación de células PyMT directamente en la tibia de los ratones FVB, en los cuales se reportaban que causaban lesiones osteolíticas entre 9-20 días dependiendo de la publicación. Inoculamos entre 50,000 a 200,000 células y esperamos hasta 28 días para la eutanasia. La máxima incidencia que obtuvimos fue del 20% (3/13) cuando inoculamos 200,000 células y esperamos por 28 días. Esta incidencia está demasiado baja como para representar un modelo de metástasis ósea útil. Análisis estadísticos indican que por lo menos 10 ratones con metástasis ósea son necesarios para tener suficiente poder estadístico y necesitaríamos entonces inocular y tratar a 50 ratones por grupo para tener resultados. Aunado a esto notamos que los tres ratones que desarrollaron metástasis ósea, desarrollaron metástasis ósea en ambas tibias, mientras que los otros no desarrollaron metástasis en ninguna de las tibias. Ninguno de los ratones presenta osteólisis en solo 1 de las 2 tibias inoculadas. Esto sugiere que algunos ratones son más susceptibles a desarrollar lesiones óseas. Considerando esta baja incidencia, la cual no se esperaba, inoculamos células PyMT de manera subcutánea. En estas condiciones el 100% de los ratones debería de presentar tumores en crecimiento. Sin embargo, solo 8 de los 20 ratones que fueron inoculados presentaron tumores palpables y medibles. Esto sugiere que algunos de los ratones fueron capaces de tener una respuesta inmune la cual puede resultar en un rechazo al tumor, a pesar de que los tumores no fueron colectados para confirmar la supuesta respuesta inmune.

En general estos resultados sugieren que podría haber suficiente diferencias genéticas entre las células PyMT las cuales derivaron de un ratón FVB y los ratones FVB:CIEA del CINVESTAV para causar esta baja incidencia de crecimiento de tumores en las tibias o s.c. Hasta el momento no tenemos evidencia para respaldar esta suposición. Sin embargo, es bien sabido que incluso los vendedores de ratones más reconocidos con excelente reputación pueden tener variaciones o errores en las colonias. Charles River distribuye Ratones desnudos atómicos [CrI:UN(NCr)-*Foxn1*] que originalmente se pensaba que tenían un trasfondo genético BALB/c y se mantenían con cruza endogámicas. Sin embargo, fue recientemente descubierto que se han mantenido como una sepa no pura y no puede seguir considerándose Balb/c. Harlan mantuvo su colonia de C57BL/6 (C57BL/6NHsd) como cepa pura desde 1974. A pesar del programa de control de calidad genético, lo que es crítico para el mantenimiento de colonias puras, una mutación ocurrió específicamente en su colonia, y esta no fue detectada en otros proveedores, probablemente desde hace décadas (Mahajan *et al.*, 2016). Hubo una duplicación homocigota de dos exones del gen

Dock2 que crea a una proteína no funcional. Esta mutación afecta la migración y el alojamiento de ambos linfocitos T y B y a un sin número de investigadores que utilizaron estos ratones, incluyendo a estudios inmunológicos.

Por lo que no es inconcebible que podrían haber suficientes diferencias genéticas en los ratones FVB:CIEA para que causara el rechazo de las células PyMT-R221A en un significativo de ratones. Nos encontramos tratando de identificar una colonia de FVB de otros proveedores que podría ser adecuado para nuestras necesidades. A pesar de que todas las demás colonias se encuentran fuera de México, lo cual significaría que se requerirían meses de procedimientos administrativos para que se permita la importación de estos ratones. Para asegurarnos de que los ratones FVB:CIEA que obtuvimos son significativamente diferentes de los FVB de otras colonias, necesitaremos realizar un escaneo genético para comparar los polimorfismos del nucleótido simple (SNP por sus siglas en inglés) entre el genoma de nuestros ratones FVB:CIEA y los ratones FVB de otros proveedores, lo cual no ha sido posible ya que tendríamos que importar a los ratones primero.

