

Tesis Doctoral

Identificación de ejes quimiotácticos que guían células madre mesenquimales al estroma tumoral en adenocarcinomas mamarios

Sganga, Leonardo

2014-03-31

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sganga, Leonardo. (2014-03-31). Identificación de ejes quimiotácticos que guían células madre mesenquimales al estroma tumoral en adenocarcinomas mamarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sganga, Leonardo. "Identificación de ejes quimiotácticos que guían células madre mesenquimales al estroma tumoral en adenocarcinomas mamarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-31.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad De Ciencias Exactas y Naturales

**Identificación de ejes quimiotácticos que guían células madre mesenquimales
al estroma tumoral en adenocarcinomas mamarios**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas.

Leonardo Sganga

Director de tesis: Dr. Osvaldo Luis Podhajcer

Director Asistente: Dra. Marcela Fabiana Bolontrade

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Daniel Iusem

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir, Laboratorio de Terapia Molecular y Celular.

Buenos Aires, febrero de 2014

Resumen

Identificación de ejes quimiotácticos que guían células madre mesenquimales al estroma tumoral en adenocarcinomas mamarios

El crecimiento tumoral depende en gran medida en la interacción de las células tumorales con el microambiente que las circunda. Entre otras células que componen el estroma tumoral se encuentran precursores locales y precursores estromales o células madre mesenquimales (MSCs) que se alojan en el tumor tras ser reclutadas desde la médula ósea. En base a esto surge la pregunta: ¿cuáles de los factores del microambiente tumoral son los responsables de la migración de MSCs provenientes de médula ósea?

Utilizando un modelo in vitro del microambiente tumoral representado por medios condicionados (MC) por muestras humanas de adenocarcinomas mamarios realizamos un estudio proteómico de citoquinas y quimioquinas sobre 8 muestras tumorales, destacándose IL-6, GRO, IL-8 y MCP-1 como los factores más representados de los medios condicionados por tumores, siendo el perfil muy similar entre todas las muestras tumorales. En busca de un modelo que remede el aporte de factores quimiotácticos por parte de los tumores humanos, se crecieron tumores ortotópicos en ratones nude combinando una línea tumoral mamaria humana con fibroblastos humanos adultos. Utilizando este modelo, se logró cuantificar las MSCs llegadas tras migración local luego de ser inyectadas de modo peritumoral.

En una validación técnica y funcional in vitro, IL-6 resultó ser quimiotáctico para MSCs pero en concentraciones mucho mayores a las encontradas en los tumores; sin embargo no se descarta un rol de IL-6 directo o indirecto. Por otra parte los ejes quimiotácticos de GRO, IL-8 y MCP-1 no revelaron un aporte significativo sobre la migración de MSCs.

Por otro lado, de un análisis estadístico y funcional comparando los MC provenientes de tumores y tejidos adyacentes libres de patología, resultó una lista de factores diferencialmente representados de los cuales MIP-3 α o proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa surge como el factor más relevante como posible mediador del reclutamiento de las MSCs hacia el tumor. La validación funcional del eje quimiotáctico MIP-3 α / CCR6 sugiere que este eje estaría involucrado, al menos en parte, en la migración de MSCs hacia tumores.

En suma, hemos logrado identificar un factor relevante para la modulación de la migración de las MSCs hacia el tumor, factible de ser utilizado en estudios posteriores para el diseño de terapias celulares contra el cáncer.

Palabras clave: MSCs, cáncer de mama, microambiente tumoral, quimiotaxis, arreglos de anticuerpos, MIP-3 α , "homing" (o alojamiento), migración.

Abstract

Identification of chemotactic axis guiding mesenchymal stem cells to the tumor stroma in breast adenocarcinomas

Tumor growth depends greatly on the interaction of tumor cells with the surrounding microenvironment. Among other cells comprising the tumor stroma, there are local precursors and stromal precursors or mesenchymal stem cells (MSCs) that home into the tumor after being recruited from the bone marrow. Based on this, the question arises: which of the factors from the tumor microenvironment are responsible for the migration of bone marrow-derived MSCs?

Using an *in vitro* model for the tumor microenvironment represented by conditioned media (CM) from human samples of breast adenocarcinomas, we performed a proteomic study of cytokines and chemokines in 8 tumor samples, highlighting IL-6, GRO, IL-8 and MCP-1 as the most represented factors in tumor -conditioned media, with a very similar profile among all tumor samples. Looking for a model that represents the contribution of chemotactic factors from human tumors, orthotopic tumors were grown in nude mice by combining a human mammary tumor cell line with human adult fibroblasts. Using this model, we were able to quantify MSCs arriving after local migration after being injected in a peritumoral way.

In a technical and functional *in vitro* validation, IL-6 was found to be chemotactic for MSCs but at much higher concentrations than those found in tumors; however, we cannot disregard a direct or indirect role for IL-6. Moreover, chemotactic axis involving GRO, IL-8 and MCP-1 did not reveal a significant contribution on MSCs migration. Furthermore, a statistical and functional analysis comparing MC from tumors and adjacent tissues free of pathology, resulted in a list of factors differentially represented where MIP-3 α or macrophage inflammatory protein- 3 alpha emerges as the most relevant factor as possible mediator for the recruitment of MSCs to the tumor. Functional validation of the chemotactic axis MIP-3 α / CCR6 suggested that this axis would be involved, at least in part, on MSCs migration to tumors.

In summary, we could identify a factor relevant for the modulation of MSCs migration into the tumor, likely to be used in subsequent studies to design cell therapies against cancer.

Key words: MSCs, breast cancer, tumor microenvironment, chemotaxis, antibody arrays, MIP-3 α , homing, migration.

*A Valentino y Victoria
quienes me llenan de alegría a cada instante. A quienes dedico lo que soy, lo que
hago y dedicaré toda mi vida para que sean felices.*

*A Mariana
el amor de mi vida, la madre de mis hijos, la mejor que pudieran tener.
A quien debo todo mi amor.*

*A Araceli
quien me dio todo siempre, vida y alma.
A quien debo lo que soy y por quien todo lo daré.*

*A Sebi
mi hermano mayor, mi primer ejemplo, mi primer amigo.
Con quien tenemos proyecto para rato.*

*A Tato
aunque eligió el peor momento para irse, cuando la familia se hacía grande
y se abrazo prometía. También por él estoy acá.*

*A mis abuelos, Gue li y Bibi
quienes me enseñaron a valorar las cosas simples de la vida y la familia,
el tesoro más grande que tengo.*

*A mis amigos de siempre, Javi, Dani, Demi
mis hermanos de alma, quienes se están desde siempre
por ellos he de jugarme el pellejo...*

*A mis amigos de la vida, Eleonora, Daniel, Héman, José ...
y quienes en mayor o menor medida son parte fundamental en mi vida.*

Soy mi gente, a ellos me debo. Son parte de mí y en mí siempre vivirán.

Agradecimientos

A Osvaldo, por haberme dado las herramientas para mi formación. Por haber confiado en mí, por su sinceridad, por haber discutido de ciencia al detalle, gracias.

A Marcela, por haberme elegido para este proyecto, por haberme enseñado y haber trabajado a la par, al pie del cañón. Por estar de principio a fin, enormes gracias.

A mis amigos del labo

A Ed, en quien encontré un amigo y un excelente compañero que me adoptó para que no cometiera esos errores que él sabía que iba a cometer!. Gracias Ed!

A Ceci, todo le debemos gran parte de nuestro trabajo. Una madre que se preocupa por la persona. Gracias Ceci por ser como sos, única.

A Caffè, un amigazo, el tipo con más experiencia que conozco, y no por viejo sino porque la comparte. Dá valor a todo lo que hace, gracias por todo Caffè.

A Lean, que no cambie nunca. El tipo del abrazo sincero, que mira a los ojos cuando saluda, siempre con buena onda. Gracias Lean.

A Lu quien nos llena de alegría con su buena onda loca. Gracias por ser tan originalmente vos.

A Santi quien sabe mucho y lo comparte. Mucho de eso está reflejado en este trabajo. Gracias Santi.

A Veró, Andrea y Gabriela, excelentes profesionales de quienes aprendí mucho. Con quienes reímos mucho también. Gracias!

A la Changui, Elvia, Mariela, Mariana, las flores del labo que dan vida con sus sonrisas todos los días. Marie te vamos a extrañar!

Especialmente a Dani y Juanma que siempre vienen con su buena onda al 107. Son geniales.

A Inés Bravo y su equipo, Irene Sorín, Alejandra Tincheiro, por el aporte vital de las muestras tumorales y el análisis de la patología. Con quienes aprendí mucho también.

A los Dres. Sorrentino y Robinson del Hospital Naval por las muestras de médula ósea.

A Luis Quezada, Ale Rabossi y Martín Pérez, con quienes dí mis primeros pasos en FIL. Gracias por todo, por ser excelentes compañeros, por enseñarme tanto y

por sobre todo por ser tan buena gente. Gracias Pérez no pierdas nunca el sentido del humor, ese tan particular que tenés.

A mi comisión de Seguimiento, Ale Schinder, Guillermo Mazzolini y Alberto Crottogini por bancarse tantas presentaciones y por tantas sugerencias a mi trabajo. Gracias por ayudarme a progresar.

A Mariana y Juan del Austral por las colaboraciones y la buena onda.

A Vanesa Gottfreddi y Fernanda Ceriani por tantas reuniones en el ministerio de cultivo. Aprendí mucho y conocí en ellas excelentes investigadoras y personas.

A Norberto Iusem, mi consejero. Siempre con una palabra positiva, gracias Norber.

A La Fundación Leloir, y su gente

A Mónica y Juan de la biblio por brindar un servicio único, y por ser personas geniales.

A Mantenimiento por estar en cada detalle que se necesita para trabajar todos los días

A Pancho, por el café y el mate cocido, por ser un tipazo.

A Hugo, Ana, Mari, gente de primera que llegué a apreciar en serio.

A Matías, Emiliano y los chicos de soporte

A Dieguito y Cristian del droguro

A Adriana, Sonia y los chicos del Bio terio

A Marcos, de compras

A Walter y Cristian

A Lili, siempre con una sonrisa

A los chicos de administración

A Dora y Bemabé

A todos gracias, sin todos ellos nuestro trabajo no sería posible.

A CONICET, a la Agencia (ANPCyT) y al Instituto Nacional del Cáncer por las becas.

A la Fundación René Barón, a AFULC por apoyar tanto al laboratorio.

ABREVIATURAS

BM-MSCs: Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal/Stem cells. Células Estromales/Madre derivadas de la Médula Ósea.

CBA: de Citometric Bead Array. Arreglo de esferas evaluado por citometría de flujo.

CCR6: Receptor de MIP-3 α /CCL20.

CICUAL: Comité para el uso y Cuidado de Animales de Laboratorio.

CXCR1/IL-8Ra: Receptor de alta afinidad por IL-8.

CXCR2/IL-8Rb: Receptor de baja afinidad por IL-8.

EGF: Epidermal growth factor. Factor de crecimiento epidermal.

FAT: Fibroblastos Asociados a Tumor.

GPCRs: G Protein Coupled Receptors. Receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G.

GRO/ CXCL1, 2 y3: Growth related oncogen. Oncogén relacionado al crecimiento.

HER2 / ErbB2: Receptor tipo 2 del Factor de crecimiento epidérmico.

H&E: Hematoxilina-Eosina.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-8: Interleuquina 8.

INC: Instituto Nacional del Cáncer de Argentina.

IHQ: Inmunohistoquímica.

MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1. Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MEC: Matriz extracelular.

MIP-3 α /CCL20: Macrophages inflammatory protein. Proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa.

MSCs: Mesenchymal stromal/stem cells. Células estromales/madre mesenquimales.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

PCR: Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.

RE: Receptores de estrógenos.

RP: Receptores de progesterona.

RT-PCR: Retrotranscripción seguida de PCR.

TKRs: Tyrosin kinase receptors. Receptores de tirosín quinasa

SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteins. Proteína secretada acídica y rica en cisteínas.

VEGF: vascular endothelial growth factor. Factor de crecimiento vascular endotelial

WHO: World Health Organization. Organización Mundial de la Salud.

Para otros factores discutidos Ver ANEXO.

