

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Caracterización del efecto de linfocitos T de metástasis ósea
en la formación de osteoclastos**

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

Presenta:

Juan Alberto Corral Avila

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Juan Alberto Corral Avila

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Juan Alberto Corral Avila © 2020

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 **Juan Alberto Corral Avila** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

Caracterización del efecto de linfocitos T de metástasis ósea en la formación de osteoclastos

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

La metástasis ósea es una complicación médica frecuente en pacientes con etapas avanzadas de cáncer de mama y próstata. A pesar de que existen tratamientos disponibles, la metástasis ósea no tiene cura. Por ello, es de suma importancia estudiar nuevas opciones de tratamientos, como es la inmunoterapia; la cual utiliza distintos componentes del sistema inmune o la respuesta inmune de los mismos pacientes, para combatir sus células cancerígenas. La inmunoterapia ya se ha probado en varios tipos de cáncer, sin embargo, ha recibido poca atención para su uso en la metástasis ósea. Una complicación potencial es que el sistema inmune regula la remodelación ósea, y que los linfocitos T pueden aumentar la formación de osteoclastos y la resorción ósea. En la metástasis ósea, la resorción ósea estimula a la proliferación de las células cancerosas y el desarrollo de la metástasis ósea. Por ello, nos enfocamos en caracterizar el efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos *in vivo* e *in vitro*. Para determinar el efecto de los linfocitos T en los osteoclastos *in vivo*, se inocularon ratones Balb/C con células 4T1 de cáncer de mama en el ventrículo izquierdo para causar metástasis ósea. Los ratones recibieron un tratamiento con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 o control isotipo para eliminar o no a los linfocitos T en los ratones. El análisis histomorfométrico de las piernas traseras de los ratones mostró que la eliminación de los linfocitos T indujo una reducción significativa en el número de osteoclastos en la interface tumor-hueso comparado con los ratones con tratamiento control. Esto se correlaciona con una reducción significativa del área de osteólisis en ratones sin linfocitos T, lo cual sugiere que los linfocitos T aumentan la formación de osteoclasto y las metástasis óseas *in vivo*. Para confirmar el efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos *in vitro*, se aislaron linfocitos T de bazo de ratón y se cultivaron en presencia o ausencia de concanavalina A, o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 para activarlos o no. Posteriormente, los linfocitos T se cultivaron con células de médula ósea de ratón en presencia de M-CSF y RANKL para inducir la formación de osteoclastos. Se encontró que los linfocitos T no activados aumentaron la formación de osteoclastos (células multinucleadas TRAP⁺), lo cual es similar a lo observado en la metástasis ósea *in vivo*. En contraste, los linfocitos T activados inhibieron la formación de osteoclastos de una manera dosis dependiente. Interesantemente, los linfocitos T CD4⁺ mostraron mayor potencia de inhibición de la formación de osteoclastos al ser comparados con los linfocitos T CD8⁺. Finalmente se observó que este efecto anti-osteoclástico no fue a causa de un efecto citotóxico por parte de los linfocitos T activados en las células de médula ósea. En general, estos resultados muestran que mientras los linfocitos T en el microambiente de la metástasis ósea aumentan la formación de osteoclastos y apoyan al desarrollo de la metástasis; la activación de los linfocitos T, potencialmente a través de la inmunoterapia, podría ayudar a los linfocitos T a atacar a las células cancerosas y también reducir la formación de osteoclastos en pacientes que sufren de metástasis ósea.

Palabras clave: remodelación ósea, osteoclastogénesis, metástasis ósea, linfocitos T, inmunoterapia.

Abstract of the thesis presented by **Juan Alberto Corral Avila** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Characterization of the effect of bone metastasis T cells in osteoclast formation

Abstract approved by:

Ph.D Pierrick Gerard Jean Fournier
Thesis Director

Bone metastases are frequent complications in patients with advanced breast and prostate cancer. Despite the available treatments, bone metastases cannot be cured. Therefore, it is critical to test new treatments such as immunotherapy that uses components of the immune system or the own immune response of the patients against their cancer cells. Immunotherapy has been tested for multiple cancers, but has received little attention in bone metastases. A potential complication is that the immune system regulates bone remodeling, and T cells can increase osteoclast formation and bone resorption. In bone metastases, bone resorption supports cancer cell proliferation and the development of bone metastases. Thus, we aimed to characterize the effect of T cells on the formation of osteoclasts *in vivo* and *in vitro*. In order to determine the effect of T cells on osteoclasts *in vivo*, Balb/C mice were inoculated with 4T1 breast cancer cells in the left cardiac ventricle to cause bone metastases. They received then a treatment with antibodies against CD4 and CD8 or isotype control to deplete or not mice of their T cells. Histomorphometric analysis of the hindlimbs showed that depletion of T cells induced a significant decrease in the number of osteoclasts at the tumor-bone interface, compared to control-treated mice. This correlates with a significant decrease of the osteolysis area in T cell-depleted mice, suggesting that T cells increase osteoclast formation and bone metastases *in vivo*. To confirm the effect of T cells on the formation of osteoclast *in vitro*, we isolated T cells from mouse spleen and cultured them in the presence or absence of concanavalin A, or anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, in order to activate them or not. Then, T cells were cultured with mouse bone marrow cells in the presence of M-CSF and RANKL to induce the formation of osteoclasts. We found that non-activated T cells increased the formation of osteoclasts (TRAP⁺ multinucleated cells), similarly to what was observed in bone metastasis *in vivo*. In sharp contrast, T cells upon activation inhibited osteoclast formation in a dose-dependent manner. Interestingly, CD4⁺ T cells were more potent at inhibiting osteoclast formation, compared to CD8⁺ T cells. This anti-osteoclastic effect was not due to a cytotoxic effect from activated T cells on bone marrow cells. Overall, these results show that while T cells in the bone metastasis microenvironment increase osteoclastogenesis and support the development of bone metastases, activation of T cells potentially through immunotherapy could not only help T cells to target cancer cells but also decrease osteoclast formation in patients suffering from bone metastases.

Keywords: bone remodeling, osteoclastogenesis, bone metastasis, T cells, immunotherapy.

Dedicatoria

A mi familia, primos, tíos y en especial a mis padres Susana y Juan Alberto, hermanas Carolina y Ana Isaura y a mis abuelos Rory y Aristeo Avila. Los quiero con todo mi corazón

A todos mis amigos, en especial a Eduardo “Chega”, Gerardo Daniel C., Baltazar I. e Isaac Ch., gracias por ser los mejores.

A Tonancy R., quien me brindó su cariño y siempre estuvo conmigo apoyándome en las buenas y malas.

A mi primo Walter Caloca D.E.P. quien siempre seguirá presente en mi vida.

A Dios, por darme fuerza en las adversidades.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por la oportunidad de incorporarme a su programa de posgrado, el apoyo de su personal y las facilidades prestadas.

Al Dr. Pierrick Fournier, por recibirme en su laboratorio. Agradezco grandemente su apoyo y entrenamiento científico brindado.

A mis sinodales la Dra. Patricia Juárez, la Dra. Ana Rodríguez y el Dr. Jorge Cáceres, por sus consejos, apoyo científico y colaboración en la revisión de este trabajo.

Al personal técnico, académico y administrativo del Departamento de Innovación Biomédica y al Posgrado de Ciencias de la Vida. Agradezco todo su apoyo brindado durante mi estancia de maestría.

A Felipe Olvera del Departamento de Biología Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, Morelos, México), y el Dr. Christopher David Wood del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada en el Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, Morelos, México) por su asistencia técnica y experiencia con el análisis de los huesos por radiografía.

A toda la Familia del laboratorio P&P desde 2017 a 2020, son un excelente grupo y del cual me siento muy contento de haber formado parte.

Un agradecimiento especial a Danna Arellano, quien me apoyó mucho en mi trabajo de laboratorio y con quien fue un placer colaborar varias veces en experimentos.

A mis compañeros de maestría y el resto de estudiantes e investigadores de CICESE.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción	
1.1 El sistema óseo.....	1
1.2 Cáncer y la metástasis ósea.....	4
1.3 La inmunoterapia para el cáncer.....	7
1.4 Antecedentes	10
1.5 Justificación	12
1.6 Hipótesis	12
1.7 Objetivos.....	12
1.7.1 Objetivo general	12
1.7.2 Objetivos específicos	13
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Experimentación animal	14
2.1.1 Crianza y mantenimiento de animales	14
2.1.2 Modelo de metástasis ósea.....	14
2.2 Análisis histológico de huesos.....	15
2.2.1 Procesamiento de tejidos.....	15
2.2.2 Tinción TRAP para detectar osteoclastos.....	16
2.2.3 Tinción con hematoxilina y eosina.....	17
2.2.4 Cuantificación de osteoclastos.....	17
2.3 Ensayos <i>ex vivo</i> de formación de osteoclastos.....	17
2.4 Aislamiento y cultivo de linfocitos T.....	18
2.5 Análisis de linfocitos T por citometría de flujo	19
2.6 Ensayos de viabilidad celular	20

2.7 Análisis estadístico	20
Capítulo 3. Resultados	
3.1 Efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos en la metástasis ósea <i>in vivo</i>	21
3.1.1 Análisis de osteoclastos en secciones de metástasis ósea por la tinción TRAP.....	21
3.1.2 Evaluación de la cantidad de osteoclastos <i>in vivo</i> a partir de ensayos de osteoclastogénesis <i>ex vivo</i>	22
3.1.2.1 Estandarización de ensayos de osteoclastogénesis.....	23
3.1.2.2 Validación de ensayos de osteoclastogénesis <i>ex vivo</i>	25
3.1.2.3 Evaluación de la cantidad de osteoclastos de médula ósea con o sin linfocitos T.....	26
3.1.3 Análisis de osteoclastos en secciones de huesos por la tinción hematoxilina-eosina.....	28
3.1.4 La Eliminación de linfocitos T reduce el número de osteoclastos en metástasis ósea de células 4T1.....	29
3.2 Efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos <i>in vitro</i>	31
3.2.1 Activadores de linfocitos T afectan la morfología de los osteoclastos	31
3.2.2 Aislamiento positivo y negativo de linfocitos T de médula ósea de ratón	34
3.2.3 Cultivo y activación <i>ex vivo</i> de linfocitos T aislados de bazo	37
3.2.4 Linfocitos T no activados aumentan la formación de osteoclastos, mientras que los linfocitos T activados la inhiben <i>ex vivo</i>	38
3.2.5 Aislamiento negativo de linfocitos T, T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ de bazo de ratón	40
3.2.6 Linfocitos T activados inhiben la formación de osteoclastos <i>ex vivo</i> en médula ósea con metástasis de células 4T1.....	42
3.2.7 Linfocitos T activados no afectan la viabilidad de células de médula ósea <i>ex vivo</i>	43
Capítulo 4. Discusión	45
Capítulo 5. Conclusiones	48
Literatura citada	49

Lista de figuras

Figura		Página
1	Representación gráfica donde se muestran las interacciones necesarias para la formación de osteoclastos	3
2	Representación gráfica donde se muestran las interacciones del ciclo vicioso de la metástasis ósea.....	6
3	La eliminación de células T citotóxicas reduce la metástasis ósea de células 4T1.....	11
4	La adición de linfocitos T de metástasis ósea activados reduce la formación de osteoclastos <i>ex vivo</i>	11
5	Observación de osteoclastos en secciones de huesos de ratones	22
6	Estandarización de condiciones para ensayos de osteoclastogénesis	24
7	Metástasis ósea aumenta la cantidad de osteoclastos en ensayos <i>ex vivo</i>	25
8	Evaluación del número de osteoclastos de médula ósea de ratones con metástasis y con o sin eliminación de linfocitos T	27
9	Evaluación de osteoclastos en secciones de huesos con una contra tinción de hematoxilina o tinción hematoxilina-eosina	28
10	Eliminación de linfocitos T reduce el número de osteoclastos en metástasis ósea de células 4T1.....	30
11	Agregar activadores de linfocitos T afecta la morfología de los osteoclastos	33
12	Estrategias de aislamiento positivo y negativo con perlas magnéticas no permiten aislar linfocitos T de médula ósea	36
13	Cultivo y activación <i>ex vivo</i> de linfocitos T aislados de bazo	37
14	Linfocitos T no activados aumentan la formación de osteoclastos, mientras que los linfocitos T activados la inhiben <i>ex vivo</i>	39
15	Aislamiento negativo de linfocitos T, T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ de bazo de ratón	41
16	Linfocitos T activados inhiben la formación de osteoclastos <i>ex vivo</i> en médula ósea con metástasis de células 4T1.....	43
17	Linfocitos T activados no afectan la viabilidad de células de médula ósea <i>ex vivo</i>	44

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Protocolo de tinciones histológicas.....	16

Capítulo 1. Introducción

1.1 Sistema óseo

1.1.1 Composición del tejido óseo

El sistema esquelético cumple múltiples funciones y está encargado de procesos vitales de suma importancia. Entre estos procesos se encuentran el soporte del organismo, locomoción, protección de órganos internos, almacenamiento de factores de crecimiento, así como el mantenimiento de los niveles fisiológicos adecuados de calcio y fósforo (Suva et al., 2005).

El tejido óseo se compone por una matriz mineral calcificada, agua, lípidos y proteínas, de las cuales se encuentra en mayor abundancia el colágeno de tipo I (Robey y Boskey, 2013). Un 80% de la matriz ósea se encuentra en forma de hidroxapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, la cual se le atribuye la dureza y rigidez del tejido. La remodelación del tejido óseo involucra la actividad coordinada de ambas resorción y formación ósea (Li et al., 2006).

Existen tres tipos de células importantes en el tejido óseo: **1)** los osteoblastos formadores de hueso, los cuales pueden terminar embebidos en la matriz mineral y convertirse en **2)** osteocitos, y finalmente **3)** los osteoclastos los cuales hacen la resorción del hueso. Cada una de estas células es capaz de responder e interactuar entre ellas mediante moléculas de señalización o contacto de célula a célula (Robey y Boskey, 2013).

1.1.2 Ciclo de la remodelación ósea

Se considera que el hueso tiene una naturaleza dinámica ya que, en respuesta a factores mecánicos o fisiológicos, se encuentra en una constante remodelación. La remodelación ósea consiste en la actividad altamente regulada de las poblaciones de células encargadas de la formación y resorción ósea, con el fin de reemplazar hueso viejo con hueso nuevo, para asegurar y mantener la integridad del esqueleto. Para que se logre la homeostasis es necesario un balance entre estos dos procesos ya que un desequilibrio puede ocasionar diversas patologías asociadas al hueso. Por ejemplo, una disminución de la masa ósea,

como en el caso de la osteoporosis, puede ser a causa de **1)** aumento en la resorción, **2)** disminución en la formación de hueso, o **3)** una combinación de ambas (Eriksen, 2010). Por otro lado, un aumento en la masa ósea, como en el caso de la osteopetrósis, puede ser a causa de **1)** aumento en la formación de hueso, **2)** disminución de la resorción, o **3)** una combinación de ambas (Eriksen, 2010).

1.1.3 Osteoclastos

Se consideran que la principal función de los osteoclastos es la resorción ósea. Los osteoclastos se forman a partir de la fusión de células precursoras, las cuales son miembros de la familia de las células mieloides. Los osteoclastos maduros son células de gran tamaño, entre 50 y 100 μ m, y cuentan con múltiples núcleos, de 6-12, algunos hasta 100.

1.1.3.1 Formación de osteoclastos

Dos citocinas son esenciales para la formación de osteoclastos, estas son el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) (Figura 1). Los osteoblastos, osteocitos y las células estromales de la médula ósea son las encargadas de liberar ambos. Las células precursoras de osteoclastos expresan en su membrana el receptor c-FMS y en presencia de su ligando M-CSF se activa una vía de señalización que aumenta la expresión del receptor activador del factor nuclear κ B (RANK). Cuando RANK se une a su ligando RANKL, se continúa la formación de osteoclastos. Mediante la interacción célula a célula de RANK y RANKL entre preosteoclastos, osteoblastos y osteocitos, se estimula la fusión de preosteoclastos, para su diferenciación en osteoclastos maduros y, posteriormente, su activación (Ross, 2009).

Otro factor importante es el inhibidor de la formación de osteoclastos OPG (osteoprotegerina) que puede ser liberada por las células estromales y osteoblastos. La proteína OPG actúa como un regulador negativo de la formación de osteoclastos uniéndose a RANKL, de esta forma deshabilitando la interacción RANKL-RANK (Amarasekara et al., 2018). La importancia de la vía de señalización de RANK-RANKL-OPG fue descubierta gracias a estudios con ratones *knockout* para el gen de RANKL, donde se observó que estos

ratones presentaron casos severos de osteopetrosis; ya que mediante análisis por rayos x, se observó un aumento en la masa ósea de huesos como la pelvis, vertebras, fémur y tibia (Li et al., 2000).

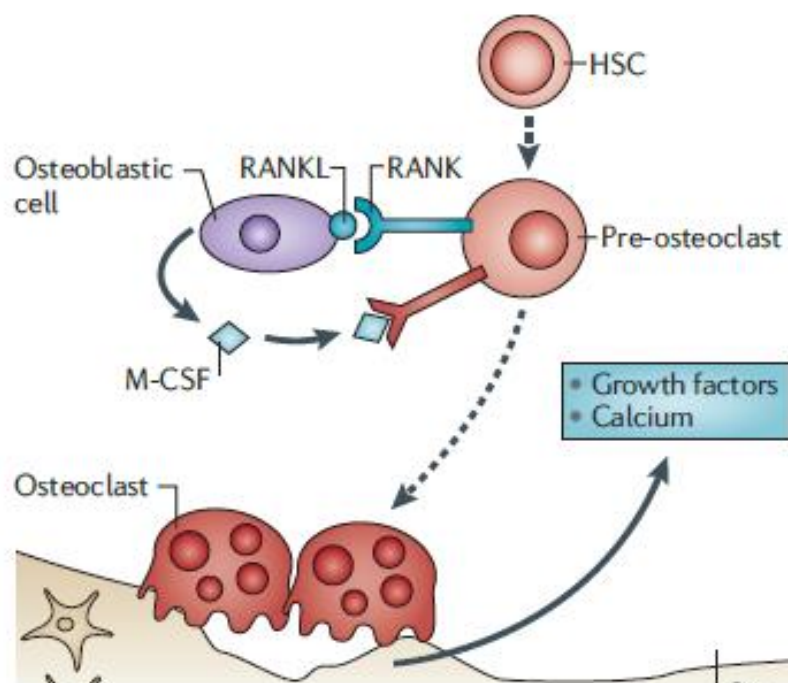


Figura 1. Representación gráfica donde se muestran las interacciones necesarias para la formación de osteoclastos. Las células precursoras de osteoclastos que provienen de la línea hematopoyética (HSC) al estar en presencia de los factores M-CSF y RANKL, se inicia una vía de señalización la cual da como resultados la formación de osteoclastos maduros capaces de resorber el hueso, lo cual libera calcio y factores de crecimiento presentes en el hueso. Modificado de Weilbaecher et al. (2011).