A partir de ahora no está claro si las células PyMT-R221A pueden ser usadas para un modelo singénico de metástasis ósea. Alternativas serían buscar otras líneas de células de cáncer de mama derivadas de ratón. Sin embargo, puede que no todas las líneas de células de cáncer de mama sean capaces de crecer en el hueso. Contamos con células 4T1 que se comportan bien en ratones BALB/c (Harlan) pero es importante considerando la heterogeneidad del cáncer confirmar que los resultados son específicos de un modelo o no. Johnstone et al. (2015) recientemente aislaron células de cáncer de mama metastásicas de un tumor metastásico en ratones C57BL/6 que expresan PTHrP y MMP-3, los cuales son dos factores importantes para el desarrollo de la metástasis ósea (Guise *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 2007). Considerando que existen muchos mecanismos que son compartidos por la metástasis de cáncer de próstata y cáncer de mama, se podría considerar probar la habilidad de las células de cáncer de próstata de ratón, como RM-1, TRAMP-C1 y TRAMP-C2 que fueron extraídas de ratones C57BL/6 y causan metástasis ósea.

El ensayo de liberación de ⁵¹Cr ha sido el experimento más utilizado para evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos T, es un sensible y sencillo método que puede utilizarse en cualquier tipo de células blanco. Debido a que solo necesitan ser cultivadas en presencia del ⁵¹Cr para ser marcadas. El único problema es la radioactividad.

Una alternativa no radioactiva es utilizando citometría de flujo para diferenciar entre células en estado de apoptosis (e.g. Anexina V, actividad de caspasas) o detectar la pérdida de la estabilidad de la membrana

(e.g. internalización de yoduro de propidio). El problema es que se requiere cultivar una gran cantidad de células por condición. Otra alternativa no radiactiva se basa en la liberación de fluorocromos (e.g. CFSE, GFP) que no permiten una amplificación de la señal o enzimas (e.g. luciferasa, β -galactosidasa) las cuales pueden producir unas señales luminiscentes, fluorescentes o productos de color específico que permite la amplificación de la señal. Esto nos permite el uso de pequeñas cantidades de células. La desventaja es que no todas las células son capaces de expresar GFP, luciferasa o β -galactosidasa.

Decidimos tomar la ventaja de la simplicidad del ensayo de β -galactosidasa y de las partículas del sistema lentiviral. Se requieren al menos 7 días de activación de los linfocitos T para comenzar a detectar la liberación de β -galactosidasa en las proporciones más altas de células efectoras con respecto a las células blanco (E:B). Existen alternativas para incrementar la sensibilidad del ensayo utilizando CPRG (Rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido), en lugar del ONPG, el cual genera una señal más intensa en diferente longitud de onda.

Las perspectivas a futuro es que se requiere más trabajo para confirmar si los conocidos inhibidores de la actividad de los linfocitos T reducirá la actividad citotóxica en nuestro ensayo (e.g TGF- β). Antes de hacer un experimento donde se aislarían los linfocitos T CD8+ (por selección negativa con perlas magnéticas Dynabeads®) de huesos normales, huesos con metástasis ósea o de algún tumor u otro sitio de metástasis para comparar la actividad citotóxica de los linfocitos T o comparar la actividad citotóxica de los linfocitos T en el sitio de metástasis ósea cuando se utilicen tratamientos que incrementan la activación de los linfocitos T (e.g. anti-TGF- β , anti-hipóxicos, IL-2 o IFN- γ).

Capítulo 5. Conclusiones

La inoculación intraperitoneal de anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 a una dosis de 100µg, cada siete días genera una eliminación exitosa (>95% en sangre periférica) de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se confirmó que este tratamiento es capaz de eliminar a las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los huesos. Por lo tanto este tratamiento nos puede ayudar a estudiar el papel de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en la metástasis ósea.

