

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

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



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

**Caracterización del efecto de los linfocitos T en la
osteoclastogénesis y el desarrollo de la metástasis ósea bajo el
control del microambiente tumoral en modelos murinos**

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

Presenta:

Danna Lyn Arellano Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Danna Lyn Arellano Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dr. Nicolás Addiel Serafín Higuera



Dra. Ana Denise Re Araujo
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

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

Caracterización del efecto de los linfocitos T en la osteoclastogénesis y el desarrollo de la metástasis ósea bajo el control del microambiente tumoral en modelos murinos

Resumen aprobado por:

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Director de tesis

La metástasis ósea es una complicación común en pacientes en estados avanzados de cáncer de mama y de próstata. Los tratamientos actuales son paliativos, tratamientos como la inmunoterapia basada en linfocitos T son muy prometedores para el tratamiento del cáncer, sin embargo, se desconoce si podría beneficiar a los pacientes con metástasis ósea. Como modelo singénico, utilizamos las células de cáncer de mama 4T1 para causar metástasis ósea en ratones, Balb/C. Los ratones con un sistema inmune normal, presentaron un incremento significativo en la metástasis osteolítica al compararlos con ratones sin linfocitos T ($p < 0.05$). Se confirmó por histomorfometría que el área del hueso era menor, y se incrementó el número de osteoclastos en la interface tumor hueso en ratones con linfocitos T. Ensayos *ex vivo* los linfocitos T aislados de metástasis ósea de células 4T1 incrementaron la osteoclastogénesis, lo cual es consistente con la expresión de *Rankl* y *Tnfa* mRNA. Sin embargo, este efecto pro-osteoclástico está específicamente relacionado con los linfocitos T no activados, ya que los linfocitos T activados inhiben la formación de osteoclastos. Confirmamos que los linfocitos T en la metástasis ósea de células 4T1 no están activados, ya que $>85\%$ de los linfocitos T no presentan el marcador de activación temprano CD69, ni perdieron el marcador CD62L. Tratamientos *ex vivo* con ConA o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 indujeron la activación de los linfocitos T de bazo, pero no lograron activar a los linfocitos T provenientes de la metástasis ósea. Esto sugiere que la inmunosupresión es inducida por el microambiente, lo cual podría deberse al incremento en la cantidad de células de origen mielóide supresoras (MDSCs), en la metástasis ósea de células 4T1. Se confirmó que las MDSC producen ROS y NO, productos que suprimen la actividad de los linfocitos T. Tratamiento con Sildenafil, un inhibidor de la PDE5, ha sido reportado como un inhibidor de las MDSCs. Sin embargo, el tratamiento con Sildenafil no tuvo efecto en la metástasis ósea de células 4T1, ni mejoró el efecto del ácido zoledrónico. Por lo que buscamos otros blancos terapéuticos, como los puntos de control inmunológicos. Encontramos que solo el 27% de los linfocitos T en la metástasis ósea son CTLA-4⁺, $>70\%$ de los linfocitos T son PD-1⁺, y el 80% de las MDSCs monocíticas fueron PD-L1⁺, lo cual puede inhibir la activación de los linfocitos T en el hueso. En conclusión, encontramos que los linfocitos T inactivados en el microambiente de la metástasis ósea incrementan la formación de osteoclastos y las lesiones osteolíticas, mientras que los linfocitos T activados inhiben la osteoclastogénesis. A pesar de que utilizar el Sildenafil contra las MDSCs no tuvo efecto, el tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunológicos (anticuerpos contra PD-1 y PD-L1) podría utilizarse en pacientes con metástasis ósea. Nuestros resultados también sugieren que uso de la inmunoterapia en la metástasis ósea podría ser benéfico ya que la activación de los linfocitos T no solo incrementaría su potencial anticancerígeno, si no también obtendrían propiedades antiosteoclásticas, lo que reduciría la metástasis osteolítica.

Palabras clave: Cáncer de mama, Linfocitos T, Inmunoterapia, Inmuno-oncología

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

Characterization of the effect of T cells during osteoclastogenesis and the development of bone metastasis under the control of the tumor microenvironment in mice

Abstract approved by:

Pierrick Gerard Jean Fournier, Ph.D.
Thesis Director

Bone metastases are a complication in advanced breast and prostate cancer patients. Bone metastases cannot be cured, with current treatments and treatments such as T cell-based immunotherapy is very promising for the treatment of cancer although remains unclear whether immunotherapy could benefit patients. Despite that, it is unclear what would be the effect of the bone microenvironment on T cells. Thus, we aim to characterize the effect of T cells in breast cancer bone metastases. As a syngeneic model, we used 4T1 breast cancer cells to cause bone metastases in mice. In normal Balb/C mice, osteolytic metastasis was increased when compared to T-cell depleted mice (x1.6, $p < 0.05$). Histomorphometry confirmed that the number of osteoclasts was increased at the tumor/bone interface in mice with T cells. *Ex vivo*, T cells isolated from 4T1 bone metastases increased osteoclastogenesis, consistent with the expression of *Rankl* and *Tnfa* mRNA. However, this pro-osteoclastic effect was specific of the non-activated T cells, as activated T cells inhibited the formation of osteoclasts *ex vivo*. Using flow cytometry, we confirmed that T cells in bone metastases are not activated, as >85% of T cells lacked the activation marker CD69. Thus, immunotherapy activating T cells could benefit patients with bone metastases. While ConA or anti-CD3/CD28 antibodies activated T cells from the spleen *ex vivo*, they failed to activate T cells from bone metastases. This suggests microenvironment-induced immunosuppression that could be due to an increase of myeloid-derived suppressor cells (MDSC), monocytic ($CD11b^+Ly6C^+Ly6G^{low}$), and polymorphonuclear ($CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$), in 4T1 bone metastases. CellROX and DAF2-DA assays confirmed that these MDSCs produced ROS and NO that suppress T cells. The PDE5 inhibitor, Sildenafil, was reported to inhibit MDSCs. However, treatment with Sildenafil did not decrease 4T1 bone metastases nor improved the effect of zoledronate. Thus, we looked for other therapeutic targets, such as immune checkpoints. Although only 27% of T cells in 4T1 bone metastases were CTLA-4⁺, >70% of T cells were PD-1⁺, and 80% of monocytic-MDSCs were PD-L1⁺, which could trigger T cell suppression in bone. In conclusion, we found that T cells inactivated in the bone metastasis microenvironment increase osteoclast formation and bone metastases, while activated T cells inhibit osteoclastogenesis. Although targeting MDSCs with Sildenafil was not efficient, treatment with immune checkpoint inhibitors (antibodies against PD-1 or PD-L1) could be used for patients with bone metastases. Our results also provide a rationale for using immunotherapy since T-cell activation would increase their anti-cancer and their anti-osteoclastic properties.

Keywords: Breast cancer, T cells, Immunotherapy, Oncoimmunology

Dedicatoria

Le dedico esta tesis a mi mamá que me ha demostrado que no hay ninguna adversidad que no se pueda sobrellevar.

“You may encounter many defeats, but you must not be defeated. In fact, it may be necessary to encounter the defeats, so you can know who you are, what you can rise from, how you can still come out of it.” -Maya Angelou

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca nacional para estudios de posgrado otorgada con el número #542213 y por el proyecto de ciencia básica CB-2014-01 241295.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), y en particular a todos los miembros del Posgrado en Ciencias de la Vida.

Al Departamento de Innovación Biomédica, por permitirme el uso de instalaciones y equipo para la realización de este doctorado.

A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Alejandro Huerta Saquero, al Dr. Nicolás Addiel Serafín Higuera, Dra. Patricia Juárez Camacho, por su valiosa participación en la realización de esta tesis.

Al Dr. Pierrick G.J. Fournier, director de esta tesis, por su dedicación, paciencia y motivación que hicieron posible la realización de esta tesis. Su capacitación en todas las técnicas de laboratorio que fueron utilizadas, por compartirme su pasión por la ciencia, a darle importancia al trato bioético de los organismos utilizados y en general por las buenas prácticas de laboratorio.

A la Dra. Patricia Juárez Camacho, desde mi maestría, por la capacitación brindada sobre en el manejo adecuado de ratones de laboratorio y transmitirme esa actitud de gratitud y bioética hacia los organismos. Por sus consejos y sugerencias para realizar presentaciones orales, y mantener un interés constante en la realización de este proyecto.

Al Biol. 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 apoyo y experiencia en el análisis de huesos por radiografía.

A la M. en C. Andrea Verdugo-Meza por su apoyo en la realización de los experimentos con eliminación de linfocitos T y por su compañerismo y apoyo a lo largo de toda esta etapa.

A la M. en C. Samanta Jiménez, al Dr. Florian Drescher por su apoyo en la realización de todos los experimentos *in vivo* y por generar un ambiente cálido y altamente coordinado de trabajo en equipo.

Al M. en C. Juan A. Corral-Ávila y a la M. en C. Paloma S. Almeida-Luna por su apoyo en la realización de algunos experimentos y por su agradable compañía.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por su apoyo en la realización de análisis histológico de los huesos.

A la M. en C. Sarai Badillo, y a la M. en C. Claudia Alcira por su apoyo y compañía en el laboratorio y fuera de él, ayuda en práctica de presentaciones, y soporte emocional.

A mis compañeros del grupo de investigación de Ensenada Cancer & Bone Research P&P.

A la M. en C. Brenda Duarte y al M. en C. Arturo Hernández, por su atención, sus preguntas y su apoyo para realizar experimentos y presentaciones.

Al equipo técnico del Departamento de Innovación Biomédica; M. en C. Samanta Jiménez, Dra. Johana Bernáldez, al Dr. Ricardo González, al Dr. Jahaziel Gasperin por su apoyo en el uso de equipos, manejo de organismos y técnicas.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Cáncer.....	1
1.1.1 Características distintivas del cáncer	7
1.1.2 Metástasis	8
1.1.3 Cáncer de mama.....	13
1.2 Antecedentes	17
1.2.1 El hueso y sus componentes	17
1.2.2 Metástasis y metástasis ósea	21
1.2.3 Síntomas y tratamientos actuales contra la metástasis ósea	24
1.2.4 Sistema inmune e inmunoterapia	27
1.2.5 Linfocitos T	29
1.2.6 Inhibición de los linfocitos T en el microambiente tumoral.....	32
1.2.7 Los linfocitos T y pérdida de hueso en condiciones patológicas.....	33
1.2.8 Linfocitos T y la metástasis ósea	34
1.2.9 El hueso y sus componentes inmunoreguladores.....	37
1.3 Justificación	38
1.4 Hipótesis.....	38

1.5	Objetivos	39
1.5.1	Objetivo general	39
1.5.2	Objetivos específicos.....	39
Capítulo 2.	Metodología.....	40
2.1	Cultivo celular.....	40
2.2	Mantenimiento y reproducción de ratones.....	40
2.2.1	Modelos de metástasis ósea	41
2.2.2	Modelo de tumores en la glándula mamaria.....	43
2.2.3	Eliminación de los linfocitos T <i>in vivo</i>	43
2.2.4	Transferencia adoptiva de linfocitos T	43
2.2.5	Tratamientos <i>in vivo</i> sildenafil y ácido zoledrónico	44
2.2.6	Tratamiento <i>in vivo</i> con inhibidores de puntos de control inmunológicos y tratamientos antiresortivos.....	45
2.3	Ensayo de osteoclastogénesis.....	46
2.4	Citometría de flujo	46
2.5	MTT	47
2.6	Radiografías.....	48
2.7	Histología e histomorfometría de los huesos	48
2.7.1	Inmunohistoquímica	49
2.8	Aislamiento de RNA y RT-qPCR	49
2.9	Análisis estadístico	50
Capítulo 3.	Resultados	51
3.1	Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea de células 4T1	51
3.1.1	Los linfocitos T infiltran la metástasis ósea de 4T1 MHC-I ⁺	51
3.1.2	Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea de células 4T1	53

3.1.3	Los linfocitos T tienen un efecto anti-cancerígeno en tumores mamarios de células 4T156	
3.1.4	Modelos de metástasis ósea de cáncer de próstata	57
3.1.5	Los linfocitos T no tienen un efecto en la metástasis ósea osteolítica de cáncer de próstata RM-1	59
3.1.6	Los linfocitos T de metástasis ósea incrementan la osteoclastogénesis <i>ex vivo</i>	60
3.2	Los linfocitos T no activados incrementan la osteoclastogénesis <i>ex vivo</i> mientras que los linfocitos T activados inhiben la osteoclastogénesis	62
3.3	La transferencia adoptiva de los linfocitos T	66
3.4	Los linfocitos T de metástasis ósea no están activados y son resistentes a los estímulos de activación <i>ex vivo</i>	68
3.5	Hay un incremento en las MDSCs metabólicamente activas en la metástasis ósea de 4T1 y las MDSCs monocíticas son PD-L1 ⁺	70
3.6	Puntos de control inmunológicos en la metástasis ósea de células 4T1	75
Capítulo 4. Discusión.....		79
Capítulo 5. Conclusiones		85
Literatura citada		86
Anexos		105

Lista de figuras

Figura 1 Clasificación de tumores benignos y malignos.....	2
Figura 2 Números de casos incidentes estimados en el mundo, en ambos sexos y todas las edades (excluyendo a cáncer de piel que no es melanoma). Figura modificada de Globocan 2020 (Sung et al., 2021).....	3
Figura 3 Número de muertes asociadas a todos los tipos de cáncer reportadas en el 2020. Considerando ambos sexos y todas las edades. Figura modificada de Globocan 2020 (Sung et al., 2021)	4
Figura 4 Características distintivas del cáncer. Figura modificada de (Hanahan, 2022).....	8
Figura 5 Transición epitelial mesenquimal. modificada de Dongre y Weinberg (2018).....	9
Figura 6 Cadena metastática. La metástasis consiste en una serie de pasos y restrictivos cuellos de botella. Modificado de Massagué y Obenauf, 2016.	11
Figura 7 Patrones de distribución de metástasis de cáncer de mama, colorrectal, próstata y riñón. modificado de Lu and Kang, 2007.	12
Figura 8 Origen anatómico e histológico del cáncer de mama, se originan principalmente de los ductos y lóbulos glandulares, pero también pueden formarse en el tejido muscular. Modificado de (Feng et al., 2018).....	14
Figura 9 Distribución metastásica pacientes con cáncer de mama en un estado avanzado (etapa IV). Modificado de Robert Morreale.....	17
Figura 10 Estructura del hueso y componentes celulares..	19
Figura 11 Intercomunicación entre las células óseas, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos lo que mantiene una densidad ósea adecuada.....	20
Figura 12 Ciclo vicioso de la metástasis ósea osteolítica. Modificado de (Kingsley et al., 2007).	24
Figura 13 Respuesta inmune innata y adaptativa.....	28
Figura 14 Presencia de linfocitos T infiltrados en la metástasis osteolítica de células de cáncer de mama 4T1 MHC-I+ en ratones..	52
Figura 15 Depleción de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ positivos con tratamiento con anticuerpos.....	54
Figura 16 Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea de células 4T1..	55
Figura 17 Los linfocitos T incrementan área tumoral y reducen el área del hueso..	56
Figura 18 Los linfocitos T reducen los tumores mamarios de células 4T1.....	57
Figura 19 Análisis de expresión de MHC-I en líneas celulares de cáncer de próstata TRAMP-C1 y RM-1.	58

Figura 20 Inoculación de células TRAMP-C1 no genero lesiones óseas.	58
Figura 21 Modelo de metástasis ósea de cáncer de próstata, con células RM-1.	59
Figura 22 Los linfocitos T no tienen efecto en lesiones osteolíticas por células RM-1.	60
Figura 23 Los linfocitos T de la metástasis ósea de 4T1 son pro-osteoclasticos.	61
Figura 24 Los linfocitos T de la metástasis ósea de 4T1 presentan expresión de <i>Rankl</i> mRNA, similar a los linfocitos T no activados.	62
Figura 25 Los linfocitos T activados inhiben la osteoclastogénesis <i>ex vivo</i>	63
Figura 26 Efecto de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en la osteoclastogénesis.	64
Figura 27 Efecto de linfocitos T en la viabilidad de células de médula ósea en osteoclastogénesis <i>ex vivo</i>	65
Figura 28 Neutralización de las citocinas IFN γ e IL-4 revierte efecto anti-osteoclastico de los linfocitos T activados.	65
Figura 29 Transferencia adoptiva de linfocitos T en ratones C57BL/6.	67
Figura 30 Transferencia adoptiva de linfocitos T activados en ratón inmunodeficiente. Ratones desnudos recibieron inoculación de 5x10 ⁶ de linfocitos T activados <i>ex vivo</i> . Se analizaron por citometría de flujo muestras de sangre retroorbital. Densitogramas representativos.	68
Figura 31 Los linfocitos T de metástasis ósea de cáncer de mama 4T1 no están activados. Se analizaron por medio de citometría de flujo muestras de médula ósea de ratones con o sin metástasis ósea de 4T1.	69
Figura 32 Los linfocitos T de metástasis ósea no responden ante estímulos para activación <i>ex vivo</i> . ..	70
Figura 33 Incremento de las células de origen mieloide supresoras (MDSCs) metabólicamente activas en ratones con metástasis ósea de células 4T1.	72
Figura 34 Ácido zolédronico y sildenafil, incrementan la población de linfocitos T en la metástasis ósea de células 4T1.	73
Figura 35 Efecto del tratamiento con Sildenafil en combinación con ácido zoledrónico en las MDSCs de la metástasis ósea de células 4T1.	74
Figura 36 Linfocitos T de metástasis ósea de 4T1 expresan el punto de control inmunológico PD-1. ..	76
Figura 37 Expresión de punto de control inmunológico PD-L1 en metástasis ósea de 4T1.	77
Figura 38 Ratones presentaron lesiones osteolíticas muy pequeñas 10 días posteriores a la inoculación de células 4T1, no se vió efecto de los tratamientos de inmunoterapia y/o ácido zoledrónico. ..	78

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Subtipos de cáncer de mama por marcadores moleculares. Modificado de (Feng et al., 2018). 15	
2. Grupos de estados anatómicos del cáncer de mama. Modificado de (Feng et al., 2018) 16	
3. Listado de anticuerpos utilizados. 105	
4. Secuencia de oligonucleotidos.....106	

Capítulo 1. Introducción

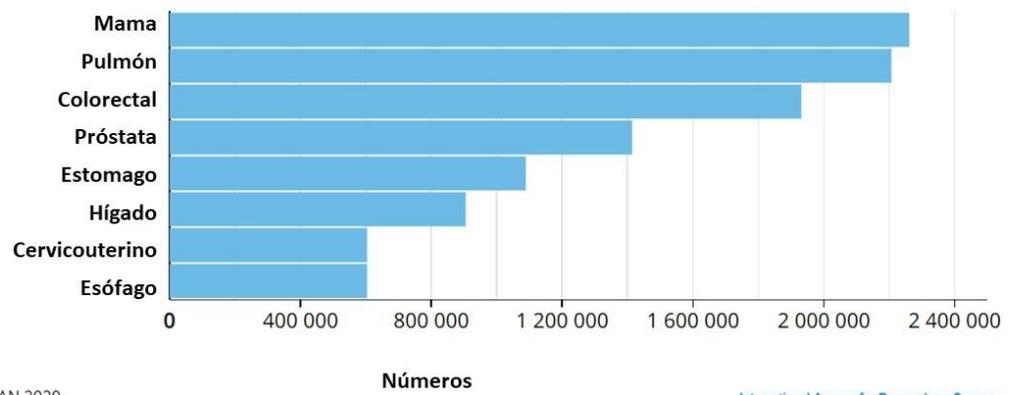
1.1 Cáncer

La descripción de cáncer más antigua de la historia médica se encuentra en los papiros de Edwin Smithen los cuales se estima fueron hechos en el 1600 AC (Papavramidou et al., 2010). Aunque el término “cáncer” se les atribuye a los médicos Hipocráticos, los cuales usaron los términos *karkinos* y *karkinoma* para describir tumores; *karkinos* se utilizó para describir a las formaciones ulcerosas que no sanaban, mientras que *karkinoma* se reservaba para tumores que no sanaban (Papavramidou et al., 2010). La Organización Mundial de la Salud describe al cáncer como un término genérico que agrupa un gran número de enfermedades, que pueden afectar cualquier parte del cuerpo y tienen en común la rápida creación de células anormales con crecimiento incontrolado más allá de sus límites, invadiendo los tejidos adyacentes o distribuyéndose a órganos distantes (Who Cancer, 2022).

Los tumores se forman a partir del crecimiento anormal de las células, los cuales se pueden clasificar como tumores benignos y tumores malignos (Figura 1). Los tumores benignos se caracterizan por permanecer en el tejido donde se originaron, no invaden otros órganos o partes del cuerpo y tienden a crecer lentamente y tener bordes definidos (Patel, 2020). No suelen ser problemáticos, a menos que crezcan demasiado y comiencen a obstruir estructuras cercanas o causan dolor. Una vez que se remueven quirúrgicamente es muy poco probable que recurra. Pero algunos pueden convertirse en malignos con el tiempo (Patel, 2020). Mientras que los tumores malignos están formados por células que crecen incontrolablemente y que se diseminan a otros sitios. Los tumores malignos son cancerosos, y se dispersan a otros tejidos por el sistema circulatorio o por el sistema linfático (Patel, 2020). En la parte posterior observamos biopsias de tumores fibrosos solitarios de origen mesenquimal, el tumor benigno presenta células con núcleos definidos (Figura 1 C), mientras que el tumor maligno están formados por células con pleomorfismo nuclear, es decir núcleos en diferentes estados mitóticos, de diferentes tamaños y número entre las células y sin contorno definido (Figura 1 D) (DeVito et al., 2015)

El cáncer es un problema de salud mundial, en el año 2020 se reportaron 19.29 millones de nuevos casos, y 10 millones de muertes asociadas al cáncer (Sung et al., 2021). Los tipos de cáncer con una mayor incidencia para ambos sexos, son el cáncer de mama (11.7%), seguido por el cáncer de pulmón (11.4%), colorrectal (10%), de próstata (7.3%), de estómago (5.6%), hepático, cervicouterino, y de esófago (Sung et

Números estimados de casos incidentes en el mundo, en ambos sexos, y todas las edades (exc. NMSC)



Data source: GLOBOCAN 2020
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
© International Agency for Research on Cancer 2022

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization

Figura 2).

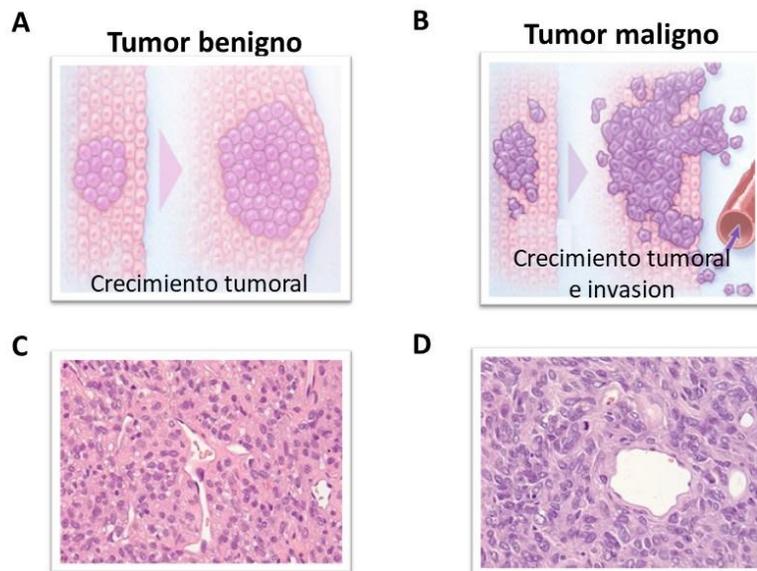
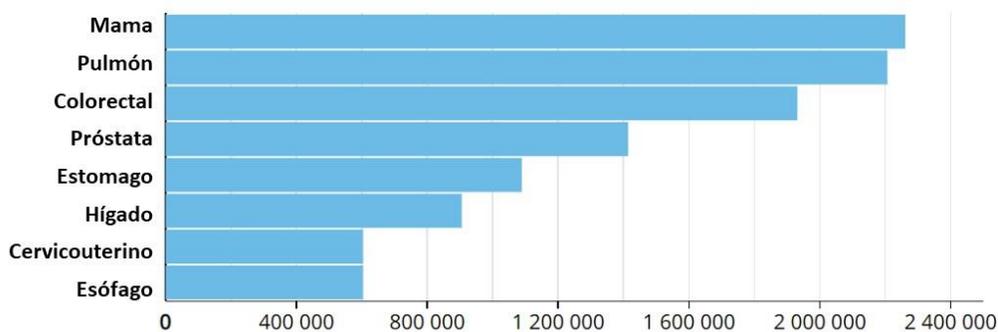


Figura 1 Clasificación de tumores benignos y malignos. A. Representación de un tumor benigno en crecimiento. B. Representación de un tumor maligno en crecimiento. Biopsias de tumores de tumores fibrosos solitarios, cortes histológicos con tinción de hematoxilina y eosina, objetivo 400X. C. Tumor benigno tiene células con núcleos vesiculares sin citología atípica, vasos sanguíneos delgados, el tejido no presenta un patrón. D. Tumor maligno presenta una arquitectura similar, pero las células presentan una marcada citología típica, incluyendo pleomorfismo nuclear y patrones atípicos de tumor mitótico. Modificado de Structure of Long Bone - Nursing Lecture (2022) y DeVito et al. (2015).

Se estima que para el año 2040 se diagnosticaran 28.4 millones de casos de cáncer en el mundo, siendo mayor el incremento en países en desarrollo económico, por lo que es fundamental que se realice un esfuerzo mundial, en investigación, en prevención del cáncer y en la distribución de tratamientos a los pacientes (Ansari y Jha, 2022). El cáncer es una de las enfermedades crónicas relacionadas con la edad. Las causas del cáncer son muchas, por ejemplo, Ansari y Jha (2022) separaron los factores de riesgos de cáncer en dos tipos: los factores de comportamiento y ambientales, compararon si tenían un efecto en la letalidad en pacientes con cáncer entre zonas con diferencias económicas países en desarrollo o países desarrollados. Reportaron que mientras que fumar, consumir bebidas alcohólicas y el escaso consumo de frutas y verduras son los factores que incrementan el riesgo de mortalidad por cáncer a nivel mundial y en países con en desarrollo (Ansari y Jha, 2022). Mientras que para los países desarrollados los factores de mayor riesgo de causa de cáncer son: el consumo de bebidas alcohólicas, fumar, y la obesidad (Ansari y Jha, 2022). Por último, la transmisión sexual del virus del papiloma humano es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer cervical en mujeres de países en desarrollo (Ansari y Jha, 2022).

Números estimados de casos incidentes en el mundo, en ambos sexos, y todas las edades (exc. NMSC)



Data source: GLOBOCAN 2020
 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
 © International Agency for Research on Cancer 2022

Números

International Agency for Research on Cancer
 World Health Organization

Figura 2 Números de casos incidentes estimados en el mundo, en ambos sexos y todas las edades (excluyendo a cáncer de piel que no es melanoma). Modificado de Sung et al. (2021).

Estos artículo nos presenta una hipótesis donde el estatus económico del país tiene un impacto en la salud y calidad de vida, reportando los países en desarrollo tienen mayor letalidad por carencias como escaso consumo de frutas y verduras, sin embargo, este estudio se realizó con base de datos comparando países

Europeos con países de Asia central. Por ejemplo, si comparamos la letalidad reportada para el año 2020 presentada en la Figura 3 Número de muertes asociadas a todos los tipos de cáncer reportadas en el 2020. Considerando ambos sexos y todas las edades. Modificado de Sung et al. (2021) Figura 3, Asia cuenta con el 58.3% de las muertes por cáncer en el mundo, mientras que Latinoamérica y el Caribe incluye a países que se consideran en desarrollo económico tiene una letalidad por cáncer del 7.2% prácticamente la misma que se reporta para África (7.1%) y Norte América (7%) (Sung et al., 2021). Por lo que no es posible generalizar que el estatus económico del país influya en la letalidad por cáncer, aunque en acuerdo con los autores los países desarrollados económicamente cuentan con un mayor acceso a las tecnologías para el diagnóstico temprano del cáncer.

Tal vez, la comparación entre la situación económica del país y el cáncer no tiene resultados representativos globalmente, pero sabemos que los factores conductuales y/o ambientales son causantes de la mayoría de los casos de cáncer. Factores ambientales y conductuales como: la exposición a los rayos UV está relacionado con una mayor propensión al cáncer de piel (Nakazawa et al., 1994).

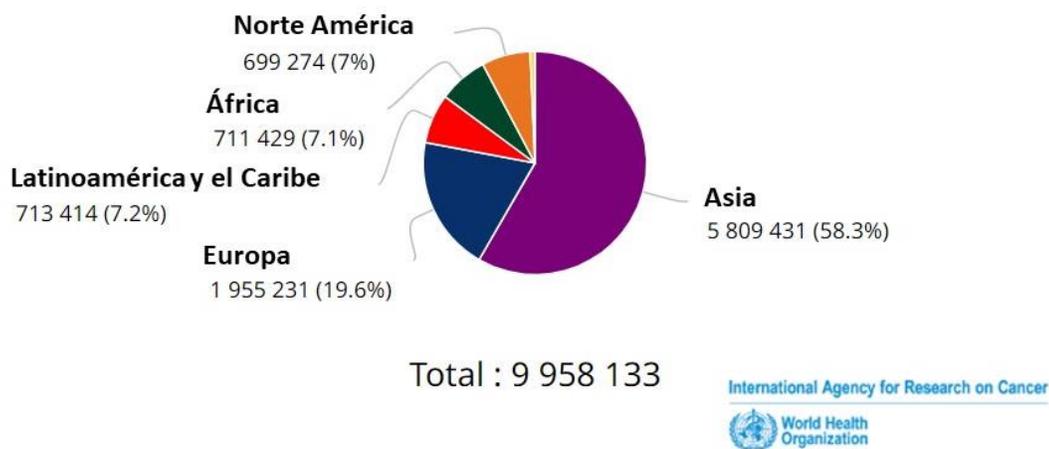


Figura 3 Número de muertes asociadas a todos los tipos de cáncer reportadas en el 2020. Considerando ambos sexos y todas las edades. Modificado de Sung et al. (2021).

Un factor ambiental: es la contaminación en el aire, la cual se determina por la cantidad de materia particulada 2.5 (PM2.5). La Unión Europea considera $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como concentración límite máximo, mientras que la OMS sugiere que el límite máximo sea $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Existen reportes de la exposición por un tiempo prolongado en ambientes con $\text{PM}_{2.5} > 5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ está asociado con un incremento en el riesgo de

cáncer de pulmón (Hvidtfeldt et al., 2021). Es decir que la contaminación en el aire por PM2.5 es un factor que incrementa la probabilidad de cáncer de pulmón, aunque sea en concentraciones inferiores al límite permitido legalmente (5 vs 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Fumar además de ser el principal factor de riesgo para cáncer de pulmón, es un factor de riesgo de cáncer en general. Como lo reportado en un análisis retrospectivo pares de gemelos donde solo un gemelo nunca fumó y se comparó con su gemelo fumador, nos enfocaremos solo en la comparación entre gemelos monocigóticos es decir que los que tienen el mismo material genético. Éstos se separaron en grupos con respecto a su estatus de fumadores (1. Nunca fumaron, 2. Fumaron alguna vez o 3. Seguían fumando al momento del estudio) y se terminó el estudio al momento de que un gemelo fue diagnosticado con cáncer (durante un periodo de 27 años) (Korhonen et al., 2022). Los resultados demostraron que los gemelos monocigóticos que fumaban (grupos 2 y 3) presentaron un incremento en el riesgo de presentar diferentes tipos de cáncer: esófago, riñón, laringe, hígado, cavidad oral, páncreas, faringe o vejiga, en comparación con sus gemelos que nunca fumaron (1). Estos resultados nos indican que fumar, incrementa la predisposición de múltiples tipos de cáncer no solo cáncer de pulmón, y que es un factor determinante independiente de la predisposición genética (Korhonen et al., 2022).

Estos resultados se obtuvieron al realizar un análisis retrospectivo comparando solo entre gemelos, es muy evidente que fumar incrementa la predisposición a varios tipos de cáncer. La siguiente incógnita es si dentro de una población de fumadores que incluye diferentes grupos étnicos, existe una variabilidad en la predisposición al cáncer. En un estudio retrospectivo de EUA, se encontró que los pacientes afroamericanos presentan una mayor incidencia de cáncer de pulmón pero tienen un menor valor de índice de elegibilidad (IE) para pruebas de detección con tomografía computarizada (CT) con baja dosis, al compararse con hombres caucásicos los cuales presentan una menor incidencia de cáncer de pulmón y un mayor valor de IE para CT de baja dosis (Pinsky et al., 2021). Pinsky et al (2021) menciona que podría haber una diferencia en la incidencia de cáncer de pulmón entre diferentes grupos étnicos aunque tengan el mismo tiempo fumando. Para tratar de entender estas variaciones el estudio del metabolismo de la nicotina es fundamental, la nicotina es altamente adictiva, no tiene efecto carcinogénico, pero al incrementar la cantidad que se fuma, se incrementa el contacto con agentes carcinogénicos presentes en el tabaco. La ruta dominante en humanos para el metabolismo de la nicotina, es la formación de cotinina, la cual ocurre en dos etapas. La primera es la oxidación de 2A6-Catalizado5' a un ion de iminio por el citocromo P450 (P450, CYP), y la segunda es la oxidación del ion de iminio a cotinina (Murphy, 2021). La vida media de la nicotina es mayor en individuos con baja actividad del P450 2A6, esta reportado que el metabolismo de la nicotina y el genotipo de CYP2A6 tienen efectos en el riesgo de cáncer de pulmón, en

particular en grupos étnicos, en particular individuos con ancestros de Japón, África o Europa (Murphy, 2021). Éste es un ejemplo donde la combinación de factores intrínsecos (el metabolismo de la nicotina, P450, CYP2A6) y extrínsecos (la acción de fumar) genera una mayor predisposición de presentar cáncer. Estos análisis apoyan el análisis del metabolismo de la nicotina, sea utilizado para ayudar a identificar que fumadores están en un mayor riesgo de cáncer de pulmón.

Fumar cigarrillos induce estrés oxidativo en bronquitis y enfisema, la inflamación está presente en estas enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (Boukhenouna et al., 2018). Fumar genera un ciclo vicioso entre la inflamación al incrementar ROS, y al haber más ROS induce la inflamación, es uno de los mecanismos por los cuales fumar incrementa el riesgo de cáncer de pulmón (Caliri et al., 2021).

La inflamación crónica está ligada al desarrollo de múltiples enfermedades crónicas relacionadas con la edad, por ejemplo, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes (Khansari et al., 2009). Los procesos inflamatorios inducen estrés oxidativo lo que reduce la capacidad antioxidante de las células, generando una sobreproducción de radicales libres. Los radicales libres pueden inducir mutaciones y daños en el DNA lo que genera predisposición al cáncer (Khansari et al., 2009).

Debido a los riesgos que las mutaciones en el DNA generan, el sistema de reparación mismatch del DNA es una ruta biológica altamente conservada y tiene un rol importante en mantener la estabilidad del genoma. El sistema de reparación mismatch del DNA tiene una especificidad principalmente por errores de apareamiento (mismatch) de base a base y de inserciones o eliminaciones que generan un mal apareamiento durante la replicación y recombinación del DNA (G.-M. Li, 2008). Este sistema se compone por múltiples proteínas que participan en varias rutas metabólicas del DNA, como MSH2, MLH1, MSH6 y PMS2, defectos en este sistema se relaciona con una amplia inestabilidad genética, con predisposición a algunos tipos de cáncer: cáncer colorrectal no poliposo hereditario o endometrial conocido como Síndrome de Lynch (G.-M. Li, 2008; Peltomäki, 2005). A diferencia de la mayoría de las enfermedades genéticas el cáncer hereditario solo representa entre el 5% y 10% de los casos (Hart et al., 2020).

BRCA1 y *BRCA2*, permiten la reparación de errores en el DNA o la eliminación de las células dañadas. Existen variantes patogénicas de estos genes y son asociadas con el cáncer de mama y de ovario hereditario (HBOC, por sus siglas en inglés). Puede utilizarse como un factor de riesgo, pero no es un proceso sencillo, se requiere un estudio familiar, solo se puede confirmar por secuenciación del DNA comparando las variables patogénicas de *BRCA1* de *BRCA2*, cuando se tienen muestras de un familiar (hasta por 3 generaciones) que presenta alguna de las siguientes situaciones (Petrucci et al., 1998):

- Cáncer de mama masculino
- Cáncer de mama antes de los 50 años
- Cáncer de mama triple negativo,
- Presentar combinación de cáncer de páncreas y/o próstata
- Presentar combinación de cáncer de páncreas y cáncer de mama y/o con cáncer de ovario
- Tener tres o más familiares directos diagnosticados con cáncer de mama

En caso de que este familiar no esté disponible se puede usar a un familiar libre de cáncer, para comparar la presencia de las variantes heterocigóticas patogénicas, pero con mayor riesgo de error en la detección (Petrucci et al., 1998).

El gen *TP53* es el guardián del genoma, ya que previene que emerjan células con mutaciones potencialmente tumorales (Lane, 1992). Análisis de secuenciación genética de tumores humanos encontraron que la mutación de *TP53* se asocia con inestabilidad genética, como cromotripsis (Rausch et al., 2012) y duplicaciones de todo el genoma (poliploidías) (Bielski et al., 2018; Fujiwara et al., 2005). Los tumores con mutaciones de *TP53* generalmente presentan una mayor heterogeneidad tumoral (Raynaud et al., 2018; Shah et al., 2012). Alteraciones en la ruta del p53 fue encontrada en el 67% de muestras de adenocarcinoma de pulmón (n=230) (Collisson et al., 2014). El gen *TP53* fue uno de los 10 genes con mayor cantidad de mutaciones encontrado en un análisis de secuenciación de muestras de tumores mamarios al compararlos con tejido sano (n=560) (Nik-Zainal et al., 2016). Mutaciones de *TP53* son una característica prominente en el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, por sus siglas en ingles). Los pacientes con tumores mutantes *TP53* son los que presentan un mal pronóstico y tienen mala respuesta al tratamiento (Kasthuber y Lowe, 2017). Baslan et al. (Baslan et al., 2022) usaron un modelo de PDAC en ratón, donde las células presentan una inactivación esporádica de p53, reportaron que tanto la pérdida de función de supresor tumoral como la inestabilidad genética contribuyen a la agresividad del cáncer. Mutaciones en los genes *TP53* y *KRAS* son comunes en múltiples tipos de cáncer (Stratton et al., 2009).

1.1.1 Características distintivas del cáncer

Si bien el cáncer puede originarse a partir de diversos factores endógenos o ambientales. Todas las células cancerosas comparten importantes capacidades biológicas, que se presentan en condiciones normales pero que las células cancerosas utilizan a su favor. Por ejemplo: la autonomía en las señales de crecimiento, dejan de responder a las señales de inhibición de crecimiento, evaden la destrucción por el sistema inmune, reprograman el metabolismo energético, evaden la muerte celular, tienen un potencial ilimitado para replicarse, presentan inestabilidad genética, inducen la angiogénesis, inducen la inflamación tumoral y por último la invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Los mismos autores reconocieron en 2011 que hay factores que no se tomaron en consideración pero que tienen una mayor complejidad, y esto es la capacidad que tienen las células cancerosas para atraer a células “normales” y entrenarlas para que fomenten el crecimiento tumoral, a estas interacciones se le denomina el microambiente tumoral y el microbioma (Hanahan y Weinberg, 2011). En el año 2021 se agregaron cuatro nuevas características: el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la presencia de células senescentes, la reprogramación genética no mutacional y microbiomas polimórficos (Figura 4) (Hanahan, 2022).



Figura 4 Características distintivas del cáncer. Figura modificada de (Hanahan, 2022).

1.1.2 Metástasis

Las células cancerosas que son invasivas y que tienen movilidad pueden entrar a la circulación desde mucho antes de que el tumor sea diagnosticado. La mayoría de estas células morirán, pero una pequeña cantidad de estas, se estima que solo 1 de cada 10,000 células cancerosas en circulación, logra invadir otro tejido (Massagué y Obenauf, 2016). Aunque las células aún deben de atravesar varias barreras antes de que logren tener efectos clínicamente relevantes en los órganos que invaden.

Antes de que las células metastaticen otros tejidos, las células neoplásicas pasan por una transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), cambian morfológicamente a un estado cuasi mesenquimales que les atribuye motilidad, las células mesenquimales pueden revertirse a su estado epitelial en un proceso conocido como mesénquima-epitelio (MET, por sus siglas en inglés). La EMT y MET se presentan en procesos normales, en la embriogénesis (en la gastrulación), durante el desarrollo morfogénico de los tejidos, en la recuperación de heridas en adultos (Nieto, 2009) y durante la progresión del cáncer, las células cancerosas raramente llegan a presentar un estado completamente mesenquimal (Dongre y Weinberg, 2019).

La morfología de células epiteliales se caracteriza por tener polaridad, tienen zona apical y basal, crecen formando una monocapa, son firmes lo que la hace la primera barrera de protección contra el ambiente. La polaridad (apical y basal) se mantiene por uniones laterales célula-célula (las proteínas de unión estrecha, molécula de adhesión epitelial (EpcAM), desmosomas) (Shibue y Weinberg, 2017). En la zona basal, están unidas a la membrana basal por hemidesmosomas e integrina $\alpha 6\beta 4$, además, expresan citoqueratinas que estabilizan a los desmosomas y le brindan resiliencia al estrés mecánico (Shibue y Weinberg, 2017). La expresión de factores de transcripción relacionados con la EMT (EMT-TFs, por sus siglas en inglés) como ZEB, SNAIL, SLUG, y/o TWIST1, reprime la expresión de los genes epiteliales mencionados previamente, y fomentan la expresión de genes asociados con el estado mesenquimal (Nieto, 2009). Por ejemplo: cadherina neural (N-cadherina), vimentina, fibronectina, integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ y matriz metaloproteasas (MMPs) (Dongre y Weinberg, 2019).