1 CONTENIDO

2 ANTECEDENTES	1
2.1 INICIO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER	1
2.2 LA GLÁNDULA MAMARIA	4
2.3 CÁNCER DE MAMA	6
2.4 CÉLULAS ESTROMALES/MADRE MESENQUIMALES, MSCs.	14
2.5 MIGRACIÓN CELULAR	17
2.6 EN BUSCA DE UN MODELO MIGRATORIO PARA MSCs	23
2.7 ESTRATEGIAS APLICABLES A DISEÑOS DE TERAPIA ANTITUMORAL	25
3 HIPÓTESIS	27
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVOS GENERALES	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5 MODELO DE ESTUDIO	30
6 RESULTADOS – PARTE I	31
6.1 CARACTERIZACIÓN DE MSCs OBTENIDAS DE MÉDULA ÓSEA. OBTENCIÓN DE SUBPOBLACIONES CON DISTINTA CAPACIDAD ADHERENTE.	31
6.2 LA SUBPOBLACIÓN MO-MSCs EXHIBE MAYOR NIVEL DE EXPRESIÓN DE INTEGRINAS, ADHESIÓN A MATRICES Y A ENDOTELIO Y TIENE UNA MAYOR CAPACIDAD MIGRATORIA.	33
6.3 LA SUBPOBLACIÓN MO-MSCs LOGRA UNA MAYOR LOCALIZACIÓN TUMORAL A NIVEL LOCO-REGIONAL.	37
7 RESULTADOS - PARTE II	38
7.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES	39
7.2 QUIMIOTAXIS DE MSCs FRENTE A LOS MC DE TUMORES Y TEJIDOS ADYACENTES	41
7.3 PRUEBA DE CONCEPTO. LLEGADA DE MSCs EN UN MODELO IN VIVO	42
7.4 CAPACIDAD DE RECLUTAMIENTO DE MSCs POR TUMORES MAMARIOS MIXTOS CRECIDOS EN RATONES “NUDE”. SEGUIMIENTO IN VIVO Y CUANTIFICACIÓN.	48

7.5	ANÁLISIS PROTEÓMICO DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LOS MC POR TUMORES Y TEJIDOS ADYACENTES MEDIANTE EL USO DE ARREGLOS DE ANTICUERPOS	55
7.6	VALIDACIÓN FUNCIONAL DE IL-6.	61
7.7	VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LAS QUIMIOQUINAS Y LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SELECCIONADOS.	63
7.8	VALIDACIÓN FUNCIONAL DE MIP-3A Y EGF.	70
7.9	EN BUSCA DE UN MODELO QUE REMEDE EL APORTE DE LOS FACTORES IDENTIFICADOS EN LAS MUESTRAS TUMORALES	73
7.10	INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE TUMORAL SOBRE LAS MIGRACIÓN DE MSCs	75
8	CONCLUSIONES	81
9	MODELO PROPUESTO	82
10	DISCUSIÓN	84
10.1	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SUBPOBLACIÓN CON ALTA CAPACIDAD DE LLEGADA A TUMOR.	84
10.2	VALIDACIÓN TÉCNICA Y FUNCIONAL DE LOS EJES SELECCIONADOS QUIMIOTÁCTICOS.	85
10.3	SEGUIMIENTO DE MSCs EN EL MODELO IN VIVO.	92
10.4	DESTINO CELULAR DE MSCs EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.	93
11	ESTRATEGIAS Y METODOLOGÍA	94
11.1	TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS FUNCIONALES	94
11.2	OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE/ESTROMALES MESENQUIMALES DE MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA.	95
11.3	MUESTRAS DE TUMORES HUMANOS. TUMOR Y TEJIDO ADYACENTE.	96
11.4	CITOMETRÍA DE FLUJO PARA CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA	97
11.5	OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS POR TUMORES HUMANOS Y TEJIDOS ADYACENTES, CÉLULAS TUMORALES Y NORMALES.	98
11.6	OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMOR (FAT) PROVENIENTES DE MUESTRAS TUMORALES, DISGREGACIÓN DE TEJIDOS TUMORALES OBTENIDOS A PARTIR DEL CRECIMIENTO DE TUMORES EN EL MODELO <i>IN VIVO</i>.	98
11.7	ENSAYOS DE MIGRACIÓN EN CULTIVO	99
11.8	DETECCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PRESENTES EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS UTILIZANDO ARREGLOS DE ANTICUERPOS.	101
11.9	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN MEDIOS CONDICIONADOS	102
11.10	DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	103
11.11	CUANTIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL ARN	104
11.12	DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE GPCRS Y TKRS EN MSCs POR RT Y PCR EN TIEMPO REAL.	105
11.13	DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE GPCRS EN SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO	107
11.14	NEUTRALIZACIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS CON ANTICUERPOS BLOQUEANTES	108

11.15	INMUNOPRECIPITACIÓN DE QUIMIOQUINAS USANDO ANTICUERPOS ESPECÍFICOS Y BEADS MAGNÉTICAS - PROTEÍNA G.	109
11.16	SILENCIAMIENTO POSTTRANSCRIPCIONAL DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS POR TRANSFECCIÓN DE ARN PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA (SiRNAs) DE DOBLE CADENA EN MSCs	110
11.17	GELES DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOTS	112
11.18	CUANTIFICACIÓN DE MIP-3A MEDIANTE ELISA.	113
11.19	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN IN VITRO	113
11.20	INMUNOHISTOQUÍMICAS E INMUNOFUORESCENCIAS	114
11.21	HISTOLOGÍA	114
11.22	MODELOS <i>IN VIVO</i>. SEGUIMIENTO DE MSCs Y TUMORES <i>IN VIVO</i>.	115
11.23	NORMAS DE BIOÉTICA EN EL USO DE MUESTRAS HUMANAS Y ANIMALES DE LABORATORIO.	119
11.24	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	119
12	<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</u>	121
13	<u>ANEXO I</u>	128
13.1	ARREGLOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN MUESTRAS TUMORALES Y TEJIDOS ADYACENTES.	128
13.2	ARREGLOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA.	133
13.3	ARREGLOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÍNEAS DE FIBROBLASTOS Y FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMOR (FAT)	134
14	<u>ANEXO II</u>	135
14.1	TABLA RESULTADO DE LA CUANTIFICACIÓN DE IL-6 POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	135
14.2	FUNCIÓN CONOCIDA DE QUIMIOQUINAS Y SUS RECEPTORES EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE	136

2 ANTECEDENTES

2.1 INICIO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER

La tumorigénesis es un proceso que involucra múltiples etapas que en conjunto producen la transformación progresiva de células normales en células malignas. En cada etapa existen alteraciones genéticas de distinto tipo que van desde mutaciones puntuales a cambios a nivel cromosómico y epigénéticos (Kinzler and Vogelstein 1996). La progresión tumoral tanto en pacientes como en modelos animales puede interpretarse como un proceso microevolutivo donde una serie de cambios genéticos se combinan con interacciones con el microambiente en el cual se produce la progresión. Estos cambios conferirían ventajas adaptativas a las células, culminando con la conversión progresiva de células normales en células cancerosas (Nowell 1976) sin obedecer las reglas para lograr la supervivencia del organismo como un todo. Este proceso posee diferentes hitos que pueden ser agrupados como capacidades que una o un grupo de células debe adquirir durante el desarrollo de la enfermedad. Hanahan y Weinberg han sugerido que estas capacidades pueden ser agrupadas en diferentes hitos fisiológicos discretos que deben atravesar las células normales para convertirse en células tumorales malignas y para que se produzca la progresión de la enfermedad (Hanahan and Weinberg 2011).

Seguidamente haremos una breve descripción de los hitos más importantes involucrados en la progresión tumoral lo cual nos dará pie para comprender la interacción de las células tumorales con células normales que, al formar parte del tumor, se encuentran respondiendo a los mecanismos utilizados por las células tumorales para progresar. Los eventos principales por los que atraviesan las células tumorales durante la progresión tumoral son:

Autosuficiencia en señales de crecimiento: las células normales requieren de señales mitogénicas de crecimiento para poder pasar de un estado quiescente a un estado replicativo. Estas señales son transmitidas a la célula a través de receptores de membrana que se unen a distintas moléculas de señalización (proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento solubles, moléculas de adhesión). Las células normales no pueden proliferar en ausencia de estas señales de crecimiento. Sin embargo, en las células tumorales, muchos oncogenes mimetizan el efecto de los factores de crecimiento favoreciendo la proliferación en forma independiente de las señales externas. Por otro lado, las células tumorales son capaces de sintetizar y secretar sus propios factores de crecimiento activando la proliferación de células vecinas (efecto parácrino) o su propia proliferación (efecto autócrino). Esta liberación del

control de la proliferación o dependencia exógena, altera en gran medida la homeostasis celular que opera para asegurar el normal comportamiento celular dentro de un tejido.

Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento: en un tejido normal existen múltiples señales inhibitorias del crecimiento que operan para mantener la quiescencia y homeostasis celular. Estas señales inhibitorias incluyen factores solubles inmovilizados en la matriz extracelular. Las células tumorales evaden el control de los puntos de chequeo permitiendo que la proliferación avance en las distintas etapas del ciclo celular.

Evasión de la apoptosis: La adquisición de resistencia a la apoptosis es un evento crítico en la carcinogénesis. La sobreexpresión o mutación de oncogenes pueden llevar a la supresión de la apoptosis y mayor supervivencia. Las mutaciones adquiridas por las células tumorales las llevan a ignorar las señales de muerte y continuar proliferando, lo que aumenta el riesgo de nuevas mutaciones y por ende, la progresión maligna. Una de las mutaciones más comunes (en más de la mitad de los tumores humanos) es en el gen supresor de tumores p53.

Ilimitado potencial replicativo: a diferencia de las células normales que entran en senescencia luego de un número determinado de duplicaciones, las células tumorales poseen ilimitado potencial replicativo *in vitro*, siempre que sean provistas de nutrientes y factores de crecimiento.

Más allá de estos hitos, originados a partir de mutaciones genéticas acumuladas en un contexto de falla en los mecanismos de control básicos, el resultado de la progresión tumoral depende de la interacción de las células tumorales pertenecientes al parénquima tumoral con el ambiente que las rodea el cual involucra células del estroma como fibroblastos, células endoteliales, pericitos, leucocitos y precursores fibroblásticos locales o provenientes de sitios distantes como la médula ósea-todos ellos asociados al tumor, la matriz extracelular (MEC) y el microambiente tumoral incluyendo la parte soluble del estroma, ambos secretados tanto por las células del parénquima como las del estroma.

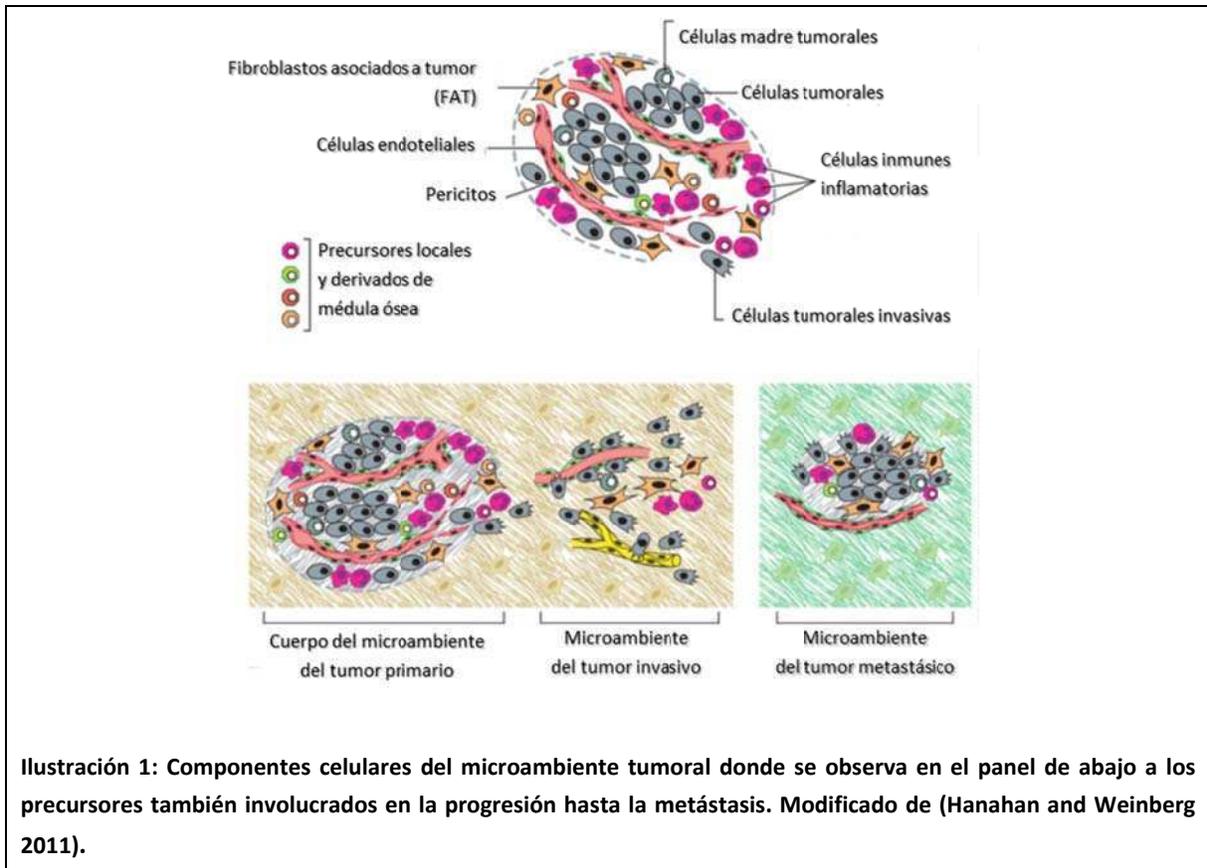
Se sabe que el crecimiento de un tumor es dependiente del desarrollo de la microvasculatura. Folkman demostró que tumores murinos singeneicos eran incapaces de crecer como explantos *in vitro*, pero retomaban un crecimiento exponencial cuando se reimplantaban en los animales de experimentación (Adini, Fainaru et al. 2009). La microvasculatura local está compuesta por células endoteliales y pericitos, y confiere no solo el aporte nutricional al tumor, sino también el aporte de oxígeno con el cual las células tumorales sobrellevan el aumento en la tasa metabólica necesaria para soportar su tasa de proliferación elevada. La excesiva proliferación

celular genera un gradiente hipóxico el cual induce un aumento en la expresión de factores de crecimiento angiogénicos tales como el Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento placentario (PLGF/PGF).

La progresión tumoral ha sido correlacionada con un aumento en la expresión génica de mediadores inflamatorios, y se piensa que es desencadenada por la rotura, daño y reciclado celular en el microambiente tumoral. La inflamación es una respuesta celular que tiene lugar bajo condiciones de daño celular y de daño a tejido o de respuesta a la presencia de patógenos. En 1986, Dvorak y colaboradores plantearon que el perfil bioquímico de los tumores es similar al de las heridas, con la diferencia de la presencia de la transformación del estroma, por lo que los denominó "heridas que no cierran" y que serían una fuente continua de mediadores inflamatorios (citoquinas, quimioquinas y otras moléculas quimioattractantes) (Sato, Kuwashima et al. 2005)

De esta manera podemos considerar a un tumor como un tejido bajo un proceso de remodelación patológica, en continuo crecimiento y favorecedor de un microambiente hipóxico. Además, promotor de la inflamación crónica y generador de factores crecimiento y/o quimiotácticos que actúan de manera parácrina y que afectan la proliferación y migración de células del entorno. Entre ellas están los fibroblastos, células endoteliales, pericitos y de precursores circulantes que pueden provenir de sitios distantes.

En resumen, muchos mecanismos detrás de la progresión tumoral permanecen aún sin poder comprenderse, particularmente respecto de los componentes celulares correspondientes al estroma o material de soporte; sin embargo en base a evidencia experimental se supone un rol central para las células estromales tales como los fibroblastos, las células endoteliales y el infiltrado inflamatorio incluyendo los macrófagos asociados a tumor, y precursores estromales que incluyen a las células madre/estromales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSCs) (Hanahan and Weinberg 2011). Acerca de éstas últimas existe suficiente evidencia aportada por una variedad de modelos experimentales acerca de su llegada y alojamiento en tumores debido, principalmente, al microambiente inflamatorio del tumor (Karnoub, Dash et al. 2007).