La inoculación intracardiaca de células de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A no genera metástasis ósea, por lo tanto este tipo de inoculación no es útil para nuestros fines. Con la inoculación intratibial se obtuvo una baja incidencia en lesiones osteolíticas, incluso con un gran número de células cancerosas (200,000). Después de una inoculación subcutánea solo el 40% de los ratones desarrolló tumores palpables. Por lo tanto, se le atribuye a una diferencia genética de la cepa de ratones FVB:CIEA con respecto a los ratones FVB de otros proveedores, sin evidencias genéticas.

El desarrollo de las células PyMT-βgal representa una sencilla alternativa no radioactiva que permite detectar la actividad citotóxica no solo de los linfocitos T CD8⁺, además de otros compuestos citotóxicos como las nanopartículas fotosensibles.

Literatura citada

- Abbas, A.K., Andrew H. Lichtman, S.P. (2012) *Cellular and Molecular Immunology 7th Edition*.
- Blank, C.U., Haanen, J.B., Ribas, A., Schumacher, T.N. (2016) Cancer Immunology. The 'cancer immunogram'. *Science (New York, N.Y.)*. **352**(6286), 658–60.
- Blattman, J.N., Greenberg, P.D. (2004) Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science (New York, N.Y.)*. **305**(5681), 200–5.
- Body, J., Bartl, R., Burckhardt, P., Delmas, P., Diel, I., Fleisch, H., Kanis, J., Kyle, R., Mundy, G., Paterson, A., Rubens, R. (1998) Current use of bisphosphonates in oncology. International Bone and Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **16**(12), 3890–3899.
- Callahan, M.K., Wolchok, J.D. (2013) At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *Journal of leukocyte biology*. **94**(1), 41–53.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev. Cancer*. **2**, 563–572.
- Christenson, R.H. (1997) Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical biochemistry*. **30**(8), 573–593.
- Coleman, R.E. (2001) Metastatic bone disease : clinical features , pathophysiology and treatment strategies. , 165–176.
- Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.-I., Cheng, P., Cho, H.-I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., McCaffrey, T. V, McCaffrey, J.C., Gabilovich, D.I. (2010) HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of experimental medicine*. **207**(11), 2439–53.
- Dong, C. (2006) Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Rev. Immunology*. **6**, 329–333.
- Fidler, I. (1970) Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. **45**(4), 773–782.
- Fournier, P.G.J., Chirgwin, J.M., Guise, T. a (2006) New insights into the role of T cells in the vicious cycle of bone metastases. *Current opinion in rheumatology*. **18**(4), 396–404.
- Globocan (2015) Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. *Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. [online]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
- Gorsch, S.M., Memoli, V.A., Stukel, T.A., Gold, L.I., Arrick, B.A. (1992) Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res*. **52**(24), 6949–6952.

- Guise, T.A., Yin, J.J., Taylor, S.D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B.F., Yoneda, T., Mundy, G.R. (1996) Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *Journal of Clinical Investigation*. **98**(7), 1544–1549.
- Guy, C.T., Cardiff, R.D., Muller, W.J. (1992) Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Molecular and cellular biology*. **12**(3), 954–961.
- Halpern, J., Lynch, C.C., Fleming, J., Hamming, D., Martin, M.D., Schwartz, H.S., Matrisian, L.M., Holt, G.E. (2006) The application of a murine bone bioreactor as a model of tumor: Bone interaction. *Clinical and Experimental Metastasis*. **23**(7–8), 345–356.
- Hanahan, D., Weinberg, R. a. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**, 57–70.
- Hofbauer, L.C., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L., Khosla, S. (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*. **25**(3), 255–259.
- Jackson, J.G., Zhang, X., Yoneda, T., Yee, D. (2001) Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate- 2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines. *Oncogene*. **20**(0950–9232 SB–IM), 7318–7325.
- Jones, D.H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Kozieradzki, I., Komarova, S. V, Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C. V, Komnenovic, V., Kong, Y.-Y., Schreiber, M., Dixon, S.J., Sims, S.M., Khokha, R., Wada, T., Penninger, J.M. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. **440**(7084), 692–696.
- Justo, N., Wilking, N., Jönsson, B. (2011) PHP3 A Review of Breast Cancer (BC) Care and Outcomes in Latin America & Caribbean (LAC). *Value in Health*. **14**(7), A549.
- Kakonen SM, M.G. (2003) Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer*. **97**(834), 839.
- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G.P., Serganova, I., Chen, C.-R., Manova-Todorova, K., Blasberg, R., Gerald, W.L., Massagué, J. (2005) Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**(39), 13909–14.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. **3**(6), 537–549.
- Kim, I.S., Baek, S.H. (2010) Mouse models for breast cancer metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **394**(3), 443–447.
- Kingsley, L. a, Fournier, P.G.J., Chirgwin, J.M., Guise, T. a (2007) Molecular biology of bone metastasis. *Molecular cancer therapeutics*. **6**(10), 2609–17.
- Kong, Y.Y., U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, et al. (2000) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. **408**, 304–309.