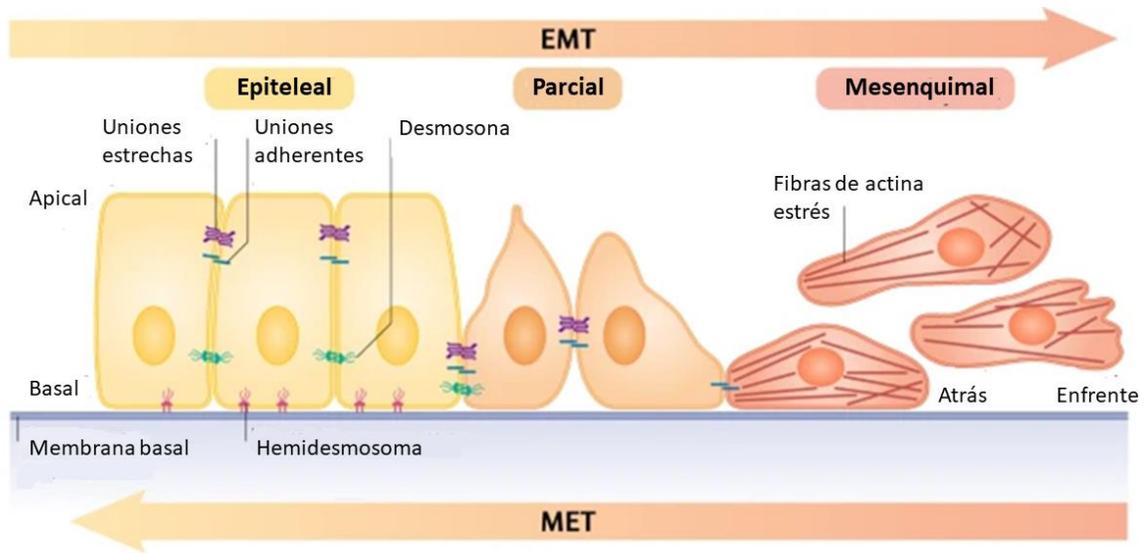


Figura 5 Transición epitelio mesénquima. Las células epiteliales presentan una polaridad caracterizada por una zona apical y una zona basal y se mantienen unidas en la misma dirección por proteínas de unión estrechas, las proteínas de uniones adherentes y los desmosomas y el perfil de expresión ayuda a mantener la polaridad de la célula. Durante la transición a células mesenquimales se da un cambio de perfil de expresión de genes asociados con el estado mesenquimal. Las células mesenquimales también presentan una polaridad de atrás o enfrente, lo cual es definido por la organización del citoesqueleto. La transición epitelial mesenquimal es reversible. Modificado de Dongre y Weinberg (2018).

Estos cambios en la expresión genética resultan en cambios en la morfología celular que involucran el desensamble de las uniones epiteliales célula-célula y la disolución de la polaridad celular apical-basal por la represión de Crumbs (proteína transmembranal), proteína asociada PALS1 de unión estrecha (PATJ, por sus siglas en inglés) y la larva gigante letal (LGL, por sus siglas en inglés) proteína del citoesqueleto, las cuales son proteínas que regulan específicamente la unión estrecha que permite la formación de la polaridad apical-basal (Aigner et al., 2007). Siguiendo un proceso progresivo la pérdida de las características epiteliales es acompañado por la adquisición de características mesenquimales con la retención de ciertas características epiteliales; aunque en algunas circunstancias, las células adquieren un set completo de características mesenquimales (Aigner et al., 2007). Las cuales incluyen: polaridad enfrente-atrás, una extensa organización del citoesqueleto, expresan los EMT-TFs que promueven y mantienen el estado mesenquimal. Durante la EMT, las células adquieren motilidad incrementando la capacidad invasora (Figura 5).

Múltiples factores determinan la probabilidad de estas células cancerosas completen todos los pasos para una metástasis observable, por ejemplo: el origen de las células tumorales, la plasticidad del cáncer, el

tejido estromal del paciente, y en respuesta a la terapia pueden emerger cualidades metastáticas (Massagué y Obenauf, 2016). La colonización de otros órganos es un proceso complejo, que se puede describir en diferentes etapas:

- La fase de pre-colonización de la metástasis involucra una serie de eventos que las células cancerosas pasan a lo largo de minutos a horas, incluyen: Invasión local de las células cancerosas alrededor del tumor primario, intravasación en la vasculatura del tumor, células tumorales en circulación (CTCs) individuales o agrupadas, cubiertos con plaquetas, arresto en capilares en un sitio distante la extravasación en el parénquima de los órganos blancos de la colonización metastásica (Figura 6, 1-4) (Massagué y Obenauf, 2016).
- Después de la extravasación, la colonización metastásica compromete la resistencia a la inmunidad y otras defensas de los tejidos del hospedero, asentándose en nichos que soportan la supervivencia y la retención de la capacidad de la iniciación de células tumorales como células madre, las células individuales entran en latencia, o como micrometástasis indolente (Figura 6, 5-9) (Massagué y Obenauf, 2016).
- Durante la fase de latencia, la cual podría durar desde meses hasta décadas, para que las células cancerosas diseminadas deben de lograr tener supervivencia a largo plazo y pueden adquirir características metastáticas para eventualmente tomar el control del órgano que están invadiendo. Las células cancerosas pueden romper la latencia, y reiniciar el crecimiento descontrolado, y tomando el control del microambiente del tejido (Figura 6, 10-14) (Massagué y Obenauf, 2016).

Una vez que la metástasis se manifiesta clínicamente, los tratamientos terapéuticos pueden ser que hayan eliminado el tumor parcialmente. Sin embargo, bajo el estrés inducido por la terapia, las células cancerosas y las células del estroma no neoplásicas movilizan las señales de supervivencia lo que nutre a las células residuales hasta que la clonas de células resistentes al tratamiento emergen y promueven el crecimiento de un tumor fármaco-resistente (Massagué y Obenauf, 2016).

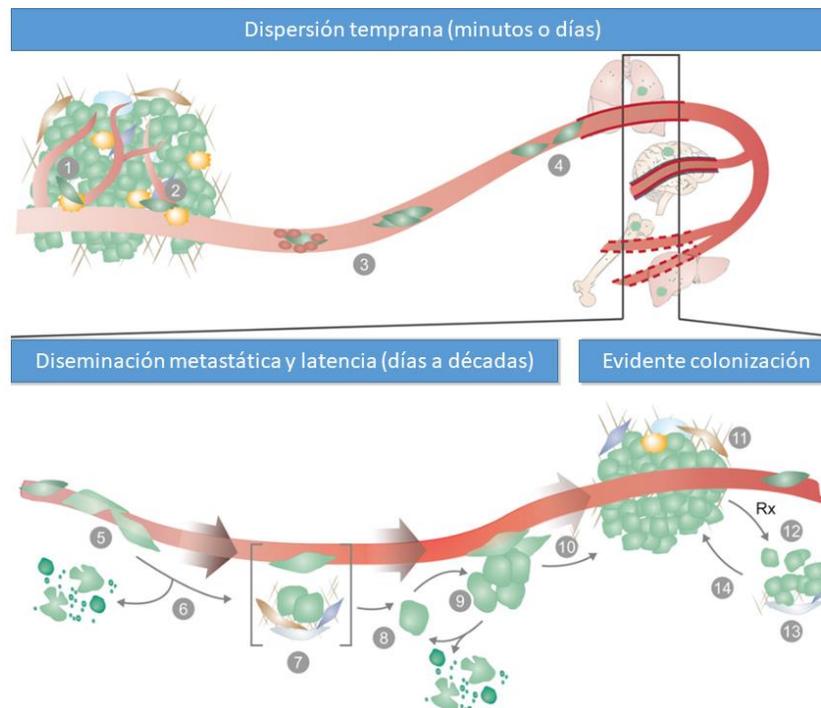


Figura 6 Cadena metastática. La metástasis consiste en una serie de pasos y restrictivos cuellos de botella. Modificado de Massagué y Obenauf (2016).

Diferentes tipos de microambientes en los tejidos del hospedero seleccionan a diferentes características metastásicas, lo que lleva a que las células cancerosas presenten afinidad por ciertos órganos. Las células metastásicas no solo deben ser capaces de invadir tejidos, tienen que ser capaces de adaptarse al microambiente del nuevo tejido y esa etapa tampoco es sencilla.

En 1970, Fidler demostró la complejidad e ineficiencia del proceso metastático, con un experimento murino donde inoculó de manera intravenosa células de melanoma B16 marcadas con 5-yodo-2´deoxyuridina (IUR por su sigla en inglés), lo que permitía detectarlas por radioactividad en diferentes tejidos. Observando la dispersión temprana reportó que 1 min después de la inoculación el 68% de las células cancerosas B16-IUR se encontraban en el pulmón. Catorce días posteriores a la inoculación ya solo se detectó el 0.2% de las células B16-IUR. Con este experimento se confirma que no es suficiente con que las células logren llegar a otros tejidos usando el sistema sanguíneo, se requieren la compatibilidad de las células con el microambiente del órgano para lograr la colonización (Fidler, 1970).

La teoría de la “semilla y el suelo”, hace referencia a la compatibilidad entre las células cancerosas con el órgano que colonizan, de la misma manera que no cualquier semilla puede crecer en todo tipo de suelo, no todas las células cancerosas pueden crecer en cualquier órgano (Paget, 1889). La metástasis no es un

proceso aleatorio, cada tipo de tumor presenta diferente afinidad a ciertos órganos, generando un patrón distinto de afectación metastásica (Figura 7). Por ejemplo: más del 85% de los pacientes con cáncer de próstata en estado avanzado (III, IV) presentan metástasis ósea (Lu y Kang, 2007). Mientras que en pacientes con cáncer colorrectal en estado avanzado la metástasis de hígado es predominante (>70%) (Figura 7) (Lu and Kang, 2007).

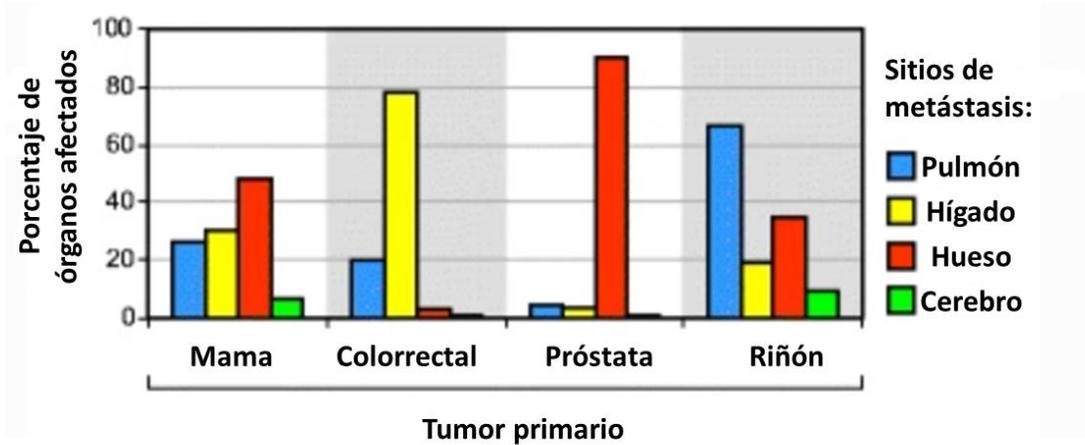


Figura 7 Patrones de distribución de metástasis de cáncer de mama, colorrectal, próstata y riñón. Porcentaje de órganos involucrados en los cuatro sitios más comunes de metástasis (pulmón, hígado, hueso y cerebro) entre pacientes con cáncer en estado avanzado al momento inicial de las evaluaciones clínicas. Los resultados presentados en esta figura fueron obtenidos de Hess et al. (2006) y de Lu and Kang (2007).

1.1.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el principal cáncer diagnosticado en mujeres, en el año 2020 se reportaron 2.26 millones de nuevos casos (24.5%) en el mundo, es la principal causa de muerte relacionada con cáncer (15.5%), y cuenta con una alta prevalencia (30.3%) a 5 años (Sung et al., 2021).

Los factores de riesgo incluyen:

- Factor familiar a pesar de que solo el 15% de los pacientes con cáncer de mama tienen historial familiar, tener un familiar directo con cáncer de mama duplica el riesgo de cáncer de mama (Kamińska et al., 2015).

- Diferencias en grupos étnicos, las mujeres caucásicas presentan mayor riesgo de cáncer de mama, al compararlo con mujeres afroamericanas, latinas y asiáticas. Pero mujeres afroamericanas presentan una mayor mortalidad (Estados Unidos) (DeSantis et al., 2016).
- Tener una alta densidad mamaria, por diferentes condiciones: embarazo, fibrosis, lesiones incrementa el riesgo (Jiping Wang et al., 2004).
- Exposición al dietilestilbestrol (DES), un fármaco análogo del estradiol, utilizado entre 1940-1970 en mujeres embarazadas para reducir riesgo de aborto espontáneo, mujeres que utilizaron DES o mujeres en la situación donde su progenitora utilizó el fármaco durante el embarazo presentan mayor riesgo de cáncer de mama (Kamińska et al., 2015).
- Métodos anticonceptivos hormonales inducen un ligero aumento al riesgo, pero este se puede prevenir al detener el tratamiento (Singletary, 2003).
- Tratamientos hormonales postmenopausia están relacionados con un mayor riesgo de cáncer de mama (Kamińska et al., 2015; Singletary, 2003).
- El consumo de alcohol en mujeres, es directamente proporcional a un mayor riesgo de cáncer de mama (Kamińska et al., 2015; Sun et al., 2017)
- Obesidad y sobre peso, incrementa el riesgo de cáncer de mama pero se desconoce el mecanismo (Patterson et al., 2010).
- Mujeres con una escasa actividad física, principalmente en mujeres post-menopáusicas (Patterson et al., 2010).
- Mujeres que no tuvieron hijos, o que su primer hijo fue después de los 30 años, o cuando no amamantaron, las mujeres que tuvieron múltiples embarazos tienen un menor riesgo (Sun et al., 2017)
- Mujeres que presentaron una menstruación temprana (antes de los 12 años de edad) o si presentaron una menopausia tardía (después de los 55 años de edad) (Kamińska et al., 2015; Singletary, 2003).

Este tipo de cáncer se caracteriza por desarrollarse en las estructuras epiteliales que forman la mama, como los lóbulos glandulares y los ductos (Figura 8) (Elenbaas et al., 2001).

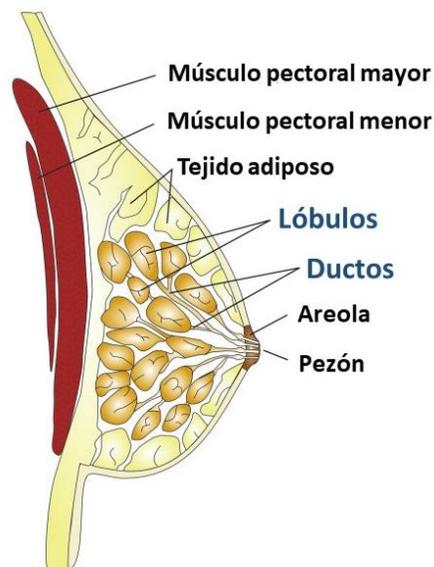


Figura 8 Origen anatómico e histológico del cáncer de mama, se originan principalmente de los ductos y lóbulos glandulares, pero también pueden formarse en el tejido muscular. Modificado de (Feng et al., 2018)

El cáncer de mama incluye a un grupo diverso de enfermedades heterogéneas que, se puede clasificar en varios subtipos, basados en la expresión genética (Allison, 2012) éstos subtipos tienen diferente comportamiento, responden diferente a los tratamientos y difieren en su pronóstico. La generación de perfiles de expresión genética, al analizar genes relacionados con Receptor de Estrógeno (ER, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, por sus siglas en inglés), receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés), y marcadores de proliferación (Ki67), permite que el cáncer de mama se pueda categorizar en 5 grupos (Tabla 1) (Allison, 2012).

El cáncer de mama se clasifica clínicamente en cuatro niveles, esto es fundamental ya que determinara que tipo de tratamiento puede recibir el paciente, los estadios clínicos son idénticos en todos los subtipos de cáncer de mama según El Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés) y la Unión Internacional para el control del cáncer (UICC, por sus siglas en inglés), utilizando tres parámetros: el Tumor, los Nódulos linfáticos y la Metástasis (TNM) el sistema de estadios: Etapas 0, Etapa I, Etapa II, Etapa III y Etapa IV, lo que se detalla en la siguiente Tabla 2.

Tabla 1 Subtipos de cáncer de mama por marcadores moleculares. Modificado de (Feng et al., 2018)

Subtipos	Marcadores moleculares	Características	Opciones de tratamiento
Luminal A	ER+, PR±, HER2-	~70%, más común	Terapia hormonal
	Bajo Ki67	El mejor pronóstico	Terapia dirigida
Luminal B	ER+, PR±, HER2±	10-20%	Terapia hormonal
	Alto Ki67	Menor supervivencia que luminal A	Terapia dirigida
HER2	ER-, PR-, HER2+	5-15%	Terapia dirigida
Triple negativo	ER-, PR-, HER2-	15-20%	Limitada terapia dirigida
		Más común en mujeres afroamericanas	
		Diagnostico a temprana edad, peor diagnostico	
Tipo normal	ER+, PR±, HER2-, Bajo Ki67	Raro	Terapia hormonal
		Expresión de grupos de genes de baja proliferación	Terapia dirigida

Tabla 2 Grupos de estados anatómicos del cáncer de mama. Modificado de (Feng et al., 2018)

Etapas		Definición
Etapa 0		Carcinoma ductal <i>in situ</i>
Etapa I	IA	Tumor primario invasivo tamaño ≤ 20 mm sin nódulos involucrados
	IB	Micrometastasis a nódulos (>0.2 mm, <2.0 mm) con o sin tumor primario ≤ 20 mm
Etapa II	IIA	Movible ipsilateral nivel I, II Metastasis a nódulos con tumor >20 mm, ≤ 50 mm, o tumor >50 mm sin nódulos involucrados
	IIB	Movible ipsilateral nivel I, II metastasis en nodulos con tumor >20 mm, ≤ 50 mm, o >50 mm tumor sin nodulos involucrados
Etapa III	IIIA	Movible ipsilateral nivel I, II Metastasis a nódulos con tumor >50 mm, o tumor primario de cualquier tamaño con fijo ipsilateral nivel I, II o metastasis en nodulos internos
	IIIB	Tumor primario invadiendo pared toracica y/o piel
	IIIC	Cualquier tamaño de tumor primario con supraclavicular o ipsilaterla nivel II metastasis de nodulos, o con ipsilateral nivel I, II y metastasis de nódulos internos
Etapa IV		Cualquier caso con metastasis en órganos distantes

Cuando se detecta en etapas tempranas (etapas I y II) los tratamientos tiene buenos resultados en la mayoría de los casos, por lo que la detección temprana es una de las principales estrategias para luchar contra el cáncer de mama, con técnicas como la autoexploración, y después de los 40 años con una mamografía anual (Trayes y Cokenakes, 2021).

En contraste, los estados avanzados (etapa III y IV) los tratamientos no tienen muy buena eficacia, son limitados y paliativos logran erradicar los síntomas pero no se incrementa la supervivencia de los pacientes (Trayes y Cokenakes, 2021). La mayoría de las muertes por cáncer de mama está asociada a la metástasis a órganos distantes, como pulmón, hígado, cerebro y hueso (Figura 9) (Hess et al., 2006).

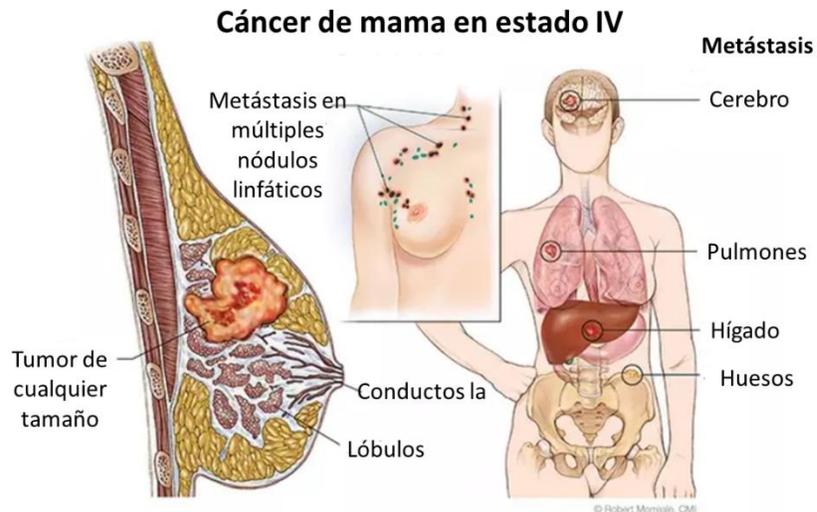


Figura 9 Distribución metastásica pacientes con cáncer de mama en un estado avanzado (etapa IV). Modificado de Robert Morreale.

1.2 Antecedentes

1.2.1 El hueso y sus componentes

El sistema esquelético tiene una variedad de funciones, da soporte estructural al resto del cuerpo, permite el movimiento al proveer a los músculos de un apoyo, protege a los órganos vitales, mantiene la homeostasis mineral y el balance ácido-básico, sirve como un reservorio de factores de crecimiento y citocinas, además provee el ambiente para la hematopoyesis entre los espacios de la médula ósea (Taichman, 2005).

El sistema esquelético de un humano adulto está formado por 213 huesos, los cuales se pueden clasificar en cuatro categorías, huesos largos, huesos cortos, huesos planos y huesos irregulares. Los huesos están compuestos por una parte mineral, de hidroxapatita, la parte orgánica, donde ~90% es colágeno de tipo 1, ~5% de proteínas no-colágeno, ~2% de lípidos (Boskey, 2013).

La estructura de los huesos largos consiste en médula ósea, rodeada por tejido óseo y periostio. A pesar de que los componentes del hueso difieren en composición, estructura y función, no son independientes e interaccionan constantemente con las células presentes en la médula ósea. La médula ósea es una reserva de células madre, los vasos sanguíneos de la médula ósea forman parte crítica del sistema

circulatorio en el hueso, desordenes o disrupciones mecánicas pueden afectar al hueso y a las células del periostio. La mayoría de las lesiones esqueléticas o tratamientos ortopédicos afectan principalmente el tejido óseo y el periostio (Buckwalter et al., 1996).

Existen dos formas de tejido óseo: el hueso cortical (compacto) y el hueso trabecular (Figura 10A). El hueso cortical y el hueso trabecular tienen la misma composición y estructura, la diferencia es la densidad ósea, el hueso cortical es más denso lo que lo hace más rígido, mientras que el hueso trabecular es menos denso y tiene mayor elasticidad (Buckwalter et al., 1996). El hueso cortical forma aproximadamente el 80% de un esqueleto maduro, rodea a la médula ósea y a las placas de hueso trabecular. En los huesos largos, un denso hueso cortical forma la diáfisis, y existe muy poco o nada de hueso trabecular en esa área. La gruesa capa de hueso cortical se va haciendo más delgada e incrementa el diámetro formando la metáfisis, donde las placas de hueso trabecular se posicionan para dar soporte a una delgada capa de hueso subcondral que rodea el cartílago de la articulación (Buckwalter et al., 1996). El hueso cortical y el hueso trabecular tienen la misma composición, pero la diferencia en la densidad y organización les atribuye diferentes características mecánicas.

En la metáfisis y epífisis, la delgada capa de hueso cortical y subcondral mantenido por hueso trabecular permite tener gran deformación, o es más flexible, lo que ayuda a absorber los impactos aplicados en los líquidos sinoviales de las articulaciones.

El endostio es una membrana delgada que limita a la cavidad medular, contiene una sencilla capa de células formadoras de huesos y una pequeña cantidad de tejido conectivo (Clarke, 2008). El periostio está unido a los huesos por fibras que perforan el hueso, gruesas fibras de colágeno (Clarke, 2008). La cavidad medular es el espacio dentro de la diáfisis que contiene a la médula ósea y presenta numerosos vasos sanguíneos, esta cavidad reduce el peso de los huesos. La actividad de la superficie periostio es importante para el crecimiento y la reparación de fracturas. Mientras que la formación ósea típicamente excede a la resorción ósea en la superficie periostio, por lo que los huesos normalmente incrementan su diámetro con la edad (Clarke, 2008).

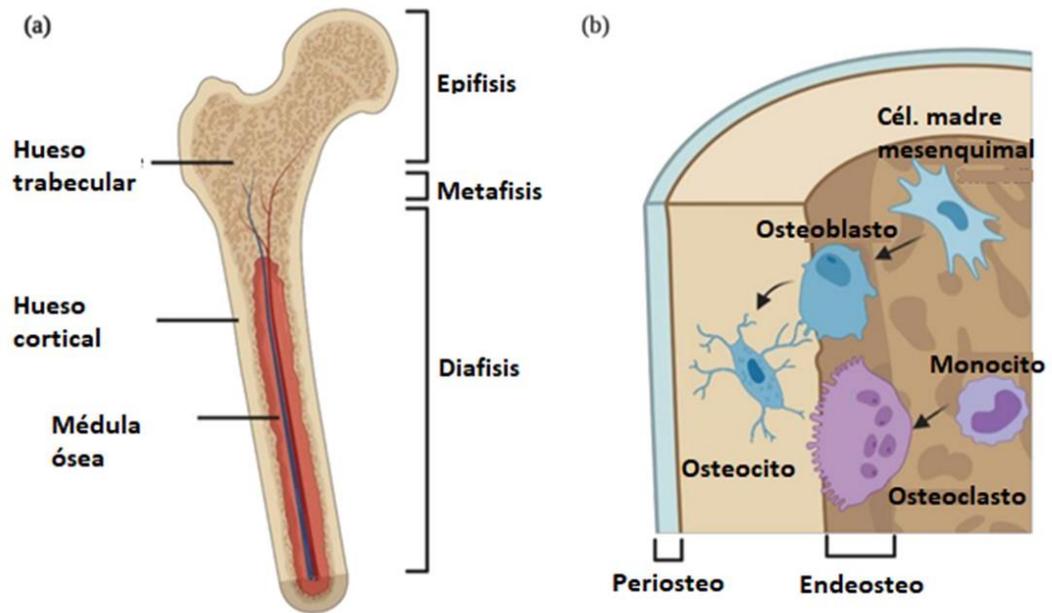


Figura 10 Estructura del hueso y componentes celulares. A. La división anatómica y los tipos de hueso presentes en los huesos largos; B. componentes celulares del hueso y sus precursores celulares. Los osteoblastos provienen de las células madres mesenquimales y forman nuevo hueso al depositar y mineralizar la matriz extracelular. Cuando los osteoblastos se quedan atrapados en el hueso nuevo formado, ellos maduran a osteocitos. La degradación ósea es realizada por unas grandes células multinucleadas, los osteoclastos, los cuales tienen un origen mieloide. Recuperado de Oliveira et al. (2020).

El tejido óseo se encuentra en constante remodelación y esto se mantiene en un equilibrio entre la formación de nuevo hueso y la reabsorción ósea, lo cual es posible gracias a una intercomunicación y una regulación muy estricta entre las células del hueso. Por lo tanto, cualquier alteración en la función de alguna de estas células, rompería el balance y afectaría la remodelación ósea. Los osteoblastos, tienen un origen mesenquimal y son las células formadoras de hueso, secretan la matriz ósea y llevan a cabo la mineralización de ésta. Los osteoblastos producen fibras de colágeno, osteocalcina y osteonectina, que son componentes importantes en la formación de hueso (Cordeiro Gomes et al., 2016). La osteocalcina se une a la hidroxapatita con el calcio y es fundamental para la mineralización ósea y funciona como un marcador de hueso nuevo. La osteonectina se une a la hidroxapatita, y también al colágeno. Los osteoblastos, expresan el ligando para el receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL), el cual se une al receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANK) expresado en la superficie de los precursores de osteoclastos, a los osteoclastos maduros o a la osteoprotegerina (OPG), su receptor análogo. Una vez que los osteoblastos forman nuevo hueso y realizan la mineralización ósea, algunos osteoblastos se quedan atrapados en el nuevo hueso, y tienen cambios morfológicos madurando hacia osteocitos. Los

osteocitos ya no tienen capacidad de formar hueso, pero tienen largas proyecciones y cumplen con un papel regulador en la fisiología del hueso (Andrzejewska et al., 2019).

La reabsorción del hueso se lleva a cabo por los osteoclastos, son células grandes, multinucleadas con un origen hematopoyético. La ruta clásica de maduración de los osteoclastos consiste en la diferenciación de las células madres hematopoyéticas, en progenitores mieloides comunes, los que pueden dar origen a macrófagos y monocitos. Éstos al ser estimulados con el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) y RANKL se diferencian en progenitores de osteoclastos (OCP, por sus siglas en inglés), los cuales requieren mayor estimulación por RANKL y esto lleva a la fusión de células precursoras de osteoclastos origina a los osteoclastos maduros (Fierro et al., 2017; Nakagawa et al., 1998), no siempre son células progenitoras fusionadas, se ha reportado que los osteoclastos maduros se dividen en osteomorfos, los cuales pueden encontrarse en circulación, para ser reciclados y fusionarse a células precursoras o a otros osteoclastos (McDonald et al., 2021).

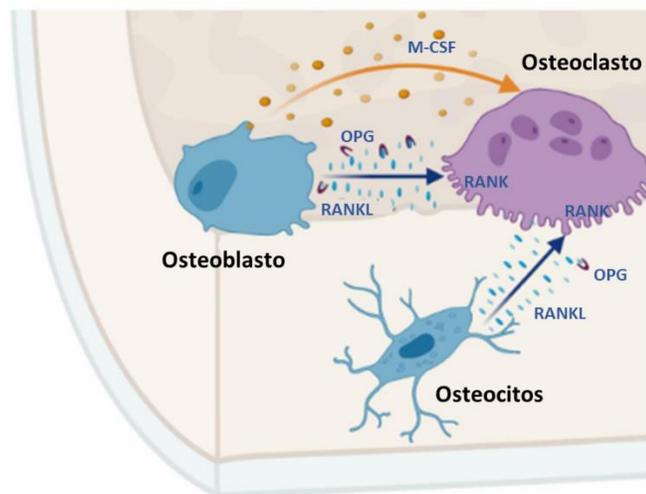


Figura 11 Intercomunicación entre las células óseas, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos lo que mantiene una densidad ósea adecuada. El balance entre el ligando del receptor activador de factor nuclear kappa-B (RANKL) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) controlan la osteoclastogénesis. Los osteoblastos y los osteocitos producen RANKL que se une a su receptor RANK en la superficie de los osteoclastos. Simultáneamente los osteoblastos secretan osteoprotegerina (OPG), que es un receptor inhibitorio de RANKL. La producción de OPG hace que el RANKL no esté disponible para los osteoclastos, lo que representa un método de regulación de la resorción ósea, dependiente de los osteoblastos. Modificado de Oliveira et al. (2020).

La diferenciación y maduración de los osteoclastos es dependiente de RANKL, y RANKL es altamente expresado en el ambiente de la médula ósea (Lacey et al., 1998). Los osteoclastos se caracterizan por la

expresión de la fosfatasa tartrato ácido resistente (TRAP, por sus siglas en inglés), catepsina K, receptor de calcitonina, y la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Fierro et al., 2017). Para poder disolver la matriz mineralizada, los osteoclastos contienen una gran cantidad de mitocondrias y lisosomas ricos en fosfatasas. Éstos últimos son transportados por arreglos de microtúbulos que se encuentran en el borde de la célula en la bahía de resorción, y son seguidos por una secreción de protones por las v-ATPasas lo cual acidifica el ambiente, causando la desmineralización de la matriz ósea con la liberación de los carbonatos de calcio y los fosfatos de carbono (Hasegawa et al., 2019). Este proceso es acompañado por la secreción de catepsina K y colagenasas que se encargan de la degradación de los componentes orgánicos del hueso (Standring, 2020) (Figura 11).

1.2.2 Metástasis y metástasis ósea

Se estima que más del 80% de los pacientes con cáncer de mama y de próstata en estados avanzados tienen metástasis ósea (Coleman, 2001). Cuando las células cancerosas invaden al hueso, estas rompen el balance entre la formación y destrucción de hueso y generan lesiones de tipo osteolíticas y osteoblásticas. Las lesiones osteolíticas se caracterizan por sobre activación de los osteoclastos lo que se refleja en pérdida ósea. Mientras que las lesiones osteoblásticas, se caracterizan por la sobre activación de los osteoblastos incrementando una mayor formación ósea generando huesos más grandes, pero con mala arquitectura. Se ha reportado que la mayoría de los pacientes con metástasis ósea presentan los dos tipos de lesiones (Mundy, 2002).

Las células cancerosas no invaden órganos aleatorios existe evidencia de que las células tumorales utilizan otras células para generar nichos premetastáticos, el nicho ecológico hace referencia a dos conceptos, el primero describe los requerimientos ambientales del organismo y el otro es la descripción del impacto *per capita* que tiene el organismo en el ambiente (Leibold, 1995). Por lo tanto, un nicho premetastático hace referencia a una ubicación (tejido, órgano) que tiene las condiciones que permiten el establecimiento de las células metastásicas. Por ejemplo, se demostró de manera experimental que células hematopoyéticas progenitoras (HPCs, por sus siglas en inglés) que expresan el receptor 1 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-1, por sus siglas en inglés), migran a órganos específicos y fomentan la expresión de integrinas que ayudaran al establecimiento de las células tumorales que expresan el receptor para esas integrinas (Kaplan et al., 2005). En un experimento con ratones se marcaron las células HPCs con proteína verde fluorescente y se inoculó a los ratones con células cancerosas de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) o con células de melanoma B16, se demostró por microscopía de fluorescencia y por citometría de

flujo que las células HPC llegaban y generaban grupos celulares en sitios de metástasis. En ratones inoculados con LLC, las HPCs se detectaron en pulmón desde el día 12 por citometría de flujo, y las células cancerosas LLC se detectaron hasta el día 18. Mientras que para los ratones inoculados con células B16 se encontraron estos grupos de HPC en pulmón, hígado, testículos, bazo y riñón, se sabe que las células B16 tienen mayor potencial metastásico (Kaplan et al., 2005). Estos trabajos nos indican que hay factores que pueden guiar o atraer a las células cancerosas de manera específica en este caso con la expresión de VEGFR-1). En pacientes con cáncer de mama, se detectó por inmunohistoquímica la presencia de grupos celulares positivos para VEGFR-1 en nódulos linfáticos, sitios comunes de metástasis (Kaplan et al., 2005).

El nicho de las células madre, tiene relevancia para el tratamiento del cáncer ya que es un blanco para las células metastásicas. El nicho de las células madre describe una ubicación anatómica específica que regula el funcionamiento y metabolismo de éstas (Scadden, 2006). El nicho de las células madre está formado por otras células y productos presentes en el tejido. Por ejemplo: el nicho de las células madre hematopoyéticas (HSCs, por sus siglas en inglés) está compuesto por los osteoblastos, la matriz extracelular que presenta osteopontina (OPN), productos extracelulares como el calcio y radicales libres (ROS, NO) (Scadden, 2006). La OPN es un elemento regulatorio del nicho de células HSCs y limita su expansión (Stier et al., 2005). OPG se une a varios receptores presentes en las HSCs como el receptor CD44 y la integrina $\alpha 4\beta 1$ (Scadden, 2006).

Por otro lado, las células metastásicas de tumores sólidos que invaden el hueso, usurpan el nicho de las HSC. Para demostrar esto, Shiozawa et. al, utilizaron un modelo de ratón inmunocomprometido (NOD/SCID) que expresa la variable de CD45.1, entonces se inocularon células de cáncer de próstata humano de manera subcutánea y se dejaron crecer por 3 semanas, se removió el tumor en ese momento por cirugía, 3 días posteriores a la cirugía se inocularon células de médula ósea de ratón que expresa la variable CD45.2 y fueron monitoreados por 4, 8, 12 y 16 semanas. Los ratones con cirugía fantasma, o los que fueron inoculados con células de cáncer de próstata transformadas para que sean no metastásicas (NMPE, por sus siglas en inglés), fueron los únicos que presentaron un incremento significativo en las células de médula ósea (CD45.2⁺) (Shiozawa et al., 2011), es decir que las células de cáncer de próstata humano invadieron los nichos de las HSC lo que impidió que las HSC CD45.2⁺ lograran llegar. También demostraron que las células de cáncer de próstata y las HSC son atraídas a los osteoblastos reconocidos por la expresión de RUNX2, ya que ambos fueron colocalizados con células RUNX2 positivas. La siguiente pregunta que se plantearon fue, ¿si se incrementa el nicho de las HSC, habrá una mayor metástasis? Para resolver esta incógnita, siguieron la siguiente lógica un mayor nicho de HSC requiere un aumento en el número de osteoblastos, lo cual se puede lograr con un tratamiento con PTH. Le administraron a los

ratones tratamiento con PTH antes de ser inoculados con células de cáncer de próstata y se confirmó que hubo un incremento en el número de células de cáncer de próstata en calvaria como en la columna vertebral (Shiozawa et al., 2011). Además, se determinó que las células de cáncer de próstata utilizan los mismos protocolos de movilización de las HSC la ruta de CXCR4/CXCL12 para llegar y salir del nicho de las HSCs. Se demostró que el bloqueo de otro receptor del CXCL12 o el factor derivado de células del estroma 1 (SDF-1 α) el CXCR7 inhibe la metástasis ósea de cáncer de próstata y su crecimiento (Sun et al., 2003, 2005; Jianhua Wang et al., 2008).

Se detectó la expresión de CXCL12, en órganos a los cuales el cáncer de mama metastatiza frecuentemente: nódulos linfáticos, pulmón, hígado y médula ósea (Müller et al., 2001). De manera consistente se detectó el receptor de CXCL12, el CXCR4 es altamente expresado en células malignas de cáncer de mama. La expresión del receptor CXCR4 por las células de cáncer de mama se relaciona con la eficiente migración e invasión inducida por CXCL12, por lo que es concebible que las interacciones CXCL12/CXCR4 contribuyan a la infiltración de las células de cáncer de mama a la médula ósea, utilizando el mismo sistema que las HPCs. Esto se comprobó en ratones deficientes para CXCL12 o con células tumorales que no expresan CXCR4, en los cuales la cantidad de metástasis se redujo considerablemente, demostrando que las interacciones CXCR4/CXCL12 son vitales para la metástasis a médula ósea (Müller et al., 2001). Sin embargo, solo la inhibición *in vivo* de estos quimiorreceptores no es suficiente para bloquear totalmente el comportamiento metastático de las células de cáncer de mama (Müller et al., 2001).

El hueso es una fuente de TGF- β , ya que es altamente producido por los osteoblastos y se encuentra embebido en la matriz ósea (Korpal et al., 2009). El TGF- β es liberado y activado en el microambiente de la metástasis ósea, la cantidad de TGF- β es más alta en lesiones osteolíticas comparadas con lesiones no osteolíticas (Korpal et al., 2009). También son liberados los factores de crecimiento insulínico uno y dos (IGF-I/-II, por sus siglas en inglés) (Jackson et al., 2001) (Figura 12), éstos factores favorecen la proliferación de las células cancerosas y promueven un fenotipo más agresivo (Hiraga et al., 2012).

Las células de cáncer de mama pueden liberar factores como la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), RANKL, IL-8, IL-11 (Kang et al., 2005; Singh et al., 2007; C Van Poznak et al., 2006; Yin et al., 1999), que contribuyen al aumento de la resorción ósea generando un ciclo vicioso (Figura 12) . Por lo tanto, los factores que favorecen la resorción ósea directa e indirectamente favorecen la metástasis ósea.

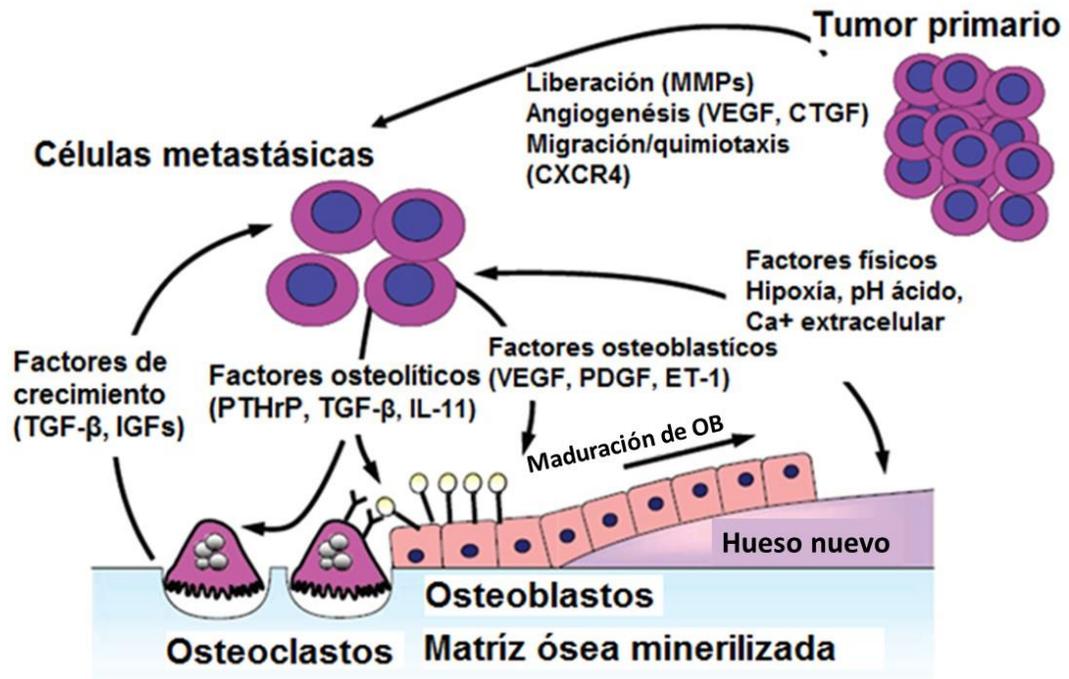


Figura 12 Ciclo vicioso de la metástasis ósea osteolítica. Modificado de Kingsley et al. (2007).