1.1.3.2 La resorción ósea

Los osteoclastos necesitan migrar de la médula ósea a los sitios resorción para cumplir sus funciones resorptivas. Por ello, existen dos diferentes estados funcionales de los osteoclastos: el estado de motilidad y el estado de resorción, los cuales presentan diferentes características morfológicas. En su estado de motilidad, los osteoclastos son células no polarizadas, que se caracterizan por tener protuberancias en su membrana llamadas lamellipodia. Estas estructuras cumplen la función de motilidad en la célula y durante esta fase los osteoclastos son aplanados al irse extendiendo sobre la superficie del hueso. Al llegar al sitio de resorción, los osteoclastos se polarizan reorganizando su citoesqueleto y generan una fuerte unión a la superficie del hueso. Una estructura de los osteoclastos presente en la fase de resorción es su membrana rugosa (*ruffled border*), la cual les permite aumentar su superficie de membrana en contacto con el hueso y con ello aumentar la capacidad de la célula de secretar factores en la zona de resorción. Una característica específica de los osteoclastos es que generan una zona sellada (*sealing zone*) entre la

membrana rugosa y el sitio de resorción, la cual sirve para separar el sitio de resorción del resto del hueso que no está siendo resorbido. El citoplasma en el área de la zona sellada está organizado en forma de un anillo que rodea la membrana rugosa conformado por filamentos de actina (Li et al., 2006). La capacidad de resorción de los osteoclastos radica en varios puntos. Primero, es necesaria la formación de un microambiente ácido entre el osteoclasto y la matriz mineralizada. Mediante el uso de bombas de protones (H^+) y cloro (Cl^-), los osteoclastos pueden generar ácido clorhídrico en el sitio y llevarlo a un pH de hasta 4.5, lo cual desmineraliza la matriz ósea (Ross, 2009).

Segundo, la reorganización del citoesqueleto que enfoca la membrana rugosa hacia el sitio de resorción y facilita una mayor liberación de proteasas resorptivas, como la cathepsina K, la cual permite la degradación del colágeno en el hueso. Finalmente, mediante vesículas los osteoclastos también son capaces de liberar metaloproteinasas de la matriz, las cuales ayudan en la degradación de la matriz del hueso; ya que estas proteínas son resistentes a ambientes ácidos (Ross, 2009). Un ejemplo es la enzima llamada fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) la cual es exclusiva para los osteoclastos en el hueso, y por ello sirve como marcador molecular en para pruebas histológicas y ensayos *in vitro* (Li et al., 2006). Todos estos factores en conjunto permiten una resorción ósea adecuada, y en consecuencia, el malfuncionamiento de ellos pueden ocasionar enfermedades relacionadas con el hueso (Ross, 2009).

Un ejemplo de enfermedad ósea es el caso de la metástasis de cáncer de mama o próstata a los huesos, la cual des balancea el ciclo de la remodelación ósea.

1.2 Cáncer y la metástasis ósea

1.2.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad de gran relevancia en la salud mundial, ya que en 2018 se reportaron 17 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes a causa de cáncer en el mundo (Bray et al., 2018). El cáncer de mama fue el cáncer más común en mujeres representando el 25% del total de nuevos casos diagnosticados en 2018 a nivel mundial (Bray et al., 2018). El cáncer se conoce como una enfermedad en la cual ocurre un descontrol en el ciclo celular a causa de mutaciones, dando como consecuencia grupos de células anormales en constante crecimiento llamados tumores. Varios factores deben de presentarse para que la formación de un cáncer ocurra, como son: resistencia a la muerte celular programada, evasión

de la respuesta inmune, estimulación de la angiogénesis, entre otros. Una vez que el tumor se desarrolla, células tumorales se vuelven capaces de migrar separándose del tumor primario hacia otros sitios donde pueden establecer nuevos tumores. Al proceso anteriormente mencionado se le conoce como la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). Cuando células tumorales son capaces de migrar y establecer tumores en los huesos, se le conoce como la condición de la metástasis ósea.

1.2.2 Metástasis ósea

Se estima que aproximadamente el 73% de pacientes con cáncer de mama y el 68% de pacientes con cáncer de próstata que mueren por enfermedad presentan metástasis ósea (Suva et al., 2011). En un estudio se encontró que en muestras de tumores de cáncer de mama la mayoría presentaron una alta expresión de la proteína del receptor RANK detectado por RNA mensajero e incluso se detectó por citometría de flujo la proteína RANK en la superficie de células de cáncer de mama. Experimentos *in vitro* se comprobó que la expresión de RANKL tiene un efecto de dosis dependiente que induce la migración, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama (Jones et al., 2006). Esto sugiere un mecanismo de cómo las células cancerígenas pueden dirigir su migración hacia el hueso donde se encuentra presente RANKL. Con este estudio se podría sugerir un tratamiento con anticuerpos anti-RANKL, como el denosumab, para el tratamiento y prevención de la metástasis ósea.

Una vez que las células cancerosas se establecen en el hueso y se forma la metástasis los pacientes presentan complicaciones en la forma de hipercalcemia, dolor de huesos, fracturas y compresión de la médula espinal las cuales se conocen como eventos relacionados con el esqueleto (SRE, *skeletal related events*). Los SRE pueden presentarse a lo largo de los años, hasta la muerte del paciente ya que la metástasis ósea no tiene cura (Johnson et al., 2017). Lo anteriormente mencionado es debido a la capacidad de las células cancerosas de liberar factores los cuales son capaces de desorganizar la función normal de las células óseas, lo cual puede llevar al incremento de la formación de hueso, metástasis ósea osteoblástica, o al incremento de la resorción del hueso, metástasis ósea osteolítica. Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la metástasis ósea osteolítica, son referidos como el ciclo vicioso de la metástasis ósea (Buenrostro et al., 2016).

1.2.3 El ciclo vicioso de la metástasis ósea

Gracias a estudios tempranos en enfermedades óseas inducidas por tumores, se encontró que un mecanismo central de la metástasis ósea osteolítica corresponde a las interacciones entre células cancerosas y células óseas. Se demostró que las células tumorales pueden liberar factores pro osteoclasticos como PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea), los cuales estimulan a osteoblastos y en respuesta producen RANKL; la producción de RANKL conlleva a un aumento de la actividad de los osteoclastos y la resorción ósea. Como consecuencia de la resorción ósea, se liberan factores de la matriz mineral ósea, como el TGF- β , los cuales apoyan a la proliferación de células cancerosas y con ello se aumenta la secreción de factores osteolíticos (Yoneda et al., 1994). Mediante estudios con modelos de ratones se estableció que ocurre un ciclo de interacciones positivas en el cual la proliferación de células tumorales y la resorción ósea se sostienen (Figura 2).

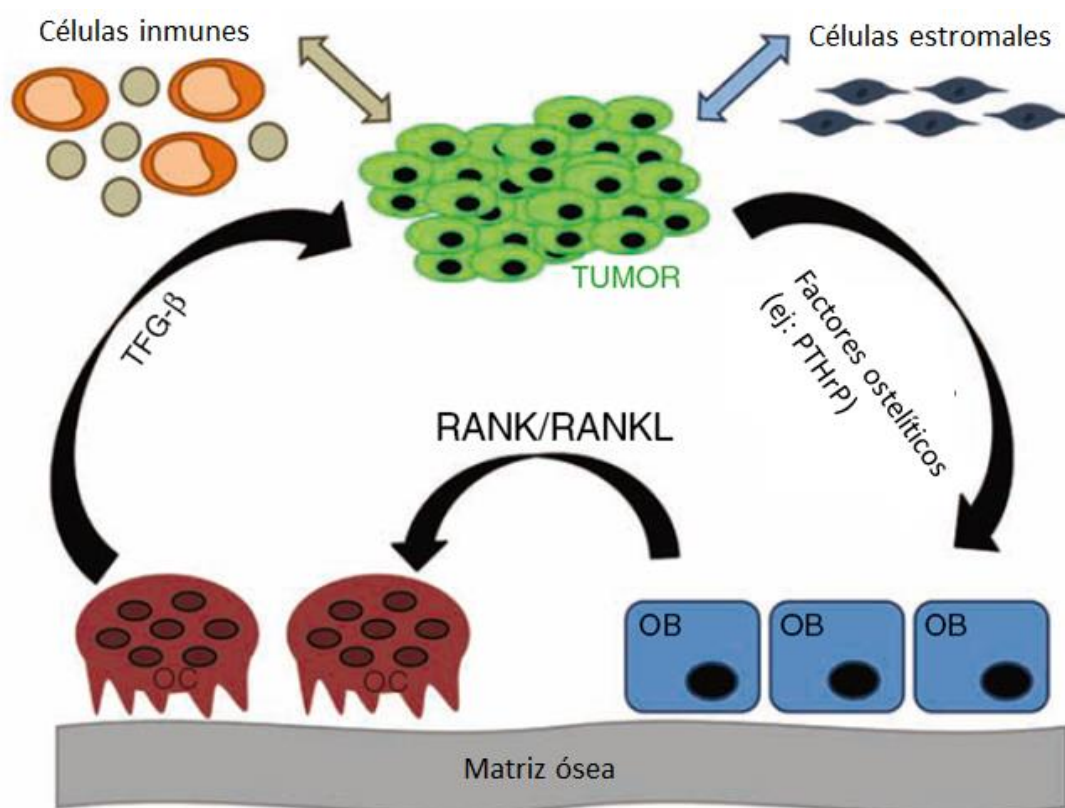


Figura 2. Representación gráfica donde se muestran las interacciones del ciclo vicioso de la metástasis ósea. Las células cancerosas metastáticas liberan factores osteolíticos, como PTHrP, que inducen la expresión de RANKL por parte de los osteoblastos y la expresión de RANK en los osteoclastos. La activación de los osteoclastos conlleva a la resorción ósea, la cual permite la liberación de factores de crecimiento, como TGF- β , los cuales actúan sobre las células cancerosas para promover su proliferación y con ello la liberación de más factores osteolíticos; ésto establece un ciclo vicioso entre las células tumorales y las células óseas. Obtenido y modificado de Johnson y Sterling 2013.

1.2.4 Tratamientos para metástasis ósea osteolítica

Basados en que los factores de crecimiento liberados por la resorción ósea en el ciclo vicioso promueven el desarrollo de las células tumorales la inhibición de la resorción ósea mediada por osteoclastos se predijo como un blanco terapéutico que reduciría el crecimiento de tumores en el hueso. Se ha propuesto que el uso de anticuerpos anti-PTHrP podría ser un buen inhibidor de la resorción ósea, o inhibidores de TGF- β , y otros factores liberados por la resorción ósea, podrían inhibir el desarrollo de la metástasis. Por otro lado, inhibidores directos de la resorción ósea son una buena opción para el tratamiento de la metástasis ósea de tipo osteolítica. Los inhibidores de la resorción ósea más usados son los bifosfonatos. Estos agentes terapéuticos se unen a la hidroxyapatita en el hueso para posteriormente ser resorbido e internalizados por los osteoclastos; como consecuencia los bifosfonatos inducen la muerte celular de los osteoclastos y por ello disminuyen la resorción ósea. El bifosfonato de mayor potencia para el tratamiento de metástasis ósea es el ácido zoledrónico (Drake et al., 2008), sin embargo, otros tratamientos se han desarrollado como es el denosumab, el cual es un anticuerpo que neutraliza la función de RANKL evitando la formación y activación de los osteoclastos (Steger y Bartsch, 2011). Mientras que los inhibidores de la resorción ósea han logrado mejorar la calidad de vida de pacientes con metástasis ósea disminuyendo el número de fracturas entre otros SRE, su uso no ha incrementado la tasa de sobrevivencia de pacientes ni son capaces de curar la metástasis ósea, por lo que se necesitan nuevas terapias (Buenrostro et al., 2016).

Una línea de tratamientos clínicos posibles es la inmunoterapia, la cual promete ser una opción diferente para el tratamiento de la metástasis ósea. Sin embargo, se necesitan más estudios para definir con mayor claridad las interacciones entre el sistema inmune y el ambiente tumoral óseo.

1.3. La inmunoterapia para el cáncer

La inmunoterapia consiste en fortalecer y activar el sistema inmune propio de los pacientes para combatir tumores. Ya que las células cancerosas adquieren mutaciones, estas producen neo antígenos en los tumores, estos antígenos pueden ser reconocidos por linfocitos B o los linfocitos T, para eliminar las células tumorales. Esta estrategia terapéutica ha recibido mucha atención en los últimos años y se considera una nueva estrategia prometedora para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Un tipo de línea inmunoterapéutica emergente es el tratamiento con inhibidores de puntos de regulación del sistema inmune (*immune check-point inhibitors*), los cuales ya se ha visto casos de éxito en pacientes con

carcinomas, como el cáncer de mama y de carcinoma de pulmón (Polk et al, 2017). Esta estrategia se basa en la observación de que las células tumorales pueden liberar factores que inhiben la función del sistema inmune, como la proteína PDL1, por lo que si se neutralizan estos factores con anticuerpos anti-PDL1, es posible reactivar al sistema inmune o unos de sus componentes como son los linfocitos T.

1.3.1 Los linfocitos T

Los linfocitos T son células del sistema inmune adaptivo, los cuales tienen la capacidad de reconocer antígenos, a través de sus receptores de linfocito T (TCR) y antígenos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En función de la composición de su TCR se pueden dividir varios grupos como son los linfocitos T $\gamma\delta$ que han recibido poca atención o los linfocitos T $\alpha\beta$ que han recibido mucha más atención en su estudio (Abbas et al., 2007). Este último grupo de células está compuesto de distintas subpoblaciones que pueden tener diferentes funciones biológicas que pueden ser anti tumorales como pro tumorales. Un ejemplo son las células T $CD8^+$ las cuales son conocidas generalmente como citotóxicas, y son responsables de los mecanismos de muerte celular dirigida a tumores (Thomas et al., 2005). Por otro lado, las células T reguladoras $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$, están involucradas en regular la tolerancia de las células T citotóxicas, lo cual contribuye al crecimiento descontrolado de los tumores. De la misma forma las células T reguladoras son capaces de infiltrarse en los tumores y liberar factores inhibitorios del sistema inmune, como IL-10, que también permiten el crecimiento del tumor (Shevach, 2009).

1.3.2 Linfocitos T y la resorción ósea

Gracias al estudio de enfermedades como la artritis autoinmune, se han descrito sub poblaciones de linfocitos que están involucrados en la resorción ósea. Este es el caso de los linfocitos T Th17 que pertenecen a los linfocitos T colaboradores $CD4^+$, se ha observado que tiene un efecto pro osteoclástico (Sato et al., 2006). Específicamente los linfocitos Th17 que se caracterizan por expresar la citocina IL-17, se ha ligado su activación a la resorción ósea. En un experimento se tomaron linfocitos T de ratón y se polarizan para tener un fenotipo Th17, y posteriormente fueron agregados a un ensayo *in vitro* de formación de osteoclastos, agregar los linfocitos T Th17 resultó en una mayor formación de osteoclastos.

En otro experimento de un modelo *in vivo* de destrucción de hueso causada por inflamación, donde se utilizan ratones transgénicos que tienen un *knockout* para el gen de la IL-17, se encontró que presentaron una menor resorción ósea comparado con los controles. Este estudio ha puesto como candidatos a los Th17 como blancos terapéuticos para enfermedades relacionadas con la resorción ósea (Sato et al., 2006).

En una revisión de las interacciones de las células óseas con el sistema inmune, reportan que los linfocitos T pueden liberar factores inhibidores de la formación de osteoclastos, como son: OPG, interferón gamma y IL-4, entre otros. Los sub grupos de linfocitos T reportados con ésta actividad son los Th1, Th2 y T reguladores (Schett et al., 2010). Se ha demostrado en un modelo *in vivo* de ratones transgénicos con activación de linfocitos T reguladores que ratones con un porcentaje alto de linfocitos T reguladores muestran un incremento en su masa ósea y protección contra la pérdida de hueso inducida por ovariectomía (Zaiss et al., 2010).

En el caso de osteoporosis postmenopáusica, se ha descrito cómo la pérdida de estrógeno regula la remodelación ósea; ésto a partir de la modulación de la producción de citocinas por parte de células óseas y células presentes en médulas ósea, entre ellas linfocitos T. Algunas citocinas reportadas son IL-1 y TNF como agentes causantes de la pérdida de hueso en la osteoporosis postmenopáusica, ya que se han encontrado en grandes cantidades en pacientes postmenopáusicos (Pacifci, 2012).

1.3.3 Linfocitos T y la metástasis ósea

Los linfocitos T también se han visto involucrados en enfermedades como la metástasis ósea. En un estudio con ratones transgénicos que cuentan con una sobre expresión del marcador de activación de linfocitos T Fox P3, se reportó que la activación de los linfocitos T provenientes del tumor primario disminuía la metástasis ósea, mientras que el agotamiento de los linfocitos T potenciaba la metástasis ósea en un modelo de ratones con metástasis ósea inducidos por melanoma. Específicamente se han propuesto a los linfocitos T CD8⁺ como reguladores importantes del crecimiento de tumores en los huesos (Zhang et al., 2011).

Se ha reportado que la presencia de linfocitos T activados de cáncer de mama puede inducir condiciones osteolíticas en el proceso de metástasis ósea. En un experimento donde ratones sin linfocitos T fueron inoculados con células 4T1 de cáncer de mama para inducir a la metástasis ósea, a los cuales se les

transplantaron linfocitos T provenientes de ratones con metástasis ósea y se realizó una transducción con un vector lentiviral para expresar un shRNA (*short hairpin RNA*) en linfocitos T y eliminar la producción de RANKL por parte de los linfocitos T; se encontró que los ratones que recibieron los linfocitos T con el tratamiento con el shRNA mostraron menor cantidad de osteoclastos comparado con los controles a los cuales no se les eliminó el RANKL *in vitro* (Monteiro et al., 2013).