- Korpal, M., Yan, J., Lu, X., Xu, S., Lerit, D. a, Kang, Y. (2009) Imaging transforming growth factor-beta signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis. *Nature medicine*. **15**(8), 960–6.
- Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M.T. Gillespie, et al. (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *Journal Clinical Investigation*. **103**, 1345–1352.
- Kozlow W, G.T. (2005) Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **10**(169), 180.
- Kruisbeek, a M. (2001) In vivo depletion of CD4- and CD8-specific T cells. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*. **Chapter 4**, Unit 4.1.
- de la Calle-Martin, O., Hernandez, M., Ordi, J., Casamitjana, N., Arostegui, J.I., Caragol, I., Ferrando, M., Labrador, M., Rodriguez-Sanchez, J.L., Espanol, T. (2001) Familial CD8 deficiency due to a mutation in the CD8 α gene. *Journal of Clinical Investigation*. **108**(1), 117–123.
- Lacey, D.L. et al. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. **93**, 165–176.
- Mahajan, V.S., Demissie, E., Mattoo, H., Viswanadham, V., Varki, A., Morris, R., Pillai, S., Cariappa, A., Takematsu, H., Liu, H., Diaz, S., Haider, K., Boboila, C., Kalloo, G., Connole, M., Shi, H.N., Varki, N., al., et, Collins, F.S., Rossant, J., Wurst, W., Consortium, I.M.K., Didion, J.P., Yang, H., Sheppard, K., Fu, C.-P., McMillan, L., Villena, F.P.-M. de, Churchill, G.A., Freeman, H.C., Hugill, A., Dear, N.T., Ashcroft, F.M., Cox, R.D., Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., Sasazuki, T., Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Inayoshi, A., Enjoji, M., Takayanagi, R., Sasazuki, T., Fukui, Y., Gotoh, K., Tanaka, Y., Nishikimi, A., Nakamura, R., Yamada, H., Maeda, N., Ishikawa, T., Hoshino, K., Uruno, T., Cao, Q., al., et, Hedlund, M., Tangvoranuntakul, P., Takematsu, H., Long, J.M., Housley, G.D., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Wynshaw-Boris, A., Ryan, A.F., Gallo, R.L., al., et, Kumar, V., Kim, K., Joseph, C., Kourrich, S., Yoo, S.-H., Huang, H.C., Vitaterna, M.H., Villena, F.P.-M. de, Churchill, G., Bonci, A., Takahashi, J.S., Kunisaki, Y., Tanaka, Y., Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Nakayama, T., Harada, M., Taniguchi, M., Sasazuki, T., Fukui, Y., Langmead, B., Salzberg, S.L., Mahajan, V.S., Pillai, S., Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.-C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., Caspi, R.R., McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., DePristo, M.A., Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., Yoshiki, A., Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., Roder, J.C., Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., al., et, Pillai, S., Cariappa, A., Pirnie, S.P., Purtha, W.E., Swiecki, M., Colonna, M., Diamond, M.S., Bhattacharya, D., Quinlan, A.R., Hall, I.M., Reheeman, A., Tasneem, S., Ni, H., Hayward, C.P.M., Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M., Sirotkin, K., Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., al., et, Specht, C.G., Schoepfer, R., Taft, R.A., Davisson, M., Wiles, M.V., Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., Taniguchi, T., Watkins-Chow, D.E., Pavan, W.J., Yalcin, B., Adams, D.J., Flint, J., Keane, T.M., Yasuda, K., Richez, C., Maciaszek, J.W., Agrawal, N., Akira, S., Marshak-Rothstein, A., Rifkin, I.R., Yasuda, K., Nündel, K., Watkins, A.A., Dhawan, T., Bonegio, R.G., Ubellacker, J.M., Marshak-Rothstein, A., Rifkin, I.R., Zurita, E., Chagoyen, M., Cantero, M., Alonso, R., González-Neira, A., López-Jiménez, A., López-Moreno, J.A., Landel, C.P., Benítez, J., Pazos, F., Montoliu, L. (2016) Striking Immune Phenotypes