2.2 LA GLÁNDULA MAMARIA

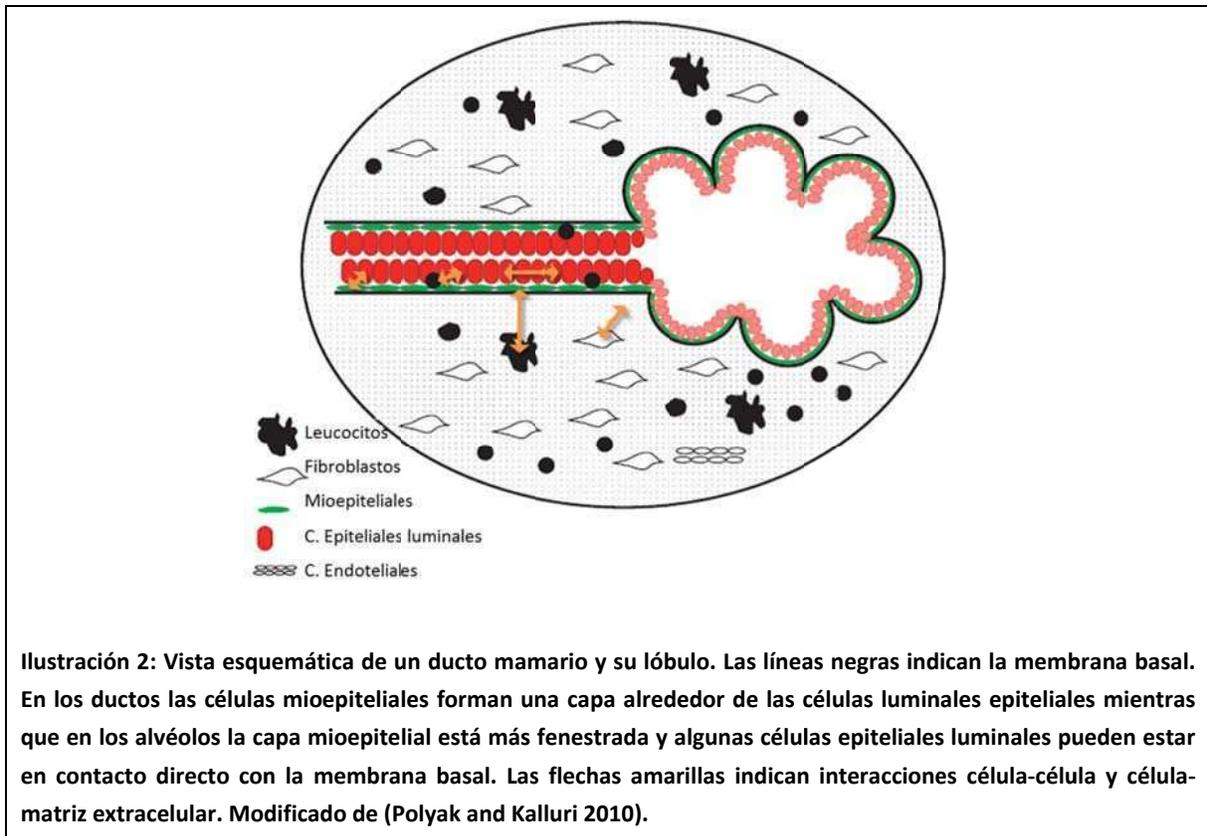
Primero dediquémosle unas palabras al tejido mamario normal, en base a esto podremos entender mejor la patología del cáncer de mama así como el origen y progresión de la enfermedad.

El origen de la glándula mamaria es ectodérmico y podemos identificar un parénquima glandular, compuesto de alveolos y ductos, y un estroma de soporte. A nivel histológico la glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: glandular de tipo túbulo-alveolar, conectivo que conecta los lóbulos, y adiposo que ocupa los espacios interlobulares. El tejido mamario consta de dos elementos fundamentales: los acinos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche y los ductos, un conjunto de estructuras tubulares y huecas, ramificadas en forma de árbol, cuyos lúmenes confluyen progresivamente en canaliculos que se van engrosando hasta terminar en uno de los doce a dieciocho vértices llamados galactóforos. Los galactóforos son dilataciones ductales a modo de reservorios situados inmediatamente por detrás del pezón, formados por un epitelio escamoso no queratinizado. Bajo La areola, que

rodea el pezón, existen numerosas glándulas sebáceas y se ubican las dilataciones de los conductos galactóforos llamadas senos lactíferos, que acumulan leche. En la base del conjunto areola-pezón se localizan las células mioepiteliales, estrictamente epiteliales en cuanto a su origen, aunque con la particularidad de que son capaces de contraerse. Estas células, rodeadas por fibras musculares lisas en forma radial, provocan la erección del pezón ante la succión produciendo la salida de la leche almacenada en los galactóforos. El resto de la glándula está compuesto por tejido conjuntivo, tejido adiposo y una aponeurosis llamada ligamento de Cooper. La composición de glándula y tejido adiposo parte de una proporción de 1:1 en mujeres que no están lactando, llegando hasta 2:1 en mujeres lactantes.

Aproximadamente un 75% de la linfa proveniente de las mamas viaja a los ganglios linfáticos de la axila del mismo lado. El resto viaja a los nódulos paraesternales, a la mama del lado opuesto y finalmente hasta los ganglios linfáticos abdominales. Los nódulos axilares incluyen el grupo inferior o pectoral, que drena la parte profunda y transmuscular, el grupo interno o subescapular que drena la parte interna de la glándula mamaria y el grupo externo o humeral, que drena el borde externo de la mama. El drenaje linfático de las mamas drena en los ganglios linfáticos de la axila.

La glándula mamaria está compuesta de un arreglo de tipos celulares que forman una red de interacción esencial para el desarrollo normal y su función fisiológica. Anormalidades en estas interacciones juegan un rol importante a través de diferentes etapas en la tumorigénesis. Los ductos ramificados y los alvéolos están alineados por una capa interna de células epiteliales luminales que producen leche durante la lactancia y están rodeadas por células mioepiteliales contráctiles y membrana basal. El estroma que lo rodea está compuesto de matriz extracelular y varios tipos celulares incluyendo fibroblastos, células endoteliales, leucocitos infiltrantes y no solo provee un soporte al órgano, sino que también regula la función glandular de las células epiteliales vía interacciones parácrinas, físicas y hormonales. Salvo raras excepciones los tumores mamarios se originan en el compartimento epitelial y en sus fases iniciales proliferan obliterando los ductos pero esta barrera se rompe con la invasión progresiva debido a una combinación de señales provenientes tanto de las células epiteliales y las células estromales. (Polyak and Kalluri 2010)



2.3 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que presenta importantes variaciones las cuales dependen de la edad de inicio, características clínicas, histológicas y antecedentes familiares. Estas diferencias se derivan de una etiología multifactorial y la participación de factores exógenos y endógenos que afectan el progreso y pronóstico de la enfermedad (Polyak 2011).

A pesar de los nuevos desarrollos terapéuticos, principalmente con anticuerpos monoclonales humanizados como el Bevacizumab, se observa una regresión en la sobrevida libre de enfermedad. Existe por esto una necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología cancerosa especialmente para la enfermedad diseminada (Stoff-Khalili, Dall et al. 2006). La mayoría de las estrategias de terapia génica del cáncer se basa en el uso de vectores adenovirales (Nouredini and Curiel 2005) los cuales pueden transducir/infectar diversos tipos celulares, tanto células quiescentes como en proliferación y pueden ser producidos con cierta facilidad. Sin embargo conservan algunas barreras importantes como la

respuesta inmune generada (Stoff-Khalili, Dall et al. 2006) y la falta de especificidad hacia el tumor por parte del vector y la baja penetrabilidad en el estroma tumoral, lo cual disminuye significativamente la eficacia terapéutica (Lyons, Onion et al. 2006).

2.3.1 Epidemiología del cáncer de mama.

Según datos de 2011 de la organización mundial de la salud (OMS o WHO por sus siglas en inglés), el cáncer de mama sigue siendo el de mayor incidencia y mortalidad, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.

Aproximadamente 200.000 nuevos casos de cáncer de mama y cerca de 40.000 muertes ocurren anualmente solo en Estados Unidos haciéndola la segunda causa de muerte (Jemal, Siegel et al. 2009) a pesar de la mejora en las terapias y métodos de detección. Las tasas de supervivencia varían mucho en función del país donde se calcula con más del 80% en Estados Unidos, en Suecia y Japón, cerca del 60% en países con ingreso per cápita intermedio y no mayor al 40% en países con el menor ingreso per cápita. (http://www.who.int/kobe_centre/mediacentre/news/breast_cancer/en/). En cuanto al diagnóstico, en países desarrollados la detección temprana hace que las estadísticas varíen enormemente. Las estadísticas varían de país en país representando, no solo la tasa de incidencia de la enfermedad por país, sino una clara evidencia de que en aquellos con mayor ingreso medio, con mejores procedimientos para la documentación de los casos y mejores sistemas de salud y métodos de detección, se logra detectar una mayor proporción de nuevos casos y de este modo la detección temprana incide en una diferencia estadística con los países de menor ingreso y desarrollo (<http://www.worldwidebreastcancer.com/learn/breast-cancer-statistics-worldwide/>) realizado según estadísticas de 2011 de la OMS.

En Argentina, el cáncer de mama es el de mayor incidencia en mujeres, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres (Ilustración 3), mientras que en hombres el de mayor incidencia es el de próstata (44 cada 100.000 hombres) seguido por el de pulmón (32,5 cada 100.000 hombres) según datos del Instituto Nacional del Cáncer (INC).

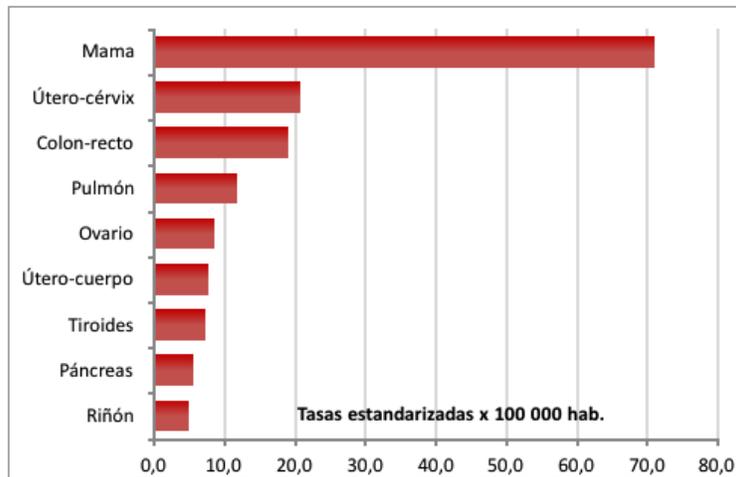


Ilustración 3: Cantidad de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama de cada 100.000 en todo el país. Fuente: Elaborado por SIVER/INC en base a los datos de Globocan 2012. Argentina, enero de 2014. Extraído de <http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>.

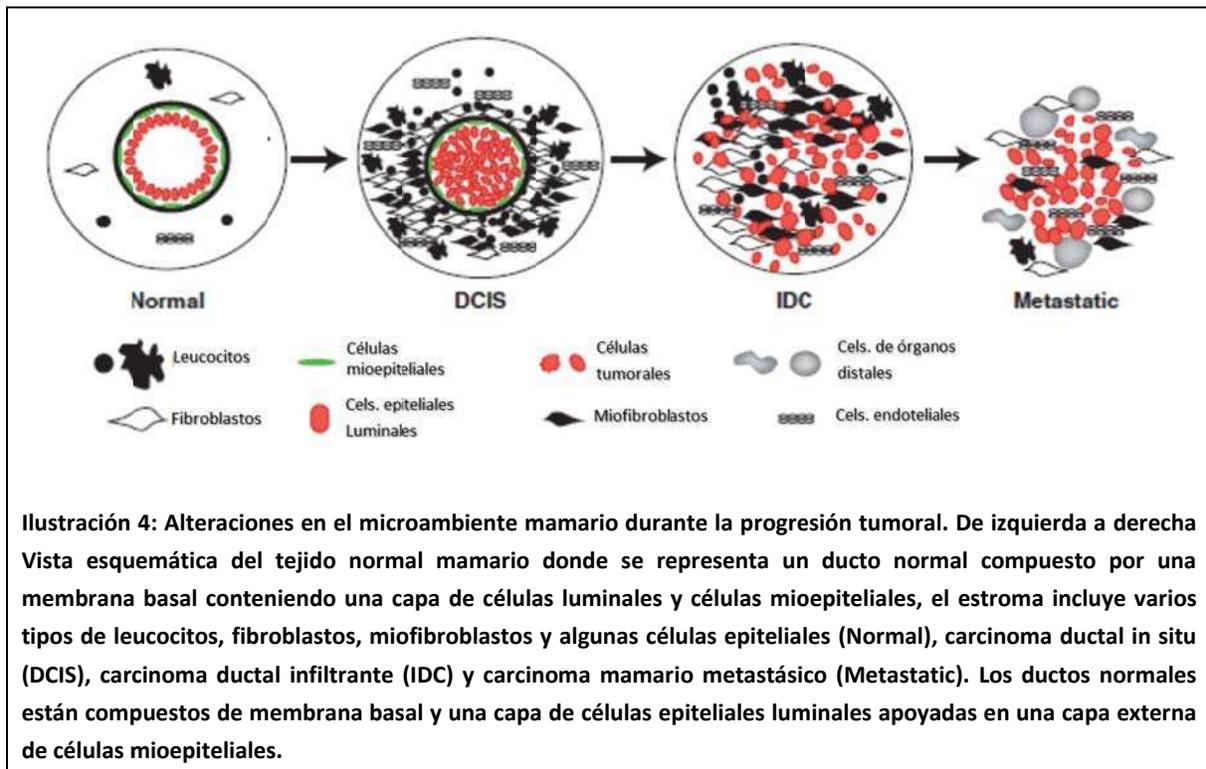
2.3.2 Origen y evolución del cáncer de mama

Los tumores de mama se originan en una región determinada de la mama y, como describíamos en la sección Inicio y progresión del Cáncer, las lesiones neoplásicas acumulan diversas mutaciones a medida que las células proliferan, y eventualmente dichas mutaciones van a conferir nuevas características de malignidad que permitirán la degradación de la membrana basal, invasión y eventualmente y en el peor de los casos, metastatizar (Polyak 2007).