Aunque los dos estudios mencionados anteriormente sugieren conclusiones contradictorias, no necesariamente tiene que ser el caso ya que ambos estudios son diferentes en el tipo de modelo de estudio de metástasis ósea. La diferencia entre estos estudios es que uno se enfoca en un modelo donde la metástasis ya se encuentra establecida, cuando el otro se enfoca más en la migración de las células del tumor primario al sitio de metástasis. Por lo tanto, el papel exacto de los linfocitos T en la metástasis ósea aún se encuentra en discusión.

1.4 Antecedentes

Resultados obtenidos en el laboratorio del Dr. Fournier, sugieren que la eliminación de linfocitos T de metástasis ósea reduce la resorción ósea (Verdugo-Meza, 2016). Esto en base a experimentos donde se induce el desarrollo de metástasis ósea a ratones normales y ratones sin linfocitos T, tanto CD4⁺ colaboradores y/o CD8⁺ citotóxicos. Se cuantificó el área de osteólisis mediante la toma de rayos x de tibias de ratones con tratamientos que agotaban ambos linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, y cada uno por su cuenta respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa ($P < 0.05$) en el área de osteólisis en los ratones agotados de ambos linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y específicamente sólo los CD8; en contraste, en los ratones agotados sólo de linfocitos T CD4⁺ no mostraron diferencia en la reducción de área de osteólisis en ratones con metástasis ósea (Figura 3).

Otros experimentos que involucran ensayos de formación de osteoclastos, donde se cultivan células precursoras de osteoclastos en presencia de M-CSF, RANKL para inducir su maduración, junto con linfocitos T de metástasis ósea (Pierrick Fournier, resultados no publicados). Al poner a prueba la importancia de la activación de éstas células, los resultados muestran que si los linfocitos T son activados por factores estimuladores como anti-CD3 y anti-CD28, éstos inhiben la formación de osteoclastos *ex vivo* (Figura 4). Sin embargo, se necesitan más experimentos para determinar el efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos *in vitro* e *in vivo*.

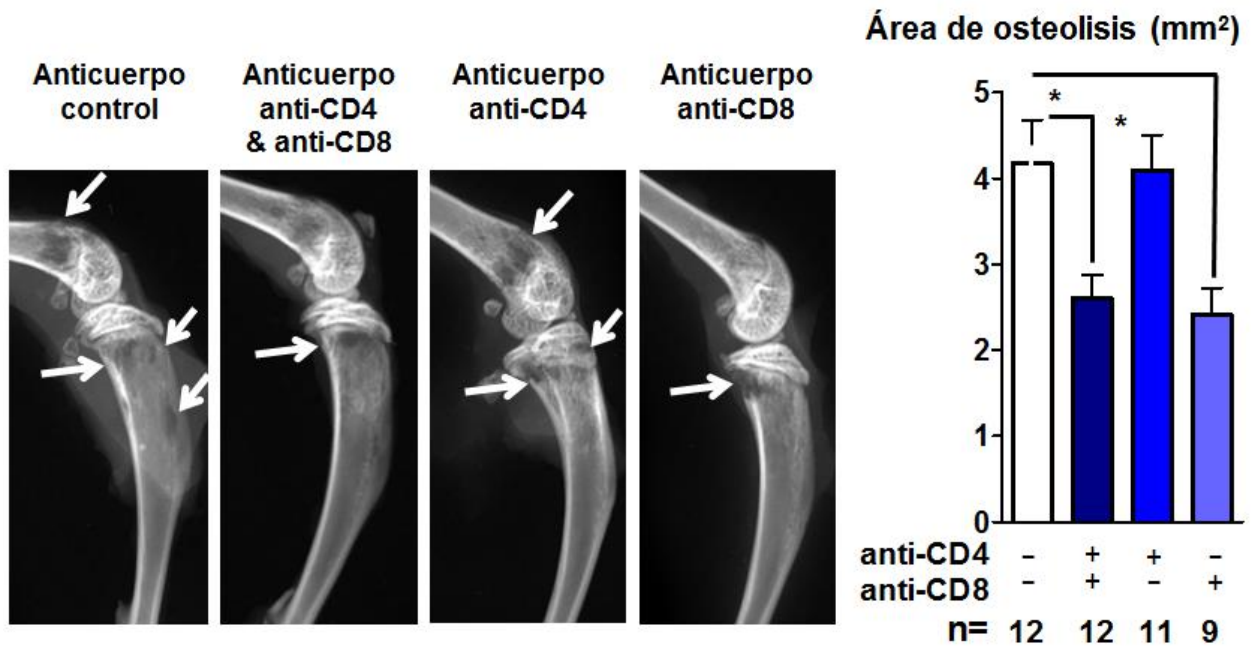


Figura 3. La eliminación de células T citotóxicas reduce la metástasis ósea de células 4T1. Resultados representados como imágenes representativas de radiografías de huesos con osteólisis y su cuantificación se presenta como el promedio \pm SEM de área de osteólisis. * $P < 0.05$ usando ANOVA de una vía con Bonferroni's posttest. Modificado de Verdugo-Meza (2016).

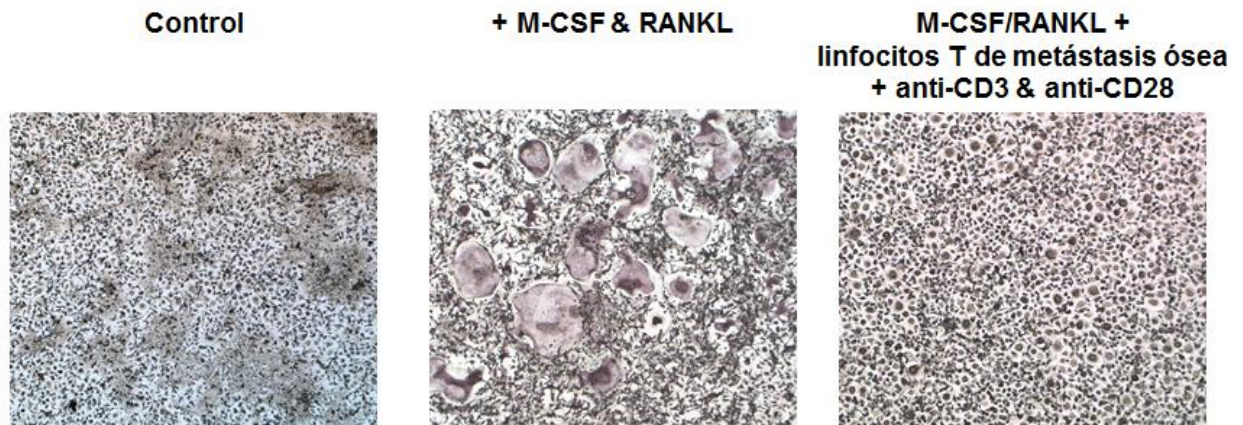


Figura 4. La adición de linfocitos T de metástasis ósea activados reduce la formación de osteoclastos *ex vivo*. Resultados de tinción TRAP de ensayo de osteoclastogénesis en presencia o ausencia de linfocitos T de metástasis ósea activados por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Pierrick Fournier, resultados no publicados).

1.5 Justificación

El cáncer de mama es uno de los cánceres con mayor incidencia en el mundo en mujeres y la mayoría de las personas con cáncer de mama en etapas tardías desarrolla metástasis a los huesos, siendo esto una de las principales causas de disminución de la calidad de vida de pacientes por SRE. Los tratamientos actuales para la metástasis ósea son limitados y, ya que los tratamientos solo logran mitigar la pérdida de hueso sin eliminar los tumores, existe una demanda por nuevos tratamientos. Una opción prometedora es la inmunoterapia, la cual consiste en el uso del sistema inmune del propio organismo para combatir enfermedades. Se ha reportado que los linfocitos T pueden incrementar la actividad de los osteoclastos en distintas patologías, sugiriendo una relación con la metástasis ósea de tipo osteolítica. Es importante investigar los mecanismos a través de los cuales los linfocitos T pueden influir en la metástasis ósea y la formación de osteoclastos, esto puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias inmunoterapéuticas para tratar a personas con cáncer y la metástasis ósea.

1.6 Hipótesis

Con base a los antecedentes revisados en la literatura y experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio se propone como hipótesis que “los linfocitos T de la metástasis ósea aumentan la formación de osteoclastos”.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de linfocitos T de metástasis ósea en la formación de osteoclastos *in vivo* y *ex vivo*.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el efecto de los linfocitos T de metástasis ósea en la formación de osteoclastos *in vivo*.
2. Establecer un ensayo de formación de osteoclastos *ex vivo* con médula ósea de ratones normales y sin linfocitos T.
3. Caracterizar el efecto de los linfocitos T de metástasis ósea en la formación de osteoclastos *ex vivo*

Capítulo 2. Metodología

2.1 Experimentación animal

2.1.1 Crianza y mantenimiento de animales

Los ratones reproductores BALB/c (cepa BALB/cAnNHsd) utilizados en éstos experimento se obtuvieron de Harlan-Envigo. Para generar suficientes ratones, se hicieron cruza de 1 macho con 1 a 3 hembras a la vez; estos fueron separados dos semanas después, al igual que las hembras para que tuvieran sus crías. Una vez ocurrido el nacimiento, las crías fueran separadas de la madre 4 semanas después del nacimiento. Los ratones que se usaron como reproductores fueron de 1.5 a 6 meses de edad. Para los experimentos se usaron ratones de 6 a 10 semanas de edad.

Los ratones se mantuvieron en jaulas con alimento con 18% de proteínas (Teklad, Envigo) y agua *ad libitum*, en un sistema de cuidado Optimice (Animal Care Systems). La habitación donde se encontraban los ratones se mantuvo a temperatura de 21°C y con ciclos de luz/oscuridad controlados (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad). Los ratones fueron manipulados y sacrificados de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

2.1.2 Modelo de metástasis ósea

Para causar la formación de metástasis ósea, los ratones recibieron una inoculación de células de cáncer de mama de ratón 4T1, en el ventrículo izquierdo del corazón.

Las células 4T1 (ATCC® CRL-2539™) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 completo (suplementado con 10% FBS, 1% antibiótico y antimicótico) a 37°C y en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. El día de la inoculación, se lavaron las células dos veces con PBS, se tripsinizaron con 4mL de tripsina (0.05%)-EDTA (0.53mM) y después se paró la reacción con 7mL de medio completo. La suspensión celular fue transferida a un tubo cónico de 50mL frío y se llevó a un volumen de 50mL agregando PBS frío. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 200 g por 10min a 4°C, seguido de 2 lavados con 50mL de PBS frío. Se utilizó una

cámara de Neubauer para calcular el número de células en la suspensión y se ajustó la concentración celular a 10^6 células/mL en PBS.

Para la inoculación de las células, primero se anestesiaron a los ratones por medio de una inoculación intraperitoneal de solución de ketamina (100mg/kg) y xilacina (10mg/kg) y se eliminó el pelo ventral poniendo especial cuidado en el área torácica, con una crema depiladora. Para localizar el ventrículo izquierdo se identificó el principio y final del esternón y se consideraron como puntos de referencia para inocular entre ambos puntos. Se cargó una jeringa de 1mL con una aguja de 25G con la suspensión de células y se administraron 10^5 células (100 μ L PBS) dentro del corazón. Al terminar el procedimiento, los ratones recibieron un cuidado post-inoculación en donde se les presionó el área inoculada para prevenir hemorragias, se colocaron en un tapete térmico para prevenir hipotermia, recibieron una aplicación de ungüento oftálmico para mantener los ojos hidratados y se les administró una inyección intraperitoneal de PBS para disminuir el efecto de la anestesia. Una vez los ratones despiertos, fueron trasladados a sus jaulas y monitoreados de su estado de salud.

Para eliminar los linfocitos T, se inocularon, de forma intraperitoneal, 100 μ g de anticuerpos monoclonales anti-CD4 (clona GK1.5, BioXCell), anti-CD8 (clona 2.43, BioXCell), o ambos, el día de la inoculación de células 4T1 y 5 días después. Para inhibir la resorción ósea, los ratones recibieron un tratamiento con ácido zoledrónico (i.p., 15 μ g/kg, 3 veces/semana).

Entre el día 9-10 después de la inoculación, se sacrificaron los ratones mediante una dosis letal (63mg/kg) de pentobarbital sódico (6.3g/100mL), seguido de una dislocación cervical y se diseccionaron los huesos (fémur y tibia).

2.2 Análisis histológico de huesos

2.2.1 Procesamiento de tejidos

Los huesos colectados fueron fijados en una solución amortiguadora de formalina (10%) por 24 horas y almacenados en etanol (70%). Para ser desmineralizados, los huesos fueron transferidos en casetas de inclusión, lavados con PBS seguido de un baño en EDTA (0.34M) en agitación por un periodo de 3 semanas (realizando cambio de la solución 2 a 3 veces por semana). Seguido, los huesos fueron procesados en un

procesador de tejidos STP 120-2 (Thermo Fisher Scientific) para realizar las etapas de 1) deshidratación en un gradiente de etanol (de 80 hasta 100%), 2) sustitución con xileno, e 3) infiltración de parafina (Tabla 1). Posteriormente los tejidos fueron embebidos en parafina líquida para crear bloques compatibles con el micrótopo. Los bloques fueron cortados con un micrótopo automático (Microm HM 355S, Thermo Scientific) generando cortes de 7 μ m de grosor; se recuperaron 3 secciones en tres profundidades diferentes con 100 μ m de distancia entre ellas.

Tabla 1 Protocolos de tinciones histológicas

Etapas	Protocolo de inclusión	Tinción TRAP	Tinción H&E
1	Etanol (80%, 1 hora)	Limoneno (10min)	Limoneno (10min)
2	Etanol (95%, 2 horas)	Limoneno (10min)	Limoneno (10min)
3	Etanol (95%, 2 horas)	Etanol (100%, 1min)	Etanol (100%, 1min)
4	Etanol (100%, 2 horas)	Etanol (95%, 1min)	Etanol (100%, 1min)
5	Etanol (100%, 2 horas)	Etanol (80%, 1min)	Etanol (70%, 1min)
6	Etanol (100%, 1 hora)	H ₂ O	Etanol (50%, 1min)
7	Xileno (2 horas)	Naphtol-Ether-Tartate (30min, 37°C)	H ₂ O
8	Xileno (2 horas)	Pararosaniline-Tartrate (10min)	Hematoxilina (40seg)
9	Parafina (58°C, 2 horas)	H ₂ O	H ₂ O
10	Parafina (58°C, 2 horas)	Hematoxilina de Harris (40seg)	Etanol ácido (30seg)
11		H ₂ O	Solución Li ₂ CO ₃ (2min)
12		Amonia (0.5%, 10seg)	H ₂ O
13		H ₂ O	Etanol (96%, 1min)
14		Etanol (80%, 1min)	eosina/floxina/orange G (20seg)
15		Etanol (95%, 1min)	Etanol (96%, 1min)
16		Etanol (100%, 1min)	Etanol (96%, 1min)
17		Limoneno (10min)	Etanol (100%, 1min)
18		Limoneno (10min)	Etanol (100%, 1min)
19			Limoneno (10min)
20			Limoneno (10min)

2.2.2 Tinción TRAP para detectar osteoclastos

Cortes de secciones de huesos fueron teñidos para detectar la actividad de la enzima fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP). Primeramente, se fijó la muestra de la sección al portaobjeto a 60 °C, por 3-5 horas, seguidos de una desparafinización, rehidratación, la tinción TRAP, una contra tinción con

hematoxilina de Harris, deshidratación y una sustitución con limoneno (Tabla 1). Al final se cubrieron las secciones con una solución selladora (Cytoseal) y un cubre objetos para su montaje.

2.2.3 Tinción con hematoxilina y eosina

Cortes de secciones de huesos fueron teñidos con hematoxilina y eosina de la siguiente forma: primeramente, se fijó la muestra de la sección al portaobjeto a 60 °C, por 3-5 horas, seguidos de una desparafinización, rehidratación, tinción con hematoxilina, tinción con eosina, deshidratación y una sustitución con limoneno (Tabla 1). Al final se cubrieron muestras con solución selladora (Cytoseal) y se colocó un cubre objetos para su montaje.

2.2.4 Cuantificación de osteoclastos

Se tomaron fotografías con un microscopio Axio Scope A1 (Zeiss), equipado con una cámara de video (Axiocam 305 color), a una magnificación de 400x. Se tomaron 3 secciones por cada ratón y se realizó el análisis de estas secciones de forma ciega. Las imágenes se analizaron en el software ImageJ donde se ajustó la escala de pixeles a micrómetros según la escala obtenida en el microscopio. Primero se cuantificó el número de osteoclastos basado en su morfología (Oc.N), se midió la superficie de los osteoclastos en contacto con el hueso (Oc.S) y la superficie del hueso (BS). De esta manera, se normalizó el número de osteoclastos por la superficie de hueso (Oc.N/BS) y la superficie de osteoclastos por superficie de hueso (Oc.S/BS).

2.3 Ensayos *ex vivo* de formación de osteoclastos

Para inducir la formación de osteoclastos, primeramente, se necesita la médula ósea de un ratón donador. El ratón donador puede ser un ratón normal, un ratón sin linfocitos T (1 inoculación i.p. con anticuerpos anti-CD3, clona 17A2, BioXCell, 100µg/ratón) ó un ratón con metástasis ósea con o sin linfocitos T.

Se colectaron huesos de las patas traseras (fémur y tibia) en condiciones de esterilidad y se hicieron orificios en la cabeza y base del fémur con una jeringa (insulina). Se extrajo la médula ósea pasando a través de hueso de 1-2ml de medio RPMI completo, y posteriormente se realizó una lisis de los eritrocitos con un buffer de lisis de eritrocitos [RBCLB; NH_4Cl (155mM), NaHCO_3 (10mM), EDTA (1mM) en agua]. Al final se obtuvieron las células de médula ósea y se resuspendieron en medio α MEM sin ribonucleosidos o deoxiribonucleosidos (Corning Cellgro) suplementado con suero fetal bovino (FBS, 10%, Biowest) y con Penicilina/Streptomycin (1%). Se contaron las células vivas en una solución de azul tripano y se cultivaron en placas de 96 pozos con una cantidad de 20,000 a 75,000 células por pozo y 40,000 células en la mayoría de los ensayos. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo α -MEM antes mencionado. Las proteínas recombinantes de ratón M-CSF (PeproTech) y RANKL (PeproTech) se utilizaron en concentraciones de 12.5ng/mL a 50ng/mL, para inducir la formación de osteoclastos. Se cambió 50% del medio de cultivo cada 2 días y se paró el ensayo a los días 5 dependiendo de la aparición de osteoclastos. Para identificar los osteoclastos se realizó una tinción TRAP utilizando el Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) kit (Sigma-Aldrich) de acuerdo al manual del proveedor. Se cuantificaron los osteoclastos en los pozos (células TRAP⁺ con 3 o más núcleos) usando un microscopio Axio Scope A1 (Zeiss) equipado con una cámara de video (AxioCam 305 color).