1.2.3 Síntomas y tratamientos actuales contra la metástasis ósea

El hueso es el sitio más común para el desarrollo de metástasis en pacientes con cáncer de mama. La metástasis ósea empeora la calidad de vida del paciente, por lo que es considerado un marcador desfavorable en la prognosis del cáncer al incrementar la morbilidad y mortalidad, en la cual menos del 20% de los casos logran una esperanza de vida mayor a los 5 años (Ban et al., 2021).

Se estima que más del 40% de pacientes con metástasis ósea presentan eventos esqueléticos, por ejemplo: un cuadro agudo de dolor, fracturas patológicas, compresión de la médula espinal y de los nervios raquídeos, déficits neurológicos e hipercalcemia (Jensen et al., 2011). En la mayoría de los casos de metástasis ósea los pacientes presentan ambos tipos de lesiones osteolíticas y lesiones osteoblásticas. Los pacientes con cáncer de próstata presentan lesiones osteoblásticas generalmente (Mundy, 2002), mientras que para pacientes con metástasis ósea de cáncer de mama presentan predominantemente lesiones osteolíticas (Käkönen y Mundy, 2003; Yoneda et al., 1994).

La forma más común para detectar la metástasis ósea, es a través de imagenología, en la cual se incluyen radiografías de rayos X, tomografía computarizada y gammagrafía ósea. Sin embargo, estos métodos solo permiten la detección de estados avanzados de metástasis, por lo que se ha incrementado el uso de otros

métodos más sensibles como la resonancia magnética nuclear de cuerpo entero y la tomografía computarizada por emisión de positrones (Petralia et al., 2019). También, se emplean análisis de sangre para confirmar la presencia de metástasis ósea. Por ejemplo, el incremento en el nivel de calcio en suero, de fosfatasas alcalinas o de PTHrP, son marcadores comunes de lesiones osteolíticas (Clézardin et al., 2021; Demers et al., 2003).

Antes de que los pacientes comiencen un tratamiento con agentes modificadores del hueso (BMA, por sus siglas en inglés) presentan una incidencia de complicaciones esqueléticas alrededor de 1.5-4 eventos por año (Lipton, 2006). La tasa de eventos relacionados al esqueleto (SER, por sus siglas en inglés) se reducen aproximadamente entre el 25 y 40% utilizando tratamiento con BMA. Se estima que el 25% de los pacientes con metástasis de cáncer de mama de próstata y mieloma presentan 1 SER antes de comenzar el tratamiento con BMA, el 20% de los pacientes experimentó >1 SER en los dos años de recibir tratamiento con BMA (ácido zóledrónico) (Himmelstein et al., 2017). No hubo diferencias entre los grupos que lo recibían cada 4 con los que lo recibieron cada 12 semanas (Himmelstein et al., 2017).

Los bifosfonatos son análogos del pirofosfato, que naturalmente se incorpora en la matriz mineralizada, particularmente en hueso en remodelación. La primera generación de bifosfonatos como el etidronato y el clodronato, no contienen nitrógeno se unen a las nuevas moléculas de ATP por la aminoacil-transferasa de clase II RNA sintetasa, después de que los osteoclastos la tomaron de la matriz mineralizada (Russell, 2006). La acumulación de este ATP no hidrolizable se cree es la causa del efecto citotóxico en los osteoclastos.

A diferencia de los primeros bifosfonatos, los bifosfonatos de segunda y tercera generación (aledronato, pamidronato y zoledronato) tienen nitrógeno en la cadena lateral R2. El mecanismo de acción es diferente, los bifosfonatos nitrogenados se unen e inhiben la actividad pirofosfato de farnesilo sintasa, un regulador clave en la ruta del ácido mevalónico, una ruta crítica para la producción de colesterol, otros esteroides y lípidos (Dunford et al., 2001). Lo que inhibe modificaciones post-traduccionales, lo que inhibe a ciertas proteínas (Rab, Rac y Rho) que juegan papeles importantes en múltiples actividades de los osteoclastos, lo que lleva a su apoptosis.

Los bifosfonatos nitrogenados o de segunda y tercera generación como el pamidronato y el ácido zoledrónico (zoledronato) tienen mayor potencia y mayor tasa de apoptosis en osteoclastos (Russell, 2011) al compararlos con bifosfonatos sin nitrógeno. Los bifosfonatos son desechados renalmente por lo que no se recomiendan en pacientes con falla renal. Los bifosfonatos son generalmente bien tolerados y pueden

presentar leves efectos secundarios como mialgia y pirexia. En caso de que se presenten son por corto plazo (1-2 semanas) relacionados con liberación de enzimas proinflamatorias (Russell, 2011).

Dentro de los efectos secundarios serios del tratamiento con BMA se encuentra la osteonecrosis mandibular. Se considera osteonecrosis mandibular cuando una infección en los huesos de la mandíbula perdura por más de 8 semanas, en pacientes que recibieron tratamiento con BMA (Khan et al., 2016). Se presenta en el 2.8% de pacientes que han llevado un tratamiento con ácido zoledrónico por más de 3 años (C. H. Van Poznak et al., 2019) y que los que reciben una extracción dental están en mayor riesgo (Vahtsevanos et al., 2009). Análisis más recientes indican que otras complicaciones serias en el uso de BMA, son las fracturas femorales atípicas, caracterizadas por ser fracturas que no están relacionadas con trauma o caídas y se han reportado en pacientes con osteoporosis y cáncer (Lenart et al., 2008).

Otro BMA como el Denosumab, un anticuerpo monoclonal anti-RANKL, fue aprobado para el tratamiento de las SREs en pacientes con tumores sólidos en 2010 en EUA y en 2011 en Europa. A diferencia de los bifosfonatos el denosumab no se une a la matriz mineralizada, es un anticuerpo que se une a RANKL. El bloqueo de RANKL previene la unión con su receptor en la superficie de los osteoclastos lo que evita su maduración y promueve la apoptosis, reduciendo la remodelación ósea (Hanley et al., 2012). El denosumab no está contraindicado en pacientes renales, pero se ha relacionado con un incremento de hipocalcemia en pacientes. El riesgo de sufrir necrosis mandibular bajo el uso de denosumab es menor al 4.6% en ensayos clínicos, pero es mayor en pacientes con cáncer de próstata (Qi et al., 2014). No hay diferencias en el riesgo de presentar necrosis mandibular entre pacientes con ácido zoledrónico o denosumab (Stopeck et al., 2016). También está relacionado con fracturas atípicas femorales, con una incidencia del 1.8% (Takahashi et al., 2019).

El denosumab es un anticuerpo monoclonal, por lo que tiene un alto costo al compararlo con el ácido zoledrónico en su forma genérica. En el 2007 se comparó el costo entre las dos terapias siendo el costo anual del ácido zoledrónico equivalente a \$214 dólares comparado con \$25,941 dólares mensuales por denosumab (Catherine Van Poznak et al., 2017). Considerando el costo contra la efectividad, el tratamiento para pacientes con metástasis ósea de tumores sólidos debería ser ácido zoledrónico, con excepción de pacientes con problemas renales donde se recomendaría denosumab (Schwartz et al., 2022).

En un ensayo clínico con más de 37,000 mujeres con cáncer de mama que recibieron tratamiento con BMA, por mínimo 6 meses, se compararon 3 grupos, las que solo recibieron ácido zoledrónico, las que solo recibieron Denosumab y las que recibieron ambos, se le dio seguimiento por 5.3 años. El tratamiento con

ácido zoledrónico, incrementa la supervivencia en pacientes con cáncer de mama en etapas tempranas (etapa II y III), el denosumab no tiene efecto en la supervivencia (Suarez-Almazor et al., 2020). Sin embargo, cuando el tratamiento se inicia en etapa IV (con metástasis ósea) no tiene efecto en la supervivencia de los pacientes.

Por lo que es necesario continuar en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas como la inmunoterapia.

1.2.4 Sistema inmune e inmunoterapia

El término inmunidad se deriva del latín *immunitas*, el cual hace referencia a la protección legal que se ofrecía a los senadores romanos durante su tiempo en la oficina. Inmunidad significa protección de enfermedades, y más específicamente de enfermedades infecciosas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune, y actúan en una colectiva y coordinada respuesta (Denman, 1992).

La función fisiológica del sistema inmune es la defensa contra microbios infecciosos. Sin embargo, cosas no infecciosas ajenas al cuerpo pueden activar una respuesta inmune. Pero en ciertas enfermedades el sistema inmune puede también causar daños en los tejidos, y otras enfermedades, inclusive en situaciones particulares algunas moléculas propias pueden despertar la respuesta inmune (respuestas auto-inmunes). Por lo que una definición más inclusiva de la respuesta inmune sería, una reacción a componentes de los microbios, así como a macromoléculas, como proteínas y polisacáridos, y pequeñas sustancias químicas que son reconocidas como extrañas (denominados antígenos), sin importar cuál sea las consecuencias fisiológicas y patológicas de esta reacción.

La protección contra microbios es mediada por las respuestas rápidas de la inmunidad innata y una respuesta tardía conocida como inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es estimulada por estructuras moleculares compartidas por grupos de microbios y por moléculas expresadas en las células dañadas del hospedero (Denman, 1992). Mientras que la inmunidad adaptativa es específica para los antígenos y esta se incrementa con el mayor número de exposiciones a éstos (memoria inmunológica).

Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas, como el epitelio y los compuestos antimicrobianos producidos en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos y

macrófagos), células dendríticas, y natural killers (NK); componentes de la sangre, proteínas incluidos algunos componentes del complemento y otros mediadores de inflamación; y proteínas llamadas citocinas que regulan y coordinan muchas actividades de las células del sistema inmune innato. Sistema inmune adaptativo

La respuesta inmune innata genera respuestas inmediatas contra estímulos presentados, pero existe otra respuesta inmune la cual es estimulada por exposición a los agentes infecciosos e incrementa en magnitud y en las capacidades defensivas con cada exposición subsecuente en respuesta a un microbio en particular. Debido a que este tipo de inmunidad se desarrolla en respuesta a una infección y se adapta a la infección, es llamada inmunidad adaptativa (Denman, 1992).

Las características principales de la inmunidad adaptativa, es que tienen una afinidad muy específica para distintas moléculas y tienen la habilidad de recordar y generar memoria, para responder con mayor intensidad en las siguientes reinfecciones. Debido a su alta afinidad o capacidad de diferenciar entre microbios, aunque estén relacionados, también se le conoce como inmunidad específica.

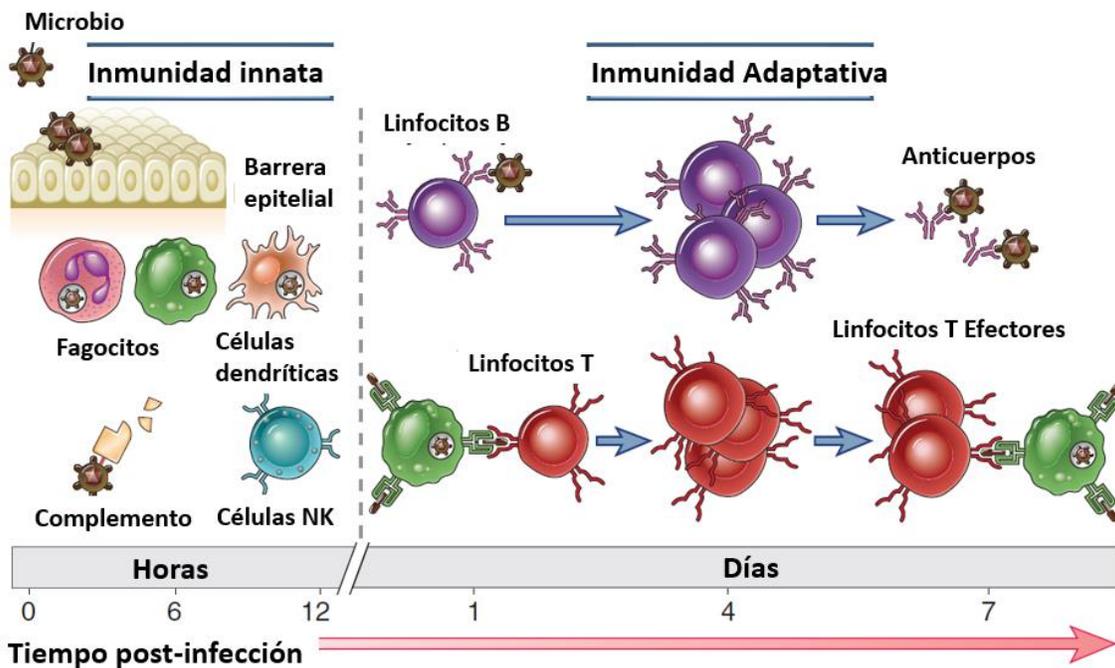


Figura 13 Respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta inmune innata provee la primera defensa en contra de los microbios que infecten al organismo. Mientras que la respuesta adaptativa consiste en la activación de los linfocitos, estas respuestas pueden variar entre diferentes infecciones. Modificado de Abbas, et al. (2012).

Los componentes principales de la inmunidad adaptativa son los linfocitos junto con los productos que estos secretan, las sustancias ajenas que inducen la respuesta específica de los linfocitos o anticuerpos se conocen como antígenos.

Los linfocitos son activados cuando se reconocen los antígenos (pequeños péptidos generalmente), a receptores los receptores de los linfocitos B (BCR, por sus siglas en inglés), o a los receptores de los linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés). Ambos tipos de linfocitos son críticos para el desarrollo y progresión del cáncer, al igual que para las terapias contra el cáncer. En este trabajo nos enfocaremos en el papel de los linfocitos T en el desarrollo de la metástasis ósea y la inmunoterapia.

1.2.5 Linfocitos T

Los linfocitos T tienen un origen hematopoyético, los linfocitos progenitores son almacenados en la médula ósea. Continúan con su diferenciación temprana en el timo, proceden a ser almacenados en los órganos linfoides secundarios como los nódulos linfáticos, donde esperan a ser activados por la presentación de antígenos. Existen varios tipos de linfocitos T los cuales reconocen diferentes tipos de antígenos y son clasificados por las diferencias en la composición heterodimérica del receptor (TCR).

La gran mayoría de los linfocitos T son alfa beta ($\alpha\beta$), el TCR está formado por una cadena α y una β . Se conocen como los linfocitos convencionales y nos referiremos a ellos solo como linfocitos T. Los linfocitos T reconocen a antígenos presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) que son cargadas con pequeños péptidos que serán reconocidos por el TCR. El MHC puede ser clasificado en dos clases, el MHC de clase I (MHC-I) el cual es expresado por todas las células somáticas y se une al TCR asociado al correceptor CD8, presente en los linfocitos T CD8⁺. Mientras que el MHC de clase II (MHC-II) solo se expresa en las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés), por ejemplo, células dendríticas o macrófagos y este se une al TCR asociado al correceptor CD4, presentado en los linfocitos T CD4⁺ (Y. Li et al., 2013). Una vez activados, dependiendo de que citocinas entren en contacto, los linfocitos T CD4⁺, conocidos como linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) ingenuos (Th0) pueden diferenciarse en diferentes subtipos Th1, Th2, Th17 o se puede inducir su diferenciación a linfocito T regulador (Treg) (Luckheeram et al., 2012). Los linfocitos T CD4⁺ son críticos para el establecimiento de una respuesta inmune bien regulada y efectiva, contra cualquier patógeno o incluso cáncer. Los linfocitos T CD8⁺ son indispensables para defender contra infecciones intracelulares (por ejemplo, virus y bacterias intracelulares) y células cancerosas. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Tc),

como su nombre lo indica inducen la muerte celular al liberar enzimas citotóxicas (por ejemplo, perforina y granzimas) e interferón gamma (IFN γ), los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos más abundantes son los Tc1, también existen otros subtipos Tc2, Tc9, Tc17 y linfocitos T CD8⁺ reguladores (Mitrücker et al., 2014; Zhang y Bevan, 2011).

Otro tipo de linfocitos T, son los gamma-delta ($\gamma\delta$) conocidos como los linfocitos T no convencionales, tienen la particularidad de que pueden reconocer antígenos no peptídicos y no están restringidos por el MHC a diferencia de los linfocitos T $\alpha\beta$.

La capacidad de los linfocitos T de reconocer antígenos se debe a que en ellos se lleva a cabo una recombinación genética, rompiendo el paradigma de la biología molecular de un gen va a codificar a una proteína, ya que los anticuerpos y el TCR son producto de la recombinación de varios genes (Hayday, 1985). La diversidad en el TCR se debe a la recombinación VDJ donde los genes: variable (V), diversidad (D) y unión (J, por su sigla en inglés) presentan inserciones y deleciones de nucleótidos para formar el TCR (Sethna et al., 2017). Debido a este proceso los linfocitos T pueden reconocer antígenos aleatorios, cuando los linfocitos T reconocen alguna proteína del cuerpo, es decir son autorreactivos existe un mecanismo de selección donde estos son eliminados para evitar respuestas autoinmunes, lo que hace que el reconocimiento de las células cancerosas sea un mayor reto.

Los linfocitos T pueden reconocer a las células cancerosas cuando presentan neoantígenos. Los neoantígenos pueden ser producto de mutaciones en las células causadas por errores en la replicación o factores externos (por ejemplo, radiación, fumar). Sin embargo, solo aprox. 1.5% del DNA es codificante, es muy poco probable que las mutaciones ocurran en estas zonas, pero cuando ocurre puede causar que una célula normal se convierta en cancerosa (Kandoth et al., 2013). La generación de neoantígenos por parte de la célula cancerosa permite que los linfocitos T las reconozcan. Otra causa de presentación de antígenos tumorales específicos (TSA, por sus siglas en inglés) son las proteínas virales. Se han detectado en 17% de la base de datos del Consorcio del análisis del genoma completo de cáncer (Pan-Cáncer Analysis of Whole Genomes Consortium), el más común fue el virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés), el virus de la hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés) o el virus Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés) (Zapatka et al., 2020). Algunas proteínas normales pueden ser detectadas por el sistema inmune como ajenas al ser expresadas por otro tejido, como el caso del antígeno cáncer/testículo (del inglés, cancer antigen testis) una proteína que normalmente solo es expresada en los testículos y en placenta (Fratta et al., 2011), al ser expresada por células de melanoma permite que el sistema inmune reconozca a estas células (Traversari et al., 1992).

Para que los linfocitos T sean activados en contra de las células cancerosas una serie de eventos e interacciones ocurren, conocidos como el ciclo de la inmunidad contra el cáncer (D. S. Chen and Mellman, 2013). El cual se explicará brevemente a continuación, los antígenos tumorales son liberados por las células tumorales vivas o muertas, estos antígenos son colectados y fagocitados por las APC como las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), ellas procesan los antígenos y comienzan a presentar pequeños péptidos en el MHC-II. Las DC migran entonces a los nódulos linfáticos, en la búsqueda de linfocitos T que tengan un TCR que reconozca los antígenos presentados, para afinar esta especificidad y activarlo. Por lo tanto, entre mayor sea la diversidad del repertorio de linfocitos T, se tendrá una mejor protección contra el cáncer (Schreiber et al., 2019). Los linfocitos T activados comienzan a proliferar y a dirigirse hacia el tumor para infiltrarlo. Una alta infiltración de linfocitos T en el tumor es un paso crítico, el cual está relacionado con un mejor diagnóstico en diferentes tipos de cáncer, y para cáncer de mama mejora la respuesta a terapia con neoadyuvantes (Chan et al., 2012; Denkert et al., 2016; Svenesvig et al., 1984; L. Zhang et al., 2003). Después de que los linfocitos T reconocen a los antígenos, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, inducen la muerte celular al liberar perforina, que permite el paso de gránulos dentro de los gránulos citotóxicos, o pueden también inducir la muerte por la expresión del ligando de Fas, el cual al unirse al receptor Fas en la célula cancerosa. La habilidad de los linfocitos T de eliminar a las células cancerosas ha sido posible de observar por técnicas de microfluidos y combinando con la identificación de marcadores específicos (Mendoza-Reinoso et al., 2020; Merouane et al., 2015). Además, los linfocitos T CD4⁺ que infiltran al tumor, tienen un papel clave al coordinar la activación y función de los linfocitos T citotóxicos en contra de las células cancerosas (Ahrends et al., 2017; Borst et al., 2018; Gil Del Alcazar et al., 2017). La transferencia adoptiva de linfocitos T que reconocen a las células cancerosas, se ha probado en pacientes con melanoma probando que tiene un efecto en la supervivencia libre de progresión de 6 de los 9 pacientes que se analizaron en el estudio (Exley et al., 2017). La transferencia adoptiva requiere: la obtención de los linfocitos T del paciente/donador, que estos sean seleccionados por especificidad al tumor, cultivados y expandidos *ex vivo*. Se requiere un tratamiento al receptor para eliminar a los linfocitos T endógenos, y por último la transfusión de los linfocitos T, este procedimiento se ha utilizado en pacientes con Melanoma (Exley et al., 2017).

La eliminación de las células cancerosas por medio de los linfocitos T, si es eficiente, sería suficiente para eliminar el tumor. Sin embargo, algunas células cancerosas tienen características que les permiten sobrevivir entrando en una fase de latencia, lo que genera una fase de equilibrio mientras que la vigilancia inmunológica previene el desarrollo del tumor sin eliminarlo por completo. En un experimento con ratones se demostró que la proliferación de tumores de sarcoma continuo al eliminar a los linfocitos T o cuando se

trasplantaron en un ratón inmunodeficiente (Koebel et al., 2007). Las células cancerosas pueden evadir al sistema inmune por diversos mecanismos.

1.2.6 Inhibición de los linfocitos T en el microambiente tumoral

Factores presentes en el microambiente tumoral que son capaces de inhibir la respuesta inmune incluyen un pH bajo (Blank et al., 2016), la hipoxia (Groh et al., 2002), el TGF- β (Akhurst y Derynck, 2001), las células de origen mielóide supresoras (MDSCs) (Dolen et al., 2015) y los puntos de control inmunológicos (CTLA-4, PD-1) (Callahan y Wolchok, 2013). Las células cancerosas modifican sus rutas metabólicas produciendo altas cantidades de ácido láctico, el cual se relaciona con un bajo pH local, generando un microambiente que es capaz de inhibir las funciones de los linfocitos T (Blank et al., 2016). Hipoxia ocurre cuando el flujo sanguíneo se bloquea o es reducido. La tensión de oxígeno (PO_2) en sangre arterial es aproximadamente 12%, en la mayoría de los tejidos se encuentra entre 4-8%. En médula ósea de donadoras se encuentra entre 6.2-6.6% (Arnett et al., 2003). Pero en ambientes pobremente vascularizados, como médula ósea de los ancianos, tejidos inflamados, infectados, tumores o sitios de fractura puede ser considerablemente menor (Arnett et al., 2003). La hipoxia en los tumores está relacionada con un fenotipo maligno caracterizado por un crecimiento incontrolado, incremento en el riesgo de metástasis, angiogénesis y el desarrollo de resistencia a quimioterapia y radioterapia (Sullivan y Graham, 2007).

Las células cancerosas pueden perder la expresión del MHC-I, la ausencia de presentación de antígenos pueden evadir la detección por los linfocitos T citotóxicos. Además de esconderse del sistema inmune, las células cancerosas pueden también pueden inhibir la respuesta inmune ya sea directamente liberando factores inmunosupresores, como los puntos de control inmunológicos como PD-L1, o por el reclutamiento de otras células como los fibroblastos-asociados a tumores, Tregs, macrófagos polarizados M2 o MDSCs que secretan citocinas inmunosupresoras, como la IL-10, TGF- β o VEGF, lo que favorece el crecimiento tumoral (Chen et al., 2013).

Las MDSCs se han encontrado en cantidades elevadas en circulación de pacientes con cáncer de mama y próstata, estas pueden usarse como biomarcadores ya que una elevada cantidad de MDSC se correlaciona con un decremento en la supervivencia (Diaz-Montero et al., 2009; Gonda et al., 2017; Idorn et al., 2014). Se han descrito dos subpoblaciones de MDSCs: las MDSCs monocíticas (M-MDSCs) y las MDSC polimorfonucleares (PMN-MDSCs) que aparentemente derivan de los diferentes linajes mieloides de los monocitos y de los neutrófilos respectivamente. Los mecanismos inmunosupresores de las MDSC son

diversos y varían entre las subpoblaciones (Veglia et al., 2018). Las M-MDSCs presentan elevados niveles de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), mientras que las PMN-MDSCs expresan arginasa 1 (ARG1), lo cual lleva a la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), respectivamente (Marvel and Gabrilovich, 2015), lo que lleva a la subsecuente inhibición de los linfocitos T (Marvel y Gabrilovich, 2015).

A estas interacciones entre las células cancerosas y el sistema inmune, se le conoce como la inmunoección del cáncer, proceso de inmunoección, que se separa en tres pasos o las tres Es, eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2004). Tiene gran relevancia en la investigación y tratamiento del cáncer (Yost et al., 2021), además de que ya es considerado como una de las características del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2.7 Los linfocitos T y pérdida de hueso en condiciones patológicas

Existen efectos indirectos en el hueso causados por la respuesta inmune ante las infecciones. Cuando el sistema inmune reconoce la invasión de un patógeno, las células del sistema inmune liberan diferentes citocinas, por ejemplo: IL-1 β , TNF α , e IL-6. Estas citocinas promueven la maduración de los osteoclastos y su actividad, por lo tanto, favorecen a la resorción ósea. Mientras que la IL-1 β y TNF α promueven la pérdida ósea al inhibir la formación de nuevo hueso (Oliveira et al., 2020).

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

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

1.2.8 Linfocitos T y la metástasis ósea

Al igual que ocurre en cualquier tumor o sitio de metástasis los linfocitos T deberían de tener como objetivo específico eliminar a las células cancerosas cuando hacen metástasis ósea. En particular, considerando la importancia de la médula ósea en el almacenamiento de linfocitos de memoria. Los linfocitos de memoria, son aquellos que después de ser activados contra su antígeno específico pueden tener una segunda respuesta inmune en presencia del mismo antígeno. La médula ósea es un reservorio de linfocitos T CD4⁺ de memoria (Okhrimenko et al., 2014; Tokoyoda et al., 2009), y de linfocitos T CD8⁺ de memoria (Becker et al., 2005), los linfocitos T de memoria son atraídos al hueso por citocinas liberadas en el hueso, como IL-17 y CXCL12, que interesantemente es el mismo mecanismo que utilizan las células cancerosas. Considerando el tiempo que le toma al tumor crecer y a las células cancerosas invadir el hueso, para hacer metástasis ósea, es razonable hipotetizar que existen linfocitos T de memoria que reconocen antígenos tumorales que estarán presentes en la médula ósea. Se reportó que hay un incremento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria en médula ósea de pacientes con cáncer de mama al compararse con donadores sanos (Feuerer, et al., 2001). Los pacientes que además presentan células cancerosas en la médula ósea, basado en la detección de la expresión de la citoqueratina 19, presentan más linfocitos T de memoria comparado con pacientes sin células cancerosas en la médula ósea. Algunos linfocitos T CD8⁺ de memoria reconocen antígenos que provienen de las células cancerosas, incluyendo antígenos de la proteína HER2/neu. La transferencia de linfocitos T aislados de médula ósea de pacientes con cáncer de mama, los cuales fueron re-estimulados *ex vivo*, fue capaz de reducir el crecimiento tumoral de fragmentos del tumor del mismo paciente que fueron trasplantados en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID) (Feuerer, et al., 2001). En un pequeño estudio piloto, se logró activar *ex vivo* linfocitos T reactivos para el tumor, de memoria provenientes de la médula ósea, en presencia de células dendritas pulsadas con lisado de células de cáncer de mama (MCF-7), los pacientes que tuvieron una respuesta de tipo 1 se consideraron exitosos, mientras que los que presentaron una respuesta de tipo 2 (IL-4) se relacionaron un pobre diagnóstico, elevada cantidad de IL-10 y linfocitos T reguladores, estos pacientes presentaban metástasis ósea (Schuetz et al., 2009). Sin embargo, la IL-4 tiene efectos paradójicos en el cáncer, por ejemplo tumores que secretan IL-4 fueron rechazados por los ratones, mientras que los tumores de las células parentales crecieron normalmente (Li et al., 2009). Ambas respuestas inmunes tipo 1 y 2 son importantes y podrían ser benéficas para el tratamiento de la metástasis ósea. Vacunas realizadas con células tumorales transformadas para que expresen IL-4 promovieron una respuesta inmune que eliminó la metástasis de pulmón, al inducir linfocitos T CD8 de tipo 2 (Tc2) activando linfocitos T CD8 tipo 1 (Tc1), demostrando que la erradicación del tumor no está restringida a la respuesta inmune tipo 1, si no que puede ser mediada también por la respuesta tipo 2 (Rodolfo et al., 1999). El IFN- γ que es secretado por los linfocitos Th1 o por

los linfocitos citotóxicos pueden inhibir el desarrollo del cáncer al incrementar la expresión del MHC-I, lo que hace que las células cancerosas sean más detectables por los linfocitos T citotóxicos (Martini et al., 2010), o directamente inhibiendo la proliferación de las células cancerosas o induciendo apoptosis (Kakuta et al., 2002). Cuando se trata de cáncer y hueso, el IFN- γ es un regulador importante. En ratones transgénicos HTLV-Tax, la expresión de la oncoproteína viral Tax, del virus linfotrópico humano de células T tipo 1 causa el desarrollo espontáneo de tumores suaves y de metástasis ósea osteolítica. La ausencia de IFN- γ en ratones knockout *Tax⁺IFN γ ^{-/-}*, incrementaron las lesiones osteolíticas (Xu et al., 2009). Estos efectos anti-osteoclasticos se correlacionan con un estudio que demostró que los linfocitos Th1 inhiben la formación de osteoclastos *in vitro* (Sato et al., 2006a). Este efecto fue mediado por el IFN- γ , ya que el efecto anti-osteoclastico de los linfocitos Th1 no se observó al utilizar precursores de osteoclastos de ratones deficientes del receptor de IFN- γ (*Ifngr^{-/-}*) (Sato et al., 2006a).

Similarmente, los linfocitos Th2 pueden también inhiben la osteoclastogenesis *in vitro*, pero no tienen el mismo efecto cuando se usan células de médula ósea de ratones *knockout* para *Stat6* (*Stat6^{-/-}*), un factor de transcripción clave para la IL-4 y su receptor, confirmando que la IL-4 regula los efectos anti-osteoclasticos de los linfocitos Th2 (Sato et al., 2006a). A diferencia de los linfocitos Th1, el efecto de los Th2 en el mieloma no ha sido esclarecido. Mientras que los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos Th1 lograron inducir la muerte celular de las células de mieloma 5T, los linfocitos Th2 favorecieron el crecimiento y proliferación de las células 5T en ratón, en este modelo los linfocitos Th2 promueven la progresión tumoral (Hong et al., 2008). Sin embargo, la transferencia adoptiva de linfocitos Th2 específicos para el tumor, en un modelo de mieloma en ratones inmunodeficientes (SCID), permitió que dichos linfocitos previnieran el crecimiento de las células de mieloma MOPC135 y la muerte del ratón, independiente de otros linfocitos (B, NK o citotóxicos), induciendo una respuesta inflamatoria de tipo II (Lorvik et al., 2016). Estos linfocitos Th2 le dieron una inmunidad duradera ya que se observó que las células cancerosas seguían siendo erradicadas en ratones inoculados, a más de 40 días del tratamiento (Lorvik et al., 2016).

Hasta el momento no hay trabajos donde se utilicen estas terapias en contra de la metástasis ósea de cáncer de mama o próstata, lo cual podría deberse a la dificultad para identificar antígenos específicos y linfocitos T anticancerígenos, o por la limitación impuesta por la escasa cantidad de modelos preclínicos. La mayoría de los modelos preclínicos de tumores sólidos, se basan en la inoculación de células cancerosas humanas en ratones inmunodeficientes como ratones desnudos o SCID los cuales carecen de linfocitos T (Campbell et al., 2012; Wright et al., 2016). Por lo tanto, para investigar el papel del sistema inmune adaptativo en el desarrollo de la metástasis ósea, se utilizan modelos singénicos, células de cáncer se

extraen de un ratón de una cepa endogámica, y estas células cancerosas pueden inocularse en ratones de la misma cepa. Una de los modelos más utilizados es utilizando células de melanoma B16, las cuales fueron extraídas de un ratón de la cepa C57BL/6 y sus diferentes subclonas (por ejemplo, B16-F1, B16-F10) las cuales pueden generar metástasis ósea (Arguello, F., et al. 1988; Overwijk y Restifo, 2001). Utilizando un modelo como este, pero con las células B16-FL las cuales expresan luciferasa, se demostró que la metástasis ósea se incrementó en ratones desnudos atímicos que carecen de linfocitos T, lo cual sugiere que los linfocitos T tienen un papel limitante para el desarrollo de la metástasis ósea en ratones C57BL/6 con un sistema inmune normal. Lo mismo se observó al inocular las células en ratones con *knockout* de MHC- y MHC-II, los cuales carecen de linfocitos T y también presentaron un incremento al compararlos con ratones con sistema inmune normal, sugiriendo que los linfocitos T tienen un papel protector contra la metástasis ósea (Zhang et al., 2011).

A pesar de estos resultados prometedores utilizando linfocitos T en modelos de melanoma y mieloma, otros datos sugieren que los linfocitos T podrían no ser capaces de atacar a las células cancerosas y eventualmente incluso aumentar la metástasis ósea. Un modelo singénico de metástasis ósea utilizando las células de cáncer de mama 4T1, las cuales se extrajeron de un ratón Balb/C, y pueden generar metástasis ósea espontáneamente al ser inoculadas en ratones Balb/C en las mamas, aunque es un proceso lento que requiere que se remueva el tumor, pero si las células se inoculan de manera intracardiaca ocurre más rápido (Campbell et al., 2012; Wright et al., 2016). El uso de este modelo, permitió observar que el tumor mamario de células 4T1, generó un nicho premetástasico al inducir una expansión de linfocitos T CD4⁺ que fomentaron un incremento en la resorción ósea, antes de que las células 4T1 estuvieran presentes en el hueso (Monteiro et al., 2013b). Uno de los productos de los linfocitos T CD4⁺, es la IL-17. La IL-17 ha sido encontrada en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, se le considera que tiene un papel crucial en la pérdida ósea en estos pacientes, al inducir una mayor producción de RANKL por los osteoblastos lo que favorece la resorción ósea (Kotake et al., 1999a). Los linfocitos T obtenidos de muestras sanguíneas de pacientes con cáncer son capaces de inducir la formación de osteoclastos. Los linfocitos T de pacientes con mieloma múltiple inducen la diferenciación de osteoclastos en ensayos *ex vivo* por la producción de la RANKL (Colucci et al., 2004). El mecanismo por el cual los linfocitos T tienen un papel supresor o promotor de las patologías se desconoce. Se denominan tumores “cálidos”, los tumores pueden generar respuesta del sistema inmune, mientras que los tumores que evaden al sistema inmune, y presentan un microambiente inmunosupresor se denominan “fríos”. Los pacientes que presentan tumores fríos tienen una mala respuesta a la inmunoterapia, es por eso que convertir tumores fríos en cálidos es uno de los objetivos, por ejemplo, en un ensayo clínico de fase 1, combinando tratamiento con un virus oncolítico (talimogene laherorepvec) y con anticuerpo anti-PD-1

(pemrolizumab). Se incrementó el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ infiltrados y la expresión de PD-L1 en respuesta completa en 33% de los pacientes con melanoma, también se incrementó el IFN- γ (Ribas et al., 2017). Se desconoce si la metástasis ósea es inmunológicamente fría o cálida, pero la evidencia indirecta, sugiere que es fría.

1.2.9 El hueso y sus componentes inmunoreguladores

La relación entre los huesos y el sistema inmune, se comenzó a estudiar en condiciones patológicas, como artritis autoinmune. Sin embargo, las células que componen a los huesos tienen una relación con las células del sistema inmune, más allá de compartir el mismo microambiente. La médula ósea es el nicho de las células madre hematopoyéticas (HSC), y se ha reportado que los osteoclastos a través de la liberación de enzimas proteolíticas como las MMP9 y la catepsina K, degradan la quimiocina CXCL12 lo cual promueve la movilización de las HSC (Kollet et al., 2006). Se ha reportado que al suministrarle RANKL a ratones, generó la movilización de las HSC debido a que se mejoró la actividad de los osteoclastos (Kollet et al., 2006). La quimiocina CXCL12 también está involucrada con la atracción y mantenimiento de los linfocitos Tregs que expresan CXCR4, y se sabe que en condiciones normales la médula ósea contiene una gran cantidad de éstos (Zou et al., 2004). Los linfocitos Tregs contribuyen a la regulación de los linfocitos T y a la auto-tolerancia (Zou et al., 2004). Las células estromales están en su nicho en contacto con los linfocitos T, e inducen a estas células a su estado de memoria, lo que inhibe su proliferación, también pueden inducir su apoptosis o evitar su activación (Nicola et al., 2002). La transición a linfocitos T de memoria también es favorecido en la médula ósea por la IL-17 (Kieper et al., 2002; Li et al., 2003).

La matriz mineralizada es una fuente de almacenamiento de TGF- β , lo cual fue demostrado al utilizar un modelo bioluminiscente donde la expresión de luciferasa estaba regulado por la expresión de TGF- β (Korpál et al., 2009). El TGF- β es un potente factor inmunosupresor, puede regular la mayor parte de los pasos de la respuesta inmune, desde la regulación de las células dendríticas, la presentación de los antígenos, la inducción de la diferenciación de los Tregs, así como la función de los linfocitos T efectores Th1, citotóxicos y los NK (Batlle y Massagué, 2019).

El hueso es un tejido hipóxico, ya que la hipoxia es un factor clave en la mineralización ósea puede ser tan bajo como el 1% en médula ósea y en el área de los osteocitos (Hirao et al., 2007). Condiciones hipóxicas en tumores inducen una acidosis láctica lo que reduce la proliferación y función de los linfocitos T (Mendler et al., 2012).

1.3 Justificación

La metástasis ósea de cáncer de mama no tiene cura, por lo que se requiere considerar nuevas estrategias cómo la inmunoterapia. Pero antes es crítico comprender de qué manera los linfocitos T pueden afectar a la metástasis ósea, y analizar de qué manera el microambiente de la metástasis ósea puede afectar a los linfocitos T. Para de esta manera determinar si el microambiente de la metástasis ósea podría afectar la eficiencia de la inmunoterapia.

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

De acuerdo a nuestros antecedentes, la metástasis ósea podría afectar la función de los linfocitos T, y los linfocitos T podrían favorecer la metástasis ósea por lo que se requiere más investigación para considerar que efectos podría tener la inmunoterapia en la metástasis ósea.

1.4 Hipótesis

Los linfocitos T suprimidos por el microambiente de la metástasis ósea de cáncer de mama incrementan la resorción ósea y favorecen el desarrollo de la metástasis ósea. Por lo tanto, la activación *in vivo* de los linfocitos T disminuirá la metástasis ósea.

La metástasis ósea de cáncer de mama es favorecida al suprimir la activación de los linfocitos T, los linfocitos T suprimidos favorecen la osteoclastogénesis.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de los linfocitos T en la osteoclastogénesis y en el desarrollo de la metástasis ósea en modelos murinos.

1.5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el efecto de los linfocitos T en la osteoclastogénesis y en el desarrollo de la metástasis ósea.
- Caracterizar el efecto de los linfocitos T en la metástasis ósea, en un segundo modelo singénico.
- Caracterizar el efecto de la metástasis ósea en los linfocitos T.
- Caracterizar el efecto de la inmunoterapia, en la metástasis ósea de células 4T1.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de ratón 4T1 (cáncer de mama), B16-F1 (melanoma) y TRAMP-C1 (cáncer de próstata), las cuales se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos Celulares (ATCC, por sus siglas en inglés). La línea celular de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A fue donada amablemente por el Dr. Connor Lynch (H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, FL, USA), la línea celular de cáncer de próstata de ratón RM-1 se obtuvo por el Dr. Timothy Thompson (The University of Texas, MD Anderson Cáncer Center).

Las líneas celulares 4T1 y RM-1 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Corning) suplementado con suero fetal bovino (SFB, 10% v/v, Atlanta Biologicals o Biowest). Las líneas celulares TRAMP-C1 y B16-F1 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Corning) suplementado con SFB (5% v/v). Mientras que la línea celular PyMT-R221A fue cultivada con medio DMEM alto en glucosa (4.5g/L, Corning) suplementado con SFB (10% v/v). Todos los medios fueron suplementados con una solución de antibiótico/antimicótico (1% v/v, Corning) y todas las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

2.2 Mantenimiento y reproducción de ratones

Los protocolos se realizaron acorde a la regulación federal para el cuidado y experimentación con animales, la NOM-062-ZOO-1999. Los ratones de la cepa BALB/C se obtuvieron de Envigo (cepa Balb/C-AnNHsd), mientras que los ratones de la cepa C57BL/6 (cepa C57BL/6N-Crl) al igual que los ratones desnudos (cepa Crl:NU/NU-nuBR) se obtuvieron de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Los ratones se mantuvieron en un cuarto con un ciclo de 12h luz/oscuridad, con temperatura estable a 22°C. Habitaron en el sistema Optimice (Animal Care Systems) dentro de una caja de 484 cm², con una población máxima de 5 ratones adultos, donde recibieron agua y comida (2018 Teklad Global 18% protein rodent diet Envigo, o Laboratory autoclavable rodent diet 5010, LabDiet) ad libitum. El lecho de las cajas estuvo formado por madera triturada (Harlan, Teklad), cada 14 días se traspasaron a cajas limpias con lecho nuevo. Se utilizaron pañuelos desechables, como material de anidación y tubos de cartón como enriquecedores del ambiente. Para los ratones inmunocomprometidos, el alimento, el agua, los materiales

de lecho, nidación y enriquecimiento fueron esterilizados previamente, y se manejaron en condiciones asépticas.