A nivel mundial, el cáncer de mama es una de las principales causas de muerte debidas a neoplasias malignas en mujeres (Kamangar, Dores et al. 2006). A pesar de los grandes avances en el diagnóstico y el tratamiento, todavía existen problemas de índole clínica y científica por resolver. Estos están relacionados con la detección de potenciales pacientes susceptibles de tratamientos preventivos, la determinación de las causas de la progresión y la recurrencia, la selección del tratamiento adecuado y la prevención de la resistencia a la terapia.

Si bien se tiene evidencia de ciertas alteraciones genómicas y/o cromosómicas, que redundan en la expresión desregulada de ciertos marcadores como los genes asociados a cáncer de mama BRCA1 y BRCA2, aún se desconocen con detalle los mecanismos por los cuales se desarrollan los tumores primarios.

Los tumores sólidos están compuestos por células tumorales (parénquima) y componentes celulares del estroma como ser la vasculatura tumoral, las células infiltradas del sistema inmune, fibroblastos y otras células estromales y la matriz extracelular. En los carcinomas *in situ*, las células mioepiteliales. Se alteran genética y fenotípicamente y disminuyen en número, potencialmente debido a la degradación de la membrana basal. Al mismo tiempo se observa un aumento del número de fibroblastos, miofibroblastos, linfocitos y células epiteliales. La pérdida de membrana basal y de células mioepiteliales, genera carcinomas ductales invasivos, en los cuales las células tumorales pueden invadir tejidos cercanos y migrar hacia órganos lejanos donde ocasionalmente crecerán metástasis (Polyak 2007).



2.3.3 Clasificación clínico-patológica

A fines de los años 50, se desarrolló un sistema de clasificación, aceptado mundialmente, que permitió agrupar a las pacientes según las características histopatológicas de la enfermedad (Denoix 1959). De acuerdo a este criterio (criterio de TNM), los tumores se diagnostican en función de 3 parámetros: Estadio T, que considera el tamaño del tumor primario. Estadio N, que considera la presencia de metástasis axilares. Estadio M, que considera la presencia de metástasis a distancia. Según esta clasificación, podemos dividir a los tumores de mama en:

Los estados IA y IIA corresponden a tumores in situ, los estados IIB a IIIC corresponden a tumores localmente infiltrantes, y el estado IV corresponde a un tumor metastásico.

A partir de la implementación de nuevas tecnologías para el diagnóstico utilizadas por los patólogos para detectar la presencia de metástasis axilares, fue necesario realizar modificaciones al criterio TNM a fin de lograr un mejor diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. En el año 2006, se propuso una modificación en la clasificación del estado N, en la cual se propuso subdividirlo en N1 (pacientes con 1-3 nodos positivos), N2 (pacientes con 4-9 nodos positivos) y N3 (pacientes con más de 9 nodos positivos). Esta modificación se hizo a partir de datos clínicos en los cuales se observó que las pacientes que tenían menor número de nódulos positivos tenían una mejor evolución de la enfermedad. Asimismo, se considera que la determinación del número de nódulos axilares positivos es uno de los factores más importantes a considerar para definir la conducta terapéutica y estimar la sobrevida (Escobar, Patrick et al. 2007).

Estado T	Estado N	Estado M	Estado total
Tis	0	0	0
1	0	0	IA
0-1	1	0	IIA
2	0	0	IIA
2	1	0	IIB
3	0	0	IIB
0-2	0	0	IIIA
3	0-1	0	IIIA
4	0	0	IIIB
Cualquier T	1	0	IIIC
Cualquier T	Cualquier N	0	IV

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama: Los estados IA y IIA corresponden a tumores in situ, los estados IIB a IIIC corresponden a tumores localmente infiltrantes, y el estado IV corresponde a un tumor metastásico

Las neoplasias malignas pueden originarse en diferentes zonas de la mama y desarrollarse a partir de cualquier tejido que se presenta en la mama. Cuando estas neoplasias se presentan en varios focos en distintos cuadrantes de la mama se define a la patología como multicentral, y las pacientes en estos casos son sometidas a una mastectomía. Cuando se presentan varios focos en un mismo cuadrante, la patología se conoce como multifocal, y la conducta terapéutica es la cirugía conservadora.

El término *carcinoma* es utilizado para describir un cáncer que tiene origen en células epiteliales de los tejidos u órganos, como el de mama. Casi todos los cánceres de mama son carcinomas.

Adenocarcinoma es un tipo de carcinoma que comienza en el tejido glandular (tejido que produce y secreta una sustancia). Los conductos y los lobulillos del seno son tejidos glandulares (producen leche), por lo que los cánceres que comienzan en estas áreas se denominan adenocarcinomas.

Los *sarcomas* son cánceres que empiezan en los tejidos conectivos, como el tejido muscular, tejido graso, o vasos sanguíneos. Los sarcomas de mama son poco frecuentes.

El término *carcinoma in situ* se utiliza para las primeras etapas del cáncer, cuando este se limita a la capa de células donde comenzó. En el cáncer de mama, las células cancerosas permanecen confinadas a los conductos (*carcinoma ductal in situ*) o a los lóbulos (*carcinoma lobulillar in situ*).

En estos casos, las células no han invadido los tejidos más profundos en el seno y no se diseminaron a tejidos lejanos.

El *Carcinoma invasivo o infiltrante* ya ha invadido más allá de la capa de células donde se originó. La mayoría de los tumores mamarios son carcinomas invasivos, ya sea el carcinoma ductal invasivo o carcinoma lobular invasivo.

El carcinoma mamario se clasifica en función del estadio clínico, la morfología celular y el análisis inmunohistoquímico (Zepeda -Castilla Ernesto 2008).

1-Clasificación morfológica: es dependiente del segmento del árbol galactóforo del que se desarrolla, y de naturaleza epitelial. La mayoría de los cánceres del seno comienzan en las células que recubren los conductos (*cáncer ductal*). Algunos comienzan en las células que recubren los lobulillos (*cánceres lobulares*), mientras que un pequeño número de inicio en otros tejidos.

2.3.4 Clasificación invasiva:

Tal como se detalló anteriormente en la clasificación clinicopatológica, el *Carcinoma in situ* no atraviesa la membrana basal, y las células tumorales proliferan obliterando el lumen del ducto.

En el *carcinoma invasivo*, las células tumorales adquieren capacidad de degradación de la matriz a través de la secreción de metaloproteasas de matriz y atraviesan la membrana basal invadiendo el tejido periférico.

En la progresión tumoral en cáncer de mama, y de acuerdo al sistema de clasificación de carcinoma invasivo, se pueden considerar diferentes estadios:

- Estadio 1: Tumor menor de 2 cm de diámetro sin compromiso ganglionar ni metástasis a distancia.
- Estadio 2: Tumor menor de 5 cm con compromiso de ganglios axilares, los cuales son móviles, y no hay metástasis a distancia. A su vez, presentan subestadios.
- Estadio 3: Incluye a todos los tumores, independientemente de su tamaño, que tengan compromiso cutáneo, pectoral o de pared torácica. Los ganglios axilares son fijos y no hay metástasis a distancia.
- Estadio 4: Cualquier tumor sin o con compromiso ganglionar, ulceración cutánea, fijación pectoral o a la pared torácica pero con metástasis a distancia.

Ductal in situ: Tal como se describió anteriormente, procede del epitelio ductal principal, se genera por una proliferación atípica del epitelio ocupando totalmente los ductos y otros conductos perilobulillares. Los acinos de las glándulas se ven dilatados y ocupados por células pequeñas y por lo general uniformes, siendo pleomórficas (variedad en el tamaño y la forma de las células o sus núcleos) solo en la afectación ductal del carcinoma. Presenta expresión de E-cadherina. Este tipo de tumor progresa frecuentemente hacia un fenotipo invasivo. Se representan en mamografía como una distorsión arquitectural con presencia de microcalcificaciones, y son resectados a través de cuadrantectomía (Biopsia radioquirúrgica). Aproximadamente el 30 por ciento de las pacientes desarrollarán cáncer de mama invasivo en un promedio de 10 años a partir del diagnóstico inicial.

Ductal infiltrante: Abarca el 70% al 80% de todos los casos, es la neoplasia más frecuente. Se entiende como un grado más en la progresión tumoral desde el *carcinoma in situ*. El tumor crece formando pequeñas glándulas irregulares, cordones, nidos o células dispersas, infiltrando un estroma fibroso, y se caracteriza por ser una masa o tumoración con límites poco definidos.

Lobulillar in situ: Está formado por acinos distendidos y completamente ocupados por células uniformes, redondeadas sin grandes atipias, de tamaño relativamente pequeño, no hay inflamación, focos necróticos ni aumento del componente conjuntivo. Un tercio de las lesiones *in situ* progresarán a carcinoma infiltrante. Las células tienen una tasa de proliferación baja. Presenta mayor posibilidad de multicentricidad y bilateralidad. Se representa en la mamografía en forma de micro calcificaciones agrupadas de varios tamaños y de formas irregulares, se pueden presentar en ambas mamas, siendo su predilección el cuadrante superior externo (CSE); la edad de incidencia oscila entre 40 y 50 años.

Lobulillar Infiltrante: Abarca entre un 5 a un 10% de los casos. Tiende a ser bilateral con más frecuencia que un carcinoma ductal. Cuando se hace infiltrante, las células se disponen en fila,

sin formar brotes, papilas u otras estructuras encontrándose en una zona difusa e infiltrante y otras veces lo hace en focos aislados y dispersos. Cuando está en un período avanzado produce nódulos bien definidos y firmes o masas más grandes de consistencia dura, representa aproximadamente el 5 por ciento de todos los cánceres malignos invasivos. Se presente con mayor frecuencia en mujeres de entre 45 y 56 años de edad. El tumor crece en el terminal (la última parte) de los lóbulos donde se produce la leche. Por lo general no aparece en las mamografías y, al tocar, podría sentirse como un engrosamiento del cuadrante superior exterior del seno. La forma infiltrante es de relativamente mejor pronóstico que la forma del carcinoma ductal correspondiente (Fattaneh A 2003).

2.3.5 Clasificación molecular:

Utilizando microarreglos de cADN, se determinó que existen varios subtipos con diferentes patrones de expresión genética con diferente pronóstico. El desarrollo de la tecnología de microarreglos permitió el estudio de la expresión de los genes de los tumores proporcionando una caracterización más detallada de la enfermedad. La clasificación molecular puede ser más precisa que la histopatológica posibilitando además predecir la respuesta al tratamiento (Zepeda -Castilla Ernesto 2008).

Esta clasificación divide en primera instancia a los tumores en dos grupos basados en *el resultado positivo o negativo de Her2*. Her2, también conocido como erbB-2, gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2. Este receptor del tipo tirosín quinasa se encuentra en niveles moderados en algunas células normales. El grupo de clasificación denominado tipo *basal-like* o *triple negativo* se caracteriza por tener expresión negativa de Her2 al igual que los receptores hormonales (ni estrógeno ni progesterona) y la expresión de queratinas de alto peso molecular (CK5/6, CK14), con expresión de P63 similar a la expresión que presenta el epitelio basal de los conductos mamarios. Estos tumores tienen el peor pronóstico y carecen además de dianas terapéuticas.

El grupo de clasificación denominado *Luminales* también se caracterizan por tener expresión negativa de Her2 pero los receptores hormonales estrógeno (RE) y /o progesterona (RP) son positivos; a su vez pueden subdividirse en dos subtipos: Luminal A y Luminal B; esta división está dada por el Índice de proliferación medido por la detección del antígeno nuclear Ki67, que se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis) pero no en G0, por lo tanto, permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción del tejido en proliferación.

Cuando su resultado es menor a 13,5% será luminal A, en caso contrario si este porcentaje es mayor a 13,5 % será luminal B (Sotiriou 2009).

Si bien existe una correlación entre la clasificación molecular y las características clinicopatológicas del cáncer de mama (Nielsen, Hsu et al. 2004) en nuestro trabajo no se dispone del perfil molecular de las muestras tumorales recibidas, ya que no es de rutina utilizado en los Hospitales de los cuales obtuvimos muestras, por lo cual no nos referiremos a esta clasificación.

2.4 CÉLULAS ESTROMALES/MADRE MESENQUIMALES, MSCs.

2.4.1 Su descubrimiento y el nicho hematopoyético.

En 1924, el investigador ruso, Alexander A. Maximow, identificó mediante histología un tipo singular de célula precursora en el interior del mesénquima de la médula ósea que se diferenciaría en distintos tipos celulares (Kalwitz, Endres et al. 2009). Bastante tiempo después, en la década del 60, Ernest A. McCulloch y James E. Till fueron los primeros en demostrar la naturaleza clonal de las células de la médula ósea (Reya, Morrison et al. 2001), (Studený, Marini et al. 2004). Luego, en los años 70, Friedenstein examinó el potencial de clonación de las células de la médula ósea y las definió como células formadoras de colonias de fibroblastos CFU-F (Wolf, Rumpold et al. 2005) y fue un tiempo después, en que tomaron su nombre primero como Células Madre Derivadas de la Médula Ósea y actualmente de Células Estromales Derivadas de la Médula Ósea, definido por la International Society for Cellular Therapy (ISCT).

Las Células Madre Mesenquimales o Células Madre Estromales o MSCs (del inglés Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells), son células primitivas, originadas a partir de la capa germinal mesodermal, con morfología fibroblastoide y con capacidad de expansión clonal y de diferenciarse en diversos linajes mesodermes (Pittenger 1999) incluyendo osteocitos, condrocitos, adipocitos, mioblastos, e incluyendo cardiomiocitos, y células de linaje neuronal como neuronas y células de la glía, astrocitos (Crigler, Robey et al. 2006; Hung, Pochampally et al. 2007; Prockop 2009), aunque la diferenciación hacia estos últimos linajes tiene discutida capacidad funcional. Por este motivo se clasifica a las MSCs como células multipotentes.