2.4 Aislamiento y cultivo de linfocitos T

Para los aislamientos de linfocitos T a partir de médula ósea, se procesaron las células como se mencionó anteriormente con el RBCLB y para el bazo se procesaron de forma similar. Se colectó un bazo de ratón Balb/C en condiciones de esterilidad y con dos portaobjetos se homogeneizó el bazo con 4mL de buffer de aislamiento (BSA (10mg/mL) y EDTA (0.5M) en PBS), se transfirieron las células de bazo en tubos cónicos, se centrifugó (350g, 8min, 4°C) y se removió el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron las células en 5ml RBCLB (estéril) y se incubó por 2min a TA. Se agregó 9ml de PBS para parar la lisis, se centrifugó (350g, 8min, 4°C) y se removió el sobrenadante. Finalmente, se resuspenden las células en 1ml de medio α MEM, sin ribonucleósidos suplementado con FBS (10%), Penicilina/Streptomycin (1x).

Para los aislamientos se usaron los kits de ThermoFisher Scientific Dynabeads™ FlowComp™ Mouse Pan T (CD90.2) para aislamiento positivo, y Dynabeads™ Untouched™ Mouse T Cells para el aislamiento negativo de linfocitos T. Para obtener linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, se usaron los kits Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD4 Cells y Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD8 Cells a partir de linfocitos T aislados de bazo. Los

linfocitos T aislados fueron cultivados con medio RPMI completo adicionado con β -mercaptoetanol (55mM) y para su activación se cubrieron placas de 48 y 24 pozos con anticuerpos anti-CD3 con una solución a 0.5 μ g/mL por 12-24 horas antes y se les agregó medio de activación que consistió en una solución con medio para cultivo de linfocitos agregando activadores concanavalina A (4 μ g/mL) o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (ambos a 5 μ g/mL), al medio sin activación se le agregó un mismo volumen de PBS. Para el cultivo se realizó un cambio de medio al día 4, removiendo 50% del medio viejo y agregando el mismo volumen de medio nuevo con o sin activadores. Para cosechar los linfocitos, al día 8 se agregó un volumen de medio a los pozos y se resuspendieron las células y se recuperaron en tubos de 15mL. Posteriormente se contaron las células con una cámara de Neubauer y se realizaron diluciones seriadas para preparar soluciones de diferentes cantidades de linfocitos en un volumen de 10 μ L y ser agregados a los ensayos de osteoclastogénesis, 24 horas después de empezar el cultivo de células de médula ósea.

2.5 Análisis de linfocitos T por citometría de flujo

Se procesaron células de bazo o de médula ósea con el protocolo de lisis de eritrocitos ya mencionado. Las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3 conjugado con FITC (500ng/10⁶ células, clona 145-2C11, eBioscience), conjugado con APC (1000ng/10⁶ células, clona 17A2, eBioscience) o conjugado con PE (500ng/10⁶ células, clona 145-2C11, eBioscience), anti-CD90.2 conjugado con PE (15ng/10⁶ células, clona 53-2.1, BioLegend) o conjugado con PE-Cy7 (15ng/10⁶ células, clona 53-2.1, BioLegend), anti-CD4 conjugado con PerCP Cy5. (62.5ng/10⁶ células, clona RM4-5, eBioscience) y anti-CD8 conjugado con AF488 (250ng/10⁶ células, clona 53-6.7, BioLegend) en un buffer de bloqueo con FBS (12%) y un anticuerpo de ratón anti-CD16/32 (1000ng/10⁶ células, clona 93, BioLegend) para bloquear los receptores FC (fragmento cristalizable). Posteriormente se realizaron unos lavados con buffer de aislamiento se analizaron las células en el citómetro de flujo Attune (Thermo Fisher Scientific). Las células se analizaron utilizando las compuertas (gates) FSC-A vs. FSC-H, y SSC-A vs. SSC-H en gráficas de densidades para discriminar células individuales o singletes, y las células se reconocieron en las compuertas FSC-A vs. SSC-A. Los datos de al menos 50,000 células fueron grabados y analizadas con el Attune Cytometric Software (v2.1).

2.6 Ensayos de viabilidad celular

Se cultivaron células de médula ósea de ratón en presencia de M-CSF. Después de 1 día de cultivo, se agregaron, o no, linfocitos T, linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD8⁺ aislados de bazo, activados o no activados, como se ha descrito anteriormente. Al día 5, se realizó una prueba MTT de viabilidad celular. Se agregaron 20µL de metil tiazol tetrazolio (5mg/mL) por pozo y se cultivaron las células por 5 horas más. Posteriormente se paró la reacción de conversión de MTT a formazan agregando 100µL de ácido clorhídrico 0.01M conteniendo 10% (w/v) dodecilsulfato sódico y se incubó por 16 horas en las mismas condiciones. Al final se midió la densidad óptica a 570nm con un espectrofotómetro para microplacas Epoch (Biotek).

2.7 Análisis estadístico

Todos los datos fueron procesados utilizando el software Graphpad Prism v5 (GraphPad Software, Inc). Se utilizaron las pruebas ANOVA de 1 o 2 vías con un post-test de Tukey o Bonferroni, respectivamente, o la prueba *t* de Student no apareada. Se realizaron pruebas de normalidad a los datos obtenidos con el fin de elegir el análisis estadístico adecuado.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos en la metástasis ósea *in vivo*

3.1.1 Análisis de osteoclastos en secciones de metástasis ósea por la tinción TRAP

Para analizar el papel de los linfocitos T en la formación de osteoclastos, en la metástasis ósea *in vivo* se compararon las cantidades de osteoclastos en la metástasis ósea de ratones con o sin linfocitos T. Se realizó un experimento en el cual ratones fueron inoculados con células 4T1 para generar metástasis ósea, estos ratones recibieron o no un tratamiento con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 para eliminar sus linfocitos T. Posteriormente se colectaron los huesos de estos ratones, se generaron cortes histológicos y se prepararon los cortes para realizarles tinción TRAP. Para confirmar la validez de la tinción TRAP, en cada tinción se anexaron cortes de muestras de tibias controles donde se sabía que había presencia de osteoclastos con actividad TRAP; de esta forma se confirmó que el protocolo de tinción funcionaba correctamente. En las imágenes se pueden observar varias células TRAP positivas de color violeta-rojo que se consideran como osteoclastos (Figura 5 izquierda).

Sin embargo, al analizar los cortes histológicos, no se pudo detectar células TRAP⁺ (morado) en las secciones analizadas (Figura 5 derecha). Considerando que en las secciones del control positivo se observaron células TRAP⁺ (Figura 5 izquierda), se concluye que no hubo un problema con la tinción si no un problema con las muestras. Una opción es rehacer el experimento para obtener muestras frescas de huesos que preserven actividad TRAP para el análisis histológico; sin embargo, esta opción requiere de mucho tiempo y material, considerando la generación de metástasis en 40 ratones, la cantidad de anticuerpos necesarios para los tratamientos de eliminación de linfocitos T, y la preparación de los huesos para histología que requiere 8 semanas. Por lo tanto, se necesita encontrar formas alternativas de evaluar el número de osteoclastos en huesos de ratones con o sin linfocitos T *in vivo*.

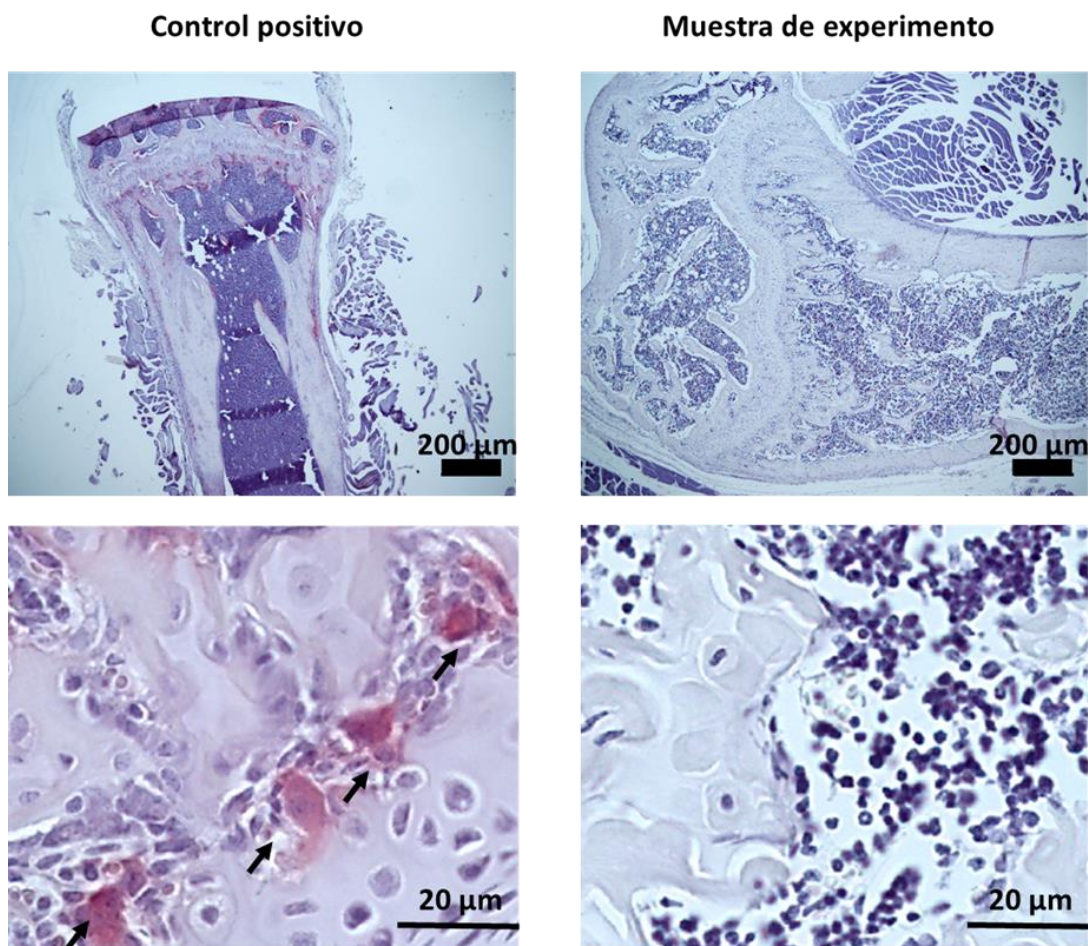


Figura 5. Observación de osteoclastos en secciones de huesos de ratones. Imágenes representativas de secciones de huesos desmineralizados con tinción TRAP. Se usó un control positivo para la tinción TRAP (izquierda) y una muestra representativa de los ratones del experimento (derecha). Las flechas indican osteoclastos identificados por actividad TRAP.

3.1.2 Evaluación de la cantidad de osteoclastos *in vivo* a partir de ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo*

Una opción menos demandante de tiempo, es evaluar la cantidad de precursores de osteoclastos, realizando ensayos de osteoclastogénesis a partir células de médula ósea. Para estos se toman las células de médula ósea y se cultivan en condiciones para inducir la formación de osteoclastos. Esto da como resultado un reflejo *ex vivo* de lo que estaba ocurriendo *in vivo* en los ratones con metástasis.

3.1.2.1 Estandarización de ensayos de osteoclastogénesis

Por lo anteriormente mencionado se planteó estandarizar las condiciones para ensayos de formación de osteoclastos; esto para evitar condiciones de saturación en cuanto al número de células precursoras sembradas o por los factores de diferenciación. Primeramente, para estandarizar el número de células precursoras a sembrar en los ensayos; se cultivaron células de médula ósea de ratones Balb/c a diferentes densidades de 20,000-75,000 células/pozo y una concentración fija de RANKL y M-CSF. Cinco días después se tiñeron los osteoclastos para detectar actividad TRAP y se cuantificaron los osteoclastos presentes. En los resultados obtenidos se observó que la cantidad de osteoclastos obtenidos fue dependiente de la densidad de células de médula ósea que se sembraron. No se pudo observar una saturación del sistema, sin embargo, en las condiciones de 40,000 a 75,000 células, se observaron muchas células que son multinucleadas, con un citoplasma amplio y con actividad TRAP, lo que corresponde a la morfología de osteoclastos (Figura 6A). En la condición de 20,000 células, la mayoría de las células eran multinucleadas y también se observó esta morfología, sin embargo, la mayoría no presentaban citoplasma amplio, lo que se considera que no es una buena morfología. En la condición de 60,000 y 75,000 células, se consideró que había demasiados osteoclastos por contar, con 40,000 células/pozo, se obtuvieron cantidades considerables de osteoclastos para contar y con buena morfología, por lo tanto, se decidió utilizar ésta condición para los futuros experimentos (Figura 6A).

Para estandarizar la concentración a utilizar de factores de diferenciación M-CSF y RANKL, se realizó un ensayo donde se sembró un número fijo de células (40,000 células/pozo) y se probaron diferentes concentraciones en un gradiente de 0-50ng/mL de RANKL y M-CSF. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que en las condiciones de 12.5 y 18.75ng/mL hubo osteoclastos, sin embargo, la mayoría no presentaron buena morfología. En la condición de 25 y 50ng/mL hubo un buen número de osteoclastos y la mayoría presentaron buena morfología, por esta razón y para evitar condiciones de saturación, se consideró que la concentración óptima de factores de diferenciación es a 25ng/mL (Figura 6B).

Con estos resultados se concluyó que las condiciones de 40,000 células/pozo en presencia de 25ng/mL de M-CSF y RANKL se lograron estandarizar las condiciones para los siguientes ensayos de formación de osteoclastos.

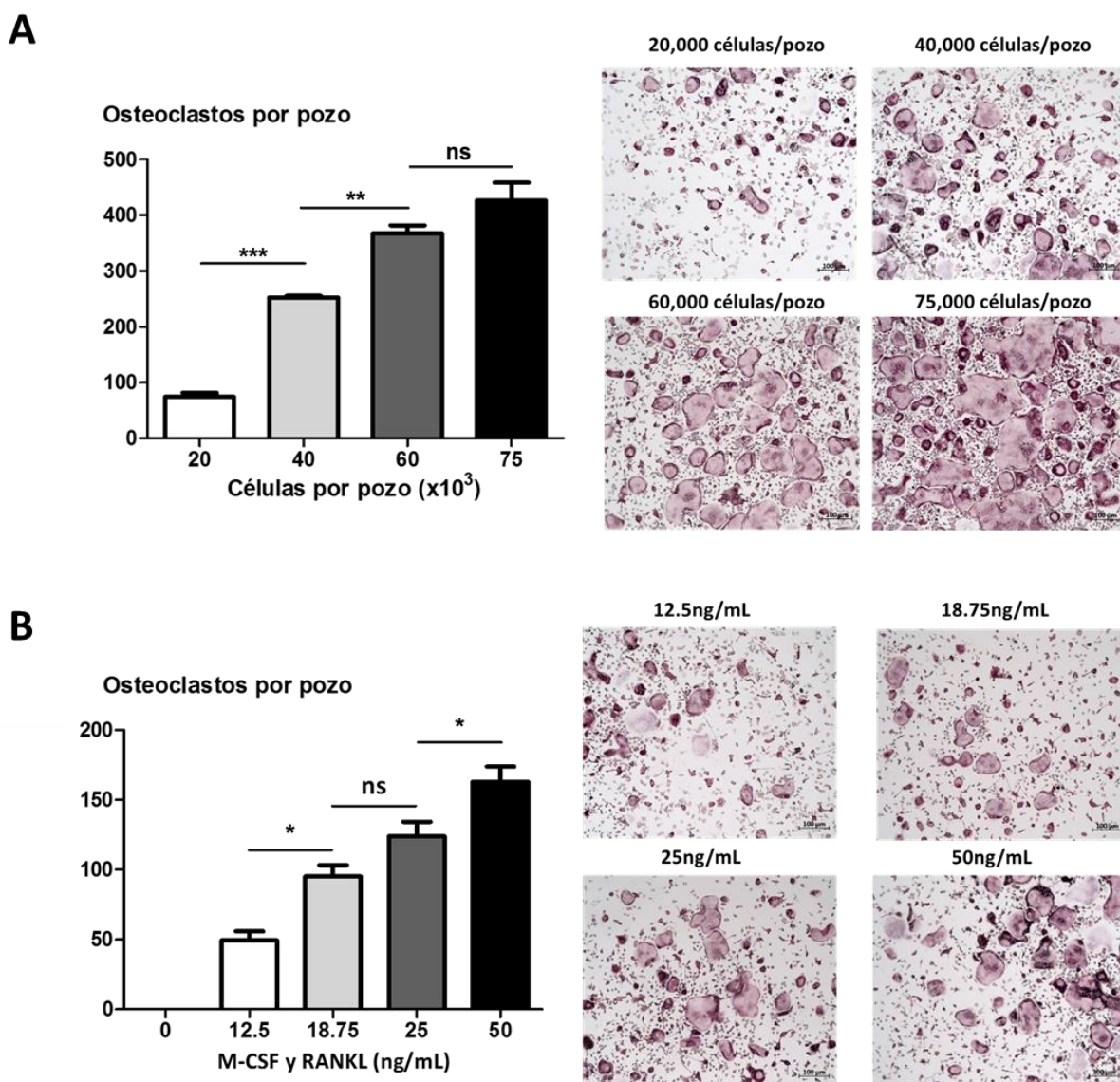


Figura 6. Estandarización de condiciones para ensayos de osteoclastogénesis. Osteoclastos fueron diferenciados sembrando **(A)** de 20,000 hasta 75,000 células, en presencia de M-CSF y RANKL (25ng/mL cada uno), o **(B)** 40,000 células, en presencia de 0 hasta 50 ng/mL de M-CSF y RANKL. Los resultados son representados (izquierda) como el promedio \pm SEM ($n=4$) de la cantidad de osteoclastos por pozo o (derecha) como imágenes representativas. ns $P>0.05$, * $P<0.05$, * $P<0.01$, *** $P<0.001$ utilizando una prueba ANOVA de 1 vía con un Tukey post hoc test.