Todos los ratones, recibieron al menos una semana para su aclimatación, antes de comenzar los experimentos. Los ratones que recibieron inoculaciones de células cancerosas, fueron monitoreados diariamente en búsqueda de signos de dolor o incomodidad, los ratones que presentaron estas señales recibieron eutanasia humanitaria y se excluyeron del experimento correspondiente.

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

2.2.1 Modelos de metástasis ósea

Se preparó una suspensión de células individuales 4T1 (10^5 células en 100 μ L de PBS) a partir de monocapas confluentes. Las células recibieron un cambio de medio un día anterior para asegurar que se mantengan en fase exponencial de crecimiento. Se realizó una tripsinización y después se centrifugaron (200g, por 10min a 4°C). Los paquetes celulares fueron resuspendidos en PBS a 4°C, se colectan todas las células de los tubos obtenidos y se mezclaron en un tubo cónico de 50 mL complementando con PBS a 4°C hasta un volumen final de 40 mL. Las células se centrifugaron (200g, por 10min a 4°C) y se resuspendieron en 40 mL de PBS frío y se repitieron estos pasos dos veces. Se resuspendió el lavado final con un pequeño volumen de PBS frío (aprox. 5 mL). Las células vivas, se cuantificaron por una dilución con azul tripán usando la cámara de Neubauer, en un microscopio óptico invertido.

Los ratones fueron pesados y marcados en la cola (marcador indeleble) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (100mg/kg) y xilasina (5-10mg/kg) intraperitonealmente con jeringa insulínica. Una vez anestesiados se confirmó que no presentaban reflejos al presionar entre los dedos de las patas traseras, se prosiguió con la depilación del área de la caja torácica colocando una gota de crema depilatoria

(Nair, piel sensible) utilizando un isopo de algodón, la cual se retiró en un tiempo aprox. de 90 segundos utilizando gasas de algodón húmedas (agua 37°C). Los ratones depilados se colocaron en un tapete térmico, donde se les untó solución oftálmica (20% aceite mineral, 80% petrolato blanco, Soothe, Nighttime Bausch&Lomb) para protegerlos de la resequeidad y se repitió constantemente hasta que despertaron de la anestesia. Los ratones se fijaron utilizando cinta adhesiva en una posición simétrica, en patas delanteras y en la cintura, se fijó la posición de la caja torácica utilizando los dedos índices y anular. Cada ratón recibió una inoculación de 100 μL (10^5 células) utilizando una jeringa de 1mL con aguja de 26 gauges, la cual es insertada entre la tercera y cuarta costilla izquierda en posición vertical (ángulo de 90°). Cuando se observó el flujo sanguíneo en la aguja se prosiguió a inocular las células, el flujo sanguíneo es un indicador de que la jeringa se insertó en el ventrículo cardíaco izquierdo, al retirar la jeringa se mantuvo presionado el área por 30 segundos para evitar pérdida de sangre. Por último, los ratones se pasaron al tapete térmico y recibieron una dosis de 250 μL de PBS (37°C) para ayudarlos a mantenerse hidratados y a recuperarse de la anestesia y se les realizó un pequeño corte en la oreja para diferenciarlos (1ro. Derecha; 2do. Izquierda; 3ero. Ambas; 4to. Ambas en forma de "V" y el 5to. Sin corte). Cuando los ratones recuperaron la movilidad fueron transportados a sus cajas.

Para la inoculación intratibial, los ratones fueron anestesiados y depilados de las patas traseras en el área de la rodilla siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente. Se sujeto firmemente la pata trasera flexionada entre los dedos índice y el dedo pulgar, utilizando una jeringa de 0.3 mL con aguja de 29 gauges, se hizo presión y se insertó la aguja por debajo de la patela haciendo ligeros giros para perforar la cabeza de la tibia, al sentir que se perforo la tibia (deja de haber resistencia en el hueso) se cambió la jeringa por otra cargada con células RM-1 (104 células en 25 μL de PBS), los ratones se mantuvieron en tapete térmico y recibieron los mismos cuidados post-inoculación mencionados previamente. Los ratones recibieron tratamiento analgésico, buprenorfina (0.1mg/kg, cada 12h) por 48h posteriores a la inoculación.

Todos los ratones que recibieron inoculación fueron monitoreados diariamente. Entre diez y veintiún días después, se realizó la eutanasia de los ratones con una sobredosis de pentobarbital o ketamina/xilasina, seguido por dislocación cervical, posteriormente los huesos fueron colectados. Los ratones que murieron durante la inoculación intracardiaca o intratibial no fueron incluidos en los análisis, tampoco los que no presentaron evidencia de osteólisis o los ratones que recibieron eutanasia por razones éticas (pérdida de peso, signos de estrés, dificultad para respirar o parálisis) antes de finalizar del experimento.

2.2.2 Modelo de tumores en la glándula mamaria

Las células 4T1 se prepararon de la misma manera que para inoculación intracardiaca, pero se llevaron a una concentración final de 2 millones por mililitro. Los ratones hembras Balb/C de seis semanas de edad fueron inoculadas en la cuarta almohadilla mamaria con células 4T1 (10^5 células en 50 μ L de PBS) utilizando una jeringa de 300 μ L con una aguja de 29-gauge. Se realizó la medición del diámetro tumoral con un vernier dos veces por semana, el volumen tumoral fue calculado utilizando la ecuación 1.

$$\text{Volumen del tumor} = (L \times A^2)/2 \quad (1)$$

Donde L y A representan largo y ancho del tumor, respectivamente expresado en milímetros. Después de 31 días se realizó la eutanasia por sobredosis de pentobarbital, seguido por dislocación cervical. Se colectaron los tumores mamarios usando una navaja de bisturí se retiró toda la piel adyacente.

2.2.3 Eliminación de los linfocitos T *in vivo*

Para eliminar a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de 100 μ g de anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. El grupo control recibió 100 μ g de isotipo control IgG2. Todas las inyecciones fueron intraperitoneales con un volumen final de 100 μ L, cada 7 días, comenzando el día que los ratones fueron inoculados con las células cancerosas.

2.2.4 Transferencia adoptiva de linfocitos T

Para probar el efecto de los linfocitos T activados en modelos de metástasis ósea, se extrajo el bazo de ratones C57BL/6 (cepa C57BL/6N-Crl) sanos, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Por medio de maceración entre dos portaobjetos, se obtuvo una suspensión de las células de bazo, y se aislaron los linfocitos T utilizando un kit de aislamiento por selección negativa (Dynabeads Untouched mouse T cells, Invitrogen).

Los linfocitos T fueron cultivados en presencia de anticuerpos, anti-CD3 adsorbido al fondo de la placa y en suspensión (5 μ g/mL), y anti-CD28 (5 μ g/mL) por cuatro días, cambiando la mitad del medio cada dos

días. Se confirmó la activación de los linfocitos T por cambios morfológicos observados en el microscopio. Al cuarto día se recuperaron todos los linfocitos T, se lavaron y se resuspendieron en PBS para su inoculación intravenosa (10^6 células/20 μ L).

Los ratones receptores fueron ratones C57BL/6 con sistema inmune normal o desnudos (cepa Crl:NU/NU-nuBR) los cuales carecen de timo, por lo tanto, no tienen linfocitos T, ambas cepas se obtuvieron de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Cinco días antes de la transferencia adoptiva, los ratones receptores con sistema inmune normal, recibieron tratamiento con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 para eliminar a las poblaciones de linfocitos T. En ambos casos recibieron transferencia adoptiva de 5 millones de linfocitos T activados *ex vivo* en una de las venas laterales de la cola. Se analizaron muestras de sangre retro-orbital para caracterizar a los linfocitos T, por citometría de flujo 7 y 14 días después de la transferencia adoptiva.

2.2.5 Tratamientos *in vivo* sildenafil y ácido zoledrónico

Se ha reportado el uso de inhibidores de la fosfodiesterasa-5 (PDE5) como el sildenafil, talafil y vardenafil, son capaces de modular la respuesta inmune antitumoral. Disminuyendo las rutas inmunosupresivas, reduciendo significativamente la actividad de las enzimas ARG1 y NOS2, que participan en la generación de ROS, principalmente óxido nítrico (NO) de las MDSCs *in vitro* y en modelos de ratón de cáncer de colon, se restaura la inmunidad antitumoral (Serafini et al., 2006b).

Por medio de citometría de flujo se demostró que existe un incremento en las MDSCs en la metástasis ósea de 4T1, por lo tanto, se decidió probar el efecto del sildenafil (inhibidor de la PDE5) en la metástasis ósea de cáncer de mama 4T1.

El ácido zoledrónico monohidratado (Sigma) fue resuspendido en PBS. Los ratones fueron inoculados con PBS o con ácido zoledrónico, en una dosis de 25 μ g/kg (subcutáneo), tres veces por semana. El citrato de sildenafil (Sigma) fue resuspendido en una concentración de 100 μ g/ μ en dimetilsulfóxido (DMSO), para después ser diluido a 3.4 μ g/ μ L en una solución de PBS-polietilenglicol (PEG) 400 (relación 5:4), los ratones recibieron una dosis de 20 mg/kg cada dos días. Los tratamientos comenzaron un día después de la inoculación de las células 4T1.

2.2.6 Tratamiento *in vivo* con inhibidores de puntos de control inmunológicos y tratamientos antiresortivos

Para determinar si tratamiento con bloqueadores de los inhibidores inmunes podría aplicarse en la metástasis ósea, el primer paso es determinar, si estos receptores puntos de control inmunológicos están presentes en la metástasis ósea. Los receptores inhibidores están presentes en los linfocitos T como CTLA-4, PD1 o tim3, o sus ligandos en otras células como el PD-L1, en condiciones patológicas como el cáncer.

Para determinar si los linfocitos T u otras células de la metástasis ósea presentan estos receptores se utilizaron los siguientes anticuerpos unidos a fluorocromos: anti-CTLA-4 (UC10-4B9), anti-PD-1 (29F.1A12), anti-PD-L1 (10F.9G2) y anti-tim3. Éstos fueron probados en diferentes suspensiones celulares, de medula ósea y de bazo, de ratones con o sin metástasis ósea y se analizaron por citometría de flujo (Attune Focusing fluid cytometer).

Confirmamos la presencia de diferentes blancos terapéuticos para inmunoterapia, alta expresión de PD-L1 en más del 80% de los M-MDSCs y la alta expresión de PD-1 en más del 70% de los linfocitos T de la metástasis ósea. Sabemos que las lesiones osteolíticas son zonas ricas en TGF- β , el TGF- β tiene un papel inmunosupresor, por lo que también es un interesante blanco terapéutico. Por otro lado, el ácido zoledrónico sigue siendo uno de los tratamientos utilizados para la metástasis ósea por lo que se decidió probar en combinación con el anti-PD-L1.

Se probó el efecto de tratamiento con los anticuerpos contra los receptores inhibidores anti-PD-L1, anti-TGF β en la metástasis ósea de cáncer de mama. En el caso de la metástasis ósea el fin no es solo eliminar a las células cancerosas, también es importante proteger el hueso por lo que se pretende combinar con un tratamiento antirresortivo (ácido zoledrónico 5 μ g/kg), un tratamiento actual de pacientes con metástasis ósea. Por lo que se caracterizaron los efectos de una terapia combinada, tratamiento antiresortivo, con bloqueadores de los receptores inhibidores en la metástasis ósea de células 4T1.

Después de la eutanasia de los ratones, se obtuvieron los huesos y se analizó el área de osteólisis por medio de radiografías, para determinar si hubo un efecto de la inmunoterapia en la reducción de la osteólisis.

2.3 Ensayo de osteoclastogénesis

Las células de médula ósea fueron extraídas de los huesos de las patas traseras (la tibia y el fémur), pasando a través de los huesos una solución de medio RPMI completo con una jeringa de 1mL y una aguja de 26G. Después de una centrifugación (350g, 8min, 4°C), las células fueron resuspendidas en una solución para eliminar los eritrocitos (155mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 1mM EDTA). Las células mononucleares fueron lavadas en PBS (1x) y resuspendidas en medio RPMI completo. La cantidad de células vivas fue evaluada usando azul tripano, en una cámara de Neubauer. Se cultivaron 4x10⁴ células de médula ósea en medio α -MEM suplementado con 10% SFB (Biowest), M-CSF (25ng/mL, PeproTech), y RANKL (12.5-25 ng/mL, PreproTech or BioLegend) en placas de 96-pozos de fondo plano. La mitad del medio fue renovado cada dos días, las células fueron monitoreadas por microscopia, en búsqueda de células grandes. Después de 5-8 días de cultivo, las células se tiñeron para la actividad de la fosfatasa resistente al ácido tartárico (TRAP) y se contabilizó por microscopía el número de osteoclastos (células multinucleadas y TRAP⁺).

Se aislaron los linfocitos T del bazo por selección negativa empleando el kit Dynabeads Untouched mouse T cells (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el aislamiento de los linfocitos T de médula ósea, se empleó el kit Dynabeads Untouched mouse T cells para una selección negativa, seguido del kit MojoSort mouse CD3 selection (BioLegend) para una selección positiva. Se confirmó el porcentaje de linfocitos T aislados por citometría de flujo (lo cual se describe adelante). Para la activación ex vivo de los linfocitos T, estos se cultivaron en placas de 96-pozos cubiertos con anticuerpo anti-CD3 en medio RPMI suplementado con SFB (5% v/v), β -mercaptoetanol (55 μ M), anti-CD3 (5 μ g/mL) y anti-CD28 (5 μ g/mL). Los linfocitos T se transfirieron al ensayo de osteoclastogénesis un día después de sembradas las células de médula ósea.

2.4 Citometría de flujo

Se obtuvieron muestras de sangre, bazo y médula ósea de ratones que fueron inoculados o no con células cancerosas. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron por medio de punción del seno retrorbital utilizando tubos capilares heparinizados. Las células de médula ósea fueron preparadas acorde a lo descrito anteriormente. Las suspensiones celulares de células de bazo se obtuvieron por maceración del tejido, utilizando dos porta-objetos esmerilados. Los eritrocitos fueron removidos utilizando una solución de lisis de eritrocitos (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA). Las células vivas fueron contadas en azul tripano en una cámara de Neubauer y centrifugadas (350g, 8min,

4°C), se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de aislamiento (PBS 1X, 1% p/v BSA y 0.5 mM EDTA), antes de resuspenderlas en una solución de bloqueo que contiene True Stain Monocyte Blocker (5µL/10⁶ de células, BioLegend), anticuerpo anti-CD16/32 (1µg/10⁶ de células, clon 93, BioLegend) y SFB (10% v/v). Los linfocitos T fueron entonces teñidos usando anticuerpos fluorocromados contra CD90.2, CD3E, CD4, CD8α, CD62L, CD69, CTLA-4, PD-1 y/o TIM-3 de ratón.

Para el análisis de las células supresoras de origen mieloide (MDSCs), las células fueron cultivadas en presencia del CellROX Orange (12.5µM, Invitrogen) o DAF-2 diacetato (6.25µM, Cayman Chemical) por 30min, a 37°C.

Posteriormente, las células fueron cultivadas con solución de bloqueo, y se tiñeron marcadores extracelulares utilizando anticuerpos fluorocromados contra CD11b, Ly6C, Ly6G y PD-L1 de ratón. Los anticuerpos fueron comprados de eBioscience o Biolegend (Detalles presentados en el anexo A). Las células fueron lavadas y se resuspenden en buffer de aislamiento y fueron analizadas inmediatamente después, utilizando un citómetro de flujo Attune acoustic (Applied Biosystems). Controles de compensación con un solo fluorocromo fueron preparados utilizando células o gránulos de compensación OneComp eBeads (Invitrogen). Las muestras fueron analizadas utilizando el programa Attune (v2.1, Applied Biosystems). Las células individuales fueron seleccionadas a partir de un densitograma utilizando FSC-A vs FSC-H, y SSC-A vs SSC-H, posteriormente las células fueron seleccionadas utilizando el FSC-A vs SSC-A. Utilizando el mismo protocolo para tinción extracelular se tiñeron las células cancerosas utilizando un anticuerpo anti ratón H-2 (MHC-I). Los resultados de citometría fueron analizados entonces utilizando el Attune software (v2.1) o el FlowJo (v10.6, BD Bioscience).

2.5 MTT

Células de médula ósea de ratones sin linfocitos T fueron extraídas por flush de las tibias y fémures, acorde a lo descrito anteriormente, se cultivaron en presencia de M-CSF (25 ng/mL, Peprotech). Un día después se agregaron linfocitos T activados *ex vivo* por 5 días, con anticuerpos anti-CD3 (5 mg/mL) y anti-CD28 (5 ng/mL) o cultivados sin estímulos. Los co-cultivos se realizaron en las mismas condiciones que los ensayos de osteoclastogénesis, en placas de 96 pozos de fondo plano. Pero el quinto día del co-cultivo se agregó metil tiazol tetrazolio (MTT) (5 mg/mL) a cada pozo, se incubaron por 5 horas más (37°C, 5% CO₂, atmósfera húmeda). Se agregó un volumen de una mezcla de ácido clorhídrico (0.01M) con dodecilsulfato sódico (10% p/v) para detener la reacción de conversión de MTT a formazan y se incubaron por 16 horas en las

mismas condiciones. Finalmente, la placa se transfirió a un espectrofotómetro para microplacas Epoch, Biotek donde se realizó una lectura a 570nm.

2.6 Radiografías

Las imágenes por rayos X se realizaron en los huesos extraídos después de la eutanasia, utilizando un In-Vivo-Xtrem imaging system (Bruker) el cual se encuentra en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México). Se realizó la cuantificación del área de osteólisis en un ensayo ciego. Cada radiografía recibió un número aleatorio utilizando random.org previo a la medición de las lesiones basados en el área radioluciente, con el programa Image J (Schneider, et al., 2012).

2.7 Histología e histomorfometría de los huesos

Inmediatamente después de que los ratones fueran eutanizados, se extrajeron los huesos y se fijaron con una solución de formalina al 10% por 48h a 4°C, después de un lavado con PBS fueron almacenados en etanol al 70% hasta su procesamiento. Posteriormente fueron descalcificados en EDTA 10% m/v (0.34M) por dos semanas (renovando las soluciones cada tercer día). Los huesos fueron embebidos en parafina usando el procesador de tejidos STP 120-2 (Thermo Fisher Scientific) para realizar la deshidratación por gradientes ascendentes de etanol (80-100%), sustitución con xileno seguida por la infiltración de parafina y fueron colocados en moldes histológicos.

Los huesos embebidos en parafina fueron almacenados a 4°C hasta que fueron cortados de manera longitudinal, media-sagital con un grosor de 7µm de tibia y fémur, utilizando un micrótomo Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific). Los cortes se montaron en laminillas en un baño maría, se dejaron una noche en el horno a 60°C, previo a la desparafinación con limoneno y fueron rehidratados los cortes por concentraciones descendentes de etanol del 100 al 70%.

Las secciones de los tejidos, fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) o para detectar la actividad TRAP y preparados para el análisis histomorfométrico. Las imágenes fueron obtenidas utilizando una cámara Q-imaging CCD montada en un microscopio Axio Scope A1 (Zeiss). Los análisis histomorfométricos

fueron realizados también de manera aleatoria, donde los cortes histológicos recibieron números aleatorios antes de realizar el análisis utilizando Image J (Schneider, et al., 2012).

2.7.1 Inmunohistoquímica

Detectamos a los linfocitos T infiltrados en la metástasis ósea, con un análisis de inmunohistoquímica. Los huesos fueron procesados y embebidos en parafina acorde a lo mencionado previamente. Los cortes histológicos fueron montados en laminillas cargadas, se incubaron en el horno por una hora a 60° C, y almacenados a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Posterior a la desparafinación y rehidratación, los cortes fueron delimitados con una pluma hidrofóbica. Usamos pepsina (0.5% p/v en HCl 10mM, pH 2.0, Sigma) como revelador antigénico se incubó a 37°C por 37 min, se inhibió la actividad de las peroxidases endógenas con un tratamiento de peróxido de hidrogeno (3% v/v) se mantuvo a temperatura ambiente por 10 min. Para bloquear reacciones inespecíficas usamos un kit de bloqueo de avidin/biotin (Vector Laboratories) y una incubación con suero de cabra (3%v/v). Se incubó toda la noche el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-humano/ratón CD3 (Dako o Sigma) en dilución 1:400. Continuamos con la incubación del anticuerpo secundario biotinizado chivo anti-conejo en dilución 1:1000. Para conjugar la estreptavidina unido a peroxidases se usó el kit Elite ABC Vectastain (Vector Laboratories) y una contratinción con hematoxilina. Los portaobjetos se preservaron con resina y cubreobjetos, y se dejaron reposar por una noche. Se analizaron usando un microscopio óptico, los linfocitos T (células CD3⁺) se observaron de color púrpura en contraste con el tejido negativo que solo presenta el color de hematoxilina. Se utilizaron muestras de bazo como control positivo.

2.8 Aislamiento de RNA y RT-qPCR

Se criopreservaron los huesos de las patas traseras de ratones inoculados o no con células 4T1 en el ventrículo cardiaco izquierdo en Trizol (Thermo Scientific). Posteriormente los huesos fueron macerados utilizando un FAST-PREP (MP Biomedicals) en presencia de perlas de cerámica de 4mm de diámetro. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo, se continuó con los primeros pasos de la extracción con Trizol, pero la fase acuosa se pasó a una columna del kit para aislamiento Gene JET (Thermo Scientific), se extrajo el RNA total. La integridad del RNA se evaluó realizando una electroforesis en un gel de agarosa.

Por medio de la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Thermo Scientific) se preparó el DNA complementario (cDNA) usando un oligo (dT). El cDNA se utilizó para evaluar la expresión genética en tiempo real usando el Master mix HotStart-II SYBR Green qPCR (USB Affymetrix) y en un sistema 7500 PCR tiempo real (Applied Biosystems). La cuantificación relativa del mRNA requirió de una curva estándar con diluciones seriadas de templados de cDNA. La expresión genética fue normalizada usando el gen *Rpl32* de expresión constitutiva. Se evaluó la expresión de los genes reguladores de la osteoclastogénesis *Rankl* y *Opg* (secuencia de oligonucleótidos en anexo B).

2.9 Análisis estadístico

Para experimentos con ratones, se utilizó el menor número de ratones posible calculado utilizando Statement o plataformas en línea (statulator.com y biomath.info) asumiendo la probabilidad de error tipo I y tipo II como $\alpha=0.05$ y $\beta=0.20$, respectivamente. El error estándar de los diferentes parámetros fue obtenido de resultados previos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Prism v8 (GraphPad software). Se determinó la distribución normal de las muestras, utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación entre dos grupos se realizó una prueba t-Student de dos colas, o prueba de Mann-Whitney. La comparación entre 3 o más grupos se realizó con un análisis de varianza ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni o de Dunnett. Para respuestas que involucran más de dos variables, se utilizó un ANOVA de 2-vías con un post-test de Bonferroni o de Dunnett. Los resultados se presentan en cajas y bigote, con la media, el rango del intercuartil, y mostrando todos los resultados en puntos cuando $P \leq 0.05$ se consideró como una diferencia significativa.

Capítulo 3. Resultados

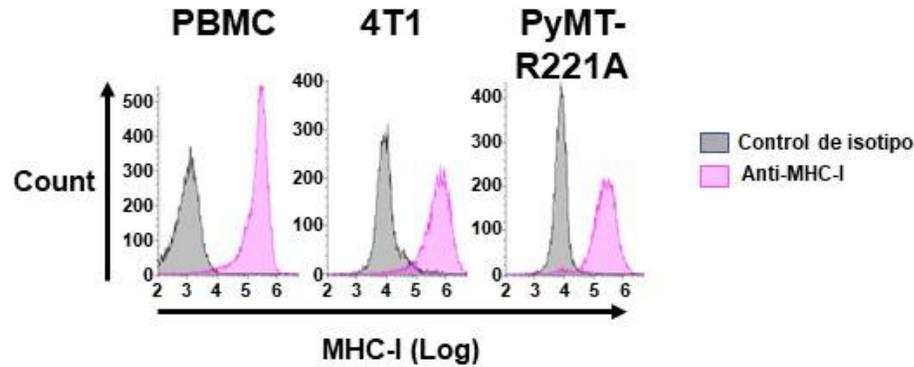
3.1 Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea de células 4T1

3.1.1 Los linfocitos T infiltran la metástasis ósea de 4T1 MHC-I⁺

Para analizar los efectos de los linfocitos T en la metástasis ósea, es necesario utilizar un modelo singénico, el cual consiste en la inoculación de líneas celulares de cáncer que fueron extraídas de un ratón de la misma cepa. Estos modelos nos permiten caracterizar las interacciones entre el sistema inmune y las células cancerosas. Para seleccionar un modelo útil para la búsqueda de nuestros objetivos, primero buscamos células cancerosas con expresión del MHC-I, molécula fundamental para la presentación de antígenos como los antígenos tumorales y el reconocimiento de las células cancerosas por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Para esto analizamos por citometría de flujo las líneas celulares de cáncer de mama de ratón PyMT-R221A y 4T1, usando como control positivo células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés). Se confirmó que ambas líneas celulares, 4T1 y PyMT-R221A, expresan el MHC-I (Figura 14 A). En consecuencia, decidimos probar si estas células de cáncer de mama hacen metástasis ósea y generan lesiones osteolíticas al inocularse en ratones de sus respectivas cepas.

Probamos la inoculación de las células PyMT-R221A en ratones hembras de la cepa FVB, debido a que la línea celular PyMT-R221A se extrajo de un tumor mamario de un ratón de la cepa FVB. Las células se inocularon de manera intracardiaca y ningún ratón presentó lesiones óseas. Al inocular a las células PyMT-R221A de manera intratibial si se observaron lesiones osteolíticas, sin embargo, solo en el 30% de los ratones inoculados (Arellano, 2016). Esto aumentaría el número de ratones que tendríamos que inocular para probar los efectos de los tratamientos y debido que los análisis de rayos X solo se pueden realizar al final del experimento, no fue posible continuar con el uso de este modelo por todas las complicaciones técnicas que involucraría.

A



B

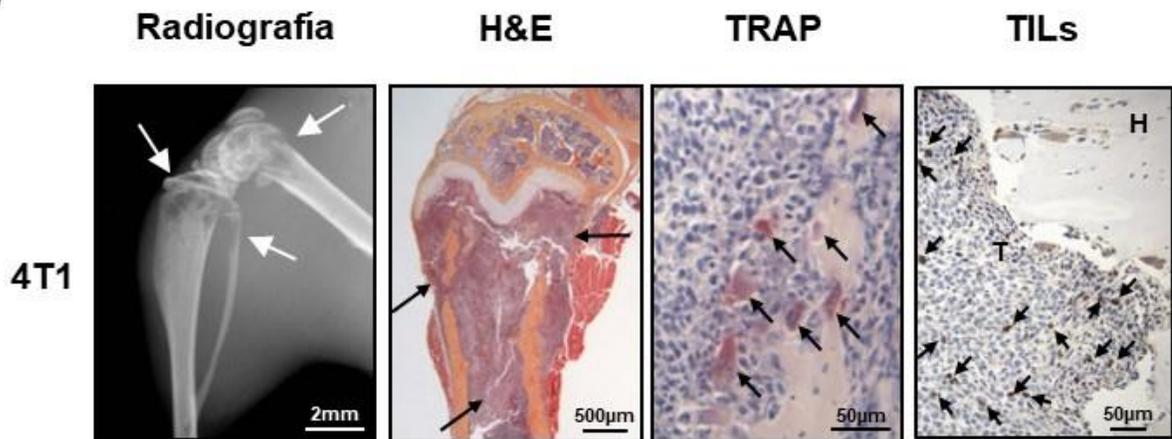


Figura 14 Presencia de linfocitos T infiltrados en la metástasis osteolítica de células de cáncer de mama 4T1 MHC-I⁺ en ratones. **A.** Análisis de la expresión de MHC-I, por citometría de flujo, en células mononucleares de sangre periférica de ratón (PBMCs por sus siglas en inglés), de cáncer de mama 4T1 y PyMT-R221A de ratón. **B.** Se inocularon células 4T1 en el ventrículo cardíaco izquierdo de ratones Balb/C hembras de 6 semanas de edad, para causar metástasis ósea. 10 días después se eutanisaron los ratones y se extrajeron los huesos de las patas traseras para su análisis. Los resultados se presentan como imágenes representativas de izquierda a derecha: radiografías de la patas traseras (donde las flechas indican el área de osteólisis), y de secciones de fémur teñidas con hematoxilina y eosina (H&E, las flechas indican la metástasis ósea), por la actividad de la fosfatasa resistente al ácido tartárico (TRAP por sus siglas en inglés, las flechas indican los osteoclastos), o inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-CD3 para detectar a los linfocitos T infiltrados en los tumores (TILs por sus siglas en inglés) (T, tumor; H, hueso; las flechas indican a los linfocitos T).

Continuamos con la inoculación de las células 4T1 en ratones hembras de la cepa Balb/C. Las células 4T1 fueron extraídas de un tumor mamario espontáneo de ratón Balb/C, las cuales presentan una alta capacidad metastática, por lo que la ATCC la describe como modelo de cáncer de mama en estado avanzado. Se inocularon las células 4T1 en el ventrículo cardíaco izquierdo de ratones Balb/C hembras, diez días después, los ratones fueron sacrificados, se colectaron y preservaron los huesos de las patas traseras. Los huesos se analizaron por rayos X y observamos la presencia de lesiones osteolíticas tanto en

la extremidad distal del fémur como en la extremidad proximal de la tibia (Figura 14 B). Los huesos se analizaron por histomorfometría, tinción de hematoxilina y eosina, se puede observar la masa tumoral en la médula ósea, caracterizado por tejido densamente poblado, desorganizado y de coloración naranja más intensa. La presencia de estos tumores se encuentra en las zonas con pérdida ósea observadas en las radiografías. Por medio de tinción de TRAP se observaron a los osteoclastos, cuyas características son células grandes multinucleadas, de coloración marrón-rojizo (TRAP⁺), localizados en la interface tumor-hueso. Por último, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica, con un anticuerpo primario anti-CD3 con el cual pudimos detectar la presencia de los linfocitos T infiltrados en la metástasis ósea causado por células 4T1 (Figura 14 B).

Estos resultados nos indican que las células de cáncer de mama 4T1 MHC-I⁺, hacen metástasis ósea, generan lesiones de tipo osteolíticas, y presentan infiltración de linfocitos T, lo que hace al modelo adecuado para analizar las interacciones entre los linfocitos T y la metástasis ósea.

3.1.2 Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea de células 4T1

Se comparó el desarrollo de metástasis ósea de células 4T1 inoculadas de manera intracardiaca en ratones hembras Balb/C, y administramos un tratamiento con anticuerpos para inducir la eliminación de los linfocitos T. Para confirmar el efecto del tratamiento se tomaron muestras de sangre retroorbital el día 7 postratamiento y se analizaron por citometría de flujo para detectar a las poblaciones de linfocitos T. Se cuantificaron las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y éstos representaron el 15.1±1.4% de las PBMCs de los ratones que recibieron el anticuerpo control versus 0.01%±0.01 que se detectó en el grupo que recibió anti-CD4 y anti-CD8 (Figura 15). El mismo efecto se generó en los linfocitos T CD8⁺ donde éstos representaron el 4.98%±0.51 de las células sanguíneas del grupo control versus <0.01% en los ratones del grupo con tratamiento. Es decir que el tratamiento indujo una reducción >99% de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 15 B).

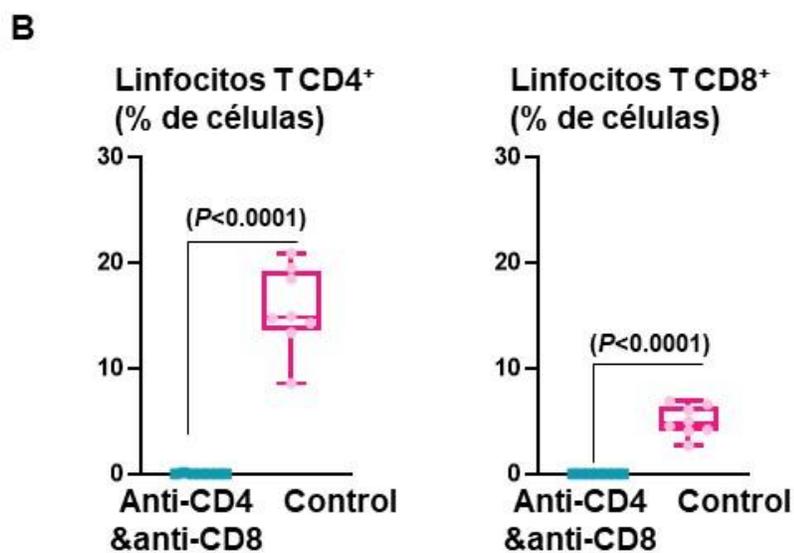
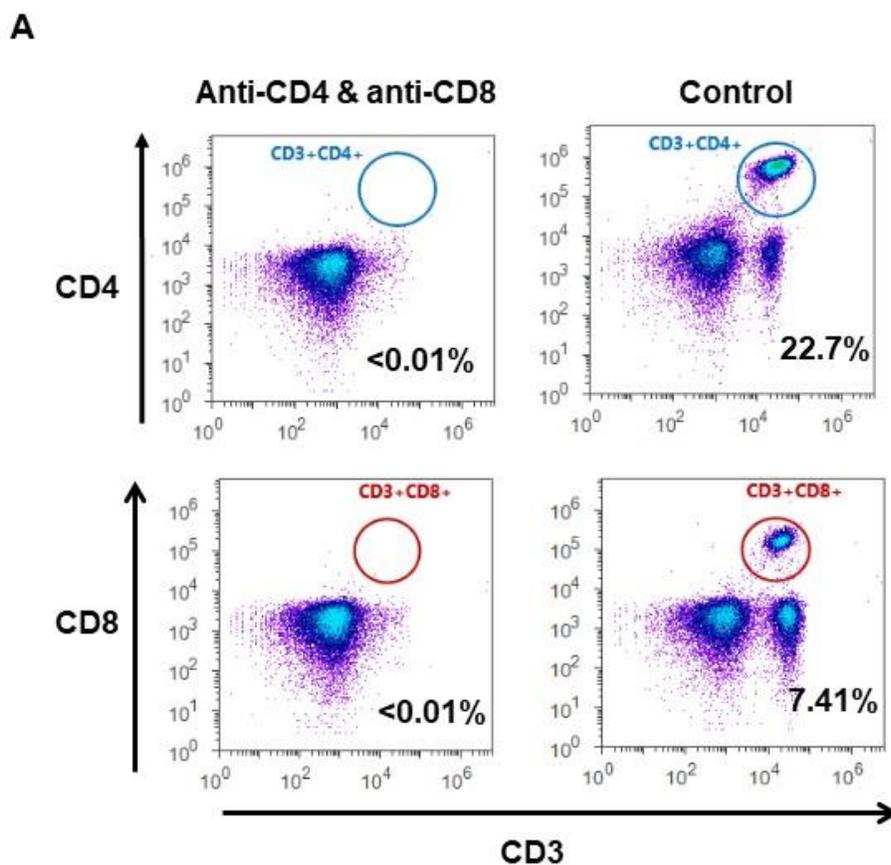


Figura 15 Depleción de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ positivos con tratamiento con anticuerpos. Se inocularon células 4T1 en el ventrículo izquierdo del corazón en ratones hembras Balb/C y recibieron tratamientos con 75µg de anticuerpos anti-CD4 y/o anti-CD8 o isotipo control, cada 7 días. **A.** Densitogramas representativos de los linfocitos T CD4⁺ y de los linfocitos T CD8⁺. **B.** Cuantificación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Los resultados se presentan en cajas y bigotes, se compararon con una prueba *t* de Student de dos colas.

Se analizaron los huesos post-mortem, 10 días después de la inoculación, por rayos X ambos grupos presentaron lesiones osteolíticas y fueron cuantificadas (Figura 16). Los linfocitos T indujeron un incremento del 83% en el área de osteólisis en los ratones con linfocitos T con respecto a los ratones sin linfocitos T ($3.0\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$ vs $1.64\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$) (Figura 16).

Se continuó con un análisis histomorfométrico, de secciones de huesos con tinción de hematoxilina y eosina para cuantificar el área tumoral y área del hueso. Los linfocitos T incrementaron el 38% del área tumoral en ratones con linfocitos T al compararlos con ratones sin linfocitos T, la diferencia fue muy cercana a la significancia estadística ($P=0.0648$) (Figura 17). Acorde a los resultados obtenidos con el área de osteólisis por radiografía, los linfocitos T generaron una disminución del 23% en el área del hueso con respecto a los ratones sin linfocitos T, y esta diferencia es altamente significativa ($P=0.0107$) (Figura 17).

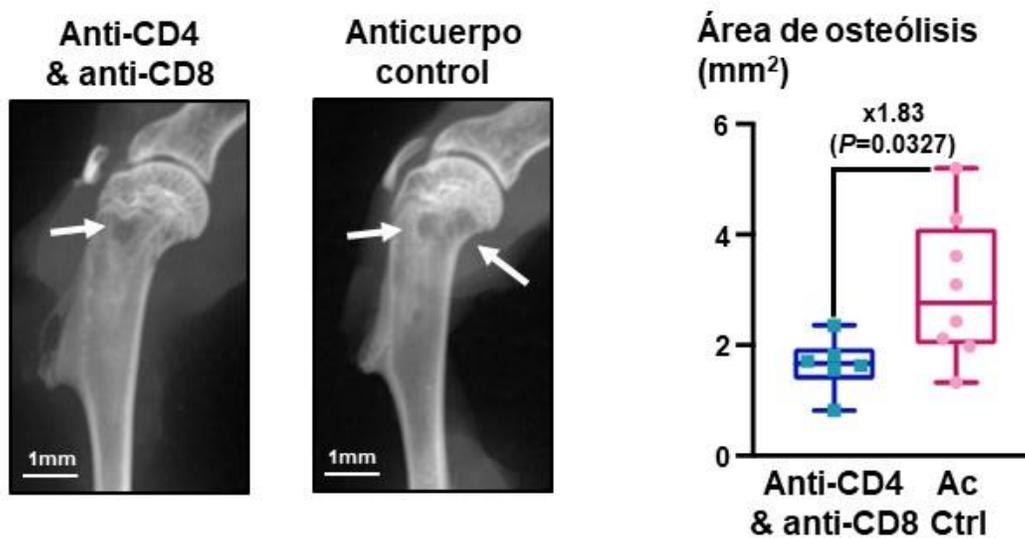


Figura 16 Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea de células 4T1. Células 4T1 fueron inoculadas en el ventrículo cardiaco izquierdo, de ratones Balb/C hembras de 6 semanas de edad, para causar metástasis ósea. Posterior a la inoculación, los ratones recibieron un tratamiento con anticuerpos control de isotipo o anti-CD4 y anti-CD8. 10 días posteriores a la inoculación fueron eutanizados y se extrajeron los huesos de las patas traseras para su análisis. (Izquierda) Radiografías representativas de las patas traseras, las flechas indican lesiones osteolíticas. (derecha) Cuantificación del área de osteólisis. Los resultados se presentan en cajas y bigotes, se compararon con una prueba *t* de Student de dos colas.

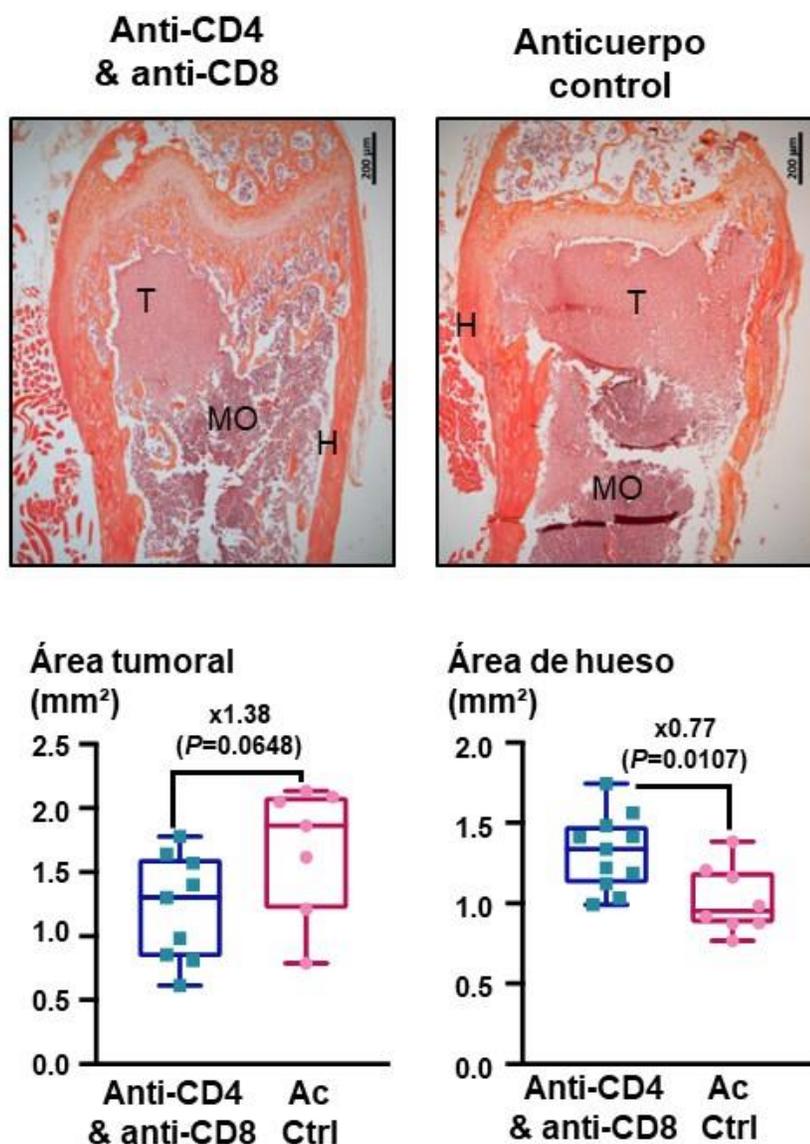


Figura 17 Los linfocitos T incrementan área tumoral y reducen el área del hueso. Secciones histológicas de los fémures de los ratones con inoculación intracardiaca de células 4T1 y tratamiento para eliminar a los linfocitos T, fueron procesados y teñidos con hematoxilina y eosina para su análisis histomorfológicos. (*arriba*) Fotografías representativas de secciones teñidas con H&E, donde T indica el tumor, H el hueso y MO la médula ósea. (*Abajo izquierda*) Cuantificación del área tumoral. (*Abajo derecha*) Cuantificación del área de hueso. Los resultados se presentan en cajas y bigotes, se compararon con una prueba *t* de Student de dos colas.