Las células que hoy conocemos como MSCs fueron aisladas de médula ósea por su adherencia al plástico por Friedenstein en 1976 quien estableció el método de obtención que se utiliza hoy en día (Friedenstein, Gorskaja et al. 1976). Son células madre no hematopoyéticas residentes

fundamentales y generadoras del estroma de la médula ósea donde dirigirían la maduración hematopoyética (Poggi and Zocchi 2008). También se han identificado como componente estromal de diversos tejidos como el adiposo, tendinoso, el cordón umbilical, la placenta, entre otros, localizándose principalmente en las zonas perivasculares como células similares a los pericitos y en el estroma circundante como células del tipo fibroblástico.

Desde su descubrimiento en la médula ósea y su descripción como sustentadoras del nicho donde ocurre la hematopoyesis e involucradas en el anclaje de las células madre hematopoyéticas (HSC), se las ha encontrado en casi todos los tejidos del organismo, como precursores de las células de soporte. Su caracterización se realiza a través de la determinación de la expresión de un número de marcadores que excluyen el linaje hematopoyético. Los siguientes criterios son considerados mínimos y necesarios para identificar a las MSCs: a) adherencia al plástico, b) expresión de antígenos de superficie CD105, CD44, CD73, CD90, CD106, CD166, así como la falta de expresión de CD45, CD34 y CD14 o CD11b, CD79a o C19, y HLA-DR y c) por representar una población de precursores con alta capacidad proliferativa y con potencialidad para diferenciarse hacia los linajes celulares adipocítico, condrocítico y osteoblástico (Pittenger 1999).

2.4.2 MSCs y terapia. Potencial en medicina regenerativa.

La habilidad de las MSCs de diferenciarse hacia distintos linajes celulares, así como sus propiedades inmunomodulatorias anti inflamatorias, sumado a que no poseen controversias éticas, y a que sean relativamente fáciles de expandir en cultivo, hace de estas células una fuente promisoría de células madre para tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorias y daño a tejidos (Pereboeva, Komarova et al. 2003). Las MSCs pueden ser reclutadas desde sus tejidos de origen hacia tejidos que presenten una alta tasa de remodelación y/o que exhiban procesos inflamatorios, tales como heridas o tejidos en isquemia. Estas características las convierte en herramientas atractivas para medicina regenerativa, y de hecho han sido utilizadas exitosamente en estrategias terapéuticas que involucran remodelación de tejidos (Bruder, Fink et al. 1994); (Bianchi, Muraglia et al. 2001).

Desde que el grupo de Michael Andreff ha demostrado que las MSCs llegaron al tumor en un modelo de melanoma humano subcutáneo en ratones y que MSCs con expresión forzada de interferón β , lograron reducir el tamaño tumoral de melanoma maligno in vivo (Studený 2002) se ha sugerido en muchos trabajos la potencialidad de la terapia con MSCs para el tratamiento

de tumores primarios y se ha estudiado la llegada de MSCs en diversos modelos tumorales de cáncer de mama, melanoma y glioma, entre otros.

Se ha sugerido que las MSCs podrían servir como vehículo celular para el envío sistémico de genes terapéuticos (Pereboeva, Komarova et al. 2003). Varios trabajos han reportado que MSCs infectadas *ex-vivo* con vectores virales son reclutadas por el tumor primario y sitios de metástasis en modelos animales de diversos tipos de tumores humanos, incluyendo cáncer colorrectal y gliomas (Komarova, Kawakami et al. 2006) y (Nakamura, Ito et al. 2004).

Sin embargo las MSCs no solo llegan al tumor sino que se distribuyen en pulmón e hígado entre otros tejidos. Por este motivo, solo un porcentaje muy bajo de las MSCs consigue llegar a la masa tumoral, lo cual disminuiría su potencial uso clínico. Su biodistribución principalmente a pulmón y luego a hígado para procesamiento hepático luego de administraciones sistémicas, sumado a las MSCs perdidas en la circulación principal, hacen que se reduzca enormemente la proporción de MSCs que logran arribar e incorporarse a otros tejidos en remodelación.

De allí que resulte necesario redireccionar a las MSCs al entorno tumoral para aumentar su eficacia terapéutica. Sin embargo las señales que median la migración a blancos específicos permanecen sin resolverse con lo cual resulta necesario identificar los factores que median la migración de las MSCs al tumor. Por este motivo resulta fundamental conocer los mecanismos que regulan la migración de las MSCs al entorno tumoral para potenciar la especificidad de llegada al mismo.

2.4.3 MSCs y progresión tumoral. Migración de MSCs hacia el tumor

Si bien la discusión está abierta, hoy es aceptado que las MSCs participarían en la progresión tumoral como células de soporte, modulando el perfil inflamatorio y por ende la actividad linfocitaria.

Como se dijo con anterioridad la progresión de neoplasias malignas es un proceso que resulta no solo de la acumulación de mutaciones dentro de las células tumorales sino también de la modulación del microambiente tumoral. Estudios en algunos modelos tumorales muestran que el reclutamiento o “homing” y las subsiguientes interacciones heterotípicas de las células estromales, incluyendo fibroblastos y células madre/estromales mesenquimales derivadas de

médula ósea (BM-MSCs) participarían en la carcinogénesis y la progresión del cáncer incluso promoviendo la metástasis (Karnoub, Dash et al. 2007)

En modelos xenogéneos de cáncer de mama humano en ratones, la coinyección de fibroblastos o MSCs con células tumorales promueve el crecimiento tumoral (Zhu, Xu et al. 2006) y la metástasis (Karnoub, Dash et al. 2007). Este efecto de promoción tumoral de las células estromales coinyectadas puede ser explicado por varios mecanismos potenciales, por ejemplo: los fibroblastos pueden activarse por las células tumorales y pueden secretar factores pro angiogénicos y pro invasivos. En favor de esta hipótesis se encontró que fibroblastos, ya sea irradiados o senescentes, y asociados a tumor (FAT) o inflamatorios promueven el crecimiento tumoral más efectivamente que los fibroblastos normales (Barcellos-Hoff 1998; A Krtolica 2002; Liu and Hornsby 2007). Alternativamente, los fibroblastos pueden modificar las células epiteliales tumorales como por ejemplo sobre regulando la expresión de quimioquinas y, por ende, generando una retroalimentación positiva. Este tipo de interacciones ocurre en casi todos los modelos experimentales pero la importancia relativa y los genes específicos involucrados pueden depender del tipo de células de cáncer y estromales usadas en cada modelo o experimento. A diferencia de los fibroblastos, las MSCs expuestas a factores solubles secretados por tumores muestran un fenotipo funcionalmente diferente caracterizado por una adquisición de morfología elongada, menor densidad de fibras de estrés, y menor capacidad adhesiva. Además poseen diferencias en la expresión génica de pequeñas GTPasas involucradas en la migración celular y determinado por PCR en tiempo real, en donde se encuentran diferencias en RhoA y Cdc42, pero no Rac1, mostrando diferencias básicas en el reclutamiento celular (McGrail, Ghosh et al. 2012).

2.5 MIGRACIÓN CELULAR

En pos de comprender los procesos por los cuales las MSCs estarían arribando al estroma tumoral debemos entender con detalle el proceso de migración de las células que tienen la capacidad para realizar esto.

La migración celular es un proceso coordinado y complejo en el que están involucrados varios compartimentos celulares, incluyendo receptores de superficie, elementos de señalización, y el citoesqueleto. Colectivamente, estos componentes que interactúan y que se requieren como elementos clave para los diversos aspectos de la migración celular conforman lo que se conoce como el migrosoma de la célula. La migración celular es un evento involucrado tanto en procesos fisiológicos como en patológicos dentro de un organismo. Requiere una interacción

regulada y dinámica entre la célula y su ambiente circundante (LaMonica, Bass et al. 2009). Para migrar, las células responden a las señales direccionales extendiendo una protuberancia oseudópodo en la dirección de movimiento de la célula. El movimiento direccional requiere una polarización de las células en un extremo frontal y un extremo trasero. Para que se produzca la movilización, el borde de avance de la célula estabiliza una adhesión, la cual genera la tracción necesaria para el movimiento celular. Posteriormente, la célula debe separar las adherencias en la parte trasera para permitir la movilidad dirigida. Por lo tanto, la migración de la célula puede separarse en pasos distintos incluyendo (1) protrusión de la membrana con la formación de pseudópodos, (2) la generación de la fuerza contráctil y (3) la liberación de la parte posterior (Wright, van Steensel et al. 2009).

Tan temprano como en 1863 Rudolf Virchow, en su trabajo “Ueber bewegliche thierische Zellen” o “sobre células móviles bestiales”, describió la observación de células móviles que había aislado de la linfa y de tejido cartilaginoso. Sin embargo, pocos tipos celulares tienen la capacidad activa y autónoma de migrar en un organismo. Son células móviles los fibroblastos, los leucocitos, los espermatozoides, las células tumorales y las células madre progenitoras de varios tipos de linajes. Los leucocitos presentan motilidad espontánea y navegan a través de diversos ambientes extracelulares como una parte normal de la vigilancia inmune. Las células móviles más activas entre los leucocitos son los Natural Killer (NK), los Linfocitos T (Lang, Drell et al. 2003), los Macrófagos, las Células Dendríticas (Gunzer, Friedl et al. 2000) y los Granulocitos Neutrófilos. Los neutrófilos tienen la velocidad de migración más alta de todas, con un máximo de hasta 15 a 20 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Behbod and Rosen 2005). En comparación, los fibroblastos son células lentas, con desplazamiento de 0,2 a 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Friedl, Zanker et al. 1998).

El patrón clásico de migración en tres pasos parece describir bastante bien la migración de las células mesenquimales, incluyendo fibroblastos y MSCs. En contraste, los mecanismos que gobiernan el movimiento de las células móviles del sistema inmune, tales como neutrófilos, son muy distintos. Los neutrófilos muestran una polarización intrínseca y coordinan de manera eficiente la formación de adherencias en la parte delantera de células y la liberación posterior mostrando una migración por deslizamiento (Dittmar, Heyder et al. 2008).

La migración celular involucra la integración celular de señales externas, incluyendo factores solubles que pueden promover o inhibir la motilidad. Las señales externas que regulan la migración celular son diversas e incluyen componentes del microambiente tales como quimioquinas, factores de crecimiento, contactos célula-célula y la matriz extracelular. Además existe competencia entre las señales quimiotácticas, de diferenciación o de proliferación y en base a esto quedará determinado el destino celular. (Pawelek and Chakraborty 2008).

El migrosoma puede existir diferencialmente por medio de una red elaborada de complejos de proteínas que consisten en receptores de adhesión y componentes del citoesqueleto. Está formado principalmente por un gran grupo de receptores transmembrana, por proteínas de adhesión focal incluyendo a moléculas de señalización, proteínas de transducción de señales y diversas proteínas adaptadoras para centrar las fuerzas mecánicas en el citoesqueleto. Recientemente se ha demostrado que la migración del endodermo parietal está dirigida por la no- canónica vía de polarización celular de Wnt a través de Rho/ROCK (LaMonica, Bass et al. 2009). Su Inhibición conduce a un incremento en las enfermedades asociadas a migración celular, debido a que dichas células carecen de migración orientada.

En respuesta a las perturbaciones específicas en tejidos, como por ejemplo en heridas, el microambiente extracelular se vuelve permisivo y contiene señales de promoción de la migración que estimulan el reclutamiento tanto de leucocitos como de fibroblastos.

Además de la presencia de señales de promoción de la migración en el microambiente, también hay señales que inhiben la migración celular. Una señal importante de inhibición de la migración está mediada por la matriz extracelular. Muchos tipos de células exhiben una relación bifásica entre la adhesión y la tasa de migración, mientras que la velocidad óptima se produce a una adhesión intermedia. Otras moléculas secretadas actúan como señales inhibitorias de la migración, reduciendo la incorporación de células en el microambiente que las produce. Por otro lado las células producen receptores que reducen o interfieren con la interacción de las señales solubles mediante el uso de receptores solubles o de membrana sin capacidad de señalizar (Hansell, Hurson et al. 2011).

Los fibroblastos comparten características con las células tumorales, tales como la existencia de los contactos de adhesión focal (Horwitz and Parsons 1999) (Hecker and Gladson 2003) los cuales coordinan y regulan la adhesión entre la matriz extracelular (MEC) y el citoesqueleto por medio de integrinas. (Kollet, Shivtiel et al. 2003). Las células madre han entrado en el foco de atención en las últimas décadas ya que se ha reconocido que no solo residen en los tejidos de origen como ser la médula ósea sino que migran activamente a ciertas áreas de regeneración tisular (Masson, Harrison et al. 2004) (Kollet, Shivtiel et al. 2003). En contraste con la capacidad migratoria y tráfico de los leucocitos se desconocen los mecanismos detallados por los cuales las células madre llegan a tejidos distantes después de atravesar varias barreras fisiológicas.

En cuanto a la naturaleza de las señales que median la motilidad y el reclutamiento linfocitario a tejidos heridos, existe abundante evidencia que implica un rol de los factores de crecimiento y quimioquinas, entre otros mediadores inflamatorios, en el subsiguiente reclutamiento y

la retención de leucocitos en los tejidos inflamados. Sin embargo estamos en el comienzo de entender cómo se logra esto en células expuestas a un gradiente quimiotáctico, y cómo a su vez, este gradiente extracelular se refleja en una organización intracelular.

2.5.1 Eje quimiotáctico

Se llama eje quimiotáctico no solo al conjunto de ligando y receptor en este caso de quimioquinas, sino también a los componentes río abajo en la cascada de señalización intracelular, entre ellos pequeñas GTPasas que desencadenan el rearrreglo del citoesqueleto. En este trabajo reduciremos el concepto de eje quimiotáctico a la interacción del ligando con el receptor y validaremos este eje de manera funcional durante la migración de las MSCs hacia el tumor quedando implícita la función de la cascada de señalización intracelular.