3.1.2.2 Validación de ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo*

Para confirmar que los ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo* reflejan la cantidad de osteoclastos *in vivo*, se compararon las cantidades de osteoclastos obtenidos a partir de médula ósea de ratones normales y de ratones con metástasis ósea, o de médula ósea de ratones con metástasis ósea que recibieron o no un tratamiento anti-resortivo. Primero se inocularon o no ratones con células 4T1 para inducir la formación de metástasis ósea. Diez días después, se colectó y cultivó la médula ósea de estos ratones para inducir la formación de osteoclastos. La cantidad de osteoclastos obtenidos a partir de médula ósea con metástasis estaba significativamente incrementada, comparado con médula ósea normal (6 veces más, $p < 0.001$), como se esperaba (Figura 7A). Un tratamiento de los ratones con ácido zoledrónico tiene un efecto en los ratones que induce la muerte de los osteoclastos y por lo tanto es anti-resortivo (Pozzi et al., 2009); por lo que hicimos un ensayo de osteoclastogénesis con la médula ósea de ratones con metástasis ósea que recibieron un tratamiento con ácido zoledrónico (15 μ g/kg) o el placebo PBS. Observamos que hay una disminución significativa de 23% ($P < 0.01$) de la cantidad de osteoclastos a partir de la médula ósea de ratones que recibieron ácido zoledrónico para inhibir la resorción ósea (Figura 7B).

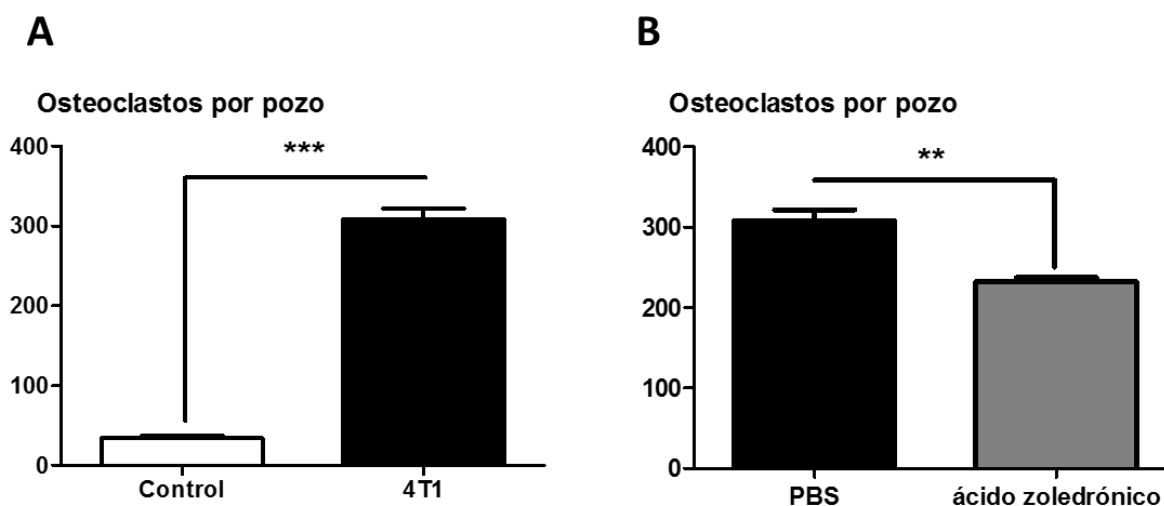


Figura 7. Metástasis ósea aumenta la cantidad de osteoclastos en ensayos *ex vivo*. Osteoclastos fueron diferenciados sembrando **A)** médula ósea de ratones con o sin metástasis ósea o **B)** médula ósea de ratones con metástasis ósea que recibieron un tratamiento con PBS o ácido zoledrónico. Células de médula ósea de ratones fueron sembradas para inducir la formación de osteoclastos. Los resultados son representados como el promedio \pm SEM (n=3) de la cantidad de osteoclastos por pozo. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ utilizando una prueba *t* de Student desapareada.

3.1.2.3 Evaluación de la cantidad de osteoclastos de médula ósea con o sin linfocitos T

Los resultados anteriores sugieren que es posible usar ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo* para evaluar la cantidad de osteoclastos *in vivo*, en la médula ósea de ratones, por lo que se compararon las cantidades de osteoclastos usando médula ósea de ratones con o sin linfocitos T. Ratones Balb/C fueron inoculados para tener metástasis ósea de células 4T1, y recibieron un tratamiento con anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8 para eliminar a los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, respectivamente, o con ambos anticuerpos para eliminar todos los linfocitos T. Se usó la médula ósea de estos ratones en ensayos de osteoclastogénesis, en dos experimentos independientes.

En el primer experimento, la eliminación de todos los linfocitos T o solamente los linfocitos T CD4⁺ disminuyeron significativamente la cantidad de osteoclastos (-27% y -55%, respectivamente) (Figura 8A). La eliminación de los linfocitos T CD8⁺ no tuvo efecto en la cantidad de osteoclastos (Figura 8A). En el segundo experimento, se encontraron resultados diferentes. Solamente la eliminación de los linfocitos T CD8⁺ disminuyó la cantidad de osteoclastos, y la eliminación de todos los linfocitos T o solamente los CD4⁺ no tuvo efecto (Figura 8B). A pesar de la variabilidad entre estos diferentes experimentos, estos resultados no se correlacionan completamente con resultados anteriores (Figura 3). Aunque la eliminación de todos los linfocitos T disminuyó la osteólisis de las metástasis óseas de células 4T1, fue la eliminación específica de los linfocitos T CD8⁺ que disminuyó la osteólisis (Figura 3). Por estas razones y a pesar de los controles establecidos (Figura 8), parece que no podemos evaluar de manera confiable la cantidad de osteoclastos *in vivo* con los ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo*.

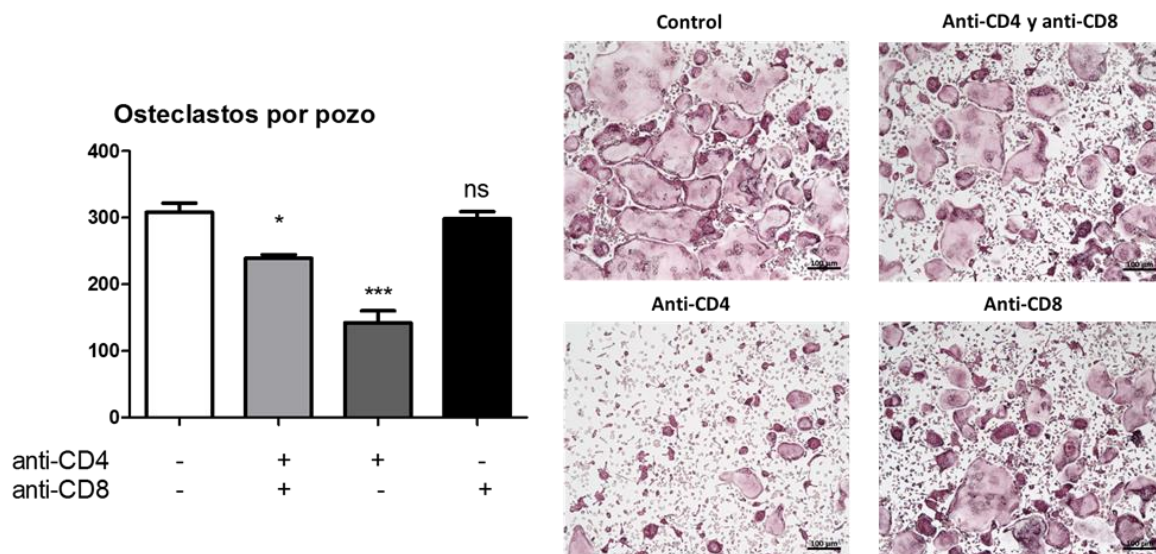
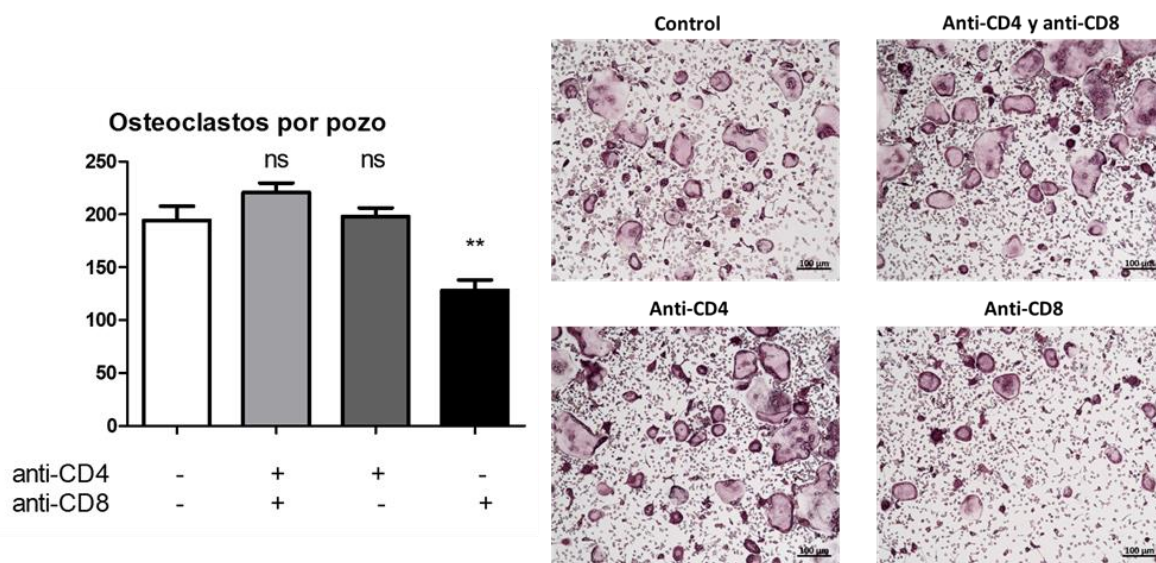
A**B**

Figura 8. Evaluación del número de osteoclastos de médula ósea de ratones con metástasis y con o sin eliminación de linfocitos T. En 2 experimentos independientes (**A**, **B**), los osteoclastos fueron diferenciados a partir de médula ósea de ratones con metástasis y con un tratamiento con anticuerpos anti-CD4 y/o anti-CD8. Los resultados son representados (izquierda) como el promedio \pm SEM ($n=4$) de la cantidad de osteoclastos por pozo o (derecha) como imágenes representativas. ns $P>0.05$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ utilizando una prueba ANOVA de 1 vía con un Tukey post hoc test.

3.1.3 Análisis de osteoclastos en secciones de huesos por la tinción hematoxilina-eosina

Considerando que no fue posible identificar los osteoclastos por tinción TRAP en secciones de huesos y que no se pudo medir la cantidad de osteoclastos *in vivo* por ensayos de osteoclastogénesis *ex vivo*, se decidió cuantificar los osteoclastos en la metástasis ósea a partir de su morfología en secciones de tejidos. Para esto se probaron dos opciones, la tinción TRAP que cuenta con una contra tinción con hematoxilina o la tinción hematoxilina-eosina. Los resultados muestran que en ambas opciones se pueden ver los osteoclastos como células grandes y con varios núcleos. Sin embargo, cuando se compararon varias secciones con ambas tinciones, se consideró que es más sencillo reconocer a los osteoclastos en las secciones teñidas con hematoxilina-eosina; esto ya que se observó un mejor contraste entre los osteoclastos y la interface del tumor-hueso (Figura 9). Con este resultado, se prosiguió a contar la cantidad de osteoclastos y la superficie de contacto de los osteoclastos con el hueso, en la interface de la metástasis ósea.

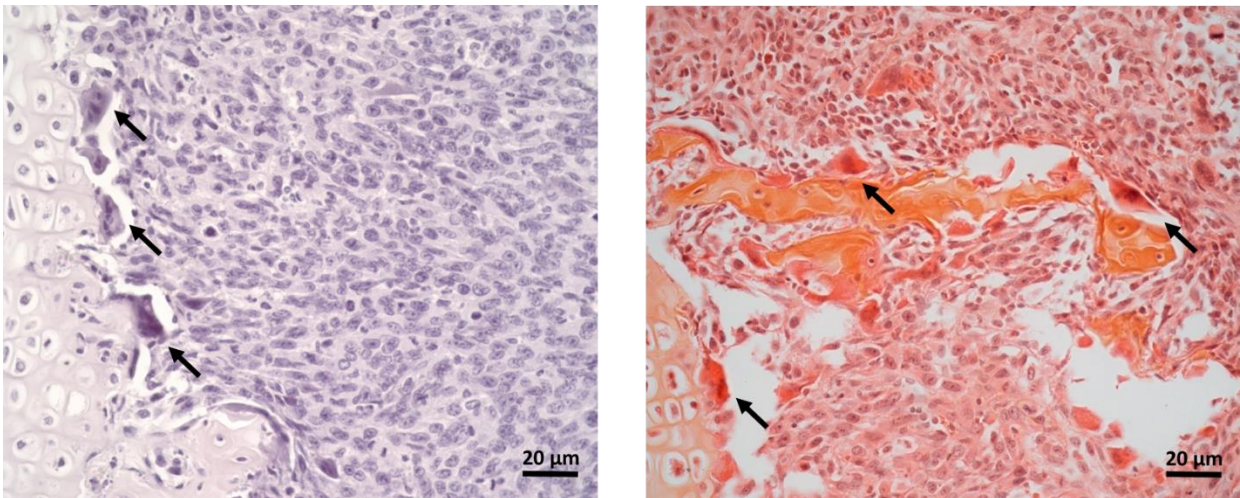


Figura 9. Evaluación de osteoclastos en secciones de huesos con una contra tinción de hematoxilina o tinción hematoxilina-eosina. Se evaluó mediante una contra tinción de hematoxilina (izquierda) o una tinción hematoxilina-eosina (derecha) los caracteres morfológicos para identificar osteoclastos en secciones de huesos. Flechas indican osteoclastos.

3.1.4 La Eliminación de linfocitos T reduce el número de osteoclastos en metástasis ósea de células 4T1

Para ver el efecto *in vivo* de la presencia y ausencia de linfocitos T en la formación de osteoclastos; se realizaron cortes histológicos de fémur (10 ratones por grupo) con un micrótopo, y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina. A continuación se analizaron los cortes, tomando fotos con un microscopio con cámara digital para cuantificar los osteoclastos presentes en la interfaz hueso-tumor (Figura 10A) y obtener datos histomorfométricos como son: el número de osteoclastos sobre superficie de hueso (Oc.N/BS) y la superficie de osteoclasto sobre superficie de hueso (Oc.S/BS). De acuerdo a los resultados obtenidos, la eliminación de los linfocitos T con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 induce una disminución no significativa de 21% ($P>0.05$) en la superficie de contacto de osteoclastos con el hueso en la metástasis ósea. Sin embargo, hubo una disminución significativa de 25% ($P<0.05$) en el número de osteoclastos en el grupo de ratones sin linfocitos T al ser comparado con el control (Figura 10B).

Por lo tanto, se concluye que la presencia de linfocitos T de médula ósea de ratones con metástasis aumenta la cantidad de osteoclastos *in vivo*.

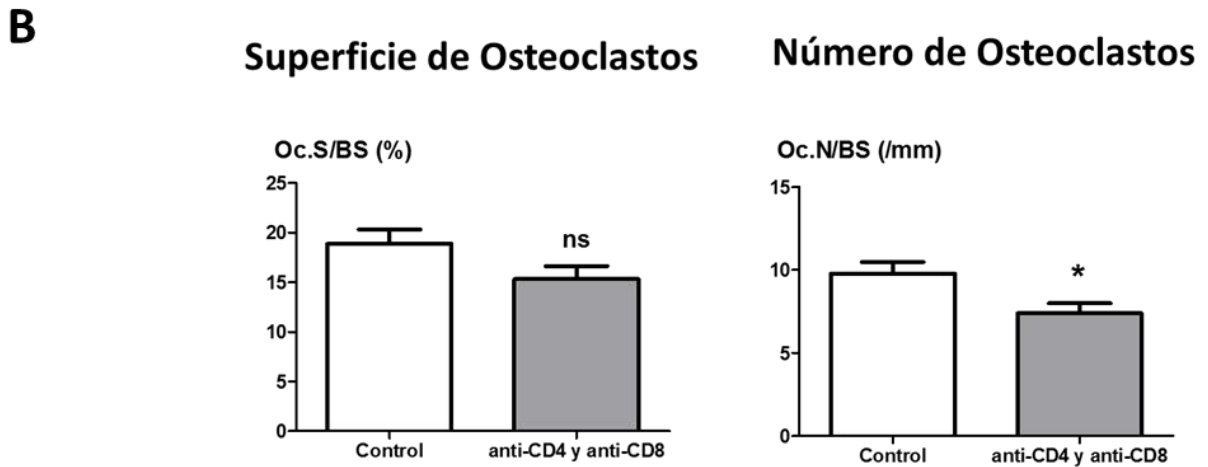
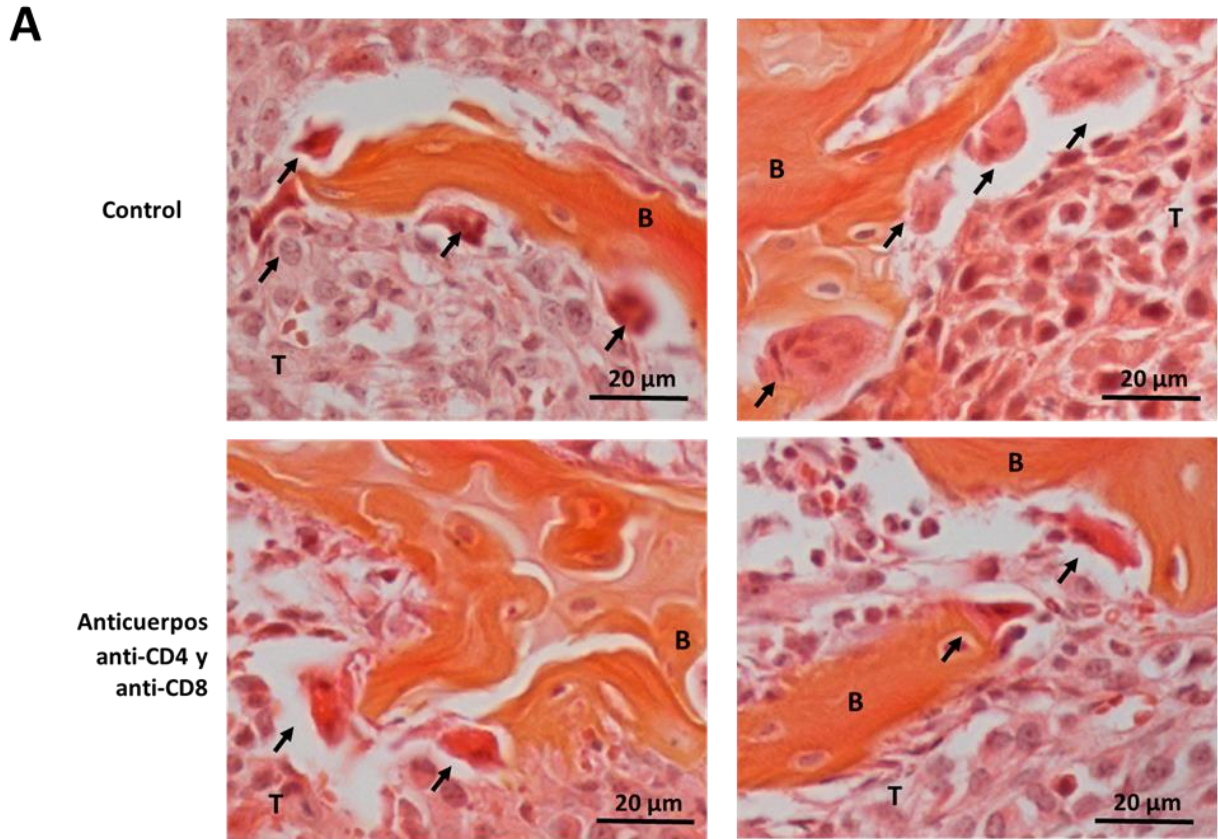


Figura 10. Eliminación de linfocitos T reduce el número de osteoclastos en metástasis ósea de células 4T1. (A) Imágene representativas donde se midió el número de osteoclastos (Oc.N) y la superficie de osteoclastos (Oc.S) en la interface tumor-hueso (BS). Flechas indican osteoclastos. B, hueso; T, tumor. **(B)** Los resultados se representan como el promedio \pm SEM (n=10). ns $P>0.05$ * $P<0.05$ utilizando una prueba *t* de Student desapareada.