3.1.3 Los linfocitos T tienen un efecto anticancerígeno en tumores mamarios de células 4T1

Los linfocitos T incrementaron la metástasis ósea de 4T1, para determinar si el efecto procancerígeno de los linfocitos T estuvo influenciado por el microambiente de la metástasis ósea de células 4T1 o si la

presencia de las células cancerígenas 4T1 en un tumor mamario pueden afectar la función de los linfocitos T. Se comparó el crecimiento de tumores mamarios de células 4T1 en ratones con o sin linfocitos T. Inoculamos células 4T1 en las glándulas mamaria de ratones hembras, y posteriormente administramos tratamiento con anticuerpo control o con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, para la eliminación de los linfocitos T. Los ratones con linfocitos T presentaron una disminución significativa del ~20% del volumen tumoral con respecto a los ratones sin linfocitos T (Figura 18). Este efecto anticancerígeno de los linfocitos T, fue significativo y se mantuvo constante a partir del día 21 post-inoculación (Figura 18). Estos resultados demostraron que los linfocitos T tienen un efecto anticancerígeno en tumores mamarios y que el efecto procancerígeno está determinado por el microambiente de la metástasis ósea de células 4T1.

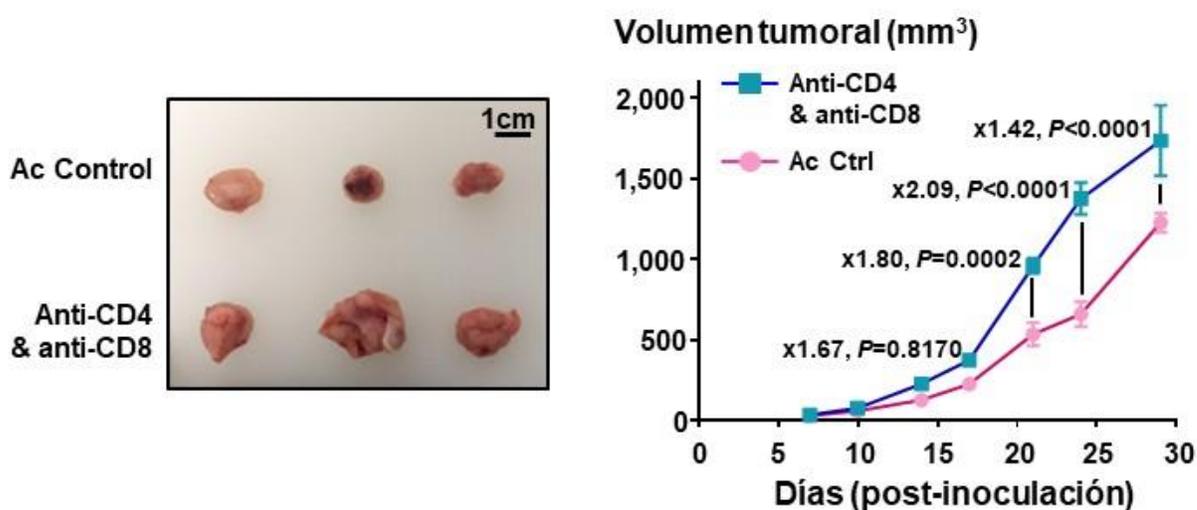


Figura 18 Los linfocitos T reducen los tumores mamarios de células 4T1. Se inocularon células 4T1 en la cuarta almohadilla de grasa mamaria, de ratones Balb/C hembras de 6 semanas de edad, para causar tumores mamarios. Posterior a la inoculación, los ratones recibieron un tratamiento con anticuerpos: control de isotipo o anti-CD4 y anti-CD8. Fotografía representativa de los tumores mamarios (*izquierda*), cuantificación del volumen tumoral (*derecha*). Cuantificación del volumen tumoral expresado en mm³, mediciones dos veces por semana, por 28 días. Resultados expresados en media \pm error estándar de la media (SEM), se analizaron usando un ANOVA de dos vías y prueba a posteriori de Bonferroni.

3.1.4 Modelos de metástasis ósea de cáncer de próstata

Los linfocitos T incrementan la metástasis ósea de células 4T1, para determinar si este efecto era específico del modelo, decidimos probar el efecto de los linfocitos T en otros modelos de metástasis ósea, al intentar establecer el modelo de metástasis ósea de la línea celular de cáncer de mama PyMT-R221A se observaron lesiones osteolíticas en <30% de los ratones inoculados intratibialmente (Arellano, 2016). La línea celular de melanoma B16-F1, genera metástasis ósea, pero no induce lesiones osteolíticas, y no presenta linfocitos

T infiltrados por lo que tampoco se utilizó. Continuamos en la búsqueda de otros modelos disponibles en el laboratorio, por lo que intentamos con líneas celulares de cáncer de próstata. Analizamos un par de líneas celulares de cáncer de próstata TRAMP-C1 y RM-1. Primero, caracterizamos la expresión del MHC-I con citometría de flujo, y se encontró que ambas líneas celulares presentan baja expresión del MHC-I comparado con las PBMCs (Figura 19).

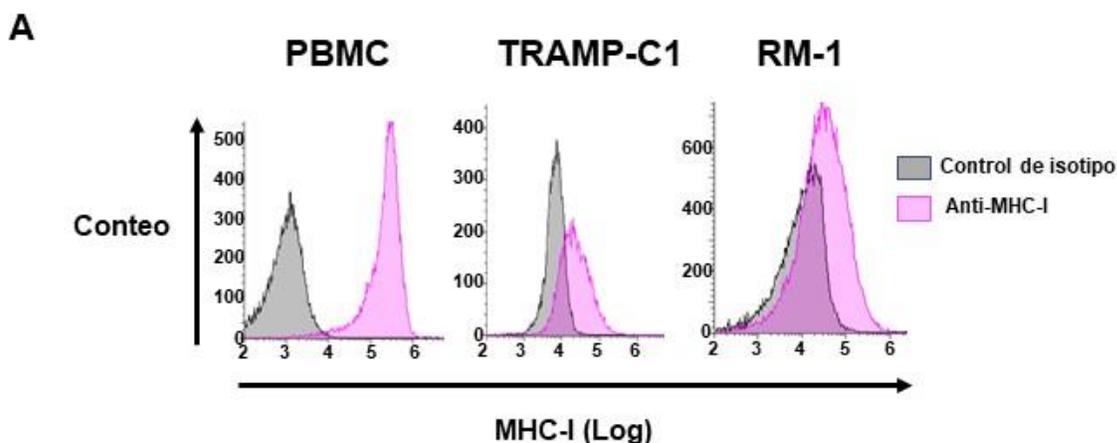


Figura 19 Análisis de expresión de MHC-I en líneas celulares de cáncer de próstata TRAMP-C1 y RM-1. Se analizó la expresión de MHC-I en líneas celulares de cáncer de próstata TRAMP-C1 y RM-1 de ratón, por citometría de flujo. Histogramas representativos de MHC-I.

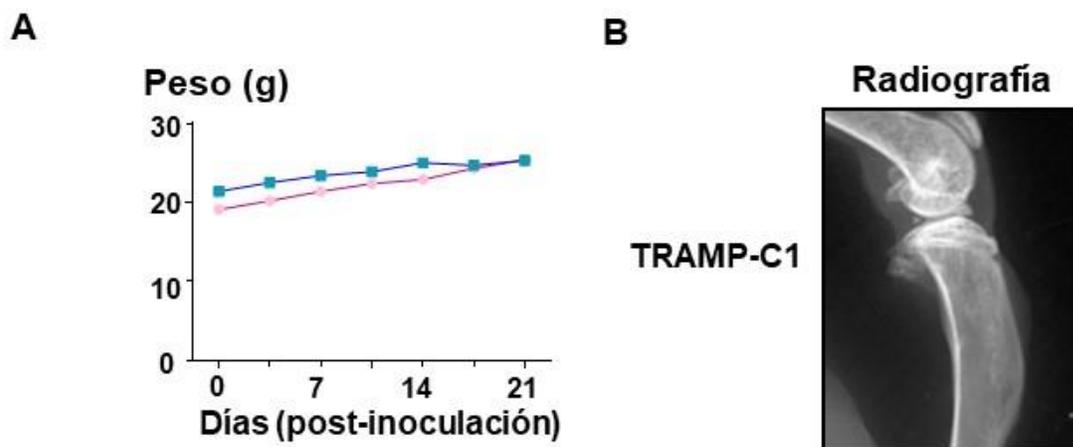


Figura 20 Inoculación de células TRAMP-C1 no generó lesiones óseas. Se inocularon células TRAMP-C1 en ratones machos C57BL/6 de manera intratibial. **A.** Se registró el peso de los ratones. **B.** Radiografías de las patas traseras 21 día post-inoculación.

Se inocularon células TRAMP-C1 de manera intratibial, los ratones no presentaron pérdida de peso (Figura 20 A) o algún signo de enfermedad, no desarrollaron lesiones osteolíticas (Figura 20 B), por lo que no se continuó con el uso de estas células.

Se inocularon células RM-1 de manera intratibial, generaron lesiones osteolíticas que podemos ver en las radiografías de las tibias (Figura 21). Con el análisis histológico, de secciones de hueso, usando la tinción de hematoxilina y eosina observamos la masa tumoral en la medula ósea. Con la tinción de TRAP, se detectaron los osteoclastos en la interfaz tumor-hueso (Figura 21). Debido a que la inoculación de células RM-1 generó lesiones osteolíticas y se detectaron osteoclastos en la interfase tumor-hueso continuamos con el uso de este modelo.

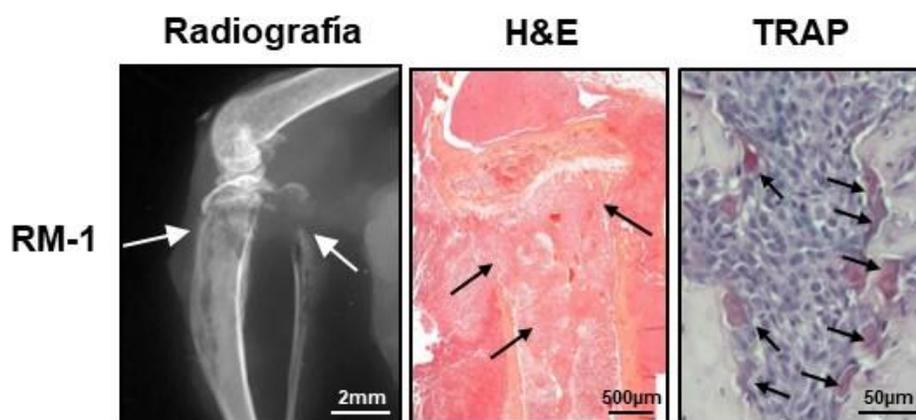


Figura 21 Modelo de metástasis ósea de cáncer de próstata, con células RM-1. Se inocularon células RM-1 en las tibias de ratones C57BL/6, 21 días después de la inoculación se analizaron los huesos de las patas traseras. Radiografía representativa, donde las flechas indican las lesiones osteolíticas. Secciones de las tibias se utilizaron para análisis histológico, con tinción de hematoxilina y eosina se observa la masa tumoral en la tibia, señalada por flechas. Utilizando la tinción de TRAP, se detectaron osteoclastos en la interfase del tumor y el hueso, OC señalados por flechas.

3.1.5 Los linfocitos T no tienen un efecto en la metástasis ósea osteolítica de cáncer de próstata RM-1

Decidimos comparar el desarrollo de la metástasis ósea de células RM-1 en ratones con y sin linfocitos T. Inoculamos células RM-1 de manera intratibial y administramos tratamiento con anticuerpos para inducir la eliminación de los linfocitos T. Los huesos se analizaron por radiografías post-mortem, 21 días después de la inoculación. Los linfocitos T no tuvieron un efecto en el área de osteólisis, no se observó una diferencia significativa entre los ratones con o sin linfocitos T (Figura 22 A, B). Usando secciones histológicas de los huesos, se realizó un ensayo de inmunohistoquímica para detectar linfocitos T, y no se

encontraron linfocitos T en la metástasis ósea de RM-1 (Figura 22 C). La ausencia de linfocitos T infiltrados en el tumor es consistente con el hecho de que los linfocitos T no tengan efecto en las lesiones osteolíticas de la metástasis ósea de células RM-1.

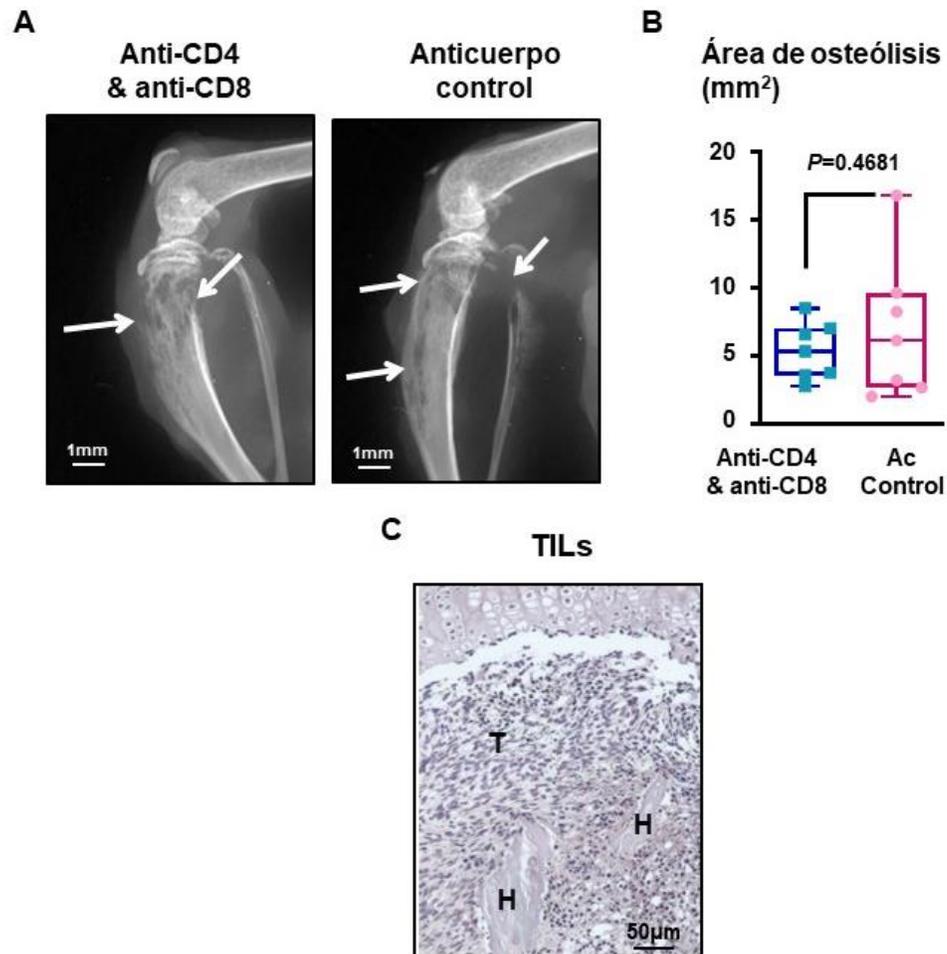


Figura 22 Los linfocitos T no tienen efecto en lesiones osteolíticas por células RM-1. Ratones machos C57BL/6 fueron inoculados de manera intratibial con células RM-1, posteriormente recibieron tratamientos con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8, para la eliminación de los linfocitos T. **A.** Radiografías representativas de las patas traseras, flechas indican lesiones osteolíticas. **B.** Cuantificación del área de osteólisis. Secciones de las tibias fueron procesadas para análisis de **C.** Inmunohistoquímica con anti-CD3.

3.1.6 Los linfocitos T de metástasis ósea incrementan la osteoclastogénesis *in vivo*

El ciclo vicioso de la metástasis ósea osteolítica, explica porque cualquier factor que incremente la resorción ósea, alimentará el ciclo vicioso teniendo como consecuencia mayor metástasis ósea. Por lo tanto, decidimos estudiar si los linfocitos T alimentan el ciclo vicioso de la metástasis ósea al favorecer la

osteoclastogénesis. Para lo cual comparamos el efecto de linfocitos T de médula ósea de ratones con o sin metástasis ósea de 4T1 en la osteoclastogénesis *ex vivo*. La adición de 10 mil linfocitos T de médula ósea generó un incremento del 5% comparado con la condición sin linfocitos T, esta diferencia no fue significativa ($P=0.999$). Mientras que la adición de 10 mil linfocitos T de médula ósea de ratones con metástasis ósea generó un incremento del 59% en el número de osteoclastos al compararlo con la condición sin linfocitos T, esta fue una diferencia altamente significativa ($P=0.01$), éste incremento fue del 51% al compararlo con la adición de 10 mil linfocitos T de ratón sin metástasis ósea, con una diferencia significativa de $P=0.023$ (Figura 23).

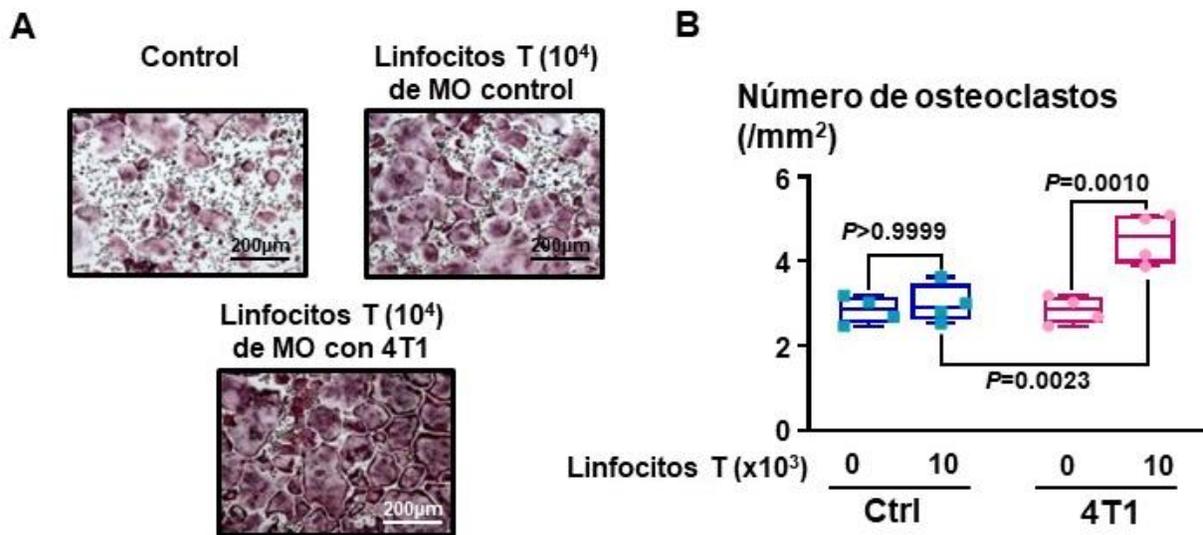


Figura 23 Los linfocitos T de la metástasis ósea de 4T1 son pro-osteoclásticos. Se aislaron linfocitos T de la médula ósea (MO) de ratones con o sin metástasis ósea de 4T1 y fueron co-cultivados con células de médula ósea en la presencia de M-CSF (25ng/mL) y RANKL (25ng/mL) para inducir la osteoclastogénesis. Los resultados se presentan con (A) fotografías representativas y (B) la cuantificación del número de osteoclastos (células multinucleadas TRAP⁺) por milímetro cuadrado. Los resultados son presentados en cajas y bigotes. Se analizaron por ANOVA de dos vías.

Se ha demostrado que los linfocitos T de metástasis ósea presentan un aumento en la expresión de *Rankl* en comparación con los linfocitos T de médula ósea sin metástasis ósea (Fournier, datos no publicados) (Figura 24 A), lo cual consiste con el aumento en el número de osteoclastos observado en los ensayos *in vivo*. Éste aumento de la expresión de *Rankl* también se observó en linfocitos T no activados al compararlos con linfocitos T activados *ex vivo* (Fournier, datos no publicados Figura 24 A). Lo que sugiere que los linfocitos T de metástasis ósea, no están activados. Se realizó un ensayo de osteoclastogénesis donde se agregaron linfocitos T no activados, para determinar si la expresión de *Rankl* era suficiente para inducir la osteoclastogénesis. Para lo cual se compararon diferentes cantidades de RANKL soluble en los co-cultivos y se observó que al contar con 25 ng/mL de RANKL no se observó una diferencia significativa al

agregar linfocitos T, pero al utilizar una cantidad subóptima 12.5 ng/mL de RANKL la presencia de los linfocitos T incrementa la cantidad de osteoclastos de manera significativa (Figura 24 B), pero en ausencia de RANKL los linfocitos T no son capaces de inducir la osteoclastogénesis (Figura 24 B). Estos resultados nos indican que los linfocitos T no activados, al igual que los linfocitos T de metástasis ósea expresan RANKL, pero no es el único factor por el cual podrían estar favoreciendo la osteoclastogénesis.

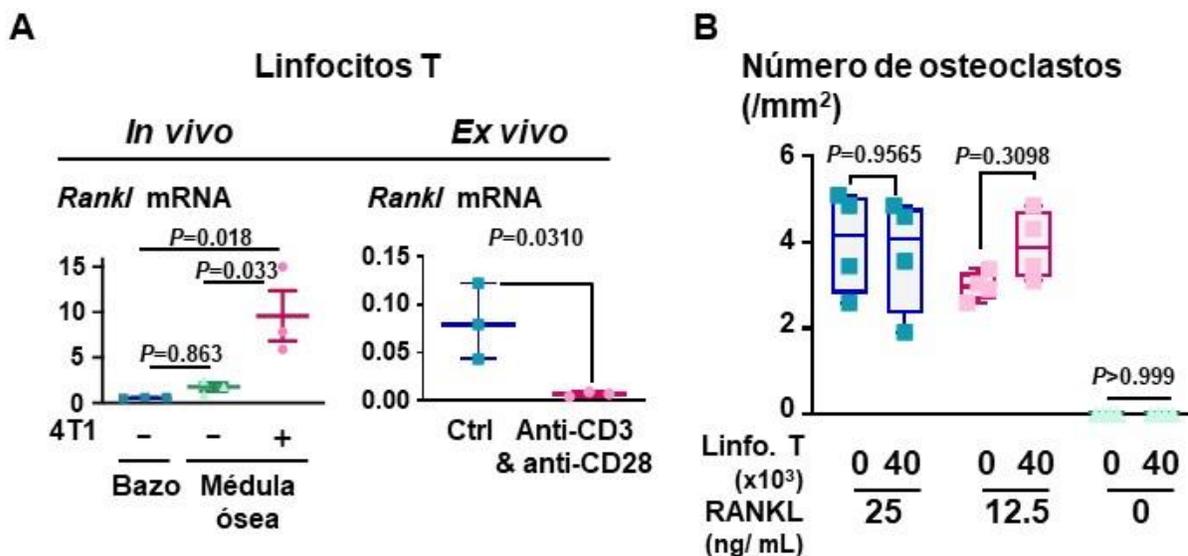


Figura 24 Los linfocitos T de la metástasis ósea de 4T1 presentan expresión de *Rankl* mRNA, similar a los linfocitos T no activados. **A.** Se presenta la expresión de *Rankl* mRNA (Fournier, datos no publicados) en linfocitos T; *in vivo* aislados de bazo y de médula ósea, de ratones con o sin inoculación de células 4T1, *ex vivo* después de cultivarse en condiciones de activación o no. **B.** Se agregaron linfocitos T no activados en un ensayo de osteoclastogénesis de células de médula ósea, en presencia de M-SCF y en concentraciones descendentes de RANKL soluble. Cuantificación de osteoclastos por mm². Resultados presentados en cajas y bigotes. Analizados con ANOVA de una vía y prueba t de Student (*in vivo*) ANOVA de dos vías.

3.2 Los linfocitos T no activados incrementan la osteoclastogénesis *ex vivo* mientras que los linfocitos T activados inhiben la osteoclastogénesis

Comparamos el efecto de los linfocitos T activados o no, en un ensayo de osteoclastogénesis *ex vivo*. Cuando se agregaron 40x10³ linfocitos T no activados incrementaron significativamente ($P=0.0214$) el número de osteoclastos, al compararlos con la condición sin linfocitos T (Figura 25 A-B), este efecto fue similar al presentado por los linfocitos T de metástasis ósea de células 4T1. En contraste, los linfocitos T activados *ex vivo* usando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, con solo 1.25x10³ linfocitos T, se generó una inhibición del 95% de los osteoclastos ($P=0.0001$) (Figura 25 B).

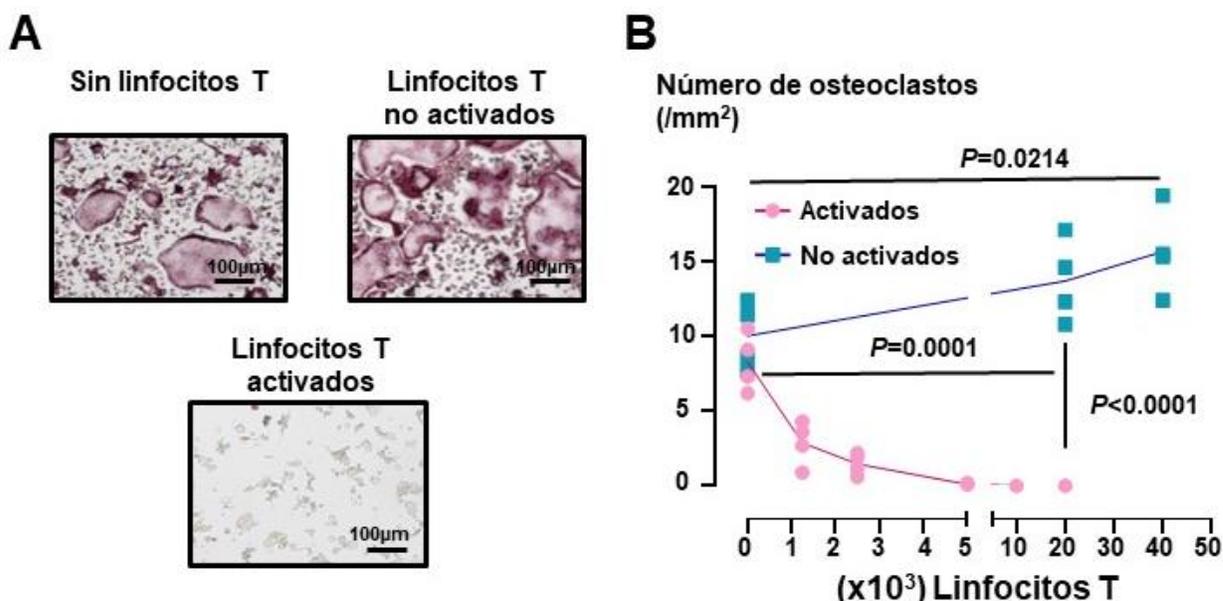


Figura 25 Los linfocitos T activados inhiben la osteoclastogénesis *ex vivo*. Se cultivaron células de médula ósea de ratón con depleción de linfocitos T en presencia de M-CSF y RANKL (25ng/mL), se agregaron linfocitos T activados *ex vivo* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, por 7 días o sin activar en diferentes cantidades (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 x10³), 6 días posteriores al co-cultivo, se realizó una tinción de TRAP para identificar a los osteoclastos. **A.** Fotografías representativas de los osteoclastos en las diferentes condiciones. **B.** Cuantificación de los osteoclastos en las diferentes condiciones. Resultados expresados en promedio \pm SEM.

Decidimos probar los subgrupos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ para saber si tenían diferentes efectos sobre los osteoclastos, así que aislamos linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺, y los cultivamos presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 para su activación *ex vivo*, y posteriormente se agregaron al cultivo. Al agregar 20x10³ linfocitos T no activados; los linfocitos T CD8⁺ no activados presentaron un incremento del 59.2% ($P=0.007$), este efecto pro-osteoclastogénico fue más fuerte que el de los linfocitos T CD4⁺ los cuales generaron un incremento del 46.1% ($P=0.039$), aunque la diferencia entre estas no es significativa ($P=0.742$). Por lo tanto, ambos tipos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ no activados presentan actividad pro-osteoclástica.

Para confirmar que los linfocitos T activados tienen propiedades anti-osteoclásticas y que no estamos observando solo un efecto *bystander*, es decir un efecto citotóxico inespecífico, se cultivaron en las mismas condiciones y se analizó la viabilidad por un ensayo de MTT. Los resultados nos indican que no hay un efecto en la viabilidad al compararse con la presencia de linfocitos T no activados contra linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ o ambos activados (Figura 27).

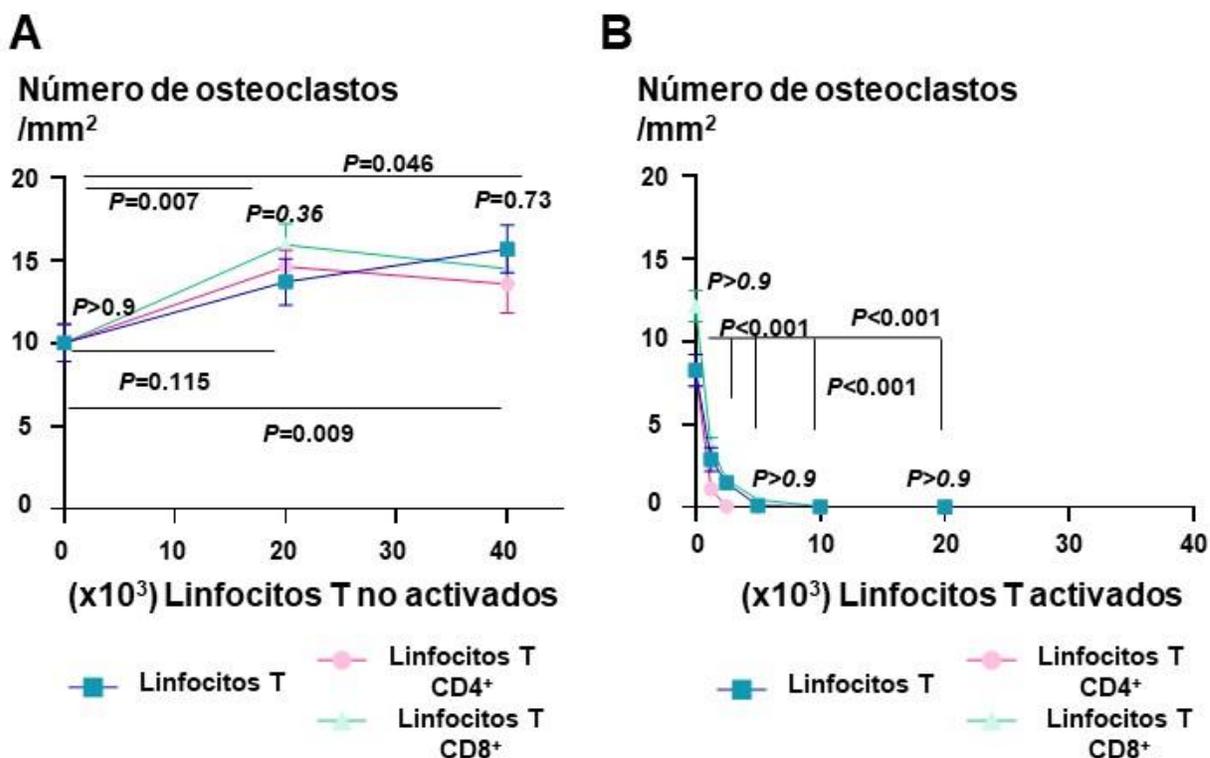


Figura 26 Efecto de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en la osteoclastogénesis. Se cultivaron células de médula ósea de ratón con depleción de linfocitos T en presencia de M-CSF y RANKL (25ng/mL), se agregaron linfocitos T no activados o activados, 6 días posteriores al co-cultivo, se realizó una tinción de TRAP para identificar a los osteoclastos. **A.** Se agregaron (20, 40 x10³) linfocitos T, CD4⁺ o CD8⁺ no activados. **B.** Se agregaron (1.25, 2.5, 5, 10, 20 x10³) linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ activados ex vivo con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Resultados expresados en promedio ±SEM. Analizados con un ANOVA de 2-vías, con un post-test de Dunnet.

Una vez que se confirmó que los efectos observados no eran citotóxicos, nos sugiere que el mecanismo por el cual los linfocitos T inhiben la osteoclastogénesis puede ser a través de la secreción de citocinas como el IFN γ y la IL-4. Decidimos probarlo agregando anticuerpos neutralizantes de IL-4 e IFN γ , a un ensayo de osteoclastogénesis, con 10 y 20 mil linfocitos T activados.

Los resultados nos indican que mientras que los anticuerpos anti-IFN γ y anti-IL4 no tuvieron un efecto en el número de osteoclastos al utilizarse de forma individual (Figura 28). Sin embargo, la combinación de los anticuerpos inhibe parcialmente la actividad anti-osteoclastogénica de los linfocitos T activados (Figura 28). Lo cual es consistente con observaciones previas.

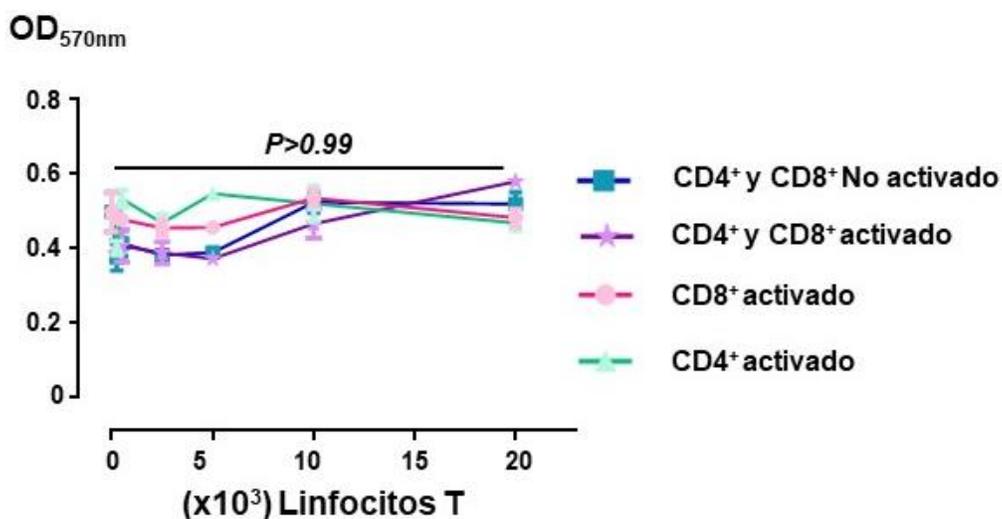


Figura 27 Efecto de linfocitos T en la viabilidad de células de médula ósea en osteoclastogénesis *ex vivo*. Se cultivaron células de médula ósea de ratón con depleción de linfocitos T en presencia de M-CSF y RANKL (25ng/mL), se agregaron linfocitos T activados *ex vivo* con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, por 7 días o sin activar en diferentes cantidades (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 x10³), 6 días posteriores al co-cultivo, se realizó el ensayo MTT. Resultados se presentan como promedio \pm SEM. Fueron analizados con un ANOVA de dos vías, con prueba a *posteriori* de Sidak.

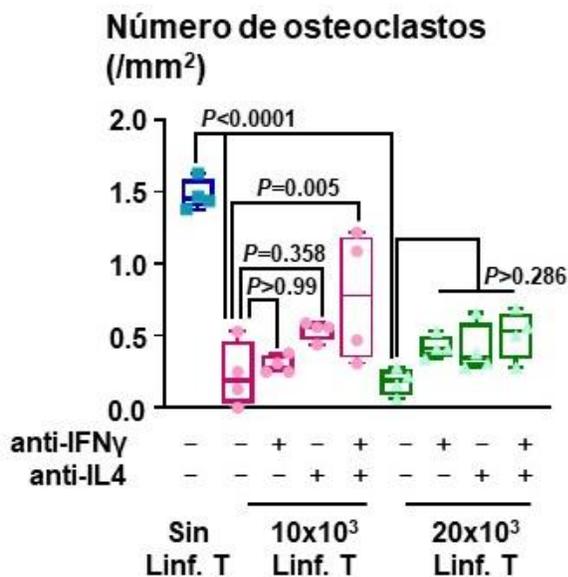


Figura 28 Neutralización de las citocinas IFN γ e IL-4 revierte efecto anti-osteoclástico de los linfocitos T activados. Linfocitos T activados se agregaron a un cultivo de células de médula ósea en presencia de M-CSF (25 ng/mL) y RANKL (25 ng/mL), y recibieron un tratamiento con anticuerpos anti-IFN γ y/o anti-IL-4. Cinco días después se realizó a tinción de TRAP y se cuantificó a los osteoclastos. Los resultados se presentan en cajas y bigotes. Analizados usando un ANOVA de dos vías, con prueba a *posteriori* de Sidak.

Por lo tanto, parece que los linfocitos T tienen efectos contrastantes en la osteoclastogénesis: los linfocitos T no activados favorecen la formación de osteoclastos, mientras que los linfocitos T activados la inhiben. Estos resultados nos sugieren que los linfocitos T en la metástasis ósea no están activados.

3.3 La transferencia adoptiva de los linfocitos T

Los linfocitos T tienen la capacidad de reconocer a las células tumorales de manera específica y eliminarlas, sin embargo, cuando el cáncer ha logrado hacer metástasis es porque ha logrado evadir al sistema inmune. En esta técnica se potencia esta capacidad, se aíslan a los linfocitos T de los pacientes con cáncer, se cultivan y expanden en vivo, o se modifican genéticamente, y se transfieren por vía intravenosa al paciente. Esta terapia está aprobada por la Agencia Federal Estadounidense, Administración de comida y fármacos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de linfoma de células B en adultos en abril de 2022 (Food and Drug and Administration, 2022).

Decidimos estandarizar esta técnica para probar el efecto de la transferencia adoptiva de los linfocitos T en la metástasis ósea, tomamos linfocitos T de bazo de ratones donadores hembras de 6 semanas de edad (C57BL/6) fueron activados ex vivo por cuatro días, se lavaron y se inocularon intravenosamente los ratones C57BL/6 que tienen un sistema inmune normal, por lo que vemos que el día -7 presentan un porcentaje esperado de linfocitos T (25-30%) (Figura 29), recibieron tratamiento con anticuerpos contra CD4 y CD8 para eliminar ambas poblaciones y vemos que el día 0 presentan linfocitos T (0.5-1%) el tratamiento fue exitoso para eliminar a los linfocitos T y poder hacer la transferencia adoptiva de los linfocitos T activados ex vivo. Se monitoreo por una semana los niveles de linfocitos T en PBMCs y al comparar los porcentajes de linfocitos T en el ratón con transferencia adoptiva con el ratón sin transferencia, se observó que los linfocitos comenzaron a subir, pero muy similar al ratón que solo recibió tratamiento con anticuerpos para eliminar a los linfocitos T (Figura 29 B) por lo tanto esta técnica no nos permite identificar de manera específica a los linfocitos T de transferencia adoptiva.

Se decidió probar entonces la transferencia adoptiva en ratones inmunodeficientes, desnudos de la cepa Crl:NU/NU-nuBR, los cuales al no tener timo carecen de linfocitos T. Se analizó una muestra de sangre retroorbital el día de la transferencia y se confirma que no hay linfocitos T endógenos (Figura 30), y se prosiguió con la transferencia adoptiva de 5 millones de linfocitos T activados ex vivo. Dos días posteriores a la transferencia se detectaron 5% de linfocitos T en PBMCs (Figura 30), sin embargo, el día 9 el porcentaje

de linfocitos T era de 4.9% (Figura 30), es decir que la población de linfocitos T no estaba expandiéndose en el ratón receptor y no se continuo con el uso de este modelo.