2.5.2 Migración vs Homing.

Llamamos "homing" tumoral o alojamiento en el tumor a un proceso complejo de múltiples pasos, usado por diversos tipos celulares para trasladarse y alojarse desde una zona distante hacia un tumor. De manera similar a las células tumorales en una cascada metastásica, las células que hacen homing deben activarse, intravasarse, viajar por el torrente sanguíneo, extravasarse y migrar, y luego finalmente podrían adquirir algún tipo de cambio fenotípico. Muchos de los aspectos de este proceso son desconocidos en el caso de las MSCs que se alojan en el tumor. Llamamos "homing" hacia el tumor a cualquier acción en la cual las células viajan desde una zona lejana hacia el estroma tumoral incorporándose en el mismo, y nos reservamos el término "migración in vivo" para definir solo el proceso activo, con movimiento celular mediado por filopodios hacia el tumor o estroma tumoral basado en quimioattractantes locales.

2.5.3 Migración inducida por Citoquinas y quimioquinas

2.5.3.1 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas mayormente glicosiladas que desarrollan múltiples funciones y actúan como reguladores locales o sistémicos. Incluyen tanto interleuquinas, factores de crecimiento, citotóxicos, de diferenciación, de quimiotaxis, etc. A diferencia de las hormonas, las citoquinas actúan dentro de los tejidos en forma parácrina o autócrina, aunque también y en menor medida a nivel endócrino. En los tejidos son reguladores de la diferenciación, el

crecimiento, inhibición y apoptosis de células así como de la regeneración tisular y la respuesta inmune local.

En este enorme grupo de biomoléculas encontramos prácticamente todos los niveles de regulación conocidos. Las citoquinas poseen receptores específicos de alta afinidad, de baja afinidad, receptores secuestrantes o “decoy”, presentan en muchos casos efectos sinérgicos, antagónicos, etc. Tanto la síntesis, secreción, clivaje o interacción con sus receptores se encuentra altamente regulada aunque en la gran mayoría de los casos no se conocen con detalle los mecanismos por los cuales ocurren estos procesos. Entre las funciones de las citoquinas, se encuentran la regulación del crecimiento, la diferenciación, proliferación y migración de los linfocitos T y B; además pueden inducir la proliferación de células hematopoyéticas. El grupo mejor estudiado es el de las *Interleuquinas*, que juegan un rol principal en la proliferación de las células del sistema inmune, y actúan en cascadas u oleadas de citoquinas para lograr dirigir las respuestas inmune innata y adaptativa. De este grupo, la IL-6 es uno de los factores más estudiados, junto a IL-1 y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). La respuesta inmune inflamatoria depende en primera instancia de oleadas de éstas tres moléculas. Otras citoquinas involucradas en migración son los *factores de crecimiento*. Los factores de crecimiento también se encuentran regulando la migración a través de receptores del tipo tirosín kinasa (TKR).

2.5.3.2 Quimioquinas, o citoquinas quimiotácticas.

Las *quimioquinas* son una familia de pequeñas citoquinas. Se clasifican de acuerdo a las características estructurales compartidas por su pequeño tamaño (todas aproximadamente entre 8-10 kDa de tamaño), y la presencia de cuatro residuos de cisteína conservados en lugares que son clave para la conformación espacial de la molécula. El nombre se deriva de su capacidad para inducir la quimiotaxis dirigida en células en las inmediaciones de respuesta, siendo citoquinas quimiotácticas. Algunas quimioquinas se consideran pro inflamatorias y pueden ser inducidas durante una respuesta inmune para dirigir a células del sistema inmune a un sitio de la infección, mientras que otras se consideran homeostáticas y están involucradas en el control de la migración de las células durante los procesos normales de mantenimiento o el desarrollo del tejido. Estas proteínas ejercen sus efectos biológicos mediante la interacción con los receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteínas G.

Las quimioquinas juegan un rol principal en la inflamación aguda y la crónica. Además promueven la respuesta inmune, contribuyen a la linfocitosis y hematopoyesis, vascularización, adhesión célula-célula, y la recirculación y homing de leucocitos, entre otras funciones. La

estimulación policlonal de linfocitos, los antígenos y citoquinas endógenas así como las heridas estimulan la producción de quimioquinas.

Los receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G o (GPCRs por sus siglas en inglés), probablemente constituyen la familia más importante de receptores para factores señal que regulan la actividad migratoria de las células y que son, además, capaces de inducir la quimiotaxis. Los ligandos más importantes para los GPCR con respecto a la migración son las quimioquinas y los neurotransmisores. Los GPCRs se activan, tras la unión con su ligando, del lado intracelular donde se encuentran las proteínas G heterotriméricas. Las proteínas G heterotriméricas se sitúan del lado intracelular de la membrana plasmática y su movilidad depende de la fluidez de ésta. Están conformadas por tres subunidades α , β y γ . En reposo unen GDP y se encuentran asociadas entre sí. Cuando un GPCR recibe un estímulo y se activa a la proteína G, une GTP y se disocia en β - γ , que puede ejercer funciones biológicas como la apertura de canales, y la subunidad α por otra parte que, en las vías que son activadas por receptores acoplados a Gs la subunidad α (α_s), estimula la adenilato ciclasa y promueve la señalización mediante AMP cíclico o, como ser la α_i inhibe a esta enzima.

Véase en Anexo II, Como referencia a la función de las quimioquinas más relevantes nombradas.

2.5.3.3 Integrinas.

Las integrinas son una de las principales familias de receptores asociados a respuestas de adhesión celular (Humphries, 2000; Hynes, 2002). Todas las integrinas son moléculas heterodiméricas que contienen una subunidad α y una subunidad β unidas no covalentemente. Ambas subunidades son proteínas transmembrana de tipo I, que contiene grandes dominios extracelulares y dominios citoplásmicos en su mayoría cortos (Springer y Wang, 2004; Arnaout et al, 2005). Los genomas de mamíferos contienen 18 genes para las subunidades α y 8 para las subunidades β , y hasta la fecha han sido identificadas 24 combinaciones α - β diferentes a nivel de proteínas. Aunque algunas subunidades sólo aparecen en un solo heterodímero, 12 integrinas contienen la subunidad β_1 , y cinco contienen α_V .

Las funciones de las integrinas se han determinado a través de una combinación de análisis biológicos y genéticos. En la cara citoplásmica de la membrana plasmática, la interacción de la integrina con su ligando coordina el ensamble de los polímeros del citoesqueleto y complejos de señalización; en la cara extracelular, las integrinas unen ya sea macromoléculas de la matriz extracelular o contra-receptores en las superficies celulares adyacentes. Estos enlaces

bidireccionales imponen restricciones espaciales sobre la señalización y el conjunto de la matriz extracelular, y de este modo, integran a las células con su microambiente. A su vez, las interacciones de membrana proximal inician más funciones distales como los patrones de tejido (extracelular) y la determinación del destino celular (intracelular). Gracias a la ingeniería genética y a la existencia de mutaciones naturales se han interpretado los roles clave para las integrinas en la arquitectura de tejidos, el tráfico celular y la diferenciación (Bouvard et al, 2001; Bokel y Brown, 2002).

2.6 EN BUSCA DE UN MODELO MIGRATORIO PARA MSCs

Los mecanismos que subyacen los procesos migratorios de las MSCs se encuentra todavía en su infancia y actualmente se está buscando modelar la migración de las MSCs en base a lo que se conoce sobre mecanismos migratorios de las células migrantes más conocidas, los leucocitos. Los factores que intervienen en la regulación de la migración de los leucocitos se han estudiado ampliamente, y es probable que muchos de los mismos factores estén involucrados en la regulación de la migración de las MSCs. Los linfocitos T, los macrófagos y las células dendríticas son todos considerados relevantes para la comprensión del "homing" de MSCs debido a sus similitudes funcionales en los tejidos inflamados / heridas. En (Spaeth, Klopp et al. 2008) consideran también el modelo de las Células Madre Hematopoyéticas (o HSC, por sus siglas en inglés) debido a que son precursores de los linajes mieloide y linfoide, además de ser residentes de la médula ósea, donde su alojamiento y parte de su maduración dependen de las células estromales de la médula ósea es decir, las MSCs.

2.6.1 Regulación de la migración por Citoquinas en MSCs

Para poder migrar las MSCs deben estar capacitadas para hacerlo, es decir, deben tener activa y en condiciones la maquinaria migratoria y es necesario que se encuentren expresando en su superficie tanto los ligandos como los receptores involucrados en el proceso de adhesión. Estos receptores van a interactuar con su/s ligando/s interviniendo de este modo en el rearrreglo del citoesqueleto necesario para dirigir la migración.

La activación de MSCs por medio de citoquinas pro inflamatorias (por ejemplo, el TNF- α) ha demostrado que aumenta la capacidad migratoria *in vivo* y la adherencia de MSCs mediada por el aumento de la expresión de receptores. Los datos existentes sugieren que las citoquinas IL - 1 β y TNF- α activan las propiedades adhesivas de las MSCs incluyendo el aumento en las vía de adhesión VCAM-1 y VLA-4 (Segers, Van Riet et al. 2006). TNF- α también estaría actuando sobre

la activación transcripcional de receptores como CCR3 y CCR4; estos hallazgos se correlacionan con la observación de un aumento de la migración *in vitro* mediada por RANTES (un ligando de CCR3) y la citoquina derivada de macrófagos (MDC o CCL22, un ligando de CCR4). Además se ha demostrado que varios factores de crecimiento inducen y o modulan la migración de MSCs. El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF - 1) aumenta la expresión del receptor de quimioquina CXCR4 en MSCs, mejorando de este modo la migración *in vivo* a través de su ligando SDF-1 (CXCL12) (Li, Chen et al. 2001). IGF - 1 es capaz de estimular la expresión de otros receptores de quimioquinas tales como CCR5 (receptor de RANTES-CCL5) y de receptores para otros factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb) y el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) ambos asociados con la angiogénesis y cuya síntesis se ve inducida a su vez por estrés hipóxico, y además moduladores de la migración celular (Schmidt, Ladage et al. 2006).

2.6.2 Citoquinas y sus respectivos receptores en MSCs

La proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1 por sus siglas en inglés) o CCL2, una quimioquina secretada por células tumorales, es un potente quimioattractante para MSCs, tal como citáramos previamente y demostrado en un trabajo de 2007 del grupo de Kerin (Dwyer, Potter-Beirne et al. 2007) en donde utilizan muestras tumorales de cáncer de mama. Sin embargo, en este trabajo no comprueban la expresión de CCR2, que es el receptor de MCP-1, además de presentar incongruencias con trabajos anteriores (Ringe, Strassburg et al. 2007), en el cual las MSCs expresaban CCR2 pero no migraban en respuesta a MCP-1. También en este último trabajo muestran la expresión de CXCR1 y CXCR2 en MSCs y demuestran su migración en respuesta a IL-8. Las citoquinas VEGF-A y PDGF A-B poseen función quimiotáctica, convirtiéndolas en citoquinas multifuncionales ya que además son conocidos mediadores angiogénicos y factores de crecimiento tumoral; en (Ball, Shuttleworth et al. 2007) muestran que VEGF-A fue capaz de inducir migración a través del receptor de PDGF, confirmando de este modo la complejidad de la inducción de las vías de señalización.

La expresión de receptores de quimioquinas inflamatorias en MSCs es influenciada por las condiciones del microambiente. Por ejemplo, los receptores de la familia de quimioquinas CC- pero no de CXC- demostraron un aumento en su expresión luego del pretratamiento con TNF- α . Esta sobrerregulación de ciertos receptores de quimioquinas en respuesta a señales celulares puede tener un rol en el "homing" tejido- específico.

Adicionalmente, no se esperaría que las citoquinas producidas por las propias MSCs tuviesen un rol directo sobre la migración de las mismas MSCs, debido a que no producirían gradientes quimiotácticos. Sin embargo, podrían estar influyendo sobre el aumento en la expresión de moléculas de adhesión, preparando de este modo los contactos con el sitio de inflamación o injuria como mecanismo de auto-acondicionamiento. De este modo, el conjunto de factores del microambiente tumoral, incluyendo los factores secretados por las mismas MSCs, formarían parte de las señales implicadas en la incorporación de MSCs en tejidos tumorales.

2.7 ESTRATEGIAS APLICABLES A DISEÑOS DE TERAPIA ANTITUMORAL

A pesar de los avances en la detección y los tratamientos del cáncer aplicando radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, combinación de drogas y terapia génica con vectores virales (Yang, Watkins et al. 2012) los índices de mortalidad permanecen elevados. Los métodos anti tumorales tradicionales pueden reducir el tamaño tumoral primario y/o metastásico sin embargo esos efectos son usualmente transientes y frecuentemente aparecen resistencias, como en el caso del anticuerpo bevacizumab, o metástasis solo demoradas en el tiempo (You and Nam 2013).

Uno de los mayores requerimientos para la terapia génica exitosa es un envío eficiente de genes terapéuticos a los sitios blanco. Desde hace tiempo los vectores más utilizados en terapia génica son virus o plásmidos (Naitoh and Belldegrun 1998), (Miranda, Filipe et al. 2013), (Ledley 1995), (Koob, Rennert et al. 2013), (Bilbao, Gomez-Navarro et al. 1998), (Blaese, Blankenstein et al. 1995). Un vector de envío de terapia ideal debe mostrar una alta transducción del tejido o población deseado, una especificidad en la llegada, y la habilidad de sobrepasar las barreras del sistema inmune con el fin de prolongar el período del tratamiento. Los adenovirus se pueden dirigir, en base a modificaciones en su cápside como ser en la fibra, a infectar o transducir específicamente células tumorales. Además se puede dirigir la replicación de adenovirus y otros vectores plasmídicos haciéndola condicional en células tumorales también. A pesar de esto el hecho de llegar con estos vectores a las células tumorales en un tumor sólido todavía es una barrera difícil de atravesar, seguramente debido a que los adenovirus ni los vectores plasmídicos tienen la capacidad de integrarse activamente a los tejidos blanco.

Las MSCs fueron propuestas como vehículos de genes terapéuticos con el potencial de sobrellevar estas barreras fisiológicas para los vectores virales, especialmente la posibilidad de evadir la respuesta inmune (Le Blanc, Samuelsson et al. 2007) (Tolar, Le Blanc et al. 2010) y permitir evadir la toxicidad (Pereboeva, Komarova et al. 2003) (Ozawa et al., 2008). Ya sea por

tropismo natural o inducido, los vehículos celulares pueden residir selectivamente en tejidos u órganos y liberar vectores artificiales o genes terapéuticos de manera locorregional en áreas que serían inaccesibles para los plásmidos o adenovirus tales como los tumores sólidos. Todo esto hace de las MSCs un vehículo ideal para el envío selectivo de drogas al tumor (El-Haibi and Karnoub 2010). En estos casos analizados se utilizan las propiedades naturales de MSCs de alojarse en tumores ya que no modifican la capacidad migratoria de las células y en todos concluyen que se necesitan conocer con mayor detalle los mecanismos por los cuales las MSCs llegan a tumores.