in Gene-Targeted Mice Are Driven by a Copy-Number Variant Originating from a Commercially Available C57BL/6 Strain. *Cell reports*. **15**(9), 1901–9.

Manual, R. Breeding Strategies for Maintaining Colonies of Laboratory Mice. Jackson The laboratory. 2007.

Marx, R.E., Hughes, D.E., Wright, K.R., Uy, H.L., al., et, Vitte, C., Fleisch, H., Guenthes, H.L., Hughes, D.E., MacDonald, B.R., Russell, R.G., al., et, Sato, M., Grasser, W., Teronen, O., Heikkila, P., Konttinenn, Y.T., al., et, Schenk, R.K., Parfett, A.M., Frith, J.C., Monkkonen, J., Blackburn, G.M., al., et, Tenenbaum, H.C., Shelemay, A., Girard, B., al., et, Fleisch, H. (2003) Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. **61**(9), 1115–7.

Masumori, N., Thomas, T.Z., Chaurand, P., Case, T., Paul, M., Kasper, S., Caprioli, R.M., Tsukamoto, T., Shappell, S.B., Matusik, R.J. (2001) A Probasin-Large T Antigen Transgenic Mouse Line Develops Prostate Adenocarcinoma and Neuroendocrine Carcinoma with Metastatic Potential. *Cancer Research*. **61**(5).

Monteiro, A.C., Leal, A.C., Gonçalves-Silva, T., Mercadante, A.C.T., Kestelman, F., Chaves, S.B., Azevedo, R.B., Monteiro, J.P., Bonomo, A. (2013) T cells induce pre-metastatic osteolytic disease and help bone metastases establishment in a mouse model of metastatic breast cancer. *PLoS one*. **8**(7), e68171.

Moore, M.A. (2001) The role of chemoattraction in cancer metastases. *Bioessays*. **23**, 674–676.

Müller, a, Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, a, Verástegui, E., Zlotnik, a (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. **410**(6824), 50–56.

Mundy, G.R. (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Rev. Cancer*. **2**, 584–593.

Nijhuis, E.W.P., v/d Wiel-van Kemenade, E., Figdor, C.G., van Lier, R.A.W. (1990) Activation and expansion of tumour-infiltrating lymphocytes by anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **32**(4), 245–250.

Paget, S. (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*. **133**(3421), 571.

Pardoll, D.M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. **12**(4), 252–264.

Van Poznak, C., Cross, S.S., Saggese, M., Hudis, C., Panageas, K.S., Norton, L., Coleman, R.E., Holen, I. (2006) Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. *Journal of clinical pathology*. **59**(1), 56–63.

Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S., Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S. (2001) Mouse 4T1 Breast Tumor Model. In *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 20.2.1-20.2.16.