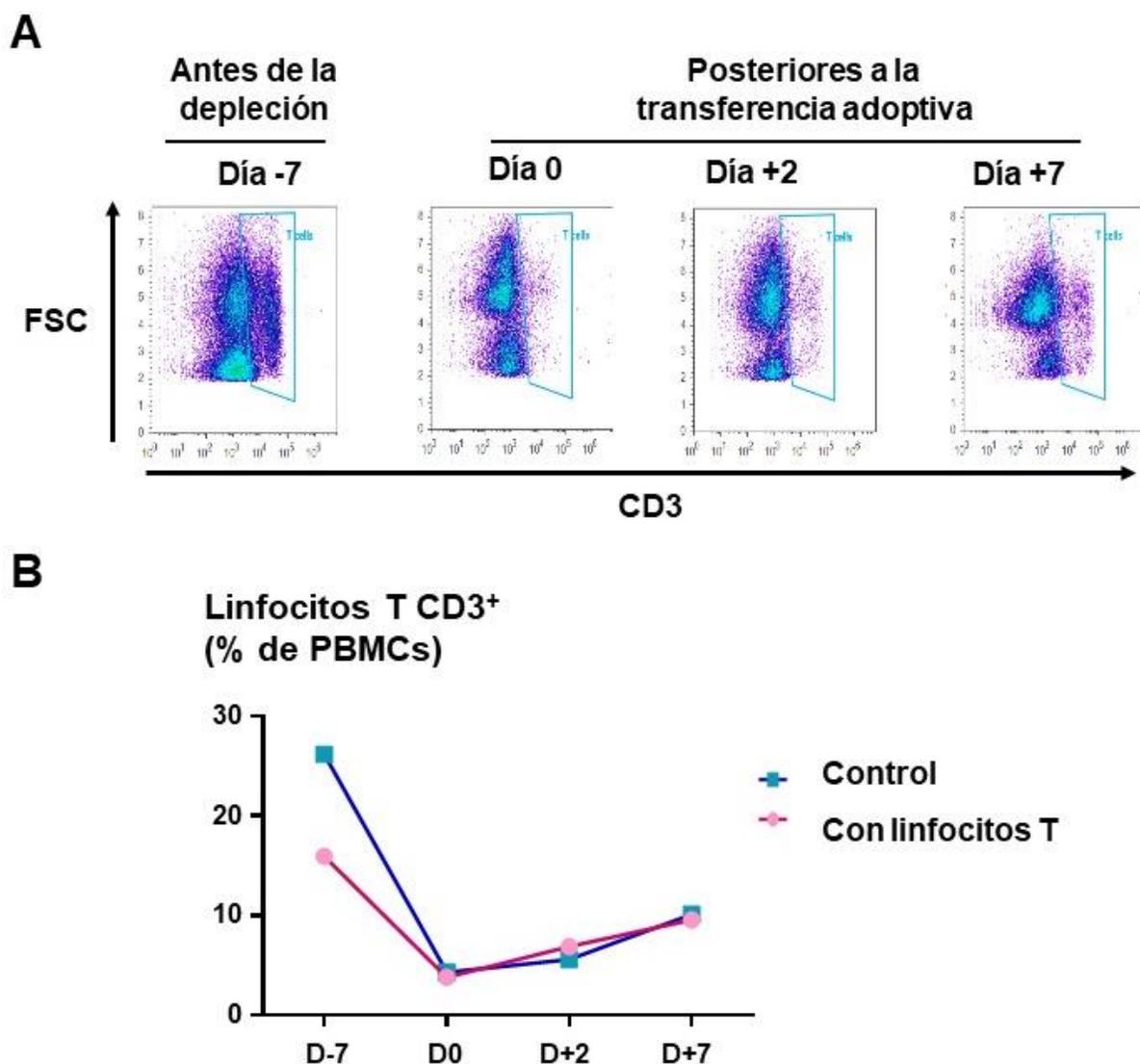


Figura 29 Transferencia adoptiva de linfocitos T en ratones C57BL/6. Ratones machos C57BL/6 recibieron un tratamiento con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 para eliminar a los linfocitos, 7 días después recibieron transferencia adoptiva de linfocitos T activados *ex vivo*. Se analizaron muestras de sangre retroorbital por citometría de flujo para cuantificar a los linfocitos T. **A.** Densitogramas representativos de la población de linfocitos T en PBMCs. **B.** Cuantificación de linfocitos T en PBMCs.

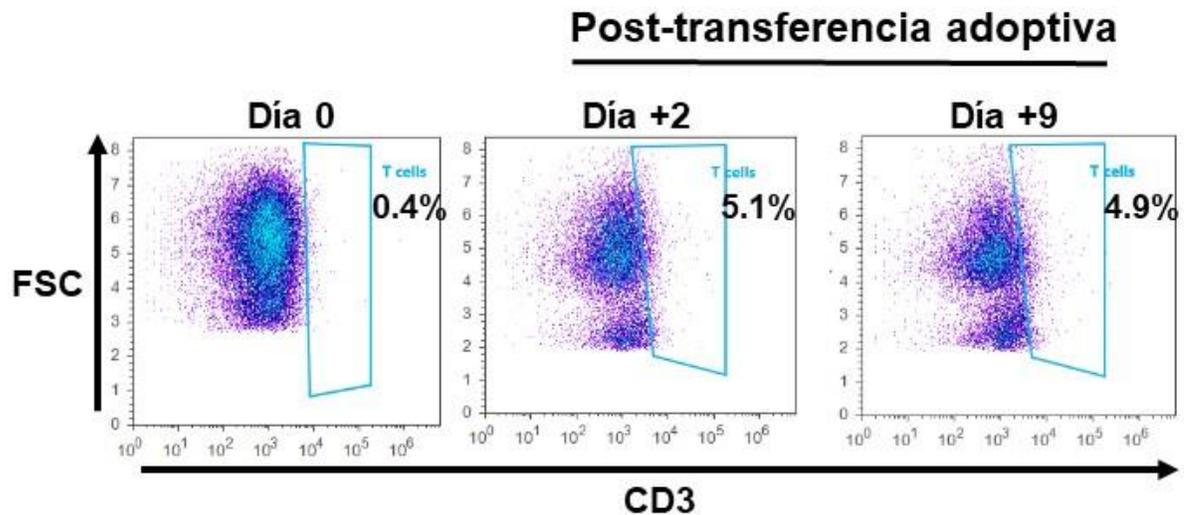


Figura 30 Transferencia adoptiva de linfocitos T activados en ratón inmunodeficiente. Ratones desnudos recibieron inoculación de 5×10^6 de linfocitos T activados *ex vivo*. Se analizaron por citometría de flujo muestras de sangre retroorbital. Densitogramas representativos.

3.4 Los linfocitos T de metástasis ósea no están activados y son resistentes a los estímulos de activación *ex vivo*

Para saber si los linfocitos T estaban activados en la metástasis ósea de 4T1, utilizamos el citómetro de flujo para caracterizar la expresión del CD69 un marcador de activación temprano, y el CD62L un marcador tardío el cual se deja de expresar en linfocitos T activados. La población de linfocitos T en la médula ósea de ratón libre de cáncer es de 0.64% ($\pm 0.04\%$) y la presencia de metástasis ósea de 4T1 causa que disminuyan significativamente a 0.26% ($\pm 0.01\%$) linfocitos T (Figura 31 A-B). En la metástasis ósea de 4T1, se presenta un incremento de los linfocitos T CD62L⁻ con respecto al grupo libre de cáncer ($31.38 \pm 8.28\%$ vs $23.5 \pm 3.71\%$), sin embargo, estas diferencias no son significativas ($P=0.0649$) (Figura 31 C). De manera similar, hubo incremento no significativo en el porcentaje de linfocitos T CD69⁺ ($13.95 \pm 3.53\%$ vs $4.50 \pm 0.92\%$, $P=0.0540$) (Figura 31 D).

En conjunto estos resultados indican que solo una pequeña fracción de los linfocitos T están activados ($\sim 15\%$ CD69⁺ o $\sim 30\%$ CD62L⁻) en la metástasis ósea de 4T1 mientras que la gran mayoría de los linfocitos T ($>70-85\%$) que se encuentran en la médula ósea no están activados (Figura 31), lo cual es consistente con su efecto pro-osteoclastico observado *in vivo*.

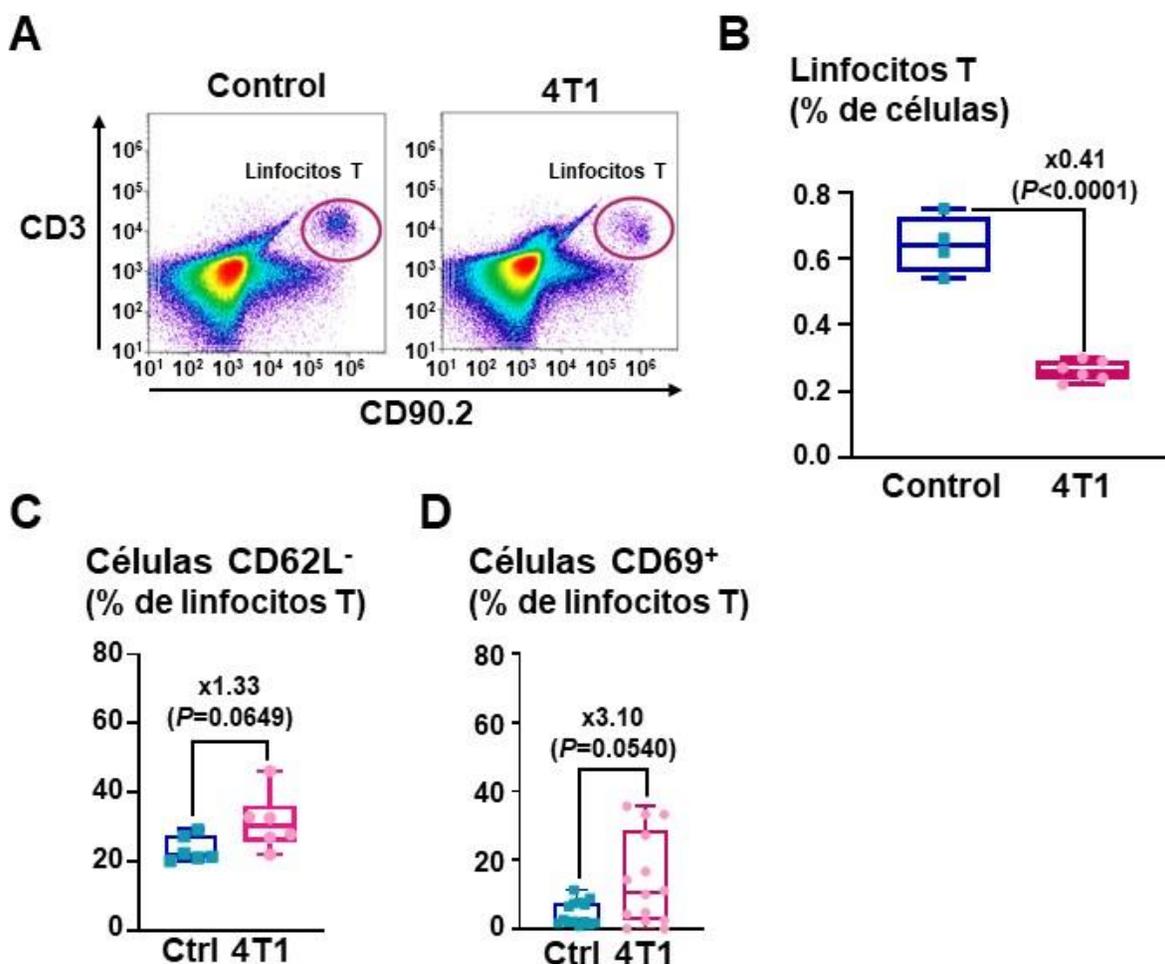


Figura 31 Los linfocitos T de metástasis ósea de cáncer de mama 4T1 no están activados. Se analizaron por medio de citometría de flujo muestras de médula ósea de ratones con o sin metástasis ósea de 4T1. **A.** Densitogramas representativos de los linfocitos T (CD3⁺, CD90.2⁺), **B.** Cuantificación de linfocitos T. Se analizaron por citometría de flujo marcadores de activación de los linfocitos T. **C.** Cuantificación de linfocitos T negativos para CD62L. **D.** Cuantificación de linfocitos T positivos para CD69. Resultados presentados en graficas de cajas y bigotes, analizados por una prueba de *t* de Student.

Para determinar si los linfocitos T de metástasis ósea pueden ser activados, cultivamos células de médula ósea de ratones con metástasis ósea en condiciones de activación ex vivo por una noche y evaluamos la expresión de CD69. Ninguna de las condiciones probadas, ni la Concanavalina A ni los anticuerpos agonistas anti-CD3 y anti-CD28 pudieron inducir la activación de los linfocitos T de la médula ósea con metástasis ósea, mientras que los linfocitos T de bazo fueron activados en las mismas condiciones (Figura 32). Por lo que, estos resultados sugieren que los linfocitos T están suprimidos por el microambiente de la metástasis ósea.

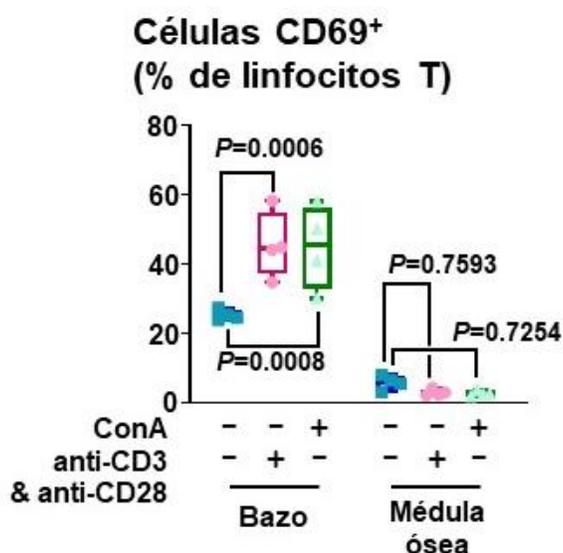


Figura 32 Los linfocitos T de metástasis ósea no responden ante estímulos para activación *ex vivo*. Se cultivaron células de bazo y médula ósea de ratones control o con metástasis ósea de 4T1, en presencia de estímulos de activación de linfocitos T, concanavalina (ConA) y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, 24h después se analizó por citometría de flujo, la presencia del marcador de activación CD69. Cuantificación de linfocitos T CD69⁺ en las diferentes condiciones. Resultados son presentados en cajas y bigotes. Analizados con un ANOVA de 2-vías, con una prueba a *posteriori* de Sidak.

3.5 Hay un incremento en las MDSCs metabólicamente activas en la metástasis ósea de 4T1 y las MDSCs monocíticas son PD-L1⁺

Nuestro siguiente objetivo fue identificar factores inmunosupresores en la metástasis ósea. Durante el análisis de citometría de flujo de células de médula ósea de ratones con cáncer, observamos un incremento en una población celular de alta granularidad, característico del linaje mieloide. En pacientes con metástasis ósea de cáncer de mama o próstata se ha descrito un incremento de las células de origen mieloide supresoras (MDSCs), las cuales se caracterizan por tener una alta granularidad y presentar los marcadores CD11b y Gr1 (Bronte et al., 1998). Las MDSCs se dividen en dos subgrupos: MDSCs polimorfonucleares (PMN-MDSCs) las cuales presentan el siguiente fenotipo CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo}, y las MDSCs monocíticas (M-MDSCs) las cuales presentan un fenotipo CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi} (Bronte et al., 2016). Estas células tienen un efecto supresor de la activación de los linfocitos T. Por lo tanto, decidimos caracterizar la cantidad de MDSCs polimorfonucleares y monocíticas en la metástasis ósea de 4T1, presentes en el bazo y en médula ósea.

La inoculación intracardiaca de células 4T1 generó un incremento significativo de las células CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo} y CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi} en el bazo y en la médula ósea (Figura 33A). Como en la mayoría

de los modelos tumorales, las PMN-MDSCs fueron más abundantes que las M-MDSCs en el bazo ($26.4 \pm 3.0\%$ vs $3.0 \pm 0.2\%$), así como en la médula ósea ($44.7 \pm 2.9\%$ vs $6.6 \pm 0.5\%$) (Figura 33 B). Además de los marcadores fenotípicos, otras características funcionales se requieren para definir a las PMN y M-MDSCs, incluyendo su capacidad para producir especies reactivas de oxígeno (ROS) o intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) como el óxido nítrico (NO), respectivamente. Teñimos a las células de médula ósea con CellROX para detectar ROS confirmando que las $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{lo}$ presentan niveles más altos de ROS al compararlos con ratones sin inoculación de 4T1 y también es mayor la presencia de ROS al compararlos con las células $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hi}$ en la metástasis ósea (4 veces, $P < 0.0001$) (Figura 33 C). Para detectar NO, las células de médula ósea fueron teñidas con DAF-2 diacetato. La presencia de NO fue detectada en ambos subtipos de células en la médula ósea y sus niveles se incrementaron cuando los ratones fueron inoculados con las células 4T1. Acorde a lo descrito previamente, las células, $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hi}$ presentaron niveles más altos de NO al compararlos con las células $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{lo}$ (1.2 veces, $P = 0.008$) (Figura 33 D).

Compuestos como el Sildenafil, el cual es un inhibidor de la fosfodiesterasa-5, y fármacos antirresortivos como el ácido zoledrónico, han demostrado en modelos de cáncer de mama y de colon, que tienen un efecto para inhibir la función de las MDSCs y disminuir su cantidad (Lin et al., 2017; Serafini et al., 2006b). Por lo tanto, probamos el efecto de estos tratamientos solos o en combinación en ratones con metástasis ósea de 4T1. El objetivo de inhibir a las MDSCs, es para proteger a los linfocitos T y su capacidad de ser activados, para poder cumplir con su función efectora. Por lo tanto, analizamos el efecto del tratamiento con sildenafil y ácido zoledrónico en las poblaciones de linfocitos T en ratones con metástasis ósea de células 4T1. Usando citometría de flujo, encontramos que el tratamiento con sildenafil y ácido zoledrónico incrementaron significativamente en 43% la población de linfocitos T de metástasis ósea (Figura 34 A). Decidimos buscar si afectaba la activación de los linfocitos, buscamos la expresión del marcador de activación CD69, y observamos que el tratamiento no tuvo efecto en la activación in vivo (Figura 34 B). No están activados in vivo, pero podrían estar menos suprimidos, lo cual decidimos probar al cultivar linfocitos T de metástasis ósea con o sin tratamiento en condiciones de activación por una noche. Al medir el marcador de activación CD69, encontramos que el tratamiento con sildenafil y ácido zoledrónico favoreció la respuesta de los linfocitos T de metástasis ósea a ser activados, éstos es decir los linfocitos T $CD69^+$ incrementaron 38% (Figura 34 C) al cultivarse en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, mientras que los cultivados en presencia de ConA se incrementaron un 52% (Figura 34 C). Por lo tanto, el tratamiento combinado tiene un efecto en los linfocitos T, decidimos probar el efecto del tratamiento directamente en el área de osteólisis y en las MDSCs.

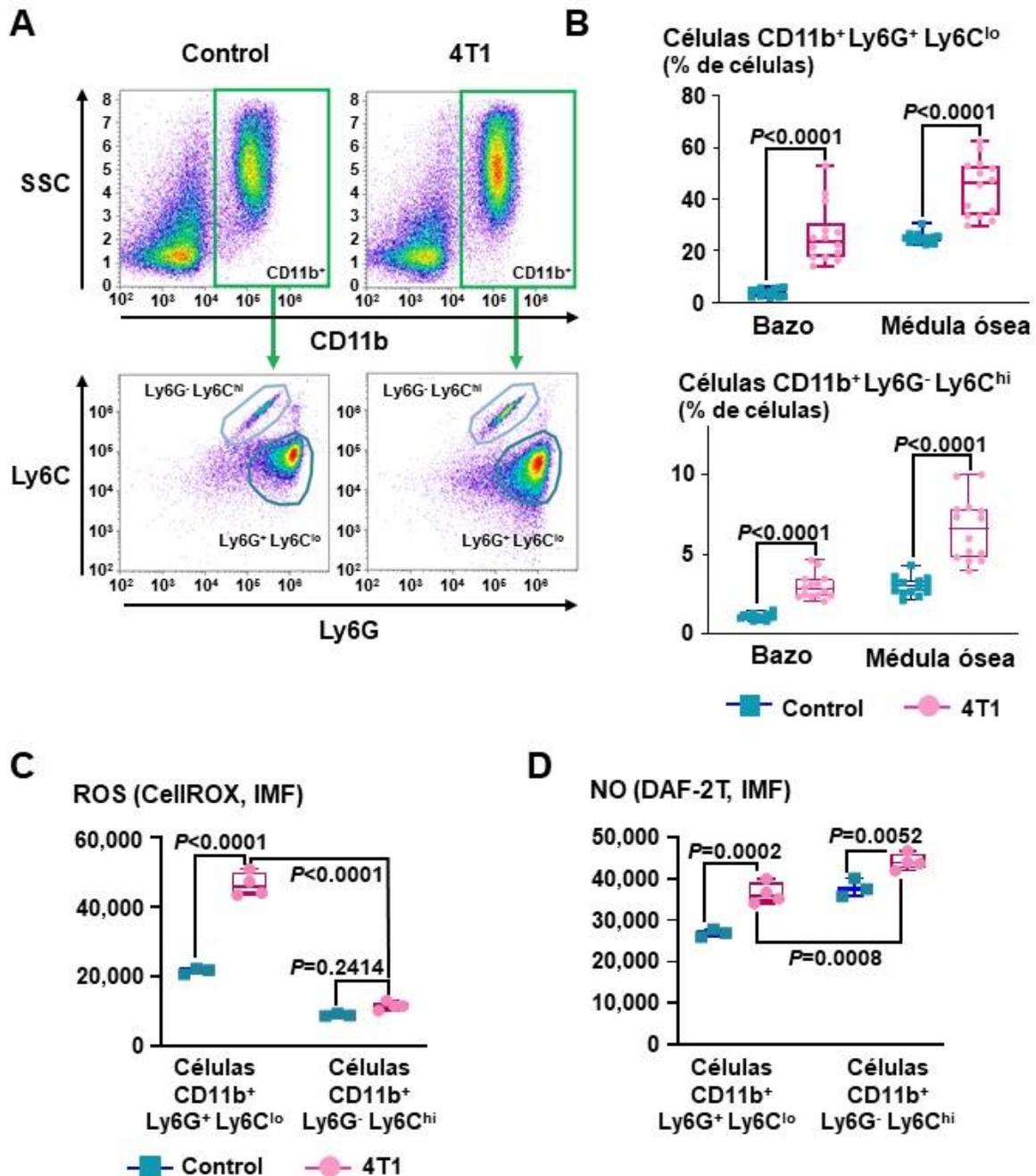


Figura 33 Incremento de las células de origen mieloide supresoras (MDSCs) metabólicamente activas en ratones con metástasis ósea de células 4T1. Se analizaron por citometría de flujo, células de médula ósea y de bazo de ratones con o sin metástasis ósea de 4T1. **A.** Densitograma representativo de las células mieloides CD11b (arriba) y Ly6C, Ly6G (abajo) para diferenciar entre las poblaciones monocíticas y las poliformonucleares. **B.** Cuantificación de las células CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{lo} (arriba) y células CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{hi} (abajo) **C.** Cuantificación de las células ROS positivas MDSCs poliformonucleares y monocíticas **D.** Cuantificación de las células positivas para óxido nítrico (NO), en MDSCs poliformonucleares y monocíticas. Resultados expresados en cajas y bigotes, analizados usando un ANOVA de dos vías y prueba a *posteriori* de Bonferroni.

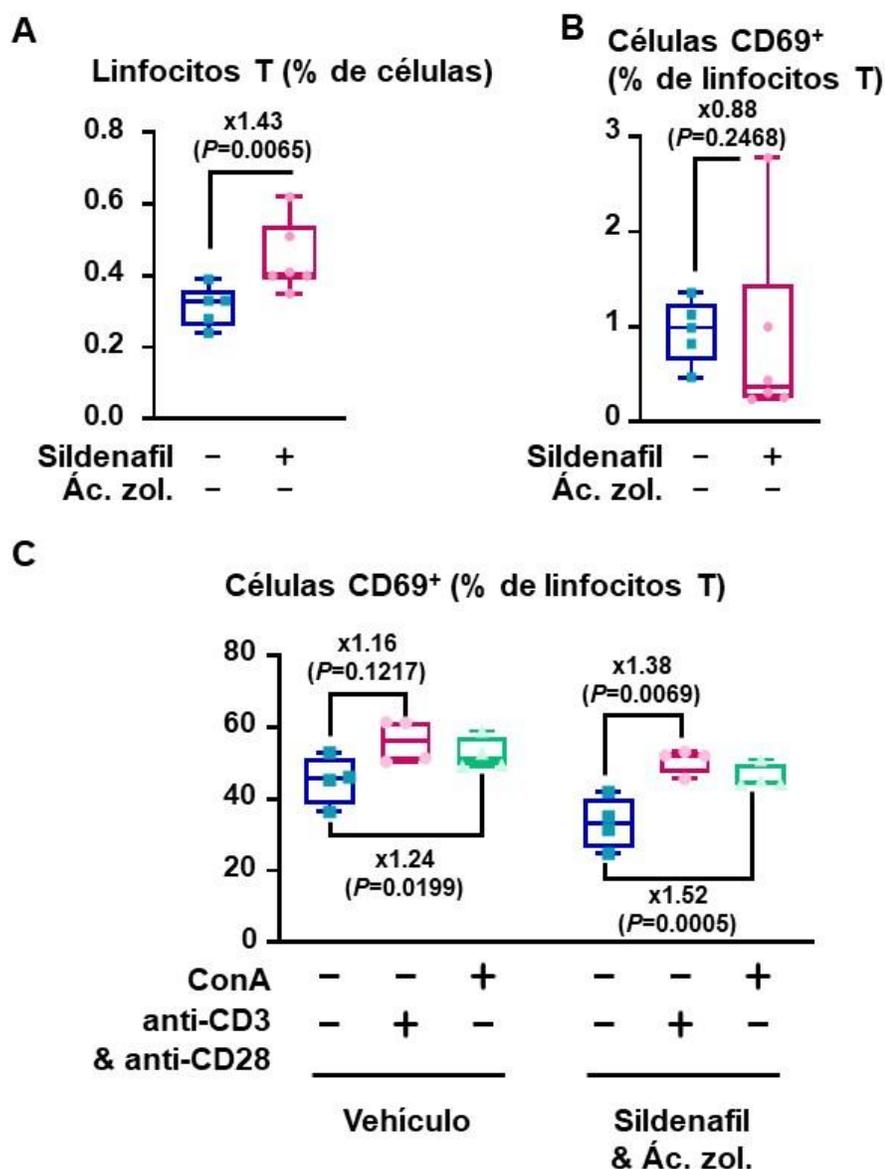


Figura 34 Ácido zolédronico y sildenafil, incrementan la población de linfocitos T en la metástasis ósea de células 4T1. Ratones BALB/C hembras de 6 semanas de edad, fueron inoculados con células 4T1 en el ventrículo cardíaco izquierdo, recibieron tratamiento con 20 mg/kg de Sildenafil, o 15µg/kg de ácido zoledrónico o el vehículo, 10 días después los ratones fueron eutanisados, las células de médula ósea se analizaron directamente o posterior a 24h de incubación en presencia de concanavalina A (ConA), o anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. **A.** Cuantificación de linfocitos T (CD3⁺, CD90.2⁺). **B.** Cuantificación de linfocitos T activados (CD69⁺) *in vivo*. **C.** Cuantificación de linfocitos T activados (CD69⁺) *ex vivo* 24h después de cultivarlos en presencia de ConA y anti-CD3 y anti-CD28. Los resultados se presentan en gráficas de cajas y bigotes, se analizaron usando una prueba *t* de Student (A y B) o un ANOVA de dos-vías y prueba *a posteriori* de Bonferroni (C).

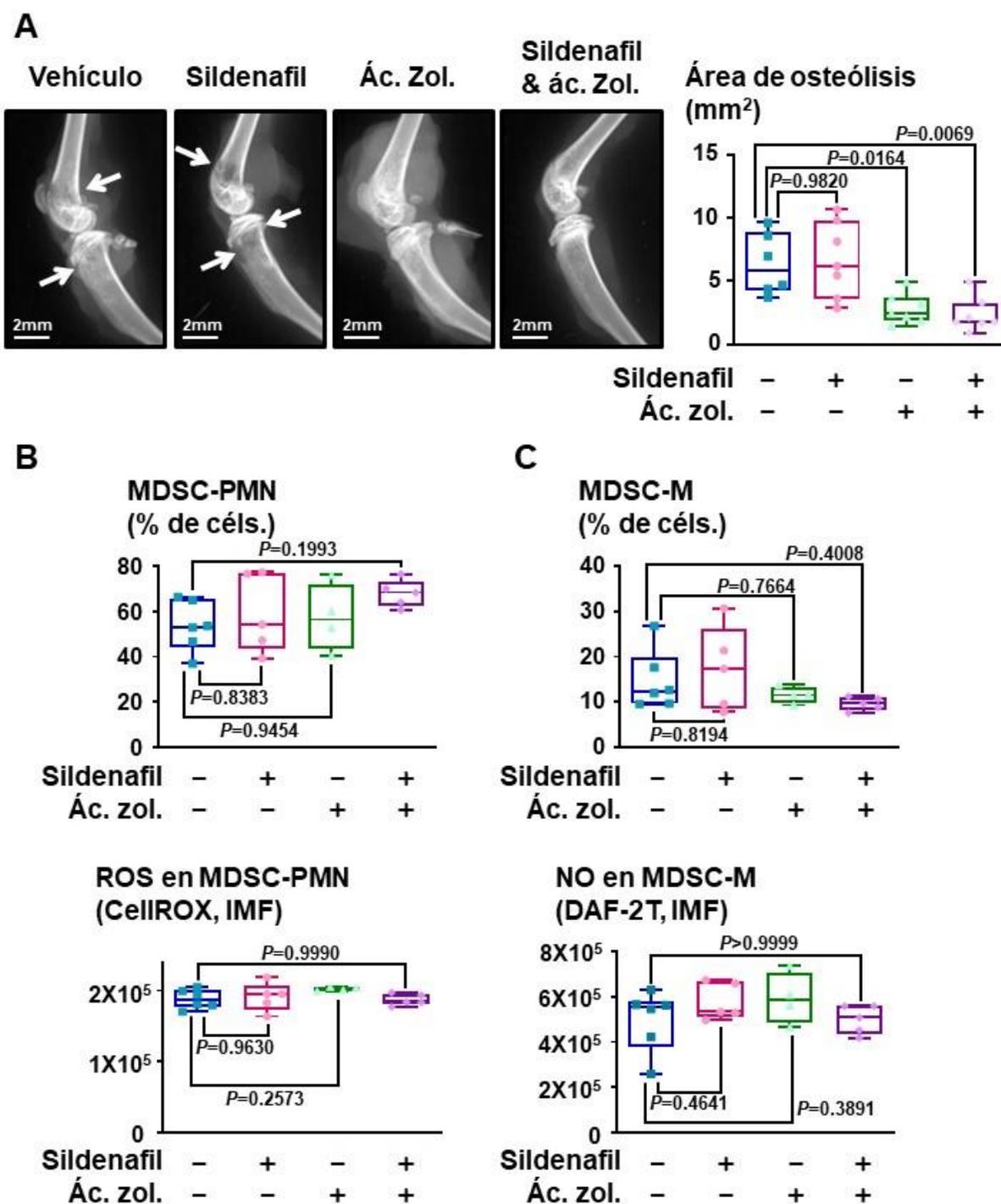


Figura 35 Efecto del tratamiento con Sildenafil en combinación con ácido zoledrónico en las MDSCs de la metástasis ósea de células 4T1. Ratones BALB/C hembras de 6 semanas de edad, fueron inoculados con células 4T1 en el ventrículo cardíaco izquierdo, recibieron tratamiento con 20 mg/kg de Sildenafil, o 15µg/kg de ácido zoledrónico o el vehículo, 10 días después los ratones fueron eutanizados. Los huesos de las patas traseras, o células de médula ósea, fueron analizados por rayos X o por citometría de flujo respectivamente. **A.** Radiografías representativas de las patas traseras (*derecha*), cuantificación del área de osteólisis (*izquierda*). **B.** Cuantificación de los porcentajes de células MDSCs polimorfonucleares (*arriba*) y el porcentaje de MDSC-PMN ROS positivas (*abajo*). **C.** Cuantificación de las MDSC monocíticas (*arriba*) y porcentaje de MDSC-M óxido nítrico positivas (*abajo*). Los resultados se presentan en gráficas de cajas y bigotes, se analizaron usando un ANOVA de una-vía con post test de Bonferroni.

Mientras que el ácido zoledrónico fue capaz de disminuir las lesiones osteolíticas causadas por las células 4T1, el sildenafil por sí mismo o en combinación no tuvo ningún efecto sobre el área de osteólisis (Figura 35 A). Cuando analizamos a las subpoblaciones de MDSCs en la metástasis ósea de 4T1, ningún tratamiento tuvo algún efecto en la cantidad de PMN-MDSCs o M-MDSCs (Figura 35 B-C), o en la cantidad de ROS y NO que producen respectivamente (Figura 35 B-C). Por lo tanto, el tratamiento de la metástasis ósea con sildenafil y ácido zoledrónico, no reducen la metástasis ósea de células 4T1 ni afecta la actividad de las MDSCs.

3.6 Puntos de control inmunológicos en la metástasis ósea de células 4T1

Decidimos continuar con la búsqueda de posibles blancos terapéuticos en la metástasis ósea de células 4T1 que ayudarán a la activación de los linfocitos T. Tratamientos con inhibidores de los puntos de control inmunológico, como anticuerpos contra la molécula 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), al receptor 1 de muerte celular programada (PD-1), pueden inducir una respuesta duradera en pacientes con cáncer con menores efectos secundarios que los tratamientos convencionales como la quimioterapia. Por lo tanto, analizamos a las poblaciones de linfocitos T de médula ósea de ratones inoculados con células 4T1 por citometría de flujo la expresión de puntos de control inmunológicos.

Encontramos que el $26 \pm 3.6\%$ de los linfocitos T de médula ósea de ratones sin cáncer eran CTLA-4⁺ y la inoculación de células 4T1 no generó un cambio (Figura 36 A). La expresión de PD-1 fue detectada en el $31 \pm 4.9\%$ de los linfocitos T de médula ósea normal pero su expresión incrementó más del doble ($\times 2.27$) con la inoculación de células 4T1, y el $70.3 \pm 2.9\%$ de los linfocitos T fueron PD-1⁺ en la metástasis ósea de 4T1 (Figura 36 B).

Buscamos la coexpresión de otro punto de control inmunológico Tim-3 que se utiliza para clasificar a los linfocitos T como exhaustos, es un fenotipo que se presenta en cáncer donde los linfocitos T han perdido su capacidad efectora, encontramos que la inoculación con células 4T1 no generó una diferencia y solo el 1% de los linfocitos T de metástasis ósea fueron PD1⁺Tim-3⁺ (Figura 36 C) por lo tanto los linfocitos T no están exhaustos en la metástasis ósea.

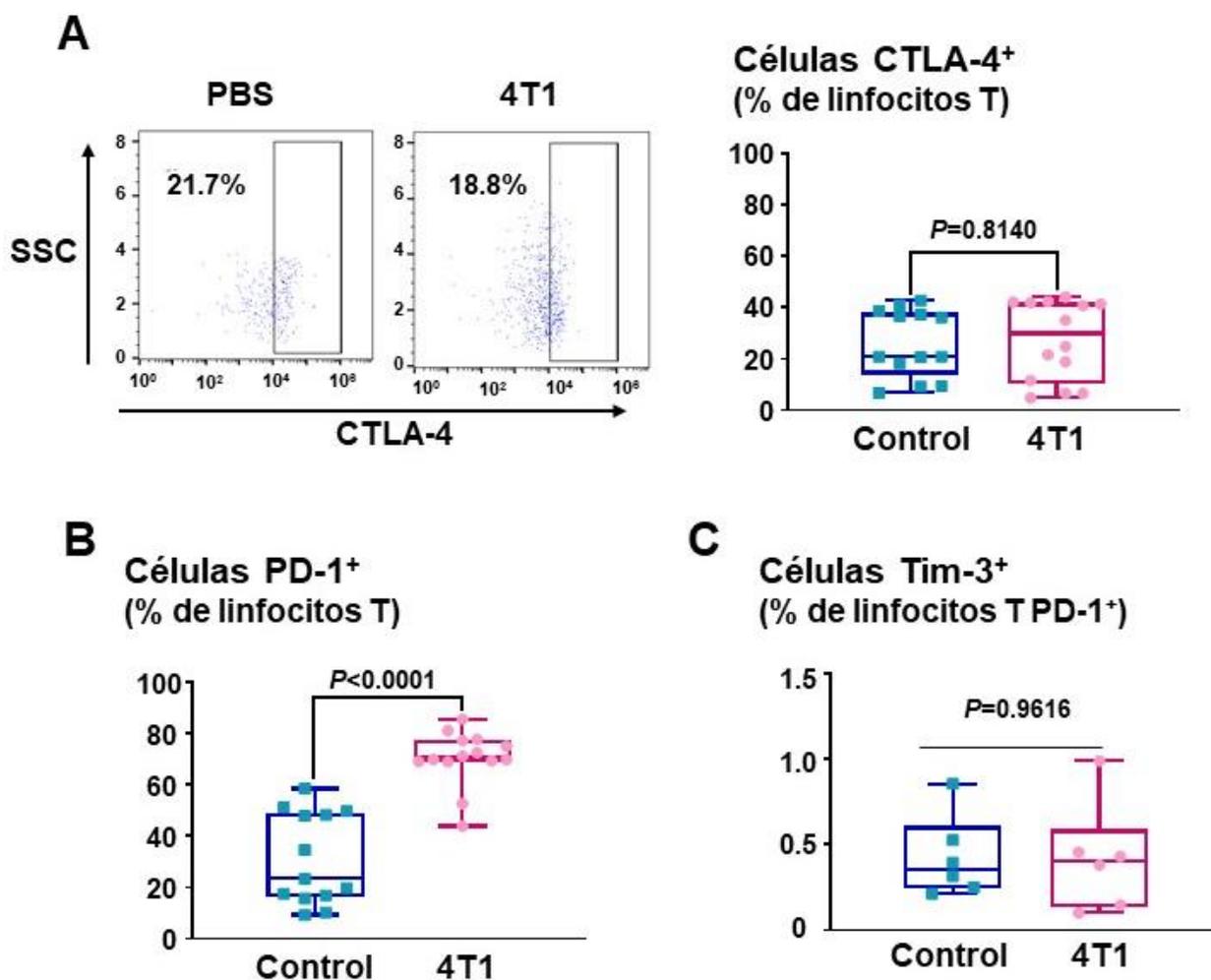


Figura 36 Linfocitos T de metástasis ósea de 4T1 expresan el punto de control inmunológico PD-1. Se detectó la presencia de células que expresaran puntos de control inmunológicos utilizando el citómetro de flujo, se compararon muestras de médula ósea de ratón sin y con metástasis ósea de 4T1. **A.** Densitogramas representativos (izquierda) y cuantificación de los linfocitos T CTLA-4 positivos (derecha). **B.** Cuantificación de los linfocitos T PD-1 positivos. **C.** Cuantificación de linfocitos T, PD-1⁺, Tim-3⁺. Resultados expresados en cajas y bigotes. Analizados con prueba de Mann-Whitney.

Continuamos con la búsqueda del ligando del PD-1, el PD-L1, encontramos que hubo un incremento del 46% en la expresión de PD-L1 en la metástasis ósea de 4T1 al compararla con médula ósea normal (5.5 ± 0.3 vs $3.8 \pm 0.3\%$, respectivamente, $P=0.0021$) (Figura 37 A). La expresión de PD-L1 parece estar relacionada con las MDSCs ya que el 9.7% de las células PD-L1⁺ son MDSCs polimorfonucleares y el 78.6% son MDSCs monocíticas (Figura 37 B). Interesantemente, solo el 2.3% de las MDSCs-PMN son PD-L1⁺, mientras que el 79.7% de las MDSCs-M son PD-L1⁺ en la metástasis ósea de células 4T1 (Figura 37 C-E), lo que podría entonces suprimir la activación de los linfocitos T y causar su efecto pro-osteoclástico.

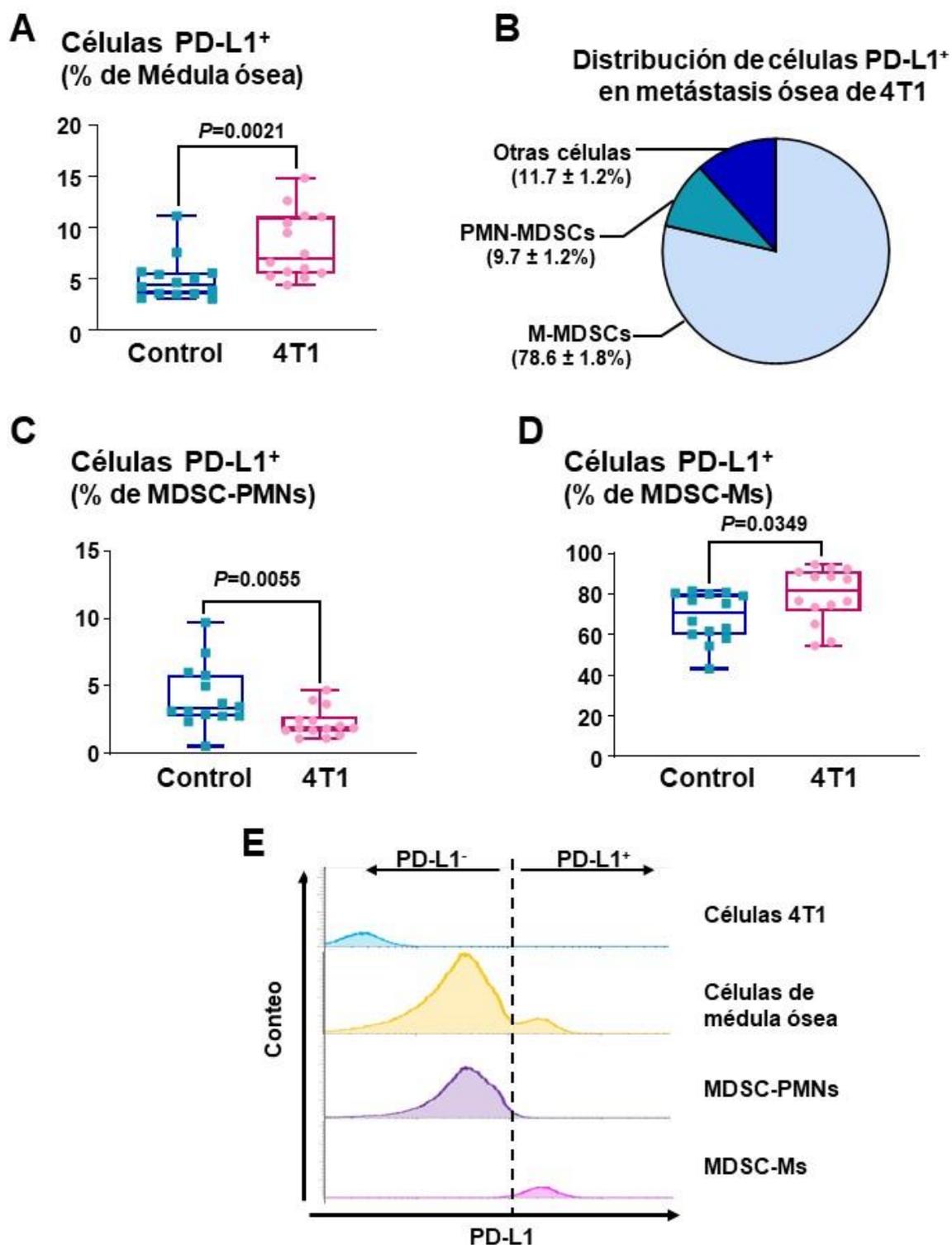


Figura 37 Expresión de punto de control inmunológico PD-L1 en metástasis ósea de 4T1. Se analizaron por citometría de flujo células de médula ósea de ratón sin o con metástasis de 4T1. A. Cuantificación de células PD-L1⁺ en la médula ósea. B. Distribución de las células PD-L1⁺ en la metástasis ósea de 4T1. C. Células PD-L1⁺ de MDSC polimorfonucleares. D. Células PD-L1⁺ de las MDSC monocíticas. E. Histogramas representativos de la expresión de PD-L1, en células 4T1, de médula ósea con metástasis ósea, y en MDSC polimorfonucleares y en MDSC monocíticas. Resultados expresados en cajas y bigotes. Analizados con prueba de Mann-Whitney.