Uno de los mecanismos de migración celular mejor estudiados es la quimiotaxis desarrollada por quimioquinas gracias a los receptores específicos de este tipo de citoquinas, los GPCRs. Como discutíamos antes, más allá de la variedad de proteínas involucradas en la incorporación de células en tejidos, ya sean moléculas de adhesión como selectinas, integrinas, etc. el eje quimiotáctico es clave en la modulación de la migración por varios motivos:

Las quimioquinas confieren dirección a la migración al formar un gradiente en la matriz extracelular. Este gradiente es sentido en la superficie celular por sus receptores específicos (GPCRs) los cuales, unidos a su ligando, activan integrinas intracelularmente, a través de talina y vinculina, haciendo que puedan interactuar con las proteínas de matriz extracelular. Este mecanismo, sumado a la especificidad del ligando en el tejido blanco confiere a la terapia dirigida una ventaja funcional para aumentar la inclusión de MSCs que se encuentran capacitadas natural o artificialmente para ello.

3 HIPÓTESIS

Nuestro laboratorio se encuentra enfocado en desarrollar diversas herramientas y formas de llegar específicamente a tratar tumores estudiando la biología tumoral y la interacción entre componentes del estroma tumoral con moléculas o células que puedan ser vehículo de terapia antitumoral.

Las MSCs muestran un alto grado de heterogeneidad tanto morfológica como funcional en cuanto a su capacidad de diferenciación. Su identificación requiere una combinación de marcadores en ausencia de un marcador que las defina.

En la primera parte del trabajo planteamos la **hipótesis** de que una subpoblación de MSCs que exhiba una capacidad aumentada en cuanto a su adhesión mostrará una mayor migración frente a medios condicionados por células tumorales y por ende un alojamiento mayor hacia modelos tumorales *in vivo*.

Por otra parte existe un particular interés en resolver las formas que tienen las Células Madre/Estromales Mesenquimales para llegar a tumores de distinta índole. Esto se basa en la evidencia experimental por la cual se ha identificado a MSCs formando parte del estroma tumoral en modelos *in vivo*.

La mayoría de los trabajos hasta 2007 provenientes de diversos laboratorios del mundo empleaban moléculas quimiotácticas en paneos o "screenings", a partir de los cuales surgieron los primeros datos sobre el comportamiento migratorio de MSCs, sobre todo *in vitro* (Ponte, Marais et al. 2007). Fue en ese momento donde se comenzó a utilizar células de líneas tumorales como modelo. Estas moléculas podrían ser utilizadas, en un futuro, para aumentar la llegada de MSCs que vehiculicen elementos de terapia específica para el tejido tumoral, en nuestro caso de interés, el tumor mamario.

El primer trabajo que refiere al uso de muestras quirúrgicas para revelar los factores provenientes de muestras de cáncer de mama fue el de Roisin Dwyer en 2007 (Dwyer, Potter-Beirne et al. 2007); en este trabajo se identifica a MCP-1 proveniente de tumores obtenidos de muestras humanas de carcinomas mamarios como un factor importante en el reclutamiento de MSCs de médula ósea mediante ensayos funcionales. Una falencia en este trabajo está dada por la ausencia de evidencia de expresión de CCR2, receptor de MCP-1, en las MSCs, además de

resultar incompatible con evidencias que mostraron que MSCs expresando CCR2 no migraban ante MCP-1 (Ringe, Strassburg et al. 2007). .

De lo expuesto, surge que los mecanismos finos involucrados en la migración de las MSCs hacia el tumor permanecen en su mayoría incomprendidos.

A partir de esta evidencia en la segunda parte del trabajo, proponemos como **hipótesis** que la migración de MSCs hacia el estroma tumoral en cáncer de mama está mediada por factores quimiotácticos originados en el tumor, ya sean aportados por las células estromales o las propias células epiteliales tumorales.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

- Identificar y caracterizar funcionalmente subpoblaciones de MSCs obtenidas de Médula ósea establecidas y aisladas por sus respuestas diferenciales de adhesión.
- Estudiar el aporte de diferentes factores presentes en el microambiente tumoral en el cáncer de mama responsables de la quimiotaxis o migración dirigida de células madre mesenquimales provenientes de médula ósea que permitan una aplicación en terapia antitumoral.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener y caracterizar fenotípica y funcionalmente subpoblaciones de células madre mesenquimales (MSCs) obtenidas de médula ósea humana.
 - a. Caracterizar las muestras de MSCs.
 - b. Evaluar el comportamiento adhesivo y migratorio tanto *in vitro* como *in vivo* de las subpoblaciones de MSCs obtenidas.
2. Validar técnica y funcionalmente el aporte de los ejes quimiotácticos responsables de la migración de MSCs hacia tumores mamarios.
 - a. Analizar la migración de MSCs hacia los MC por tumores y tejidos adyacentes
 - b. Establecer un modelo de cáncer de mama humano *in vivo* que remede la migración de MSCs hacia el microambiente tumoral.
 - c. Identificar y seleccionar factores de origen tumoral en base a un estudio proteómico.
 - d. Validar funcionalmente los ejes quimiotácticos seleccionados.
3. Estudiar la influencia del microambiente tumoral sobre la migración en MSCs

5 MODELO DE ESTUDIO

El uso de muestras quirúrgicas no es muy frecuente en este tipo de estudios, pero representan cabalmente la fisiología propia del tumor si se desean investigar las propiedades intrínsecas del microambiente tumoral. El uso de modelos de cáncer humano *in vivo* en ratones inmunodeficientes se basa en general en líneas celulares de origen tumoral que no representan el componente estromal ni las interacciones entre la célula maligna y su entorno en términos del balance de los factores que podrían estar modulando el reclutamiento y anclaje de las MSCs. Trabajos *in vitro* propusieron que VEGF y PLGF-1 estarían entre los factores quimiotácticos de MSCs (Fiedler, Leucht et al. 2005); asimismo, factores quimiotácticos pro inflamatorios compartidos con los leucocitos son también factores de reclutamiento de MSCs *in vitro* (Spaeth, Klopp et al. 2008). Se ha identificado a MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), una citoquina pro inflamatoria, como factor soluble proveniente de muestras frescas de cáncer de mama responsable de la migración de MSCs en ensayos *in vitro* (Dwyer, Potter-Beirne et al. 2007) utilizando tejidos de reducciones mamoplásticas como control en las migraciones. Estos trabajos asignan una responsabilidad limitada a esos factores sobre la respuesta quimiotáctica en MSCs, sugiriendo que habría factores adicionales que participan de la inducción de la migración de MSCs. Además, la regulación de la respuesta migratoria puede ser compleja e involucrar diversos factores como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y pequeños péptidos que pueden estar actuando mediante diversos mecanismos.

Como modelo de estudio se utilizaron muestras humanas tanto tumorales provenientes de cirugías, como MSCs obtenidas de extracciones de médula ósea de donantes sanos, con el fin de identificar los principales factores que guían a las MSCs humanas provenientes de médula ósea a alojarse en el estroma tumoral mamario.

Creemos que estos modelos remedan más fielmente lo que ocurre a nivel fisiológico que las líneas celulares establecidas ya que no solo incorporan el estroma tumoral sino que además conservan más fielmente las características de las células estudiadas ya que no sufrieron un proceso de transformación. De esta manera, esperamos que en un futuro se podrán trasladar estos conocimientos en una herramienta celular de aplicación clínica.

6 RESULTADOS – PARTE I

6.1 CARACTERIZACIÓN DE MSCs OBTENIDAS DE MÉDULA ÓSEA. OBTENCIÓN DE SUBPOBLACIONES CON DISTINTA CAPACIDAD ADHERENTE.

En una primera etapa del trabajo, se desarrolló una metodología que permitió identificar y aislar una subpoblación de MSCs con un comportamiento adhesivo y migratorio aumentados hacia el tejido maligno (Bolontrade, Sganga et al. 2012). Brevemente, se plaquearon las células mononucleares obtenidas a partir de centrifugación diferencial en gradiente de densidad, en presencia de suero fetal bovino (SFB) al 20% en el medio de cultivo. Luego de 1 hora de adhesión, se recolectó el sobrenadante y se sembró de manera independiente permitiendo la adhesión en ambos casos durante un período de 3 días; posteriormente, ambos cultivos se lavaron y se mantuvieron de forma independiente en condiciones de cultivo de MSCs hasta lograr una confluencia del 80 a 90%. La población celular obtenida después del primer punto de tiempo del cultivo se denominó MO-MSCs. La obtenida luego de la siembra del sobrenadante recogido se denominó MOSN-MSCs. Los cultivos a los cuales se hace referencia aquí como MSCs original o "whole", son los descriptos como protocolo estándar que por ende contiene ambas subpoblaciones. Tanto la subpoblación MO-MSCs como la MOSN-MSCs y las MSCs "Whole"/originales se caracterizaron en cuanto a su expresión de antígenos de superficie por citometría de flujo (CF) y potencial de diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, para determinar el origen mesenquimal.

Tanto las subpoblaciones como la población original de MSCs se caracterizaron morfológicamente (Figura 1); a pasaje 0 o luego del sembrado original. La morfología de ambos tipos celulares es diferente, mientras que las MO-MSCs presentaron una morfología típicamente fibroblastoide las MOSN-MSCs mostraron una morfología más monocítica. Luego del 2^o-3^{er} pasaje en cultivo ambas subpoblaciones mostraron el mismo tipo de morfología fibroblastoide indicando que en las MOSN-MSCs se conserva una morfología mesenquimatosa. Inmunofenotípicamente ambas subpoblaciones resultaron positivas entre otros para los marcadores CD90, CD73, CD44, CD105 y negativas para linaje hematopoyético, CD34 y CD45 además de resultar ser negativas para CD80 y CD31. (Figura 2). Además se caracterizó la potencialidad de diferenciación de las diferentes subpoblaciones para las muestras analizadas hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico (Figura 3) demostrando que ambos tipos celulares son MSCs.

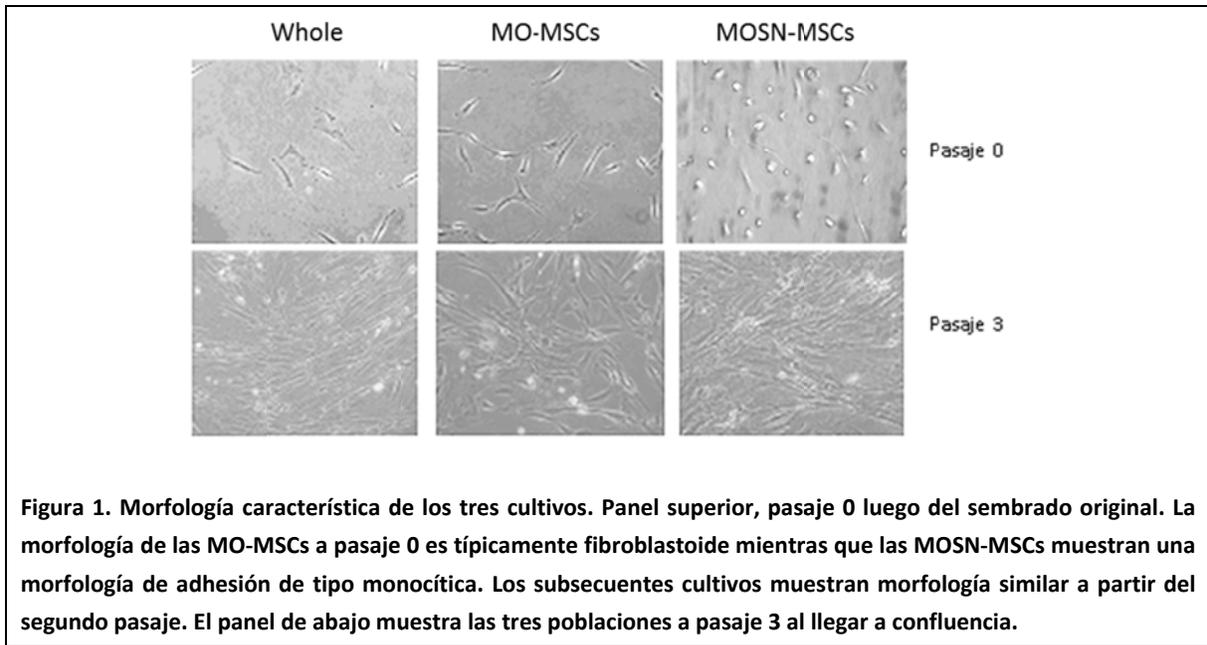


Figura 1. Morfología característica de los tres cultivos. Panel superior, pasaje 0 luego del sembrado original. La morfología de las MO-MSCs a pasaje 0 es típicamente fibroblastoide mientras que las MOSN-MSCs muestran una morfología de adhesión de tipo monocítica. Los subsecuentes cultivos muestran morfología similar a partir del segundo pasaje. El panel de abajo muestra las tres poblaciones a pasaje 3 al llegar a confluencia.