- Rogers, M.J., Xiong, X., Ji, X., Mönkkönen, J., Russell, R.G.G., Williamson, M.P., Ebetino, F.H., Watts, D.J. (1997) Inhibition of Growth of *Dictyostelium discoideum* Amoebae by Bisphosphonate Drugs Is Dependent on Cellular Uptake. *Pharmaceutical Research*. **14**(5), 625–630.
- Roggia, C., Gao, Y., Cenci, S., Weitzmann, M.N., Toraldo, G., Isaia, G., Pacifici, R. (2001) Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**(24), 13960–5.
- Roodman, G.D. (1999) Cell biology of the osteoclast. *Exp. Hematol.* **27**, 1229–1241.
- Rose, A.A.N., Pepin, F., Russo, C., Abou Khalil, J.E., Hallett, M., Siegel, P.M. (2007) Osteoactivin Promotes Breast Cancer Metastasis to Bone. *Molecular Cancer Research*. **5**(10).
- Ross, F. (2000) RANKing the importance of measles virus in Paget's disease. *J. Clin. Invest.* **105**, 555–558.
- Sambrook, Joseph. Russell, David W. (David William), 1957 (2006) *The condensed protocols from molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. - Version details - Trove.*
- Singh, B., Berry, J., Shoher, A., Ayers, G., Wei, C., Lucci, A. (2007) COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene*. **26**, 3789–3796.
- Stopeck, A.T., Lipton, A., Body, J.-J., Steger, G.G., Tonkin, K., de Boer, R.H., Lichinitser, M., Fujiwara, Y., Yardley, D.A., Viniegra, M., Fan, M., Jiang, Q., Dansey, R., Jun, S., Braun, A. (2010) Denosumab Compared With Zoledronic Acid for the Treatment of Bone Metastases in Patients With Advanced Breast Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *Journal of Clinical Oncology*. **28**(35), 5132–5139.
- Taketo, M., Schroeder, A.C., Mobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F., Hansen, C.T. (1991) FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**(6), 2065–9.
- Theill, L.E., Boyle, W.J., Penninger, J.M. (2002) RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual review of immunology*. **20**(4), 795–823.
- Thiolloy, S., Edwards, J.R., Fingleton, B., Rifkin, D.B., Matrisian, L.M., Lynch, C.C. (2012) An osteoblast-derived proteinase controls tumor cell survival via TGF-beta activation in the bone microenvironment. *PLoS ONE*. **7**(1).
- Thompson, D.D., Simmons, H.A., Pirie, C.M., Ke, H.Z. (1995) FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. **17**(4 Suppl), 125S–133S.
- Tyznik, A.J., Sun, J.C., Bevan, M.J. (2004) The CD8 Population in CD4-deficient Mice Is Heavily Contaminated with MHC Class II-restricted T Cells. *Journal of Experimental Medicine*. **199**(4).
- Vétizou, M., Pitt, J.M., Daillère, R., Lepage, P., Waldschmitt, N., Flament, C., Rusakiewicz, S., Routy, B., Roberti, M.P., Duong, C.P.M., Poirier-colame, V., Roux, A., Becharef, S., Formenti, S., Golden, E., Cording, S., Eberl, G., Schlitzer, A. (2015) Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. **350**(6264), 1079–1084.

- Weaver, C.T., L.E. Harrington, P.R. Mangan, M. Gavrieli, and K.M.M. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. **24**, 677–688.
- Weitzmann, M.N., Pacifici, R. (2005) The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev.* **208**, 154–168.
- Werbeck, J.L., Thudi, N.K., Martin, C.K., Premanandan, C., Yu, L., Ostrowski, M.C., Rosol, T.J. (2014) Tumor Microenvironment Regulates Metastasis and Metastasis Genes of Mouse MMTV-PyMT Mammary Cancer Cells In Vivo. *Veterinary Pathology*. **51**(4), 868–881.
- Wright, L.E., Ottewill, P.D., Rucci, N., Peyruchaud, O., Pagnotti, G.M., Chiechi, A., Buijs, J.T., Sterling, J.A. (2016) Murine models of breast cancer bone metastasis. *BoneKEy Reports*. **5**.
- Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G.R., Guise, T.A. (1999) TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. . **103**(2), 197–206.