Decidimos probar el efecto de anticuerpos para inhibir a los puntos de control inmunológicos (anti-PD-L1) en combinación con tratamientos antirresortivos como el ácido zoledrónico, o el anti-TGF β , en ratones con metástasis ósea de células 4T1. Sin embargo, no pudimos observar el efecto de estos tratamientos, posiblemente se deba a la escasa cantidad de lesiones osteolíticas (Figura 38), el área de osteólisis no presento cambios en ningún grupo (Figura 38 B).

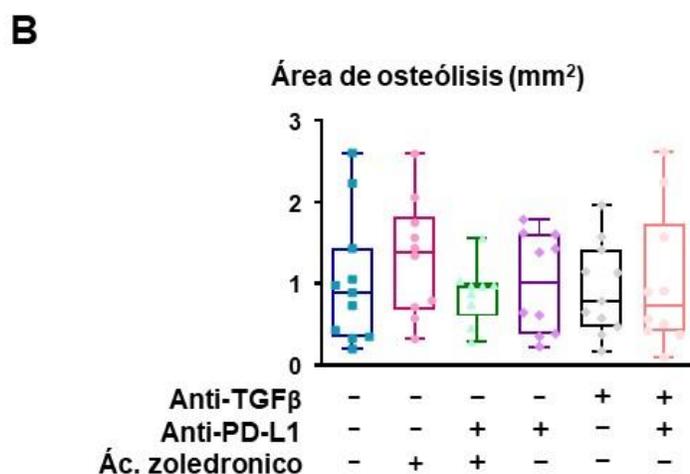
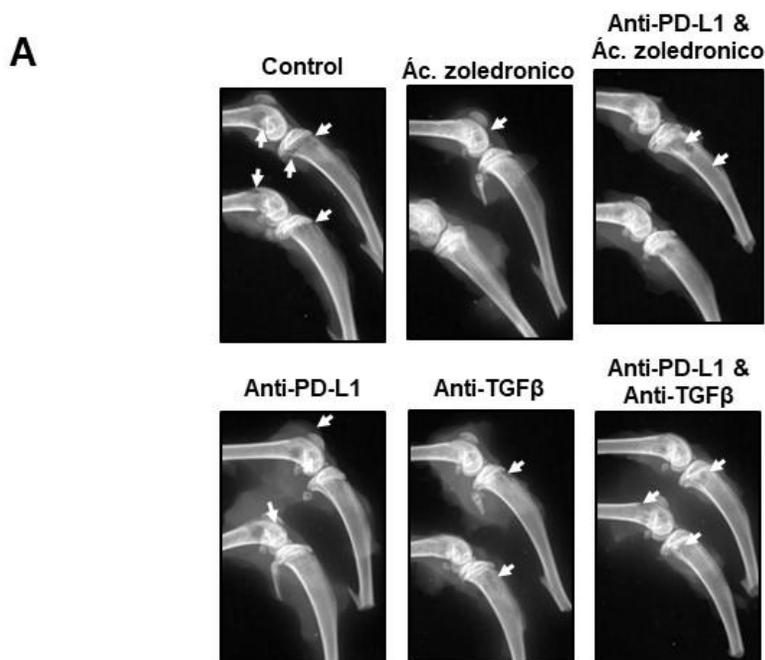


Figura 38 Ratones presentaron lesiones osteolíticas muy pequeñas 10 días posteriores a la inoculación de células 4T1, no se vió efecto de los tratamientos de inmunoterapia y/o ácido zoledrónico. Se inocularon células 4T1 en el ventrículo cardíaco izquierdo de ratones BALB/C hembras, recibieron tratamiento con ácido zoledrónico y/o anticuerpos anti-PD-L1 y/o anti-TGF β . Nueve días después los ratones fueron eutanizados y se colectan los huesos de las patas traseras, para su análisis por rayos X. **A.** Radiografías representativas. **B.** Cuantificación del área de osteólisis por grupos. Resultados expresados en cajas y bigotes. Analizados por ANOVA de 1-vía, con post-test de Dunnet.

Capítulo 4. Discusión

El sistema inmune en condiciones ideales tiene la capacidad de detectar de manera específica a las células cancerosas y tiene la capacidad de generar una respuesta dirigida para eliminarlas, sin embargo, al igual que en los procesos evolutivos, de cazador y presa que vemos entre las especies animales, las células cancerosas se han adaptado adoptando características que le permiten sobrevivir huyendo de su cazador el sistema inmune. Estas estrategias, incluyen “reclutar guardaespaldas” al inducir la diferenciación de células mieloides, que tienen un alto potencial inmunosupresor, o adaptarse a un medio con condiciones como la hipoxia, lo que a su vez inhibe la actividad de los linfocitos T. Por lo tanto, es una carrera donde las células cancerosas han sido muy eficientes al evadir al sistema inmune, pero los pacientes tienen la ayuda de las inmunoterapias que van a potenciar la respuesta inmune, y lograr evadir esas condiciones adversas para que puedan llevar a cabo sus funciones efectoras.

El sistema inmune puede responder utilizando componentes del sistema inmune innato, como los macrófagos o las células asesinas naturales, o con los linfocitos T del sistema inmune adaptativo, que pueden eliminar de manera específica a las células cancerosas (Chen y Mellman, 2013). Sin embargo, una de las características distintivas del cáncer es que tienen la capacidad de evadir o inhibir la respuesta inmune (Hanahan y Weinberg, 2011). La inmunoterapia tiene la capacidad de potenciar una respuesta inmune en contra del cáncer (por ejemplo, con vacunas tumorales, linfocitos T con receptores quiméricos) o activar a las células inmunes del paciente (por ejemplo, puntos de control inmunológicos, anticuerpos bi-específicos que atraen a los linfocitos T). La mayoría de las inmunoterapias están enfocadas en la activación de los linfocitos T en contra de las células cancerosas y muchas han presentado buenos resultados en ensayos clínicos, incrementando la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, continúa sin ser determinado si las inmunoterapias pueden curar a pacientes con metástasis ósea o si por el contrario los perjudicaría al incrementar la resorción ósea mediada por linfocitos T.

A pesar de que algunos laboratorios han comenzado a utilizar ratones humanizados (Kähkönen et al., 2019) la mayoría de los modelos de metástasis ósea utilizan ratones inmunodeficientes inoculados con células cancerosas humanas (Wright et al., 2016). Por lo tanto, el efecto de los linfocitos T en la metástasis ósea no se conoce completamente. Publicaciones anteriores que han intentado clarificar la relación entre los linfocitos T y la metástasis ósea han generado resultados contrastantes que disminuye o aumenta la metástasis ósea (Monteiro et al., 2013a; Zhang et al., 2011). En nuestro intento por aclarar esto, utilizamos diferentes líneas celulares cancerosas de ratón que se pueden usar como modelos singénicos al inocularlas

en ratones inmunocompetentes de la misma cepa. Al usar el modelo de cáncer de mama 4T1, encontramos que hubo una infiltración de linfocitos T CD3⁺ en la metástasis ósea y que los linfocitos T incrementan la metástasis ósea, ya que los ratones a los que se les eliminaron los linfocitos T por tratamiento con anticuerpos, presentaron menores lesiones osteolíticas. Nuestros resultados, indican que son los linfocitos T suprimidos o no activados los que fomentan la osteoclastogénesis ya que más del 75% de los linfocitos T no estaban activados (CD69⁻) en la metástasis ósea, demostramos que no están en estado exhausto porque solo el 1% de los linfocitos T fueron PD-1⁺Tim-3⁺. Lo cual fue confirmado ya que al tratar de activarlos *ex vivo* ellos no respondieron antes los estímulos, este resultado es interesante, debido a que considera que efecto tiene el microambiente de la metástasis ósea en los linfocitos T. En nuestro intento de estandarizar la transferencia adoptiva de linfocitos T utilizamos linfocitos T ingenuos, activados de manera *ex vivo*, la manera ideal sería utilizar TILs de metástasis ósea ya que estos linfocitos T ya reconocen los antígenos tumorales. Uno de los problemas que se encuentra al tratar de usar linfocitos T de médula ósea no se pueden activar *ex vivo* es decir que para poder utilizar esta herramienta, tendríamos que utilizar tratamientos previos para reducir los factores inmunosupresores de la metástasis ósea.

Los linfocitos T favorecen el crecimiento de las células 4T1 en el hueso, lo cual está relacionado con factores presentes solo en el microambiente de la metástasis ósea. La eliminación de linfocitos T en tumores mamarios tiene el efecto opuesto, los ratones sin linfocitos T presentaron tumores de mayor tamaño al compararlos con ratones con linfocitos T. Estos resultados sugieren, que los linfocitos T son modificados por factores presentes en el microambiente de la metástasis ósea de células 4T1.

El incremento de las células 4T1 puede deberse a un incremento en la migración de células al hueso o un incremento a la proliferación. Como lo explica el ciclo vicioso de la metástasis ósea osteolítica, un incremento en la resorción ósea puede incrementar la migración de las células al hueso atraídas por factores liberados de la matriz mineralizada (Cox et al., 2015). La hipótesis es que los linfocitos T incrementan la resorción ósea, lo que alimenta al ciclo vicioso y que es independiente de propiedades de los huesos. El tratamiento con anticuerpos para eliminar a los linfocitos T, se administró a los ratones después de la inoculación de las células 4T1.

Considerando que factores que incrementan la resorción ósea contribuyen al ciclo de la metástasis ósea, nos enfocamos en la búsqueda de efecto de los linfocitos T sobre los osteoclastos. En los ratones con linfocitos T, encontramos un incremento en el número de osteoclastos en la interfaz entre tumor y hueso en metástasis de células 4T1 (Corral-Avila, 2020). Un efecto similar había sido reportado por los linfocitos T bajo la influencia de tumores primarios de células 4T1 (Monteiro et al., 2013a) o en condiciones

patológicas como artritis reumatoide (Sato et al., 2006b) y osteoporosis (Cenci et al., 2000). Los linfocitos T obtenidos de sangre periférica, de pacientes con lesiones osteolíticas causadas por cáncer de mama, de próstata, de pulmón o de mieloma incrementaron la osteoclastogénesis *ex vivo* (Colucci et al., 2004; Roato et al., 2006). Este efecto se puede deber por la expresión de RANKL en los linfocitos T, ya que los linfocitos T de metástasis ósea presentaron mayor expresión de RANKL al compararse con linfocitos T de bazo (Fournier, datos no publicados).

En un ensayo *ex vivo* confirmamos que los linfocitos T aislados de médula ósea con metástasis ósea de células 4T1 incrementaron la formación de osteoclastos en ensayos de cultivo de células de médula ósea de ratón sin linfocitos T, mientras que los linfocitos T de médula ósea de ratón sano no tuvo el mismo efecto. Este resultado sugiere que son los linfocitos T infiltrados en la metástasis ósea y no otros linfocitos T de la médula ósea quien afecta a los osteoclastos. Esta observación se refuerza con los resultados observados en el modelo de metástasis ósea de células de cáncer de próstata RM-1, donde no se observaron linfocitos T infiltrados en la metástasis ósea, y la eliminación de linfocitos T no tuvo efectos en el área de osteólisis. En conjunto, estos resultados sugieren que la infiltración de los linfocitos T tiene un efecto pro-osteoclástico e incrementan el desarrollo de la metástasis ósea.

Nuestros resultados indican que son los linfocitos T no activados o suprimidos los que incrementan la formación de osteoclastos. Al comparar el efecto de los linfocitos T activados éstos tienen un efecto totalmente opuesto inhiben la formación de osteoclastos. Consistente con esta observación, encontramos que más del 70-80% de los linfocitos T de metástasis ósea de células 4T1 presentan un fenotipo no activado como CD69⁻ o CD62L⁺. La inmunoterapia podría beneficiar a los pacientes de metástasis ósea, al activar a los linfocitos T contra las células cancerosas, pero también al tener actividad anti-osteoclastica.

En un estudio preclínico utilizaron un anticuerpo contra uno de los puntos de control inmunológico, el CTLA-4 y este redujo la carga tumoral en los huesos de células de melanoma B16-FL, demostrando que la activación de los linfocitos T podrían reducir la metástasis ósea (Zhang et al., 2011). En contraste, la metástasis ósea de melanoma células B16-F1 si hace metástasis ósea pero no generan lesiones osteolíticas y no se encontraron linfocitos T infiltrados. Sin embargo, la diferencia puede deberse a las células utilizadas por Zhang, et al. (2011) expresaban luciferasa, la cual puede ser reconocida por los linfocitos T como un antígeno, incrementando la inmunogenicidad de las células B16-FL (Baklaushev et al., 2017). Por lo que este modelo, podría haber una respuesta inmune basada en linfocitos T, e inducir la infiltración de linfocitos T en la metástasis ósea los cuales pudieron haber sido activados con el anticuerpo anti-CTLA-4, reduciendo la metástasis ósea. En un ensayo clínico de fase 1, el tratamiento con pasotuxizumab, un

anticuerpo bi-específico el cual puede reconocer y unirse a un antígeno prostático expresado en membrana (PSMA, por sus siglas en inglés) y reconoce al CD3 del TCR con lo que induce el reclutamiento de los linfocitos T y causó una marcada regresión de la metástasis ósea en 1 de 47 pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración (Hummel et al., 2021). Los resultados que se tienen de los ensayos clínicos son prometedores, pero parece que están limitados a una pequeña población de pacientes como lo demostrado en el ensayo clínico donde el tratamiento con pasotuxizumab tuvo excelentes resultados, pero solo en uno de los pacientes (Hummel et al., 2021), o con un rango de respuesta entre 5 y 30% de los pacientes con cáncer de mama triple negativo que recibieron tratamiento de inhibición de los puntos de control inmunológico en monoterapia (Keenan y Tolaney, 2020).

La eficacia de la inmunoterapia puede estar limitada por características intrínsecas de las células cancerosas, incluyendo una baja tasa de mutaciones como ha sido reportado en el cáncer de próstata y de mama (Alexandrov et al., 2020) lo cual reduce la apariencia “foránea” del tumor, lo que hace más difícil el reconocimiento por los linfocitos T. La baja eficiencia de la inmunoterapia podría deberse también a las condiciones presentes en el microambiente tumoral (Blank et al., 2016), lo cual podría ocurrir en el hueso.

El hueso es un componente importante en la vida de los linfocitos T, los precursores de linfocitos T provienen de la médula ósea, algunos linfocitos T de memoria son almacenados en la médula ósea donde las células estromales de médula ósea presentes en los nichos mesenquimales, suprimen su activación (Alexandrov et al., 2020). La médula ósea normal es por lo tanto un microambiente no muy favorable para la capacidad anticancerígena de los linfocitos T, esto empeora en el contexto de la metástasis ósea. La metástasis ósea es un microambiente hipóxico (Dunn et al., 2009) además de que hay altos niveles de TGF- β (Korpal et al., 2009), dos factores que suprimen los efectos anticancerígenos de los linfocitos T (Kumar y Gabrilovich, 2014; Thomas y Massagué, 2005). Otros factores como los linfocitos Tregs, los cuales fueron identificados como el tercer subtipo de linfocito T más abundante identificado en la metástasis ósea de células 4T1 (Fournier, datos no publicados) o por la presencia de las células de origen mieloides supresoras (MDSCs, por sus siglas en inglés) podrían ser responsables por la inactivación de los linfocitos T. En varios estudios, se ha reportado una acumulación de MDSCs en la metástasis ósea, aunque solo los identifican como células CD11b⁺Gr1⁺, lo cual corresponde a un fenotipo que se usaba antes y que no es suficiente para separar a los diferentes subtipos (Danilin et al., 2012; Park et al., 2013) o los estudios enfocados en las MDSCs-PMN (Bidwell et al., 2012; Edgington-Mitchell et al., 2015). En este estudio, confirmamos que las MDSCs-PMN (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo}) se acumulan en la metástasis ósea de células 4T1 y ellas están metabólicamente activas, produciendo ROS, son la población más abundante. Lo que identificamos por primera vez es la población de MDSCs-M (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{hi}) también se expandieron en la metástasis

ósea, aunque en menor abundancia comparado con las MDSCs-PMN, podrían ser más inmunosupresivas, ya que presentan la expresión de NO y de PD-L1, especialmente porque más del 70% de los linfocitos T de metástasis ósea expresan su receptor PD-1. En conjunto, estos resultados confirman la importancia de las MDSCs-M en la metástasis ósea, al igual que la importancia de los diferentes subtipos, polimorfonucleares, neutrofílicos y las MDSCs-M pueden ser más relevantes por su función en el desarrollo de la metástasis ósea.

Las MDSCs son relevantes blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer y sus complicaciones, incluyendo la metástasis ósea por su capacidad para diferenciarse en osteoclastos o suprimir la respuesta inmune. La eliminación de las MDSCs usando anticuerpos anti-Gr1 reduce la metástasis ósea de cáncer de mama y de pulmón usando células de Lewis en ratón (Capietto et al., 2021). Este efecto fue potencializado cuando el anticuerpo anti-Gr1 se combinó con el inhibidor de la resorción ósea, el ácido zoledrónico (Capietto et al., 2021). El Gr1 es expresado en la MDSCs y en otras células mieloides de los ratones, pero no es expresada en las MDSCs de humanos (Bronte et al., 2016).

Buscando alternativas que podrían usarse en pacientes, encontramos que el inhibidor de la PDE5 sildenafil (Serafini et al., 2006a) y el inhibidor de la resorción ósea ácido zoledrónico (Melani et al., 2007) se reportó que eran capaces de inhibir a las MDSCs en ratones. Sin embargo, ninguno de los tratamientos, solos o en combinación, presento reducción ni el porcentaje de MDSCs-PMN o M ni en los niveles de ROS y NO, responsable por la inmunosupresión de estas células, tampoco hubo un incremento en la cantidad de linfocitos T. Tratamientos más potentes o dirigidos podrían ser necesarios para atacar a las MDSCs en la metástasis ósea, o en combinación con otras inmunoterapias. Por ejemplo, RGX-104, un agonista del receptor nuclear α /apolipoproteína E reduce los porcentajes de MDSCs en ratones y pacientes con cáncer (Tavazoie et al., 2018). La combinación de RGX-104 con el inhibidor del punto de control inmunológico, anti-PD-L1, también fue más eficiente al reducir el desarrollo de células B16-F10 de melanoma y de cáncer de pulmón Lewis en ratón (Tavazoie et al., 2018). Como encontramos que casi el 80% de los linfocitos T en la metástasis ósea de células 4T1 son PD-1⁺ y casi el 6% de las células de medula ósea expresan su ligando PD-L1, pero predominantemente las MDSCs-M, una combinación similar RGX-104 y anti-PD-1 podrían ser eficientes en la reducción de la metástasis ósea. La combinación de inmunoterapia como los puntos de control inmunológico con quimioterapia también parece ser efectiva. En pacientes con cáncer de mama triple negativo, la combinación de atezolizumab, un anticuerpo anti-PD-L1, con Nabpaclitaxel lleva a un incremento en la supervivencia libre de progresión y la supervivencia en general (Schmid et al., 2018).

En un modelo de cáncer de próstata resistente a la castración, Jia o *et al.* y encontraron que los inhibidores de los puntos de control inmunológicos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 que reducen el desarrollo de los tumores subcutáneos, pero no en la metástasis ósea (Jiao et al., 2019). En pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, el tratamiento con inhibidores de los puntos de control inmunológicos fue menos eficiente cuando los pacientes ya tenían metástasis ósea y se reflejó en una reducción de la supervivencia general (Landi et al., 2019; Qin et al., 2021). Estos datos sugieren que el microambiente de la metástasis ósea puede hacer que la inmunoterapia sea menos eficiente, probablemente al suprimir la actividad de los linfocitos T, lo que es consistente con nuestros resultados donde encontramos que los linfocitos T no están activados en el hueso y son difíciles de reactivar *ex vivo*. Sin embargo, fue posible reducir la masa tumoral en los huesos en ratones al usar una combinación de inhibidores de los puntos de control inmunológicos con un anticuerpo neutralizante de RANKL o TGF- β (Jiao et al., 2019). Estos resultados son importantes por que sugieren que estos factores contenidos en la matriz mineralizada, que son liberados al momento de la resorción ósea, como TGF- β que contribuye a la inmunosupresión, por lo tanto, podría limitar el efecto de la inmunoterapia. La neutralización del TGF- β fue asociada con un incremento en la activación de los linfocitos Th1 y citotóxicos contra las células de cáncer de próstata en la metástasis ósea (Jiao et al., 2019). En el modelo de cáncer de mama 4T1, encontramos que el eje PD-L1/PD-1 es un blanco terapéutico relevante, considerando la cantidad de células de médula ósea que son PD-L1⁺, al igual que la expresión de PD-1 en más del 70% de los linfocitos T. Por lo tanto, terapias similares combinando inhibidores de los puntos de control inmunológicos con inhibidores de la resorción ósea o un tratamiento anti-TGF- β podría ser eficiente contra la metástasis ósea de cáncer de mama.

Capítulo 5. Conclusiones

La eficacia de la inmunoterapia para el tratamiento de la metástasis ósea y el efecto de los linfocitos T en el desarrollo de la metástasis ósea no ha sido esclarecido aún. Para abordar este problema, utilizamos modelos singénicos de metástasis ósea en ratón y ensayos *ex vivo* de osteoclastogénesis. Nuestros resultados muestran que los linfocitos T no activados incrementan la osteoclastogénesis y que los linfocitos T incrementan el desarrollo de la metástasis ósea. La inactivación de los linfocitos T podría deberse a factores presentes en el microambiente como la expansión de las MDSCs metabólicamente activas, incluyendo a las MDSCs-M PD-L1+, las cuales pueden tener mayor efecto inmunosupresor a los linfocitos T. Por medio de la producción de NO o por la expresión de PD-L1 el ligando de PD-1 receptor presente en más del 70% de los linfocitos T de metástasis ósea. En contraste, cuando los linfocitos T fueron activados *ex vivo* inhibieron la formación de osteoclastos. Por lo tanto, la activación de los linfocitos T usando inmunoterapia puede no solo ayudar a que los linfocitos T eliminen a las células cancerosas, pero también a prevenir la formación de osteoclastos y la pérdida ósea asociada a la metástasis ósea en pacientes con cáncer.

Literatura citada

- Abbas A. K. , Andrew H. Lichtman, S. P. 2012. Cellular and Molecular Immunology 7th Edition (7th ed.). Saunder, Elsevier Inc, Philadelphia, PA. doi:10.1084/jem.20090209.
- Ahrends, T., Spanjaard, A., Pilzecker, B., Bąbala, N., Bovens, A., Xiao, Y., Jacobs, H. y Borst, J. 2017. CD4 + T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity*, 47(5), pp. 848-861.e5. doi:10.1016/J.IMMUNI.2017.10.009
- Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., Sommergruber, W., Schweifer, N., Wernitznig, A., Beug, H., Foisner, R. and Eger, A. 2007. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*, 26(49), pp. 6979–6988. doi:10.1038/SJ.ONC.1210508
- Akhurst, R. J. y Derynck, R. 2001. TGF- β signaling in cancer a double-edged sword. *Trends in Cell Biology*, 11(11), p. pp.S44-S51. doi:10.1016/s0962-8924(01)02130-4
- Alexandrov, L. B., Kim, J., Haradhvala, N. J., Huang, M. N., Tian Ng, A. W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K. R., Gordenin, D. A., Bergstrom, E. N., Islam, S. M. A., Lopez-Bigas, N., Klimczak, L. J., McPherson, J. R., Morganella, S., Sabarinathan, R., Wheeler, D. A., Mustonen, V., Boutros, P., ... Yu, W. 2020. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*, 578(7793), pp. 94–101. doi:10.1038/S41586-020-1943-3
- Allison, K. H. 2012. Molecular Pathology of Breast Cancer What a Pathologist Needs to Know. *American Journal of Clinical Pathology*, 138(6), pp. 770–780. doi:10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO
- Andrzejewska, A., Catar, R., Schoon, J., Qazi, T. H., Sass, F. A., Jacobi, D., Blankenstein, A., Reinke, S., Krüger, D., Streitz, M., Schlickeiser, S., Richter, S., Souidi, N., Beez, C., Kamhieh-Milz, J., Krüger, U., Zemojtel, T., Jürchott, K., Strunk, D., ... Geissler, S. 2019. Multi-Parameter Analysis of Biobanked Human Bone Marrow Stromal Cells Shows Little Influence for Donor Age and Mild Comorbidities on Phenotypic and Functional Properties. *Frontiers in Immunology*, 10, p. 2474. doi:10.3389/FIMMU.2019.02474/BIBTEX
- Ansari, K. K. y Jha, A. 2022. Causes of Cancer in the World: Comparative Risk Assessment of Nine Behavioral and Environmental Risk Factors. *Cureus*, 14(9). doi:10.7759/CUREUS.28875
- Arellano, D. L. 2016. Interacciones entre los linfocitos T y el microambiente de la metástasis ósea de cáncer de mama. Tesis de maestría CICESE . Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, BC . pp. 83 . <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1272>
- Arguello, F., Baggs, R. B. & Frantz, C. N. 1988. A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. *Cancer Research*, 48(23), pp. 6876–6881. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3180096/>
- Arnett, T. R., Gibbons, D. C., Utting, J. C., Orriss, I. R., Hoebertz, A., Rosendaal, M. and Meghji, S. 2003. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *Journal of Cellular Physiology*, 196(1), pp. 2–8. doi:10.1002/jcp.10321

- Baklaushev, V. P., Kilpeläinen, A., Petkov, S., Abakumov, M. A., Grinenko, N. F., Yusubaliev, G. M., Latanova, A. A., Gubskiy, I. L., Zabozaev, F. G., Starodubova, E. S., Abakumova, T. O., Isaguliants, M. G. y Chekhonin, V. P. 2017. Luciferase Expression Allows Bioluminescence Imaging But Imposes Limitations on the Orthotopic Mouse (4T1) Model of Breast Cancer. *Scientific Reports*, 7(1), p. 7715. doi:10.1038/s41598-017-07851-z
- Ban, J., Fock, V., Aryee, D. N. T. y Kovar, H. 2021. Mechanisms, Diagnosis and Treatment of Bone Metastases. *Cells*, 10(11), p. 2944. doi:10.3390/cells10112944
- Baslan, T., Morris, J. P., Zhao, Z., Reyes, J., Ho, Y.-J., Tsanov, K. M., Bermeo, J., Tian, S., Zhang, S., Askan, G., Yavas, A., Lecomte, N., Erakky, A., Varghese, A. M., Zhang, A., Kendall, J., Ghiban, E., Chorbadjiev, L., Wu, J., ... Lowe, S. W. 2022. Ordered and deterministic cancer genome evolution after p53 loss. *Nature*, 608(7924), pp. 795–802. doi:10.1038/s41586-022-05082-5
- Battle, E. y Massagué, J. 2019. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, 50(4), pp. 924–940. doi:10.1016/J.IMMUNI.2019.03.024
- Becker, T. C., Coley, S. M., Wherry, E. J. y Ahmed, R. 2005. Bone Marrow Is a Preferred Site for Homeostatic Proliferation of Memory CD8 T Cells. *The Journal of Immunology*, 174(3), pp. 1269–1273. doi:10.4049/JIMMUNOL.174.3.1269
- Bidwell, B. N., Slaney, C. Y., Withana, N. P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., Andrews, D., Mikeska, T., Mangan, N. E., Samarajiwa, S. A., De Weerd, N. A., Gould, J., Argani, P., Müller, A., Smyth, M. J., Anderson, R. L., Hertzog, P. J. and Parker, B. S. 2012. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nature Medicine*, 18(8), pp. 1224–1231. doi:10.1038/NM.2830
- Bielski, C. M., Zehir, A., Penson, A. V., Donoghue, M. T. A., Chatila, W., Armenia, J., Chang, M. T., Schram, A. M., Jonsson, P., Bandlamudi, C., Razavi, P., Iyer, G., Robson, M. E., Stadler, Z. K., Schultz, N., Baselga, J., Solit, D. B., Hyman, D. M., Berger, M. F. and Taylor, B. S. 2018. Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers. *Nature Genetics*, 50(8), pp. 1189–1195. doi:10.1038/s41588-018-0165-1
- Blank, C. U., Haanen, J. B., Ribas, A. and Schumacher, T. N. 2016. The “cancer immunogram.” *Science*, American Association for the Advancement of Science, 352(6286), pp. 658–660. doi:10.1126/science.aaf2834
- Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M. and Kastenmüller, W. 2018. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. Vol. 18. Issue 10. pp. 635–647 . doi:10.1038/s41577-018-0044-0
- Boskey, A. L. 2013. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKey Reports*, 2, pp. 1–11. doi:10.1038/bonekey.2013.181
- Boukhenouna, S., Wilson, M. A., Bahmed, K. and Kosmider, B. 2018. Reactive Oxygen Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, pp. 1–9. doi:10.1155/2018/5730395
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H. and Gabrilovich, D. I. 2016. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and

- characterization standards. *Nature Communications*. Vol. 7. Issue 1. pp. 1–10 . doi:10.1038/ncomms12150
- Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W. W., Surman, D. R., Pericle, F., Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. 1998. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *Journal of Immunology*, 161(10), pp. 5313–5320. /pmc/articles/PMC2239007/
- Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. and Recker, R. 1996. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures*. Vol. 45. pp. 371–386 .
- Caliri, A. W., Tommasi, S. and Besaratinia, A. 2021. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 787, pp. 1–49. doi:10.1016/j.mrrev.2021.108365
- Callahan, M. K. and Wolchok, J. D. 2013. At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, The Society for Leukocyte Biology, 94(1), pp. 41–53. doi:10.1189/jlb.1212631
- Campbell, J. P., Merkel, A. R., Masood-Campbell, S. K., Elefteriou, F. and Sterling, J. A. 2012. Models of bone metastasis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, MyJoVE Corporation, 67, p. e4260. doi:10.3791/4260
- Capietto, A. H., Lee, S., Clever, D., Eul, E., Ellis, H., Ma, C. X. and Faccio, R. 2021. Effective Treatment of Established Bone Metastases Can Be Achieved by Combinatorial Osteoclast Blockade and Depletion of Granulocytic Subsets. *Cancer Immunology Research*, 9(12), pp. 1400–1412. doi:10.1158/2326-6066.CIR-21-0232
- Cenci, S., Weitzmann, M. N., Roggia, C., Namba, N., Novack, D., Woodring, J. and Pacifici, R. 2000. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *Journal of Clinical Investigation*, 106(10), pp. 1229–1237. doi:10.1172/JCI11066
- Chan, M. S. M., Wang, L., Felizola, S. J. A., Ueno, T., Toi, M., Loo, W., Chow, L. W. C., Suzuki, T. and Sasano, H. 2012. Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients – an immunohistochemical study of CD8⁺ and FOXP3⁺ using double immunostaining with correlation to the pat. *The International Journal of Biological Markers*, 27(4), pp. 295–304. doi:10.5301/JBM.2012.10439
- Chen, D. S. y Mellman, I. 2013. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*. Vol. 39. Issue 1. pp. 1–10 . doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Chen, X., Eksioglu, E. A., Zhou, J., Zhang, L., Djeu, J., Fortenbery, N., Epling-Burnette, P., Van Bijnen, S., Dolstra, H., Cannon, J., Youn, J., Donatelli, S. S., Qin, D., De Witte, T., Tao, J., Wang, H., Cheng, P., Gabrilovich, D. I., List, A. and Wei, S. 2013. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Clinical Investigation*, 123(11), pp. 4595–4611. doi:10.1172/JCI67580
- Clarke, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. Vol. 3. Issue Suppl 3. pp. S131–S139 . doi:10.2215/CJN.04151206

- Clézardin, P., Coleman, R., Poppo, M., Ottewell, P., Bonnelye, E., Paycha, F., Confavreux, C. B. and Holen, I. 2021. Bone metastasis: mechanisms, therapies, and biomarkers. *Physiological Reviews*, 101(3), pp. 797–855. doi:10.1152/physrev.00012.2019
- Coleman, R. E. 2001. Metastatic bone disease: Clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treatment Reviews*, 27(3), pp. 165–176. doi:10.1053/ctrv.2000.0210
- Collisson, E. A., Campbell, J. D., Brooks, A. N., Berger, A. H., Lee, W., Chmielecki, J., Beer, D. G., Cope, L., Creighton, C. J., Danilova, L., Ding, L., Getz, G., Hammerman, P. S., Hayes, D. N., Hernandez, B., Herman, J. G., Heymach, J. V., Jurisica, I., Kucherlapati, R., ... Cheney, R. 2014. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*, 511(7511), pp. 543–550. doi:10.1038/nature13385
- Colucci, S., Brunetti, G., Rizzi, R., Zonno, A., Mori, G., Colaianni, G., Del Prete, D., Faccio, R., Liso, A., Capalbo, S., Liso, V., Zallone, A. and Grano, M. 2004. T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: The role of the OPG/TRAIL interaction. *Blood*, 104(12), pp. 3722–3730. doi:10.1182/blood-2004-02-0474
- Cordeiro Gomes, A., Hara, T., Lim, V. Y., Herndler-Brandstetter, D., Nevius, E., Sugiyama, T., Tani-ichi, S., Schlenner, S., Richie, E., Rodewald, H. R., Flavell, R. A., Nagasawa, T., Ikuta, K. and Pereira, J. P. 2016. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity*, 45(6), pp. 1219–1231. doi:10.1016/j.immuni.2016.11.004
- Corral-Avila, J. A. 2020. Caracterización del efecto de linfocitos T de metástasis ósea en la formación de osteoclastos. Tesis de maestría . Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C. . p. 55 pp. . <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3234>
- Cox, T. R., Rumney, R. M. H., Schoof, E. M., Perryman, L., Høye, A. M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N. A., Forrest, H., Evans, H. R., Huggins, I. D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A. and Erler, J. T. 2015. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, 522(7554), pp. 106–110. doi:10.1038/NATURE14492
- Danilin, S., Merkel, A. R., Johnson, J. R., Johnson, R. W., Edwards, J. R. and Sterling, J. A. 2012. Myeloid-derived suppressor cells expand during breast cancer progression and promote tumor-induced bone destruction. *Oncotarget*, 1(9), pp. 1484–1494. doi:10.4161/onci.21990
- Demers, L. M., Costa, L. and Lipton, A. 2003. Biochemical Markers and Skeletal Metastases. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 415(SUPPL.), pp. S138–S147. doi:10.1097/01.blo0000092979.12414.54
- Denkert, C., Wienert, S., Poterie, A., Loibl, S., Budczies, J., Badve, S., Bago-Horvath, Z., Bane, A., Bedri, S., Brock, J., Chmielik, E., Christgen, M., Colpaert, C., Demaria, S., Van Den Eynden, G., Floris, G., Fox, S. B., Gao, D., Ingold Heppner, B., ... Salgado, R. 2016. Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 29(10), pp. 1155–1164. doi:10.1038/MODPATHOL.2016.109
- Denman, A. M. 1992. Cellular and Molecular Immunology. *Postgraduate Medical Journal*, Philadelphia, Elsevier/Saunders, 68(798), pp. 305–305. doi:10.1136/pgmj.68.798.305

- DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Kramer, J. L., Smith, R. A. and Jemal, A. 2016. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), pp. 31–42. doi:10.3322/CAAC.21320
- DeVito, N., Henderson, E., Han, G., Reed, D., Bui, M. M., Lavey, R., Robinson, L., Zager, J. S., Gonzalez, R. J., Sondak, V. K., Letson, G. D. and Conley, A. 2015. Clinical characteristics and outcomes for solitary fibrous tumor (SFT): A single center experience. *Public Library of Science ONE*, 10(10), pp. 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0140362
- Diaz-Montero, C. M., Salem, M. L., Nishimura, M. I., Garrett-Mayer, E., Cole, D. J. and Montero, A. J. 2009. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(1), pp. 49–59. doi:10.1007/s00262-008-0523-4
- Dolen, Y., Gunaydin, G., Esendagli, G. and Guc, D. 2015. Granulocytic subset of myeloid derived suppressor cells in rats with mammary carcinoma. *Cellular Immunology*, 295(1), pp. 29–35. doi:10.1016/j.cellimm.2015.02.005
- Dong, C. 2006. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), pp. 329–334. doi:10.1038/nri1807
- Dongre, A. and Weinberg, R. A. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), pp. 69–84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4
- Dunford, J. E., Thompson, K., Coxon, F. P., Luckman, S. P., Hahn, F. M., Poulter, C. D., Ebetino, F. H. and Rogers, M. J. 2001. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(2), pp. 235–242.
- Dunn, G. P., Old, L. J. and Schreiber, R. D. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*. Vol. 22. pp. 329–360 . doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
- Dunn, L. K., Mohammad, K. S., Fournier, P. G. J., McKenna, C. R., Davis, H. W., Niewolna, M., Peng, X. H., Chirgwin, J. M. and Guise, T. A. 2009. Hypoxia and TGF-beta drive breast cancer bone metastases through parallel signaling pathways in tumor cells and the bone microenvironment. *PLoS One*, 4(9). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0006896
- Edgington-Mitchell, L. E., Rautela, J., Duivenvoorden, H. M., Jayatilleke, K. M., van der Linden, W. A., Verdoes, M., Bogyo, M. and Parker, B. S. 2015. Cysteine cathepsin activity suppresses osteoclastogenesis of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Oncotarget, Impact Journals, LLC*, 6(29), pp. 27008–27022. doi:10.18632/oncotarget.4714
- Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M. D., Zimonjic, D. B., Donaher, J. L., Popescu, N. C., Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. 2001. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & Development*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15(1), pp. 50–65. doi:10.1101/GAD.828901
- Exley, M. A., Friedlander, P., Alatrakchi, N., Vriend, L., Yue, S., Sasada, T., Zeng, W., Mizukami, Y., Clark, J., Nemer, D., LeClair, K., Canning, C., Daley, H., Dranoff, G., Giobbie-Hurder, A., Hodi, F. S., Ritz, J. and Balk, S. P. 2017. Adoptive Transfer of Invariant NKT Cells as Immunotherapy for Advanced

- Melanoma: A Phase I Clinical Trial. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, American Association for Cancer Research, 23(14), pp. 3510–3519. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0600
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C. and Ren, G. 2018. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), pp. 77–106. doi:10.1016/j.gendis.2018.05.001
- Feuerer, M., Beckhove, P., Bai, L., Solomayer, E.-F., Bastert, G., Diel, I. J., Pedain, C., Oberniedermayr, M., Schirmacher, V. and Umansky, V. 2001. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nature Medicine*, 7(4), pp. 452–458. doi:10.1038/86523
- Feuerer, M., Rocha, M., Bai, L., Umansky, V., Solomayer, E. F., Bastert, G., Diel, I. J. and Schirmacher, V. 2001. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *International Journal of Cancer*, 92(1), pp. 96–105. doi:10.1002/1097-0215(200102)9999:9999<::AID-IJC1152>3.0.CO;2-Q
- Fidler, I. 1970. Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With ¹²⁵I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *Journal of the National Cancer Institute*, 45(4), pp. 773–782. doi:10.1093/jnci/45.4.773
- Fierro, F. A., Nolta, J. A. and Adamopoulos, I. E. 2017. Concise Review: Stem Cells in Osteoimmunology. *Stem Cells*, 35(6), pp. 1461–1467. doi:10.1002/STEM.2625
- Food and Drug Administration. 2022. Burst Edition: FDA approval Yescarta (axicabtagene ciloleucel) for adult patients with large B-cell lymphoma that is refractory to first-line chemoimmunotherapy or relapses within 12 months of first-line chemoimmunotherapy | FDA. D.I.S.C.O. Consultado September 12, 2022, from <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-disco-burst-edition-fda-approval-yescarta-axicabtagene-ciloleucel-adult-patients-large-b-cell>
- Fratta, E., Coral, S., Covre, A., Parisi, G., Colizzi, F., Danielli, R., Marie Nicolay, H. J., Sigalotti, L. and Maio, M. 2011. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Molecular Oncology*, 5(2), p. 164. doi:10.1016/J.MOLONC.2011.02.001
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E. V., Bronson, R. T. and Pellman, D. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*, 437(7061), pp. 1043–1047. doi:10.1038/NATURE04217
- Gil Del Alcazar, C. R., Huh, S. J., Ekram, M. B., Trinh, A., Liu, L. L., Beca, F., Zi, X., Kwak, M., Bergholtz, H., Su, Y., Ding, L., Russnes, H. G., Richardson, A. L., Babski, K., Kim, E. M. H., McDonnell, C. H., Wagner, J., Rowberry, R., Freeman, G. J., ... Polyak, K. 2017. Immune escape in breast cancer during in situ to invasive carcinoma transition. *Cancer Discovery*, 7(10), pp. 1098–1115. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0222
- Gonda, K., Shibata, M., Ohtake, T., Matsumoto, Y., Tachibana, K., Abe, N., Ohto, H., Sakurai, K. and Takenoshita, S. 2017. Myeloid-derived suppressor cells are increased and correlated with type 2 immune responses, malnutrition, inflammation, and poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncology Letters*, 14(2), pp. 1766–1774. doi:10.3892/OL.2017.6305