3.2 Efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos *in vitro*

Para caracterizar los mecanismos pro osteoclásticos de los linfocitos T, se prosiguió a probar el efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos en ensayos *in vitro*. La estrategia que se planteó fue aislar linfocitos T de ratones a partir de bazo o de médula ósea y agregarlos a ensayos de osteoclastogénesis.

3.2.1 Activadores de linfocitos T afectan la morfología de los osteoclastos

Una estrategia común para cultivar linfocitos es agregar activadores (concanavalina A, anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3) de linfocitos T para asegurar su actividad. En experimentos previos a este trabajo, se realizaron ensayos de formación de osteoclastos agregando linfocitos T de metástasis ósea (Figura 4) donde se agregaron activadores de linfocitos T, por esto se planeó agregar activadores a nuestros ensayos. Sin embargo, para nuestros ensayos primero se decidió probar si los activadores de linfocitos tendrían un efecto inespecífico en las células precursoras de osteoclastos. Para ver el efecto que tiene los activadores de linfocitos T en los ensayos de osteoclastogénesis, se estableció un modelo con médula ósea de ratones Balb/c a los cuales se les eliminaron sus linfocitos T con un tratamiento con anticuerpos anti-CD3. La correcta eliminación de los linfocitos T en la médula ósea fue corroborada mediante citometría de flujo (Figura 11A).

Posteriormente se realizó un ensayo de osteoclastogénesis en donde se le agregaron diferentes activadores de linfocitos T: anti-CD3 fijo en placa, anti-CD28 soluble y concanavalina A a las células de médula ósea del ratón sin linfocitos T. Los resultados mostraron que los tratamientos no inducen una variación significativa en el número de osteoclastos obtenidos al ser comparados con el control (Figura 11B).

A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en las condiciones probadas, sí se observó un efecto marcado en cuanto a un cambio en la morfología de los osteoclastos obtenidos al realizar la tinción TRAP. El efecto observado es más evidente en las muestras tratadas con concanavalina A y anti-CD3 fijo en las cuales se obtuvieron osteoclastos de mayor tamaño, con formas alargadas y estrelladas; por otro lado, las muestras con anti-CD3 fijo y anti-CD28 soluble mostraron osteoclastos más pequeños y también con formas alargadas (Figura 11C).

Con estos resultados se concluye que no es una buena opción agregar los activadores al ensayo de osteoclastogénesis para activar a los linfocitos residentes en la médula ósea, esto ya que los activadores tienen un efecto que modifica la morfología de los osteoclastos. Por lo tanto, también se concluye que los linfocitos T deben de ser activados *ex vivo* antes de ser agregados a los ensayos de osteoclastogénesis y así evitar agregar los activadores.

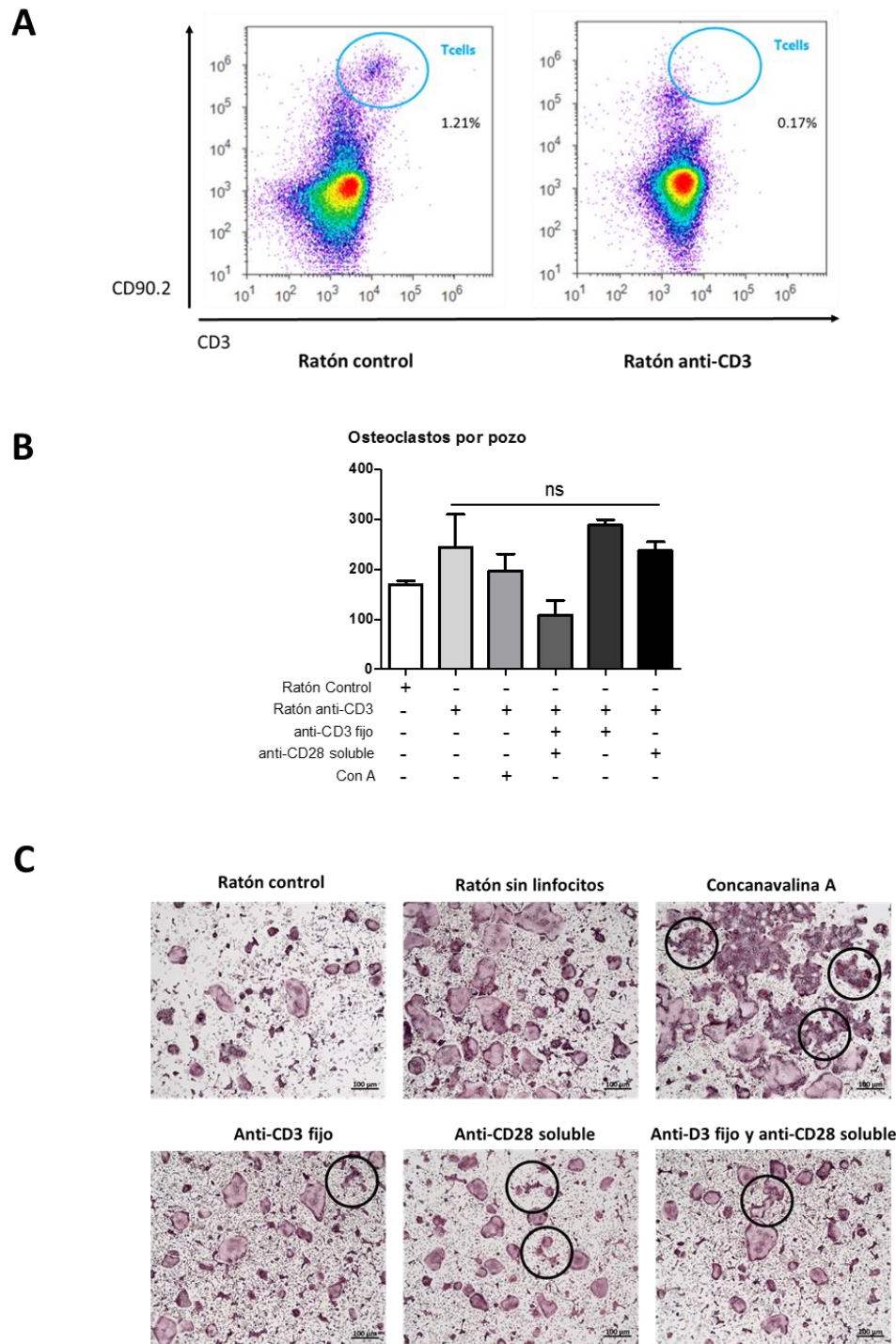


Figura 11. Agregar activadores de linfocitos T afecta la morfología de los osteoclastos. (A) Gráficas de citometría de flujo donde se muestra la eliminación de linfocitos T en la médula ósea de un ratón tratado con anticuerpos anti-CD3 **(B)** Los resultados se representan como el promedio \pm SEM ($n=4$). ns $P>0.05$, utilizando una prueba ANOVA de 1 vía con un Tukey post hoc test. **(C)** Se muestran imágenes representativas de ensayos de osteoclastos agregando activadores de linfocitos T. Círculos indican morfologías de osteoclastos anormales observadas en las condiciones con activadores.

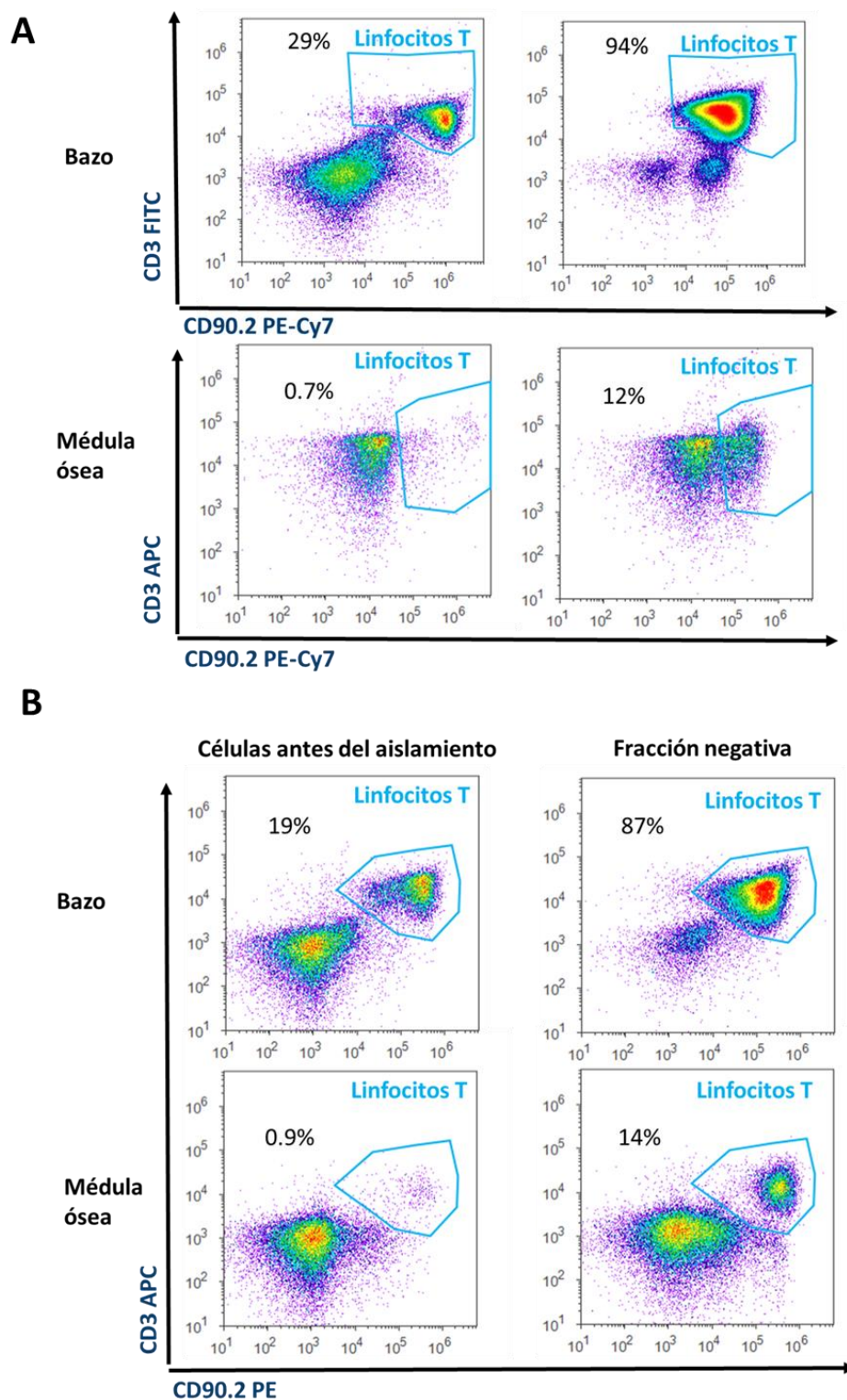
3.2.2 Aislamiento positivo y negativo de linfocitos T de médula ósea de ratón

Para ver el efecto de los linfocitos T de metástasis en la formación de osteoclastos *in vitro*, se planteó aislar linfocitos T de médula ósea proveniente de un ratón con metástasis, para ser agregados a ensayos estandarizados de formación de osteoclastos. Un método estándar para aislar linfocitos T es con una estrategia de selección positiva, en la cual se usa un anticuerpo anti-CD3 para aislar los linfocitos T con la ayuda de perlas magnéticas. Esta estrategia tiene dos complicaciones potenciales: 1) el anticuerpo podría inducir una activación de los linfocitos T, y 2) las perlas magnéticas al quedarse unidas pueden tener un efecto citotóxico en los linfocitos T. Una forma de solucionar el primer problema es cambiar el anticuerpo anti-CD3 por un anticuerpo anti-CD90.2 que también reconoce a los linfocitos T sin activarlos. Para el segundo problema, se necesita un kit en el que se puedan liberar las perlas de los linfocitos T, esto se puede lograr con anticuerpos anti-CD90.2 biotinilados; una biotina modificada en el anticuerpo se une a estreptavidina en las perlas magnéticas, al agregar una solución con biotina normal la estreptavidina se desprende de la biotina modificada y se une con mayor afinidad a la biotina normal liberando a las células unidas a los anticuerpos. Otra forma de solucionar los problemas mencionados anteriormente es utilizar una estrategia de selección negativa, en donde los anticuerpos no se unen a los linfocitos T, dejando a los linfocitos T intactos sin problemas de activación o de desprendimiento de las perlas magnéticas.

Se probaron dos estrategias para aislar linfocitos T provenientes de médula ósea de ratones: 1) aislamiento negativo de linfocitos T o 2) aislamiento positivo de linfocitos T. La primera estrategia consiste en el uso de un coctel de anticuerpos de rata que deben de reconocer células de diferentes linajes que no sean linfocitos T, posteriormente se usan perlas magnéticas con anticuerpos anti-rata para eliminar estas células y obtener una muestra que contiene solo linfocitos T (fracción negativa). La estrategia de aislamiento positivo consiste en el uso de anticuerpos biotinilados de rata que reconocen a los linfocitos T (células CD90.2⁺), después se agregan perlas magnéticas con anticuerpos anti-rata para separar estas células de la muestra (fracción positiva), y finalmente se agrega una solución que desprende a las células de las perlas magnéticas. A la par de la médula ósea como fuente de linfocitos, se utilizaron muestras de bazo de los mismos ratones, ya que en el bazo hay 30% de linfocitos T (Figura 12A) se pueden usar como control positivo, considerando que la médula ósea solo tiene 1% de linfocitos T (Figura 11A). Se realizaron los protocolos de aislamiento de ambas estrategias según las recomendaciones de los proveedores y al final se teñieron muestras con anticuerpos para detectar células CD3⁺ y CD90.2⁺ que se consideraron como linfocitos T. Las muestras teñidas fueron de células tanto de bazo como de médula, antes y después del

aislamiento; esto para confirmar la eficiencia de aislamiento de ambas estrategias mediante citometría de flujo.

Se logró ejecutar efectivamente el protocolo para kit de aislamiento positivo ya que se observó un incremento (del 29% a un 94%) en el porcentaje de linfocitos T de bazo antes y después del aislamiento. Sin embargo, en el caso de los linfocitos T de médula ósea no se logró un gran aumento en el porcentaje de linfocitos T (del 0.7% a un 12%) antes y después del aislamiento positivo (Figura 12A). Para el kit de aislamiento por selección negativa también se obtuvo una buena pureza en el aislamiento de linfocitos T a partir de bazo (incremento del 19% a un 87%), lamentablemente tampoco se logró un buen aislamiento de linfocitos T a partir de médula ósea (incremento del 0.9% a un 14%) (Figura 12B). Ya que los controles positivos de bazo funcionaron, se consideró que la razón de las bajas eficiencias de aislamiento fue porque estos kits no están optimizados para obtener linfocitos a partir de médula ósea y funcionan mejor con otros órganos linfoides como el bazo. Como conclusión, no se pueden utilizar estos kits para preparar linfocitos T de médula ósea para los ensayos de osteoclastogénesis. A pesar de nuestro objetivo era obtener linfocitos T de médula ósea, se consideró que para futuros experimentos se pueden obtener linfocitos T a partir de bazo con ambas estrategias de aislamiento, y utilizarlos para ser agregados a ensayos de osteoclastogénesis.



3.2.3 Cultivo y activación *ex vivo* de linfocitos T aislados de bazo

Ya que no se logró obtener linfocitos T de médula ósea, como una alternativa se decidió aislar linfocitos T a partir de bazo con el kit de aislamiento negativo; esto para ver el efecto de los linfocitos T en ensayos *in vitro* de formación de osteoclastos. De acuerdo a los resultados obtenidos, donde se vio un efecto negativo en los ensayos de formación de osteoclastos agregando activadores de linfocitos T, se decidió activar a los linfocitos T aislados en cultivo, para posteriormente ser agregados a los ensayos; esto para evitar agregar los activadores al ensayo de formación de osteoclastos. Los linfocitos fueron cultivados en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y concanavalina A por 8 días para inducir o no su activación. Al día 8 se confirmó su activación al observar cambios en su morfología, ya que los linfocitos T activados muestran formación de cúmulos y se agrandan comparados con los linfocitos T no activados (Figura 13). Con estos resultados se decidió que se pueden utilizar éstas células para agregarlas a los ensayos de formación de osteoclastos y determinar si tienen un efecto.