- Groh, V., Wu, J., Yee, C. and Spies, T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 419(6908), pp. 734–738. doi:10.1038/nature01112
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. Vol. 12. Issue 1. pp. 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D. and Weinberg, R. a. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), pp. 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D. and Weinberg, R. a. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hanley, D. A., Adachi, J. D., Bell, A. and Brown, V. 2012. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *International Journal of Clinical Practice*, 66(12), pp. 1139–1146. doi:10.1111/ijcp.12022
- Hart, S. N., Polley, E. C., Yussuf, A., Yadav, S., Goldgar, D. E., Hu, C., LaDuca, H., Smith, L. P., Fujimoto, J., Li, S., Couch, F. J. and Dolinsky, J. S. 2020. Mutation prevalence tables for hereditary cancer derived from multigene panel testing. *Human Mutation*, 41(8), pp. e1–e6. doi:10.1002/humu.24053
- Hasegawa, T., Kikuta, J. and Ishii, M. 2019. Imaging the Bone-Immune Cell Interaction in Bone Destruction. *Frontiers in Immunology*, 10(596), pp. 1–7. doi:10.3389/fimmu.2019.00596
- Hayday, A. 1985. Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell*, 40(2), pp. 259–269. doi:10.1016/0092-8674(85)90140-0
- Hess, K. R., Varadhachary, G. R., Taylor, S. H., Wei, W., Raber, M. N., Lenzi, R. and Abbruzzese, J. L. 2006. Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer*, 106(7), pp. 1624–1633. doi:10.1002/cncr.21778
- Himmelstein, A. L., Foster, J. C., Khatcheressian, J. L., Roberts, J. D., Seisler, D. K., Novotny, P. J., Qin, R., Go, R. S., Grubbs, S. S., O'Connor, T., Velasco, M. R., Weckstein, D., O'Mara, A., Loprinzi, C. L. and Shapiro, C. L. 2017. Effect of longer-interval vs standard dosing of zoledronic acid on skeletal events in patients with bone metastases: A randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, 317(1), pp. 48–58. doi:10.1001/jama.2016.19425
- Hiraga, T., Myoui, A., Hashimoto, N., Sasaki, A., Hata, K., Morita, Y., Yoshikawa, H., Rosen, C. J., Mundy, G. R. and Yoneda, T. 2012. Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases. *Cancer Research*, 72(16), p. 4238. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3061
- Hirao, M., Hashimoto, J., Yamasaki, N., Ando, W., Tsuboi, H., Myoui, A. and Yoshikawa, H. 2007. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 25(5), pp. 266–276. doi:10.1007/s00774-007-0765-9
- Hofbauer, L. C., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L. and Khosla, S. 1999. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 25(3), pp. 255–259. doi:10.1016/S8756-3282(99)00162-3
- Hong, S., Qian, J., Yang, J., Li, H., Kwak, L. W. and Yi, Q. 2008. Roles of idiotype-specific t cells in myeloma cell growth and survival: Th1 and CTL cells are tumoricidal while Th2 cells promote tumor growth. *Cancer Research*, 68(20), pp. 8456–8464. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2213

- Hummel, H. D., Kufer, P., Grüllich, C., Seggewiss-Bernhardt, R., Deschler-Baier, B., Chatterjee, M., Goebeler, M. E., Miller, K., De Santis, M., Loidl, W., Dittrich, C., Buck, A., Lapa, C., Thurner, A., Wittemer-Rump, S., Koca, G., Boix, O., Döcke, W. D., Finfern, R., ... Bargou, R. C. 2021. Pasotuxizumab, a BiTE® immune therapy for castration-resistant prostate cancer: Phase I, dose-escalation study findings. *Immunotherapy*, 13(2), pp. 125–141. doi:10.2217/imt-2020-0256
- Hvidtfeldt, U. A., Severi, G., Andersen, Z. J., Atkinson, R., Bauwelinck, M., Bellander, T., Boutron-Ruault, M. C., Brandt, J., Brunekreef, B., Cesaroni, G., Chen, J., Concin, H., Forastiere, F., van Gils, C. H., Gulliver, J., Hertel, O., Hoek, G., Hoffmann, B., de Hoogh, K., ... Fecht, D. 2021. Long-term low-level ambient air pollution exposure and risk of lung cancer – A pooled analysis of 7 European cohorts. *Environment International*, 146, p. 106249. doi:10.1016/j.envint.2020.106249
- Idorn, M., Køllgaard, T., Kongsted, P., Sengeløv, L. and thor Straten, P. 2014. Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(11), pp. 1177–1187. doi:10.1007/s00262-014-1591-2
- Jackson, J. G., Zhang, X., Yoneda, T. and Yee, D. 2001. Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate- 2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 20(50), pp. 7318–7325. doi:10.1038/sj.onc.1204920
- Jensen, A. T., Jacobsen, J. B., Nørgaard, M., Yong, M., Fryzek, J. P. and Sørensen, H. T. 2011. Incidence of bone metastases and skeletal-related events in breast cancer patients: A population-based cohort study in Denmark. *BioMed Central, Cancer*, 11(1), pp. 1–6. doi:10.1186/1471-2407-11-29
- Jiao, S., Subudhi, S. K., Aparicio, A., Ge, Z., Guan, B., Miura, Y. and Sharma, P. 2019. Differences in Tumor Microenvironment Dictate T Helper Lineage Polarization and Response to Immune Checkpoint Therapy. *Cell*, 179(5), pp. 1177-1190.e13. doi:10.1016/j.cell.2019.10.029
- Kähkönen, T. E., Suominen, M. I., Mäki-Jouppila, J. H. E., Halleen, J. M., Tanaka, A., Seiler, M. and Bernoulli, J. 2019. Human Immune System Increases Breast Cancer-Induced Osteoblastic Bone Growth in a Humanized Mouse Model without Affecting Normal Bone. *Journal of Immunology Research*, 2019. doi:10.1155/2019/4260987
- Käkönen, S. and Mundy, G. 2003. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer*, 97(S3), pp. 834–839. doi:10.1002/cncr.11132
- Kakuta, S., Tagawa, Y. I., Shibata, S., Nanno, M. and Iwakura, Y. 2002. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon- γ through direct inhibition of cell proliferation and activation of antitumour host mechanisms. *Immunology*, 105(1), pp. 92–100. doi:10.1046/J.0019-2805.2001.01342.X
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P. and Starosławska, E. 2015. Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny*. Vol. 14. Issue 3. pp. 196–202 . doi:10.5114/pm.2015.54346
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D. M., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J. and Ding, L. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), pp. 333–339. doi:10.1038/nature12634

- Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G. P., Serganova, I., Chen, C.-R., Manova-Todorova, K., Blasberg, R., Gerald, W. L. and Massagué, J. 2005. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences, 102(39), pp. 13909–13914. doi:10.1073/pnas.0506517102
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., ... Lyden, D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), pp. 820–827. doi:10.1038/nature04186
- Kastenhuber, E. R. and Lowe, S. W. 2017. Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), pp. 1062–1078. doi:10.1016/j.cell.2017.08.028
- Keenan, T. E. and Tolaney, S. M. 2020. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 18(4), pp. 479–489. doi:10.6004/jnccn.2020.7554
- Khan, A., Morrison, A., Cheung, A., Hashem, W. and Compston, J. 2016. Osteonecrosis of the jaw (ONJ): diagnosis and management in 2015. *Osteoporosis International*, 27(3), pp. 853–859. doi:10.1007/s00198-015-3335-3
- Khansari, N., Shakiba, Y. and Mahmoudi, M. 2009. Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 3(1), pp. 73–80. doi:10.2174/187221309787158371
- Kieper, W. C., Tan, J. T., Bondi-Boyd, B., Gapin, L., Sprent, J., Ceredig, R. and Surh, C. D. 2002. Overexpression of Interleukin (IL)-7 Leads to IL-15-independent Generation of Memory Phenotype CD8⁺ T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(12), p. 1533. doi:10.1084/JEM.20020067
- Kingsley, L. a, Fournier, P. G. J., Chirgwin, J. M. and Guise, T. a. 2007. Molecular Biology of Bone Metastasis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(10), pp. 2609–2617. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0234
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J. and Schreiber, R. D. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171), pp. 903–907. doi:10.1038/nature06309
- Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R. M., Goichberg, P., Spiegel, A., Elson, A. and Lapidot, T. 2006. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nature Medicine*, 12(6), pp. 657–664. doi:10.1038/nm1417
- Korhonen, T., Hjelmberg, J., Harris, J. R., Clemmensen, S., Adami, H. O. and Kaprio, J. 2022. Cancer in twin pairs discordant for smoking: The Nordic Twin Study of Cancer. *International Journal of Cancer*, 151(1), pp. 33–43. doi:10.1002/IJC.33963
- Korpal, M., Yan, J., Lu, X., Xu, S., Lerit, D. a and Kang, Y. 2009. Imaging transforming growth factor-beta signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis. *Nature Medicine*, 15(8), pp. 960–966. doi:10.1038/nm.1943

- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., Martin, T. J. and Suda, T. 1999a. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 103(9), pp. 1345–1352. doi:10.1172/JCI5703
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., Martin, T. J. and Suda, T. 1999b. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 103(9), pp. 1345–1352. doi:10.1172/JCI5703
- Kumar, V. and Gabrilovich, D. I. 2014. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology*, 143(4), pp. 512–519. doi:10.1111/imm.12380
- Lacey, D. ., Timms, E., Tan, H.-L., Kelley, M. ., Dunstan, C. ., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.-X., Kaufman, S., Sarosi, I., ... Boyle, W. . 1998. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 93(2), pp. 165–176. doi:10.1016/S0092-8674(00)81569-X
- Landi, L., D’Inca, F., Gelibter, A., Chiari, R., Grossi, F., Delmonte, A., Passaro, A., Signorelli, D., Gelsomino, F., Galetta, D., Giannarelli, D., Soto Parra, H., Minuti, G., Tiseo, M., Migliorino, M. R., Cognetti, F., Toschi, L., Bidoli, P., Piantedosi, F., ... Cappuzzo, F. 2019. Bone metastases and immunotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), pp. 1–9. doi:10.1186/S40425-019-0793-8/TABLES/3
- Lane, D. P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*. Vol. 358. Issue 6381. pp. 15–16 . doi:10.1038/358015a0
- Leibold, M. A. 1995. The niche concept revisited: Mechanistic models and community context. *Ecology*, 76(5), pp. 1371–1382. doi:10.2307/1938141
- Lenart, B. A., Lorch, D. G. and Lane, J. M. 2008. Atypical Fractures of the Femoral Diaphysis in Postmenopausal Women Taking Alendronate. *New England Journal of Medicine*, 358(12), pp. 1304–1306. doi:10.1056/NEJMc0707493
- Li, G.-M. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), pp. 85–98. doi:10.1038/cr.2007.115
- Li, J. C., Huston, G. and Swain, S. L. 2003. IL-7 Promotes the Transition of CD4 Effectors to Persistent Memory Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), p. 1807. doi:10.1084/JEM.20030725
- Li, Y., Yin, Y. and Mariuzza, R. A. 2013. Structural and Biophysical Insights into the Role of CD4 and CD8 in T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*, 4, p. 206. doi:10.3389/fimmu.2013.00206
- Li, Z., Chen, L. and Qin, Z. 2009. Paradoxical Roles of IL-4 in Tumor Immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(6), pp. 415–422. doi:10.1038/cmi.2009.53
- Lin, S., Wang, J., Wang, L., Wen, J., Guo, Y., Qiao, W., Zhou, J., Xu, G. and Zhi, F. 2017. Phosphodiesterase-5 inhibition suppresses colonic inflammation-induced tumorigenesis via blocking the recruitment of MDSC. *American Journal of Cancer Research*, e-Century Publishing Corporation, 7(1), pp. 41–52. /pmc/articles/PMC5250679/

- Lipton, A. 2006. Future Treatment of Bone Metastases. *Clinical Cancer Research*, 12(20), pp. 6305s-6308s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1157
- Lorvik, K. B., Hammarström, C., Fauskanger, M., Haabeth, O. A. W., Zangani, M., Haraldsen, G., Bogen, B. and Corthay, A. 2016. Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer Research*, 76(23), pp. 6864–6876. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1219
- Lu, X. and Kang, Y. 2007. Organotropism of breast cancer metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(2–3), pp. 153–162. doi:10.1007/S10911-007-9047-3/FIGURES/4
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. and Xia, B. 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012. doi:10.1155/2012/925135
- Martini, M., Testi, M. G., Pasetto, M., Picchio, M. C., Innamorati, G., Mazzocco, M., Ugel, S., Cingarlini, S., Bronte, V., Zanovello, P., Krampera, M., Mosna, F., Cestari, T., Riviera, A. P., Brutti, N., Barbieri, O., Matera, L., Tridente, G., Colombatti, M. and Sartoris, S. 2010. IFN- γ -mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine*, 28(20), pp. 3548–3557. doi:10.1016/J.VACCINE.2010.03.007
- Marvel, D. and Gabrilovich, D. I. 2015. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(9), pp. 3356–3364. doi:10.1172/JCI80005
- Massagué, J. and Obenauf, A. C. 2016. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), pp. 298–306. doi:10.1038/nature17038
- McDonald, M. M., Kim, A. S., Mulholland, B. S. and Rauner, M. 2021. New Insights Into Osteoclast Biology. *Journal of Bone and Mineral Research Plus*, 5(9), pp. 1–10. doi:10.1002/jbm4.10539
- Melani, C., Sangaletti, S., Barazzetta, F. M., Werb, Z. and Colombo, M. P. 2007. Amino-Biphosphonate-Mediated MMP-9 Inhibition Breaks the Tumor-Bone Marrow Axis Responsible for Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion and Macrophage Infiltration in Tumor Stroma. *Cancer Research*, 67(23), pp. 11438–11446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1882
- Mendler, A. N., Hu, B., Prinz, P. U., Kreutz, M., Gottfried, E. and Noessner, E. 2012. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *International Journal of Cancer*, 131(3), pp. 633–640. doi:10.1002/IJC.26410
- Mendoza-Reinoso, V., McCauley, L. K. and Fournier, P. G. J. 2020. Contribution of Macrophages and T Cells in Skeletal Metastasis. *Cancers*, 12(4). doi:10.3390/CANCERS12041014
- Merouane, A., Rey-Villamizar, N., Lu, Y., Liadi, I., Romain, G., Lu, J., Singh, H., Cooper, L. J. N., Varadarajan, N. and Roysam, B. 2015. Automated profiling of individual cell–cell interactions from high-throughput time-lapse imaging microscopy in nanowell grids (TIMING). *Bioinformatics*, 31(19), pp. 3189–3197. doi:10.1093/bioinformatics/btv355
- Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. and Huber, M. 2014. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), pp. 449–458. doi:10.1007/s00005-014-0293-y

- Monteiro, A. C., Leal, A. C., Gonçalves-Silva, T., Mercadante, A. C. T., Kestelman, F., Chaves, S. B., Azevedo, R. B., Monteiro, J. P. and Bonomo, A. 2013a. T Cells Induce Pre-Metastatic Osteolytic Disease and Help Bone Metastases Establishment in a Mouse Model of Metastatic Breast Cancer. *PLoS ONE*, 8(7), pp. 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0068171
- Monteiro, A. C., Leal, A. C., Gonçalves-Silva, T., Mercadante, A. C. T., Kestelman, F., Chaves, S. B., Azevedo, R. B., Monteiro, J. P. and Bonomo, A. 2013b. T Cells Induce Pre-Metastatic Osteolytic Disease and Help Bone Metastases Establishment in a Mouse Model of Metastatic Breast Cancer. *Public Library of Science (PLoS) ONE*, 8(7), pp. 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0068171
- Müller, a, Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verástegui, E. and Zlotnik, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), pp. 50–56. doi:10.1038/35065016
- Mundy, G. R. 2002. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), pp. 584–593. doi:10.1038/nrc867
- Murphy, S. E. 2021. Biochemistry of nicotine metabolism and its relevance to lung cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 296, p. 100722. doi:10.1016/J.JBC.2021.100722
- Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T. and Higashio, K. 1998. RANK Is the Essential Signaling Receptor for Osteoclast Differentiation Factor in Osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), pp. 395–400. doi:10.1006/bbrc.1998.9788
- Nakazawa, H., English, D., Randell, P. L., Nakazawa, K., Martel, N., Armstrong, B. K. and Yamasaki, H. 1994. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), pp. 360–364. doi:10.1073/pnas.91.1.360
- Nicola, M. Di, Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S. and Gianni, A. M. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), pp. 3838–3843. doi:10.1182/BLOOD.V99.10.3838
- Nieto, M. A. 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10), pp. 1541–1547. doi:10.1387/IJDB.072410MN
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S., Smid, M., Brinkman, A. B., Morganella, S., Aure, M. R., Lingjærde, O. C., Langerød, A., Ringné, M., ... Stratton, M. R. 2016. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* 2016 534:7605, 534(7605), pp. 47–54. doi:10.1038/nature17676
- Okhrimenko, A., Grün, J. R., Westendorf, K., Fang, Z., Reinke, S., Von Roth, P., Wassilew, G., Kühl, A. A., Kudernatsch, R., Demski, S., Scheibenbogen, C., Tokoyoda, K., McGrath, M. A., Raftery, M. J., Schönrich, G., Serra, A., Chang, H. D., Radbruch, A. and Dong, J. 2014. Human memory T cells from the bone marrow are resting and maintain long-lasting systemic memory. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 111(25), pp. 9229–9234. doi:10.1073/PNAS.1318731111
- Oliveira, T. C., Gomes, M. S. and Gomes, A. C. 2020. The crossroads between infection and bone loss. *Microorganisms*, 8(11), pp. 1–18. doi:10.3390/MICROORGANISMS8111765
- Overwijk, W. W. and Restifo, N. P. 2001. B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 20(1). doi:10.1002/0471142735.IM2001S39
- Paget, S. 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133(3421), p. 571.
- Papavramidou, N., Papavramidis, T. and Demetriou, T. 2010. Ancient Greek and Greco–Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2010 17:3, 17(3), pp. 665–667. doi:10.1245/S10434-009-0886-6
- Park, S. I., Lee, C., David Sadler, W., Koh, A. J., Jones, J., Seo, J. W., Soki, F. N., Cho, S. W., Daignault, S. D. and McCauley, L. K. 2013. Parathyroid hormone-related protein drives a CD11b+Gr1+ cell-mediated positive feedback loop to support prostate cancer growth. *Cancer Research*, 73(22), pp. 6574–6583. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4692
- Patel, A. 2020. Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology*, 6(9), pp. 1488–1488. doi:10.1001/JAMAONCOL.2020.2592
- Patterson, R. E., Cadmus, L. A., Emond, J. A. and Pierce, J. P. 2010. Physical activity, diet, adiposity and female breast cancer prognosis: A review of the epidemiologic literature. *Maturitas*, 66(1), pp. 5–15. doi:10.1016/J.MATURITAS.2010.01.004
- Peltomäki, P. 2005. Lynch Syndrome Genes. *Familial Cancer* 2005 4:3, 4(3), pp. 227–232. doi:10.1007/S10689-004-7993-0
- Petralia, G., Padhani, A. R., Pricolo, P., Zugni, F., Martinetti, M., Summers, P. E., Grazioli, L., Colagrande, S., Giovagnoni, A. and Bellomi, M. 2019. Whole-body magnetic resonance imaging (WB-MRI) in oncology: recommendations and key uses. *La Radiologia Medica*, 124(3), pp. 218–233. doi:10.1007/S11547-018-0955-7
- Petrucelli, N., Daly, M. B. and Pal, T. 1998. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *GeneReviews*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>
- Pinsky, P. F., Lau, Y. K. and Doubeni, C. A. 2021. Potential Disparities by Sex and Race or Ethnicity in Lung Cancer Screening Eligibility Rates. *Chest*, 160(1), pp. 341–350. doi:10.1016/J.CHEST.2021.01.070
- Qi, W.-X., Tang, L.-N., He, A.-N., Yao, Y. and Shen, Z. 2014. Risk of osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving denosumab: a meta-analysis of seven randomized controlled trials. *International Journal of Clinical Oncology*, 19(2), pp. 403–410. doi:10.1007/s10147-013-0561-6
- Qin, A., Zhao, S., Miah, A., Wei, L., Patel, S., Johns, A., Grogan, M., Bertino, E. M., He, K., Shields, P. G., Kalemkerian, G. P., Gadgeel, S. M., Ramnath, N., Schneider, B. J., Hassan, K. A., Szerlip, N., Chopra, Z., Journey, S., Waninger, J., ... Owen, D. H. 2021. Bone Metastases, Skeletal-Related Events, and Survival in Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Immune Checkpoint

- Inhibitors. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 19(8), pp. 915–921. doi:10.6004/JNCCN.2020.7668
- Rausch, T., Jones, D. T. W., Zapatka, M., Stütz, A. M., Zichner, T., Weischenfeldt, J., Jäger, N., Remke, M., Shih, D., Northcott, P. A., Pfaff, E., Tica, J., Wang, Q., Massimi, L., Witt, H., Bender, S., Pleier, S., Cin, H., Hawkins, C., ... Korbel, J. O. 2012. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell*, 148(1–2), pp. 59–71. doi:10.1016/J.CELL.2011.12.013
- Raynaud, F., Mina, M., Tavernari, D. and Ciriello, G. 2018. Pan-cancer inference of intra-tumor heterogeneity reveals associations with different forms of genomic instability. *Public Library of Science, Genetics*, 14(9). doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1007669
- Ribas, A., Dummer, R., Puzanov, I., VanderWalde, A., Andtbacka, R. H. I., Michielin, O., Olszanski, A. J., Malvehy, J., Cebon, J., Fernandez, E., Kirkwood, J. M., Gajewski, T. F., Chen, L., Gorski, K. S., Anderson, A. A., Diede, S. J., Lassman, M. E., Gansert, J., Hodi, F. S. and Long, G. V. 2017. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell*, 170(6), pp. 1109–1119. doi:10.1016/J.CELL.2017.08.027
- Roato, I., Brunetti, G., Gorassini, E., Grano, M., Colucci, S., Bonello, L., Buffoni, L., Manfredi, R., Ruffini, E., Ottaviani, D., Ciuffreda, L., Mussa, A. and Ferracini, R. 2006. IL-7 up-regulates TNF-alpha-dependent osteoclastogenesis in patients affected by solid tumor. *Public Library of Science ONE*, 1(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0000124
- Rodolfo, M., Zilocchi, C., Accornero, P., Cappetti, B., Arioli, I. and Colombo, M. P. 1999. IL-4-Transduced Tumor Cell Vaccine Induces Immunoregulatory Type 2 CD8 T Lymphocytes That Cure Lung Metastases Upon Adoptive Transfer. *The Journal of Immunology*, 163(4), pp. 1924–1928.
- Roggia, C., Gao, Y., Cenci, S., Weitzmann, M. N., Toraldo, G., Isaia, G. and Pacifici, R. 2001. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), pp. 13960–13965. doi:10.1073/pnas.251534698
- Russell, R. G. G. 2011. Bisphosphonates: The first 40years. *Bone*, 49(1), pp. 2–19. doi:10.1016/j.bone.2011.04.022
- Russell, R. G. G. 2006. Bisphosphonates: From Bench to Bedside. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068(1), pp. 367–401. doi:10.1196/annals.1346.041
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J. and Takayanagi, H. 2006a. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(12), pp. 2673–2682. doi:10.1084/JEM.20061775
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Akira, S., Iwakura, Y., Cua, D. J. and Takayanagi, H. 2006b. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(12), pp. 2673–2682. doi:10.1084/jem.20061775
- Scadden, D. T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), pp. 1075–1079. doi:10.1038/nature04957

- Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S. and Emens, L. A. 2018. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(22), pp. 2108–2121. doi:10.1056/NEJMOA1809615/SUPPL_FILE/NEJMOA1809615_DATA-SHARING.PDF
- Schneider, C., Rasband, W., y Eliceiri, K. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, pp 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schreiber, K., Karrison, T. G., Wolf, S. P., Kiyotani, K., Steiner, M., Littmann, E. R., Pamer, E. G., Kammertoens, T., Schreiber, H. and Leisegang, M. 2019. Impact of TCR Diversity on the Development of Transplanted or Chemically Induced Tumors. *Cancer Immunology Research*, 8(2), pp. 192–202. doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0567
- Schuetz, F., Ehlert, K., Ge, Y., Schneeweiss, A., Rom, J., Inzkiweli, N., Sohn, C., Schirmacher, V. and Beckhove, P. 2009. Treatment of advanced metastasized breast cancer with bone marrow-derived tumour-reactive memory T cells: A pilot clinical study. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(6), pp. 887–900. doi:10.1007/S00262-008-0605-3/FIGURES/5
- Schwartz, E., Reichert, Z. and Van Poznak, C. 2022. Pharmacologic management of metastatic bone disease. *Bone*, 158, p. 115735. doi:10.1016/J.BONE.2020.115735
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V. and Borrello, I. 2006a. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *Journal of Experimental Medicine*, 203(12), pp. 2691–2702. doi:10.1084/jem.20061104
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V. and Borrello, I. 2006b. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of Experimental Medicine*, Rockefeller University Press, 203(12), pp. 2691–2702. doi:10.1084/jem.20061104
- Sethna, Z., Elhanati, Y., Dudgeon, C. S., Callan, C. G., Levine, A. J., Mora, T. and Walczak, A. M. 2017. Insights into immune system development and function from mouse T-cell repertoires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9), pp. 2253–2258. doi:10.1073/PNAS.1700241114/-/DCSUPPLEMENTAL
- Shah, S. P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., Turashvili, G., Ding, J., Tse, K., Haffari, G., Bashashati, A., Prentice, L. M., Khattra, J., Burleigh, A., Yap, D., Bernard, V., McPherson, A., Shumansky, K., Crisan, A., ... Aparicio, S. 2012. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486(7403), pp. 395–399. doi:10.1038/NATURE10933
- Shibue, T. and Weinberg, R. A. 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(10), pp. 611–629. doi:10.1038/NRCLINONC.2017.44
- Shiozawa, Y., Pedersen, E. A., Havens, A. M., Jung, Y., Mishra, A., Joseph, J., Kim, J. K., Patel, L. R., Ying, C., Ziegler, A. M., Pienta, M. J., Song, J., Wang, J., Loberg, R. D., Krebsbach, P. H., Pienta, K. J. and Taichman, R. S. 2011. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche

- to establish footholds in mouse bone marrow. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(4), pp. 1298–1312. doi:10.1172/JCI43414
- Singh, B., Berry, J., Shoher, A., Ayers, G., Wei, C. and Lucci, A. 2007. COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene*, 26, pp. 3789–3796. doi:10.1038/sj.onc.1210154
- Singletary, S. E. 2003. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Annals of Surgery*, 237(4), p. 474. doi:10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87
- Standring, S. 2020. Chapter 39. Nose, nasal cavity and paranasal sinuses. *Gray's Anatomy*, 42nd Edition. *The Anatomical Basis of Clinical Practice*.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grünewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L. M., Rittling, S. R. and Scadden, D. T. 2005. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(11), pp. 1781–1791. doi:10.1084/JEM.20041992
- Stopeck, A. T., Fizazi, K., Body, J. J., Brown, J. E., Carducci, M., Diel, I., Fujiwara, Y., Martín, M., Paterson, A., Tonkin, K., Shore, N., Sieber, P., Kueppers, F., Karsh, L., Yardley, D., Wang, H., Maniar, T., Arellano, J. and Braun, A. 2016. Safety of long-term denosumab therapy: results from the open label extension phase of two phase 3 studies in patients with metastatic breast and prostate cancer. *Supportive Care in Cancer : Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 24(1), pp. 447–455. doi:10.1007/S00520-015-2904-5
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. and Futreal, P. A. 2009. The cancer genome. *Nature*, 458(7239), pp. 719–724. doi:10.1038/NATURE07943
- Structure of Long bone - Nursing Lecture. n.d. Retrieved Consultado August 30, 2022, from Consultado August 30, 2022, from <https://nursinglecture.com/structure-of-long-bone/>
- Suarez-Almazor, M. E., Herrera, R., Lei, X., Chavez-MacGregor, M., Zhao, H. and Giordano, S. H. 2020. Survival in older women with early stage breast cancer receiving low-dose bisphosphonates or denosumab. *Cancer*, 126(17), pp. 3929–3938. doi:10.1002/CNCR.33035
- Sullivan, R. and Graham, C. H. 2007. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(2), pp. 319–331. doi:10.1007/s10555-007-9062-2
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P. and Zhu, H. P. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, Ivspring International Publisher, 13(11), p. 1387. doi:10.7150/IJBS.21635
- Sun, Y. X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Wang, J., Cook, K., Osman, N. I., Koh-Paige, A. J., Shim, H., Pienta, K. J., Keller, E. T., McCauley, L. K. and Taichman, R. S. 2005. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *J Bone Miner Res*, 20(2), pp. 318–329. doi:10.1359/JBMR.041109
- Sun, Y. X., Wang, J., Shelburne, C. E., Lopatin, D. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Pienta, K. J. and Taichman, R. S. 2003. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry*, *J Cell Biochem*, 89(3), pp. 462–473. doi:10.1002/JCB.10522

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. doi:10.3322/caac.21660
- Svennevig, J. L., Lunde, O. C., Holter, J. and Bjørgsvik, D. 1984. Lymphoid infiltration and prognosis in colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 49(3), pp. 375–377. doi:10.1038/bjc.1984.60
- Taichman, R. S. 2005. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105(7), pp. 2631–2639. doi:10.1182/BLOOD-2004-06-2480
- Takahashi, M., Ozaki, Y., Kizawa, R., Masuda, J., Sakamaki, K., Kinowaki, K., Umezu, T., Kondoh, C., Tanabe, Y., Tamura, N., Miura, Y., Shigekawa, T., Kawabata, H., Baba, N., Iguchi, H. and Takano, T. 2019. Atypical femoral fracture in patients with bone metastasis receiving denosumab therapy: a retrospective study and systematic review. *BioMed Central, Cancer*, 19(1). doi:10.1186/S12885-019-6236-6
- Tavazoie, M. F., Pollack, I., Tanqueco, R., Ostendorf, B. N., Reis, B. S., Gonsalves, F. C., Kurth, I., Andreu-Agullo, C., Derbyshire, M. L., Posada, J., Takeda, S., Tafreshian, K. N., Rowinsky, E., Szarek, M., Waltzman, R. J., Mcmillan, E. A., Zhao, C., Mita, M., Mita, A., ... Tavazoie, S. F. 2018. LXR/ApoE Activation Restricts Innate Immune Suppression in Cancer. *Cell*, 172(4), pp. 825–840. doi:10.1016/J.CELL.2017.12.026
- Thomas, D. A. and Massagué, J. 2005. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), pp. 369–380. doi:10.1016/j.ccr.2005.10.012
- Tokoyoda, K., Zehentmeier, S., Hegazy, A. N., Albrecht, I., Grün, J. R., Löhning, M. and Radbruch, A. 2009. Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. *Immunity*, 30(5), pp. 721–730. doi:10.1016/J.IMMUNI.2009.03.015
- Traversari, C., van der Bruggen, P., Van den Eynde, B., Hainaut, P., Lemoine, C., Ohta, N., Old, L. and Boon, T. 1992. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics*, 35(3), pp. 145–152. doi:10.1007/BF00185107
- Trayes, K. P. and Cokenakes, S. E. H. 2021. Breast Cancer Treatment. *American Family Physician*, 104(2), pp. 171–178. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2021/0800/p171.html>
- Vahtsevanos, K., Kyrgidis, A., Verrou, E., Katodritou, E., Triaridis, S., Andreadis, C. G., Boukovinas, I., Koloutsos, G. E., Teleioudis, Z., Kitikidou, K., Paraskevopoulos, P., Zervas, K. and Antoniadis, K. 2009. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(32), pp. 5356–5362. doi:10.1200/JCO.2009.21.9584
- Van Poznak, C. H., Unger, J. M., Darke, A. K., Moinpour, C., Bagramian, R. A., Schubert, M. M., Hansen, L. K., Floyd, J. D., Dakhil, S. R., Lew, D. L., Wade, J. L., Fisch, M. J., Henry, N. L., Hershman, D. L. and Gralow, J. 2019. Osteonecrosis of the jaw in patients with cancer receiving zoledronic acid for bone metastases: SWOG S0702, NCT00874211. *Journal of Clinical Oncology*, 37(15_suppl), pp. 11502–11502. doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.11502
- Van Poznak, C., Cross, S. S., Saggese, M., Hudis, C., Panageas, K. S., Norton, L., Coleman, R. E. and Holen, I. 2006. Expression of osteoprotegerin (OPG), TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), and

- receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human breast tumours. *Journal of Clinical Pathology*, 59(1), pp. 56–63. doi:10.1136/jcp.2005.026534
- Van Poznak, Catherine, Somerfield, M. R., Barlow, W. E., Biermann, J. S., Bosserman, L. D., Clemons, M. J., Dhesy-Thind, S. K., Dillmon, M. S., Eisen, A., Frank, E. S., Jagsi, R., Jimenez, R., Theriault, R. L., Vandenberg, T. A., Yee, G. C. and Moy, B. 2017. Role of Bone-Modifying Agents in Metastatic Breast Cancer: An American Society of Clinical Oncology–Cancer Care Ontario Focused Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 35(35), pp. 3978–3986. doi:10.1200/JCO.2017.75.4614
- Veglia, F., Perego, M. and Gabrilovich, D. 2018. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, 19(2), pp. 108–119. doi:10.1038/s41590-017-0022-x
- Wang, Jianhua, Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K. J., Mehra, R., Loberg, R. and Taichman, R. S. 2008. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(7), pp. 4283–4294. doi:10.1074/JBC.M707465200
- Wang, Jiping, Costantino, J. P., Tan-Chiu, E., Wickerham, D. L., Paik, S. and Wolmark, N. 2004. Lower-Category Benign Breast Disease and the Risk of Invasive Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(8), pp. 616–620. doi:10.1093/JNCI/DJHS105
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. and Murphy, K. M. 2006. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity*, 24(6), pp. 677–688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002
- Who Cancer. 3 de February del 2022. Cancer. Consultado October 30, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Wright, L. E., Ottewell, P. D., Rucci, N., Peyruchaud, O., Pagnotti, G. M., Chiechi, A., Buijs, J. T. and Sterling, J. A. 2016. Murine models of breast cancer bone metastasis. *BoneKEy Reports*, Springer Nature, 5. doi:10.1038/bonekey.2016.31
- Xu, Z., Hurchla, M. A., Deng, H., Uluçkan, Ö., Bu, F., Berdy, A., Eagleton, M. C., Heller, E. A., Floyd, D. H., Dirksen, W. P., Shu, S., Tanaka, Y., Fernandez, S. A., Rosol, T. J. and Weilbaecher, K. N. 2009. Interferon-gamma targets cancer cells and osteoclasts to prevent tumor-associated bone loss and bone metastases. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7), pp. 4658–4666. doi:10.1074/JBC.M804812200
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G. R. and Guise, T. A. 1999. TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), pp. 197–206. doi:10.1172/JCI3523
- Yoneda, T., Sasaki, A. and Mundy, G. R. 1994. Osteolytic bone metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 32(1), pp. 73–84. doi:10.1007/BF00666208
- Yost, K. E., Chang, H. Y. and Satpathy, A. T. 2021. Recruiting T cells in cancer immunotherapy. *Science*, 372(6538), pp. 130–131. doi:10.1126/science.abd1329
- Zapatka, M., Borozan, I., Brewer, D. S., Iskar, M., Grundhoff, A., Alawi, M., Desai, N., Sülthmann, H., Moch, H., Cooper, C. S., Eils, R., Ferretti, V. and Lichter, P. 2020. The landscape of viral associations in human cancers. *Nature Genetics*, 52(3), pp. 320–330. doi:10.1038/s41588-019-0558-9

- Zhang, K., Kim, S., Cremasco, V., Hirbe, A. C., Novack, D. V., Weilbaecher, K. and Faccio, R. 2011. CD8+ T Cells Regulate Bone Tumor Burden Independent of Osteoclast Resorption. *Cancer Research*, 71(14), pp. 4799–4808. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3922
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C. and Coukos, G. 2003. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(3), pp. 203–213. doi:10.1056/NEJMoa020177
- Zhang, N. and Bevan, M. J. 2011. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, 35(2), pp. 161–168. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.010
- Zou, L., Barnett, B., Safah, H., LaRussa, V. F., Evdemon-Hogan, M., Mottram, P., Wei, S., David, O., Curiel, T. J. and Zou, W. 2004. Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Research*, 64(22), pp. 8451–8455. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1987

Anexos

Anexo A

Tabla 3 Listado de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Tipo	Marca	Clona	Animal origen	Técnica donde se utilizo	Concentración utilizada
Anti-ratón CD3	Conjugado con FITC	eBioscience	145-2C11	Hamster	Citometría de flujo	500 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD3	Conjugado con APC	eBioscience	145-2C11	Hamster	Citometría de flujo	125 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD3	Conjugado con APC-eFlour780	eBioscience	17A2	Hamster	Citometría de flujo	1 µg/10 ⁶ células
Anti-ratón CD4	Conjugado con PE-Cy5.5	eBioscience	RM4-5	Rata	Citometría de flujo	62.5 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD8α	Conjugado con eFlour450	eBioscience	53-6.7	Rata	Citometría de flujo	125 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD8α	Conjugado con FITC	eBioscience	53-6.7	Rata	Citometría de flujo	250 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD62L	Conjugado con PE	eBioscience	MEL-14	Rata	Citometría de flujo	125 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD69	Conjugado con PE	eBioscience	H1.2F3	Rata	Citometría de flujo	62.5 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD90.2	Conjugado con PE-Cy7	eBioscience	53-2.1	Rata	Citometría de flujo	15 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD11b	Conjugado con PE	BioLegend	M1/70	Rata	Citometría de flujo	31.3 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD11b	Conjugado con FITC	BioLegend	M1/70	Rata	Citometría de flujo	31.3 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón Ly6C	Conjugado con PerCP-Cy5.5	eBioscience	HK1.4	Rata	Citometría de flujo	125 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón Ly6G	Conjugado con APC-Cy7	BioLegend	1A8	Rata	Citometría de flujo	31.3 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón H-2 (MHC-I)	Conjugado con PE	BioLegend	M1/42	Rata	Citometría de flujo	250 ng/10 ⁶ células
Isotipo control	Conjugado con PE	eBioscience	eBR2a	Rata	Citometría de flujo	250 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CTLA-4	Conjugado con PE-Cy7	eBioscience	UC10-4B9,	Hamster	Citometría de Flujo	500 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón PD-1	Conjugado con APC-Cy7	BioLegend	29F.1A12,	Rata	Citometría de Flujo	125 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón PD-L1	Conjugado con PE	BioLegend	10F.9G2	Rata	Citometría de Flujo	250 ng/10 ⁶ células
Anti-ratón CD16/32	Ultra-LEAF	BioLegend		93 Rata	Citometría de Flujo	1 µg/10 ⁶ células
Anti-ratón IFNγ	Ultra-LEAF	BioLegend	XMG1.2	Rata	Neutralización	10 µg/ratón
Anti-ratón IL-4	Ultra-LEAF	BioLegend	11B11	Rata	Neutralización	10 µg/ratón
Anti-ratón CD4	InVivoMAb	Bio X Cell	GK1.5	Rata	Depleción	100 µg/ratón
Anti-ratón CD8α	InVivoMAb	Bio X Cell		2.43 Rata	Depleción	100 µg/ratón
IgG2b control de isotipo	InVivoMAb	Bio X Cell	LTF2	Rata	Control de Isotipo	100 µg/ratón
Anti-ratón CD3	InVivoMAb	Bio X Cell	17A2	Rata	Activación <i>in vitro</i>	5 µg/mL
Anti-CD28	InVivoMAb	Bio X Cell		37.51 Rata	Activación <i>in vitro</i>	5 µg/mL
Anti-ratón CD3E		Dako		Conejo	Inmunohistoquímica	1/100
Anti-ratón CD3E		Sigma		Conejo	Inmunohistoquímica	1/1000
Anti-conejo IgG	Biotinizado	Abcam		Chivo	Inmunohistoquímica	1/1000

Anexo B**Tabla 4** Secuencia de oligonucleótidos.

Gen	Secuencia
<i>Rpl32</i>	3' CAGGGTGCGGAGAAGGTTCAAGGG 5' 5' CTTAGAGGACACGTTGTGAGCAATC 3'
<i>Rankl</i>	3' AGCCGAGACTACGGCAAGTA 5' 5' GCGCTCGAAAGTACAGGAAC 3'
<i>Opg</i>	3' CCAAGCATGCTGAGTGAGAA 5' 5' CAGCTGTGAGGAGAGGAAGG 3'