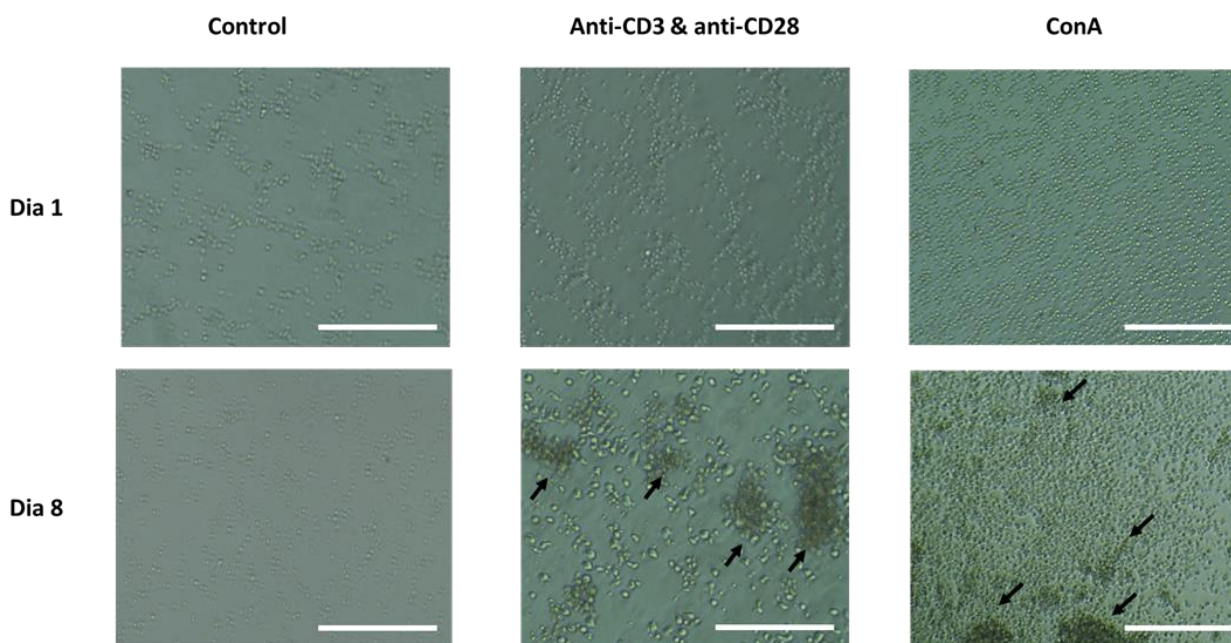


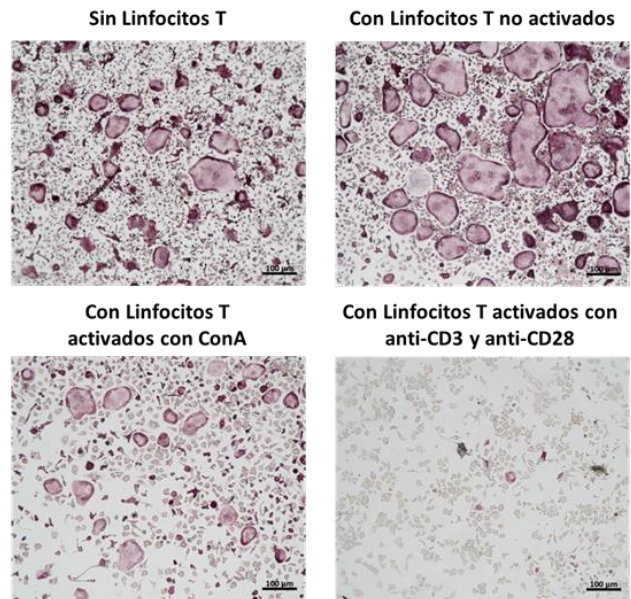
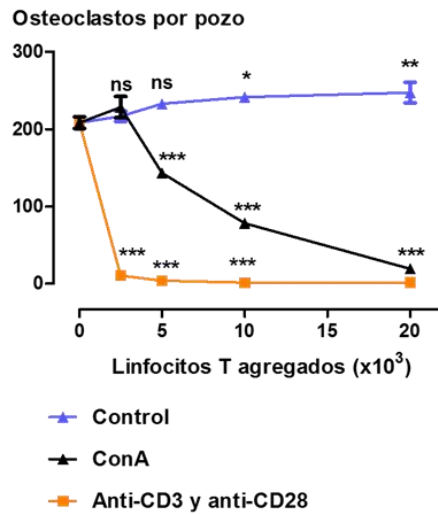
Figura 13. Cultivo y activación *ex vivo* de linfocitos T aislados de bazo. Los resultados se presentan como imágenes representativas de linfocitos T al día 1 o día 8 de cultivo en condiciones de activación o no activación. Flechas indican cúmulos observados de linfocitos T activados. Barras de escala representan 200 micrómetros.

3.2.4 Linfocitos T no activados aumentan la formación de osteoclastos, mientras que los linfocitos T activados la inhiben *ex vivo*

Para caracterizar el efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos *in vitro*, se sembraron células de médula ósea y se agregaron linfocitos T activados o no en diferentes cantidades. Los resultados obtenidos indicaron que los linfocitos T no activados en cantidades de 10,000 y 20,000 células mostraron un aumento significativo de 13% y 16% ($P < 0.05$) respectivamente en el número de osteoclastos comparados con el control sin linfocitos. Al contrario, al agregar los linfocitos T activados con concanavalina A o anti-CD3 y anti-CD28 hubo una disminución significativa de 35% y 95% ($P < 0.001$) respectivamente, en el número de osteoclastos a partir de 5,000 células. Estos resultados son representativos de 4 experimentos independientes, por lo que se concluye que los linfocitos T no activados aumentan la formación de osteoclastos y los linfocitos T activados la inhiben en ensayos *in vitro* con médula ósea de un ratón normal. (Figura 14A).

A continuación, se sugiere que los linfocitos T pueden tener expresión de RANKL, lo cual puede contribuir a este efecto pro osteoclastico; sin embargo, en nuestros ensayos estándar se agrega RANKL exógeno. Para ver el efecto específico de RANKL derivado de los linfocitos T, se repitieron estos ensayos en presencia o ausencia de RANKL (condiciones sub óptimas) y aumentando las cantidades de linfocitos T. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto pro osteoclástico anteriormente observado es gracias a la producción de RANKL por parte de los linfocitos T no activados; esto ya que se observó de nuevo un aumento significativo en el número de osteoclastos (35% y 70% para 20,000 células y 40,000 células respectivamente, $P < 0.01$) y también se observó formación de osteoclastos en las condiciones de ausencia de RANKL. (Figura 14B). Con estos resultados se concluye que agregar linfocitos T no activados, induce la formación de osteoclastos a partir de médula ósea en ausencia de RANKL exógeno *in vitro*.

A



B

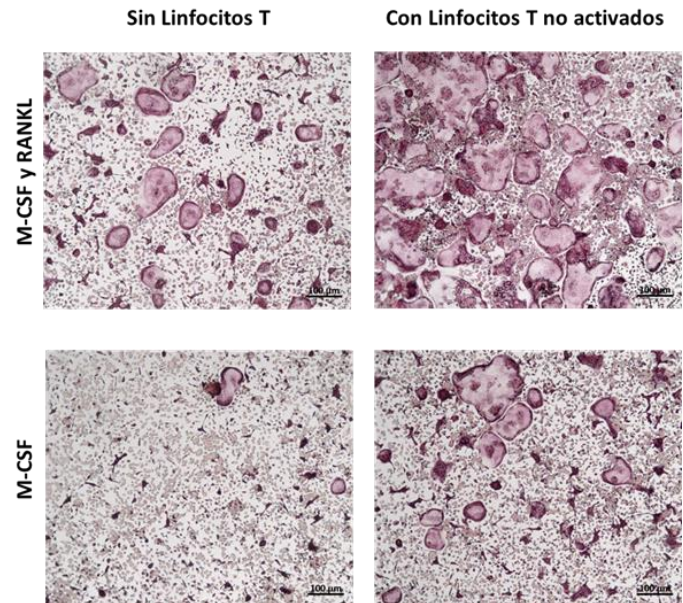
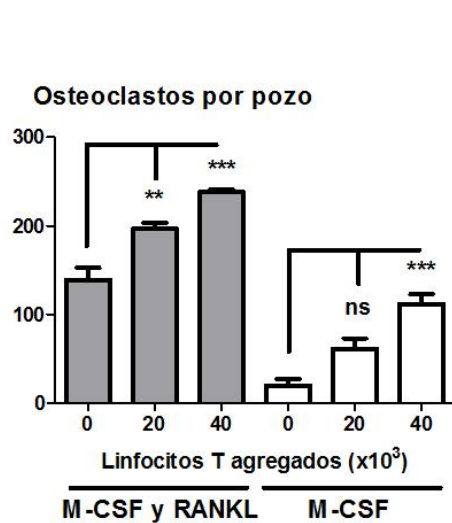


Figura 14. Linfocitos T no activados aumentan la formación de osteoclastos, mientras que los linfocitos T activados la inhiben *ex vivo*. (A, B) Osteoclastos fueron diferenciados a partir de médula ósea de ratones y se les agregó a los ensayos diferentes cantidades de linfocitos T que habían sido cultivados previamente en condiciones con o sin activación. Resultados se representan como el promedio \pm SEM ($n=4$) ns $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ utilizando una prueba ANOVA de 1 vía con un Tukey post hoc test; o imágenes representativas del ensayo agregando 10^4 linfocitos T (A) o 4×10^4 linfocitos T no activados (B).

3.2.5 Aislamiento negativo de linfocitos T, T CD4⁺ y T CD8⁺ de bazo de ratón

Para caracterizar el efecto inhibitorio observado de los linfocitos T activados, decidimos realizar un nuevo aislamiento de linfocitos T y a partir de esta muestra realizar un segundo aislamiento negativo específico para linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ por separado. Esto con el fin de determinar qué población de linfocitos es responsable del efecto inhibitorio en la formación de osteoclastos. Los resultados obtenidos por citometría mostraron que se logró un buen primer aislamiento de linfocitos partiendo de una muestra de bazo con 25% de linfocitos, se obtuvo una muestra con 87% de linfocitos (células CD3⁺ y CD90.2⁺) (Figura 15A).

Los resultados de citometría obtenidos de las muestras del segundo aislamiento mostraron una buena eficiencia de aislamiento. Se obtuvo una muestra de con un porcentaje de linfocitos T CD4⁺ de 96%, y otra muestra con un porcentaje de linfocitos T CD8⁺ de 91% (Figura 15B). Con estos resultados se decidió cultivar los linfocitos en condiciones de activación para su posterior adición a los ensayos de formación de osteoclastos. Ya que se observó un mayor efecto inhibitorio de los linfocitos activados con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, se decidió sólo utilizar estas condiciones de activación.

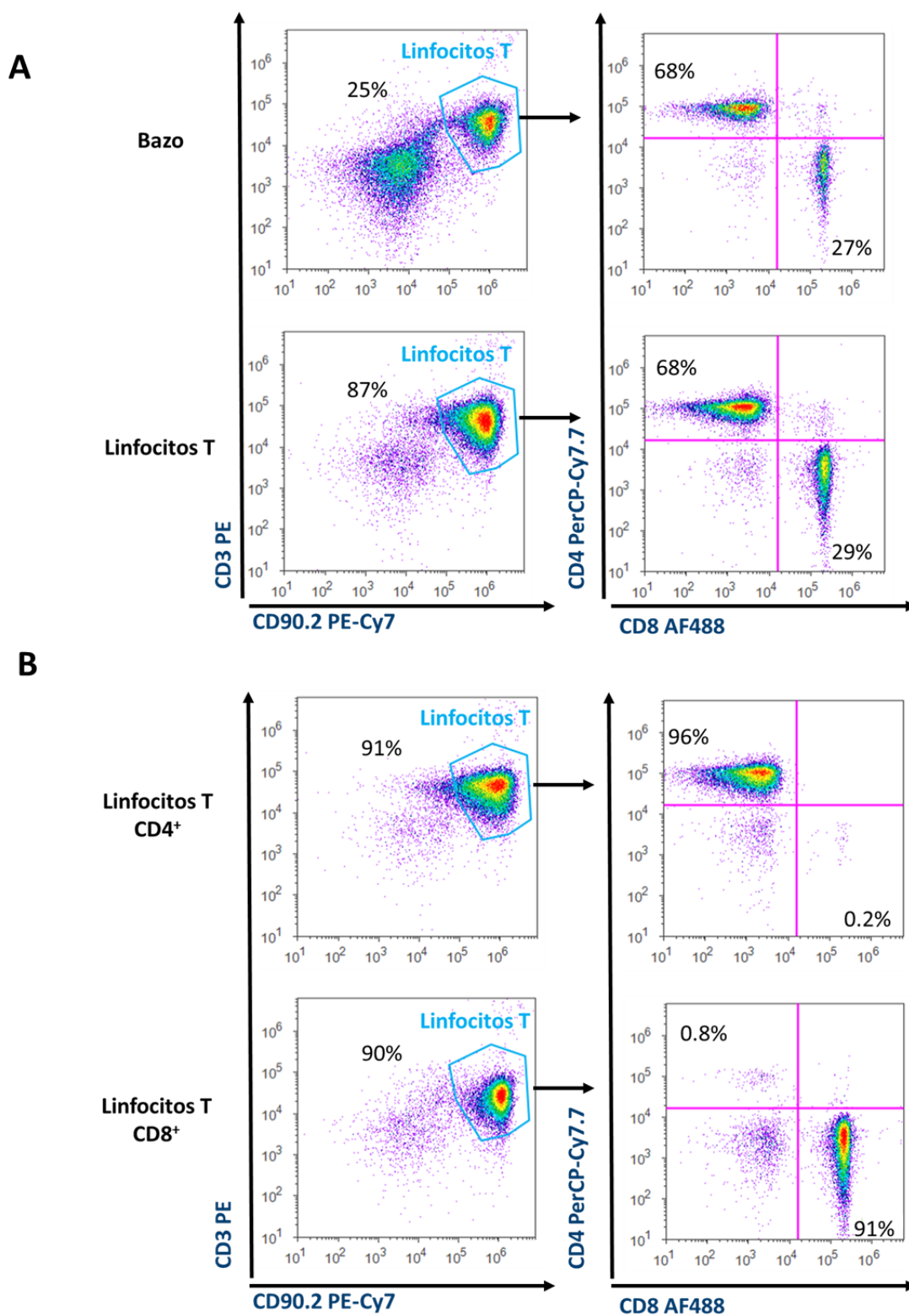


Figura 15. Aislamiento negativo de linfocitos T, T CD4⁺ y T CD8⁺ de bazo de ratón. (A) Se aislaron linfocitos T de bazo de un ratón Balb/C utilizando perlas magnéticas para remover células de bazo no deseadas (selección negativa). **(B)** De la misma forma, linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ se aislaron de una preparación de linfocitos T mediante selección negativa. Se tiñeron células de diferentes poblaciones con anticuerpos fluorescentes para cuantificar la cantidad de linfocitos T (eventos CD3⁺ CD90.2⁺), linfocitos T CD4⁺ (eventos CD4⁺ CD8⁻) y linfocitos T CD8⁺ (eventos CD8⁺ CD4⁻) mediante citometría de flujo. Los resultados se presentan como gráficas de densidad representativas y se indican los porcentajes de las células de interés.

3.2.6 Linfocitos T activados inhiben la formación de osteoclastos *ex vivo* en médula ósea con metástasis de células 4T1

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que linfocitos T aislados de bazo activados *ex vivo* inhiben la formación de osteoclastos a partir de médula ósea normal, considerando que inhibir la formación de osteoclastos puede ser una manera de limitar la metástasis ósea, se decidió comprobar si linfocitos T activados inhiben la formación de osteoclastos en ensayos *in vitro* con medula ósea de ratones con metástasis. Para esto, se agregaron linfocitos T activados a ensayos de formación de osteoclastos a partir de médula ósea con metástasis.

Para estos ensayos se agregaron los linfocitos T previamente aislados (linfocitos T CD4, T CD8 y ambos T CD4/T CD8) y fueron cultivados en condiciones de activación con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28; éstos se recuperaron y se agregaron al ensayo de formación de osteoclastos con medula ósea con metástasis.

Los resultados mostraron que los linfocitos lograron inhibir la formación de osteoclastos en estos ensayos de una forma dosis dependiente (Figura 16). A pesar de que no se obtuvo una inhibición tan marcada como en los experimentos anteriores, la inhibición fue significativa, especialmente en la condición con 10,000 linfocitos T donde se observó una inhibición de 80% ($P < 0.001$) al ser comparado con el control. Los linfocitos T CD4⁺ mostraron un efecto inhibitorio más potente que el de los linfocitos T CD8⁺ (62% y 27%, $P < 0.001$ y $P < 0.05$ respectivamente.), sin embargo, ambas poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ tuvieron un mayor efecto que por separados cada uno por su cuenta. (Figura 16).

Con estos resultados, se concluye que los linfocitos T activados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inhiben la formación de osteoclastos en ensayos *in vitro* en el contexto de la metástasis ósea. También se concluye que los linfocitos T CD4⁺ tienen un mayor efecto inhibitorio que los linfocitos T CD8⁺.

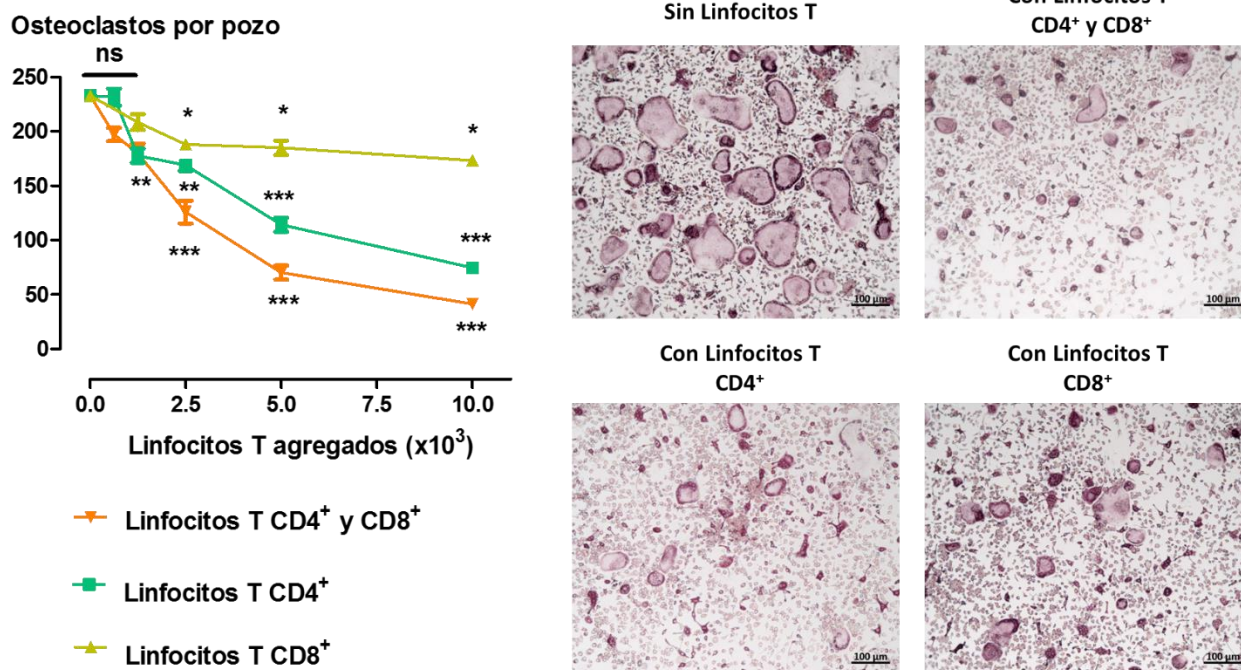


Figura 16. Linfocitos T activados inhiben la formación de osteoclastos *ex vivo* en médula ósea con metástasis de células 4T1. Osteoclastos fueron diferenciados a partir de médula ósea de ratones con metástasis y se le agregó al ensayo diferentes cantidades de linfocitos T, T CD4⁺ y T CD8⁺, que fueron cultivados en condiciones de activación. Resultados se representan como el promedio \pm SEM (n=4) o imágenes representativas del ensayo agregando 10^4 linfocitos T. ns $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ utilizando una prueba ANOVA de 1 vía con un Tukey post hoc test.

3.2.7 Linfocitos T activados no afectan la viabilidad de células de médula ósea *ex vivo*

La activación de los linfocitos puede otorgarle un fenotipo citotóxico el cual podría explicar la reducción del número de osteoclastos; en el caso de que estas células estén matando por un “*bystander effect*” a las células precursoras de osteoclastos, y por ello obteniendo menos osteoclastos. Para probar si los linfocitos activados están teniendo un efecto citotóxico en las células de médula ósea se realizaron ensayos de viabilidad celular con el reactivo MTT. Este ensayo se probó agregando todas las condiciones de linfocitos por agregar anteriormente utilizadas. Los resultados mostraron que no hubo una diferencia significativa en la viabilidad de las células de médula ósea al comparar los grupos con linfocitos T activados contra los no activados; por lo tanto, no se considera que los linfocitos activados tengan un efecto citotóxico (Figura 17).

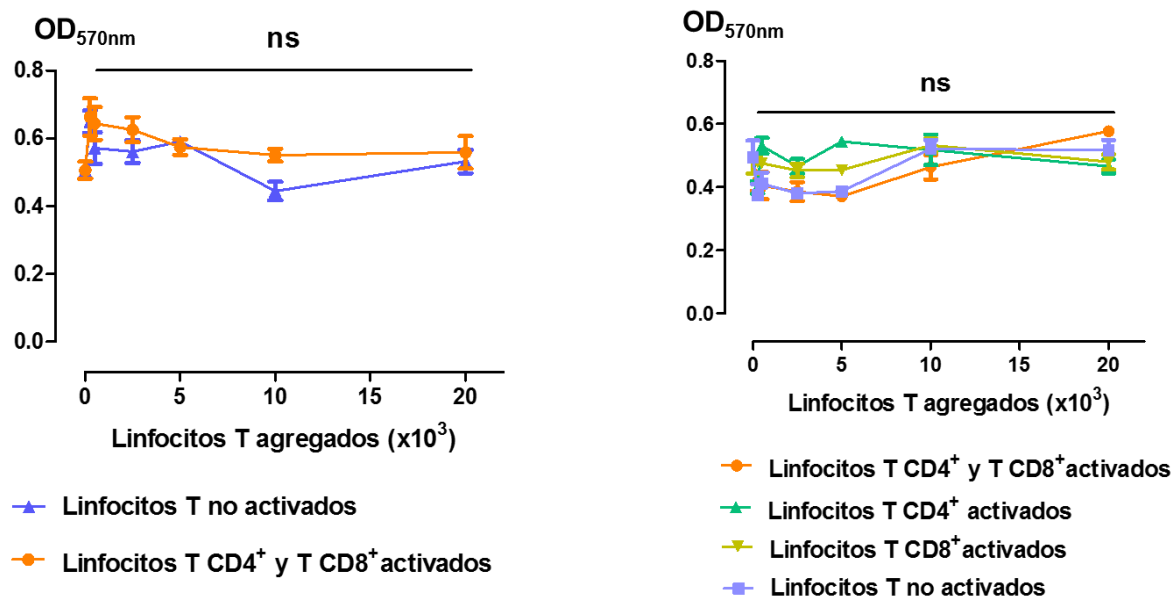


Figura 17. Linfocitos T activados no afectan la viabilidad de células de médula ósea *ex vivo*. Células de médula ósea de ratón fueron cultivadas en presencia de linfocitos T que fueron previamente cultivados en condiciones con o sin activación, posteriormente se realizó un ensayo MTT de viabilidad celular. Los resultados se representan como el promedio \pm SEM (n=4). ns P>0.05; utilizando una prueba ANOVA de 2 vías con un Bonferroni post hoc test.

Capítulo 4. Discusión

La mayoría de las personas con etapas avanzadas de cáncer de mama presentan metástasis ósea la cual es incurable y es una fuente importante de morbilidad y mortalidad. Por esto es importante entender los mecanismos de la metástasis ósea de cáncer de mama para identificar nuevos blancos terapéuticos y desarrollar tratamientos más eficientes. Una opción prometedora para el tratamiento de la metástasis ósea es la inmunoterapia, sin embargo, uno de los retos es que se ha descrito que el sistema inmune tiene la capacidad de regular la remodelación ósea.

En este estudio nos enfocamos en caracterizar el efecto de los linfocitos T en la formación de osteoclastos en el contexto de la metástasis ósea. Para esto se quiso saber si la presencia de los linfocitos T afectan la formación de osteoclastos *in vivo*. Se obtuvieron secciones de huesos de ratones con metástasis ósea con o sin linfocitos T y realizó una tinción TRAP, sin embargo, no se identificaron osteoclastos por esta técnica. Esta tinción es dependiente de la enzima TRAP, la cual se sabe que es sensible y puede perder su actividad. Una posible explicación es que la fijación de las muestras por tiempo prolongado pudo haber sobre fijado las muestras lo cual afectó a la enzima. Otro factor es que la enzima es sensible a la temperatura, por lo que en los baños con parafina a 60°C para la inclusión pudieron afectarla. Para evitar esto otros autores realizan la inclusión con resina de metil-metacrilato ya que el protocolo se realiza a temperaturas bajas entre 4 y -20°C, de esta manera se protege la muestra resina (Pierrick Fournier, comunicación personal). Desafortunadamente no se pudo hacer este protocolo ya que no contamos con un micrótopo especial que permite cortar este tipo de.

Para compensar este problema y ver el efecto de los linfocitos T de metástasis ósea, realizamos ensayos de formación de osteoclastos a partir de médula ósea. Para asegurarnos que los ensayos funcionaran bien, confirmamos que con la médula ósea de un ratón con metástasis hay más células precursoras de osteoclastos que con un ratón normal, y que la cantidad de osteoclastos se disminuye con un tratamiento con ácido zoledrónico. Sin embargo, haciendo este tipo de ensayos con médula ósea de ratones con o sin linfocitos T, no logramos obtener resultados concluyentes con diferencias significativas y que sean coherentes con los resultados obtenidos de la osteólisis (Arellano-Rodriguez et al., resultados no publicados). La razón por la que se pudieron haber obtenido resultados diferentes entre las radiografías y los ensayos *ex vivo* de osteoclastos, es que en las radiografías medimos la osteólisis (resorción ósea) y en los ensayos de formación de osteoclastos medimos la cantidad de osteoclastos formados a partir de precursores, lo cual no es un reflejo de la cantidad de osteoclastos que había en la médula ósea en ese

momento. De hecho, se sabe que es muy difícil obtener osteoclastos del hueso de ratón para cultivo primario, ya que como son células grandes multinucleadas son frágiles al desprenderlos del hueso. Solo se han reportado protocolos para obtener osteoclastos primarios a partir de la médula ósea de conejos (Coxon et al., 2012). Por esta diferencia entre ambos ensayos no se pueden comparar los resultados. Aunado a esto el tratamiento con ácido zoledrónico es efectivo para inhibir la resorción ósea, sin embargo, el porcentaje de inhibición que observamos en la cantidad de osteoclastos es muy bajo, lo que nos confirma que estamos observando a la cantidad de precursores y no la cantidad de osteoclastos que había en los huesos.

De acuerdo a los resultados anteriores, se necesitó regresar a las secciones de huesos para intentar identificar a los osteoclastos por su morfología, esto ya que se pudo observar en las tinciones TRAP células que tenían la morfología de osteoclastos. Por ello se probó que con la tinción de hematoxilina y eosina es mejor para identificar a los osteoclastos por su morfología. De esta manera se encontró una disminución de la cantidad de osteoclastos por la eliminación de linfocitos, lo cual es consistente con la disminución en la osteólisis en las radiografías de esos ratones (Figura 3). Estos resultados confirman que *in vivo* los linfocitos T aumentan la formación de osteoclastos, lo cual puede explicar por qué hay más metástasis ósea en los ratones con linfocitos. Estos resultados se correlacionan con datos de rayos X previamente obtenidos en nuestro laboratorio donde se observó menor osteólisis por metástasis en ratones con eliminación de linfocitos T. Ya que estos experimentos son en ratones, es probable que en pacientes podríamos tener el mismo tipo de efecto; sin embargo, es necesario realizar más experimentos para determinar si algo similar ocurre en humanos.

Para confirmar este efecto *in vitro* y entender más a fondo los mecanismos para eventualmente desarrollar tratamientos, se prosiguió a agregar linfocitos T a ensayos de formación de osteoclastos. Para esta estrategia se presentaron dificultades para aislar linfocitos T a partir de la médula ósea. Para las técnicas estándar de kits de aislamiento que utilizan perlas magnéticas, los protocolos son desarrollados para aislar linfocitos T a partir de órganos linfoides secundarios como el bazo y ganglios linfáticos, y no para la médula ósea. Otra complicación que enfrentamos fue que los anticuerpos anti-CD90.2 también reconocen a células estromales y mesenquimales presentes en la médula ósea, lo que afectó en la pureza de nuestros aislamientos. En el caso de la estrategia de aislamiento negativo, la cual sería una buena estrategia para aislar los linfocitos T que no se unen a los anticuerpos, no funcionó, ya que los anticuerpos para eliminar las células no deseadas, no son suficientes para eliminar algunas poblaciones de células de la médula ósea. Al final desafortunadamente solo se logró aislar linfocitos T provenientes de bazo. Sin embargo, estos linfocitos T tiene un comportamiento que parece similar a los linfocitos T de médula ósea; ya que se

encontró que los linfocitos T de bazo no activados también efecto pro osteoclástico. Esto de acuerdo a experimentos donde se encontró que los linfocitos T de médula ósea con metástasis no están activados (Arellano-Rodriguez et al. 2019), y que estos linfocitos tienen una mayor expresión de RANKL y TNF α (Fournier et al., resultados no publicados). Nuestros resultados en ensayos de ausencia de RANKL exógeno sugieren que el efecto se le puede atribuir a que los linfocitos T no activados pueden estar produciendo RANKL u otra citocina que induzca la producción de RANKL en otras células de médula ósea. Los resultados anteriormente mencionados se correlacionan con los resultados obtenidos en ensayos *in vivo* donde se observó un mayor número de osteoclastos en ratones con metástasis al ser comparados con ratones sin linfocitos T. Estos resultados también son similares a otro estudio donde en un modelo de melanoma se asoció a los linfocitos T con actividad pro-metastática (Monteiro et al. 2013). Gracias a estos resultados, se consideró que activar a los linfocitos T podría evitar el efecto pro osteoclastico de los linfocitos T no activados. Por lo tanto, se hicieron activaciones de linfocitos T y al agregar estos linfocitos se obtuvo el efecto inhibitorio en los ensayos de formación de osteoclastos. En paralelo con esto, otros estudios también han reportado que los linfocitos T activados mostraron un efecto anti-osteoclástico y de disminución de la metástasis ósea (Zhang et al. 2011), lo cual es similar a lo que observamos en nuestro modelo *in vitro*. Con estos resultados en mente, se plantea que la activación de los linfocitos T mediante inmunoterapia podría ser un tratamiento para pacientes con metástasis ósea, tanto para inhibir la resorción ósea como para combatir a las células tumorales. Esto con la hipótesis de que los linfocitos ayudarán a combatir el tumor y al mismo tiempo inhibir la formación de los osteoclastos.

Capítulo 5. Conclusiones

La eliminación de linfocitos T reduce significativamente el número de osteoclastos *in vivo* en ratones Balb/c con metástasis ósea generada por inoculación intracardiaca de células 4T1 de cáncer de mama.

No se logró ver el efecto de la eliminación de linfocitos en la formación de osteoclastos *in vitro*, ni el efecto de los linfocitos T de metástasis ósea en la formación de osteoclastos. Sin embargo, linfocitos T aislados de bazo y cultivados, inducen la formación de osteoclastos. En contraste, al activar los linfocitos T aislados de bazo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, se encontró que estos inhiben la formación de osteoclastos al ser agregados a ensayos estandarizados de osteoclastogénesis *in vitro*.

Con estos resultados, posiblemente se podría desarrollar una estrategia de inmunoterapia, donde se activen los linfocitos T de pacientes con metástasis ósea, y con esto reducir el efecto osteolítico del microambiente tumoral, así como la eliminación del tumor.

Literatura citada

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. 2007. Cellular and molecular immunology (6th ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier. (pp. 137-149).
- Amarasekara, D. S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., & Rho, J. 2018. Regulation of osteoclast differentiation by Cytokine Networks. *Immune Network*, 18(1), 1–18.
- Arellano-Rodriguez D., Drescher F., Jiménez-Flores S., Olvera-Rodriguez F., Juarez P., Fournier P., 2019. Characterization of T cell suppression in the bone microenvironment for the immunotherapy of bone metastases. En: American Society for Bone and Mineral Research 2019 Annual Meeting, Orange County, CA, EEUU, 23 de septiembre.
- Buenrostro, D., Mulcrone, P. L., Owens, P., & Sterling, J. A. 2016. The bone microenvironment: a fertile soil for tumor growth. *Current Osteoporosis Reports*, 14(4), 151–158.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer Journal of Clinicians*. 68(6):394-424.
- Coxon FP, Rogers MJ, Crockett JC. 2012. Isolation and purification of rabbit osteoclasts. *Methods in Molecular Biology*. 816:145-158.
- Eriksen EF. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11:219–227.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), 646–674.
- Jackson H.J., Rafiq S, Brentjens RJ. 2016. Driving CAR T-cells forward. *Nature Reviews in Clinical Oncology*. 13(6):370-383.
- Johnson, R. W., & Suva, L. J. 2018. Hallmarks of bone metastasis. *Calcified Tissue International*, 102(2), 141–151.
- Johnson, R. W., & Sterling, J. A. 2013. Metastatic solid tumors to bone. In C. Rosen (Ed.), *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Eighth Edition. American Society for Bone and Mineral Research (pp. 686–693).
- Jones, D., Nakashima, T., Sanchez, O. et al. 2006. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440, 692–696.
- Li J, Sarosi I, Yan X, et al. 2000. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(4).
- Li, Z., Kong, K., & Qi, W. 2006. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(2), 345–350.

- Lian, J. B., Stein, G. S., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Hassan, M. Q., Gaur, T., & Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(4), 212–227.
- Matthew T. Drake, Bart L. Clarke, Sundeep Khosla M. 2008. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clinic Proceedings*. 83(9):1032-1045.
- Monteiro, A. C., Leal, A. C., Gonçalves-Silva, T., Mercadante, A. C. T., Kestelman, F., Chaves, S. B., 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), 1–13.
- Pacifici, R. 2012. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(2), 231–239.
- Polk, A., Svane, I-M., Andersson, M., Lisbet Nielsen, D. 2017. Checkpoint inhibitors in breast cancer – current status, *Cancer Treatment Reviews*.
- Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, et al. 2009. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clinical Cancer Research*. 15(18):5829-5840.
- Robey, P. G., & Boskey, A. L. 2013. The composition of bone. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism: Eighth Edition*. American Society for Bone and Mineral Research (pp. 32–38).
- Ross, F. P. 2009. Osteoclast biology and bone resorption. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism: Eighth Edition*. American Society for Bone and Mineral Research (pp. 16–22).
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Takayanagi, H. 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(12), 2673–2682.
- Schett, G., & David, J. P. 2010. The multiple faces of autoimmune-mediated bone loss. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(12), 698–706.
- Shevach, E. M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30(5), 636–645.
- Steger GG, Bartsch R. 2011. Denosumab for the treatment of bone metastases in breast cancer: evidence and opinion. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. :233-243.

- Suva L. J., Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. . 2011. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(4):208-218.
- Suva, L. J., Gaddy, D., Perrien, D. S., Thomas, R. L., & Findlay, D. M. 2005. Regulation of bone mass by mechanical loading: microarchitecture and genetics. *Current Osteoporosis Reports*, 3(2), 46–51.
- Thomas, D. A., & Massague, J. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), 369–380.
- Verdugo-Meza, A. 2016. El papel de los linfocitos T cooperadores y T citotóxicos en el desarrollo de metástasis ósea por cáncer de mama en ratones BALB/. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: A fatal attraction. 2011. *Nature Reviews Cancer*. 11(6):411-425.
- Yoneda, T., Sasaki, A., & Mundy, G. R. 1994. Osteolytic bone metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 32(1), 73–84.
- Zaiss, M. M., Sarter, K., Hess, A., Engelke, K., Bohm, C., Nimmerjahn, F., David, J.-P. 2010. Increased bone density and resistance to ovariectomy-induced bone loss in FoxP3-transgenic mice based on impaired osteoclast differentiation. *Arthritis and Rheumatism*, 62(8), 2328–2338.
- Zhang, K., Kim, S., Cremasco, V., Hirbe, A. C., Novack, D. V., Weilbaecher, K., & Faccio, R. 2011. CD8⁺ T cells regulate bone tumor burden independent of osteoclast resorption. *Cancer Research*, 71(14), 4799–4808.