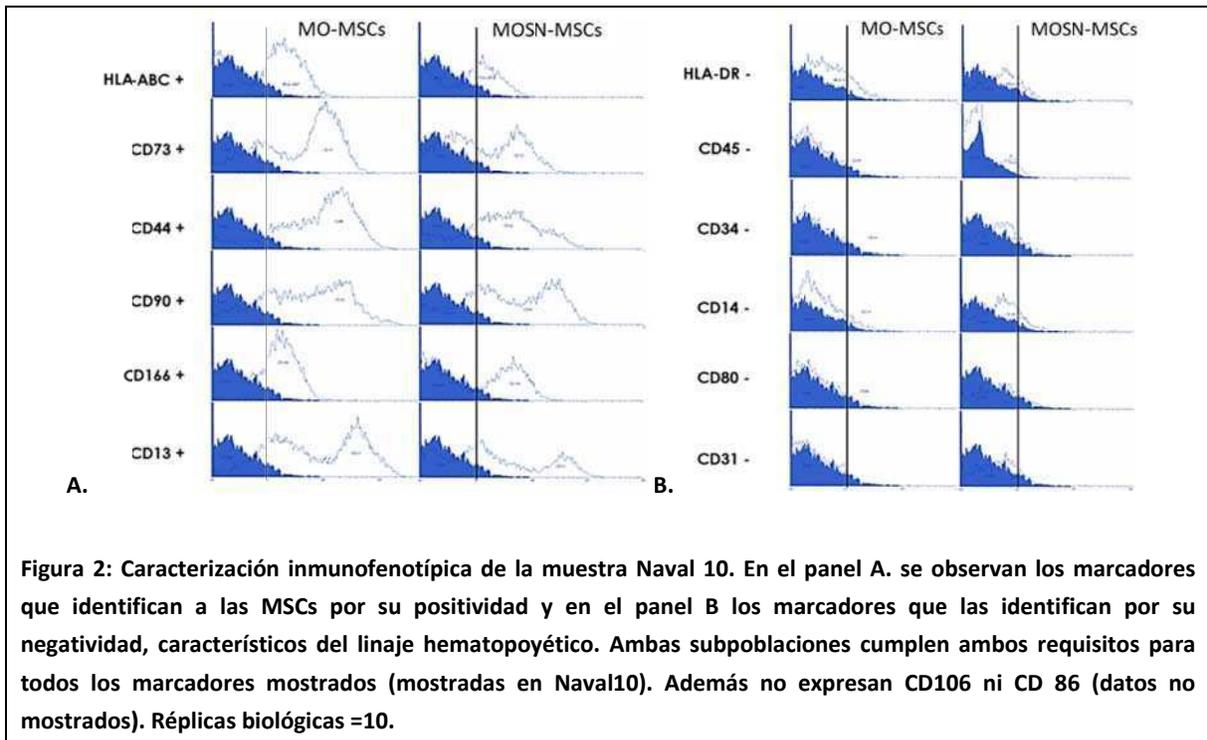
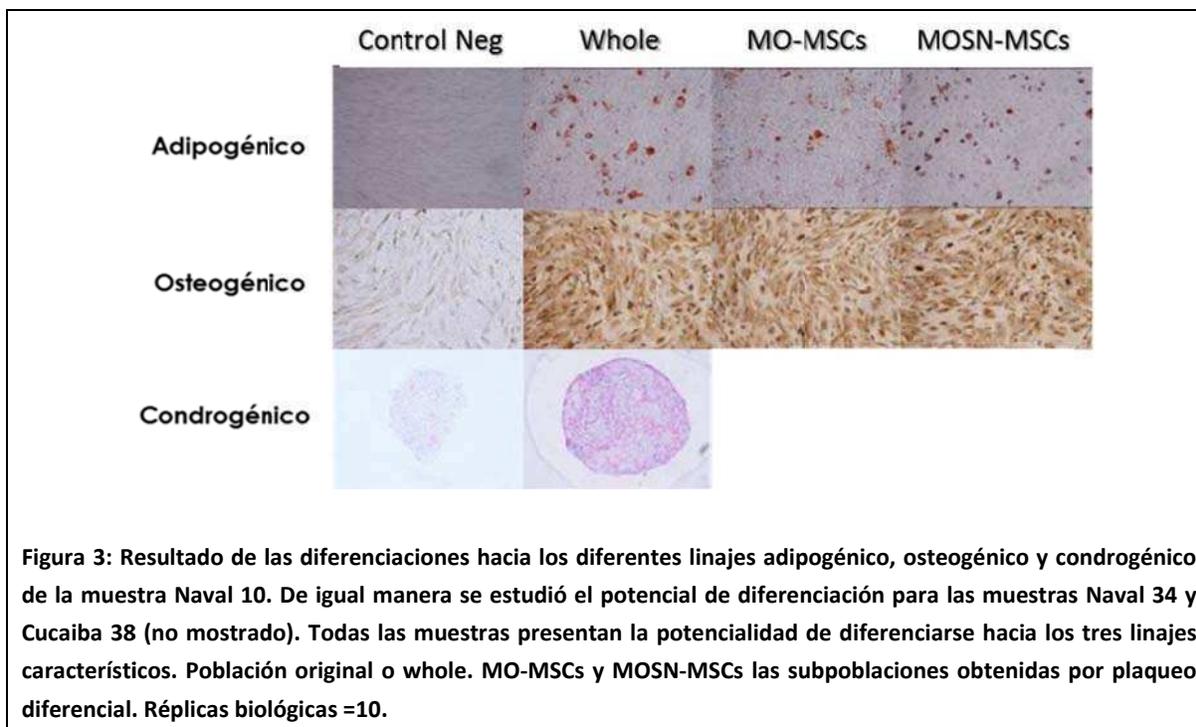


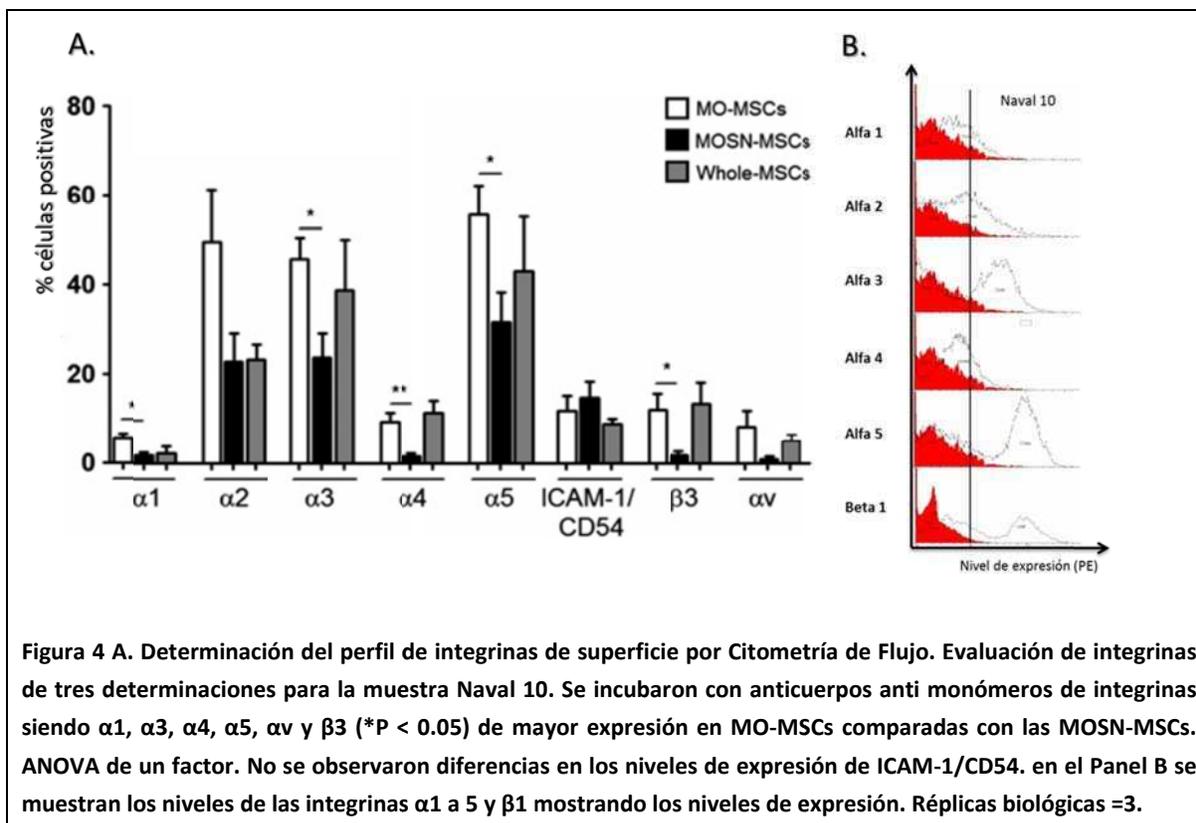
Figura 2: Caracterización inmunofenotípica de la muestra Naval 10. En el panel A. se observan los marcadores que identifican a las MSCs por su positividad y en el panel B los marcadores que las identifican por su negatividad, característicos del linaje hematopoyético. Ambas subpoblaciones cumplen ambos requisitos para todos los marcadores mostrados (mostradas en Naval10). Además no expresan CD106 ni CD 86 (datos no mostrados). Réplicas biológicas =10.



6.2 LA SUBPOBLACIÓN MO-MSCs EXHIBE MAYOR NIVEL DE EXPRESIÓN DE INTEGRINAS, ADHESIÓN A MATRICES Y A ENDOTELIO Y TIENE UNA MAYOR CAPACIDAD MIGRATORIA.

En virtud de la capacidad de adhesión diferencial asumimos que existirían diferencias en los niveles de expresión de moléculas de adhesión entre ambas subpoblaciones por lo cual analizamos por citometría de flujo las diferentes integrinas en la superficie celular. La subpoblación MO-MSCs exhibió, en comparación con las MOSN-MSCs, mayores niveles de expresión de la mayoría de los monómeros de integrinas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αV , y $\beta 3$, mientras que no se observaron diferencias en la expresión de ICAM-1/CD54 (Figura 4). Tampoco se observaron diferencias en la expresión de integrina $\beta 1$ sin embargo es la integrina con el nivel de expresión más elevado en todas las MSCs evaluadas a su vez que es uno de los marcadores positivos utilizados como criterio mínimo de caracterización.

En cuanto a los niveles generales de las integrinas evaluadas se observa que las subunidades $\beta 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ presentan los mayores niveles de expresión, las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 4$ presentan niveles de expresión intermedios, mientras que se observan niveles bajos de expresión de $\alpha 1$.



El colágeno tipo 1 se une a los heterodímeros $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 1\beta 1$, el colágeno tipo IV se une al heterodímero $\alpha 1\beta 1$, fibronectina es el ligando de $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ entre otras, mientras vitronectina se une a $\alpha 5\beta 3$ (Humphries, Byron et al. 2006). Para determinar si las diferencias en la expresión de integrinas en la superficie celular podrían reflejar una capacidad adhesiva diferencial a sus respectivos ligandos, se analizó el comportamiento adhesivo de las subpoblaciones MO-MSCs y MOSN-MSCs frente a los diferentes componentes de matriz extracelular (MEC). La subpoblación MO-MSCs exhibió un nivel de adhesión mayor hacia colágeno I, colágeno IV, fibronectina, vitronectina y Matrigel (Figura 5), siendo coherente con la expresión de integrinas $\alpha 2\beta 1$, receptor para Colágeno, y $\alpha 5\beta 1$, receptor de Fibronectina, correlacionando con las integrinas con niveles más elevados

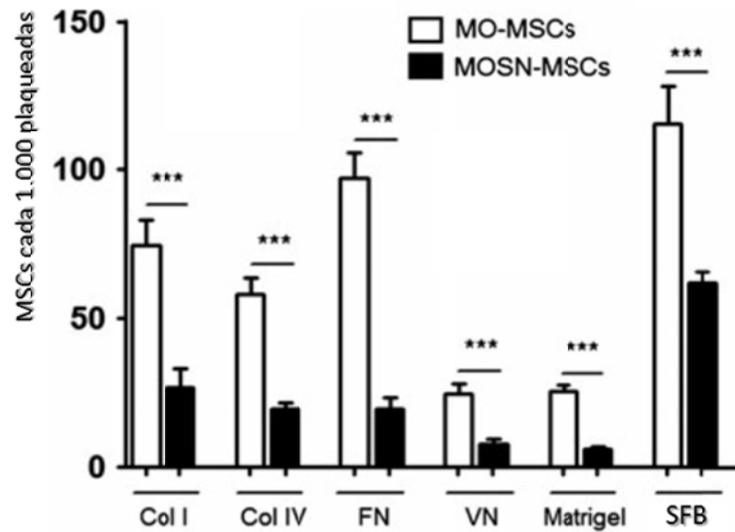


Figura 5 Ensayo de adhesión de MO-MSCs y MOSN-MSCs a diferentes componentes de matriz extracelular. Colágeno tipo I, Colágeno tipo IV, Fibronectina, Vitronectina Matrigel, Suero fetal bovino (SFB). El resultado es coincidente para las tres muestras de MSCs testeadas. Se muestra un ensayo representativo para la muestra Naval 10. Anova de un factor; (***) $P < 0.001$). Réplicas biológicas = 3.

Como parte de los mecanismos de reclutamiento en la masa tumoral las MSCs deben adherirse a la vasculatura y transmigrar a través del endotelio. Por lo tanto, se analizó el comportamiento adhesivo de ambas subpoblaciones frente a una monocapa de células microendoteliales humanas (HMEC-1) (Figura 6). La subpoblación MO-MSCs presentó una adhesión a las células microendoteliales mayor en comparación con las MOSN-MSCs luego de 15 minutos de plaqueadas. El número de células adheridas aumenta con el tiempo y permanece significativamente diferente de la de las MOSN-MSCs.

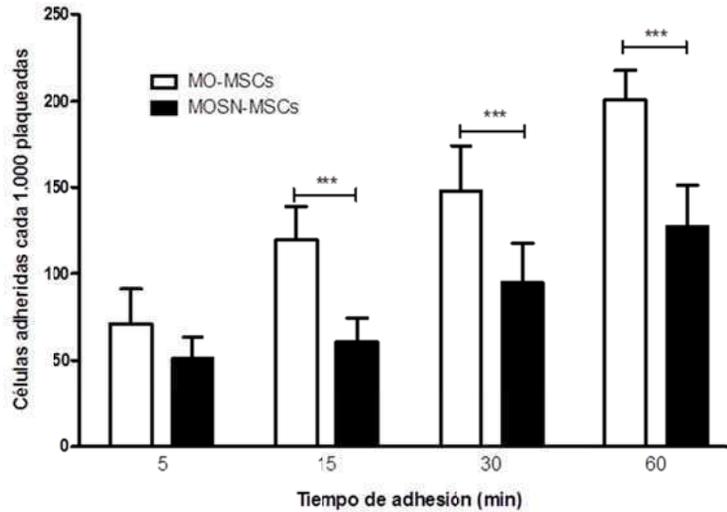
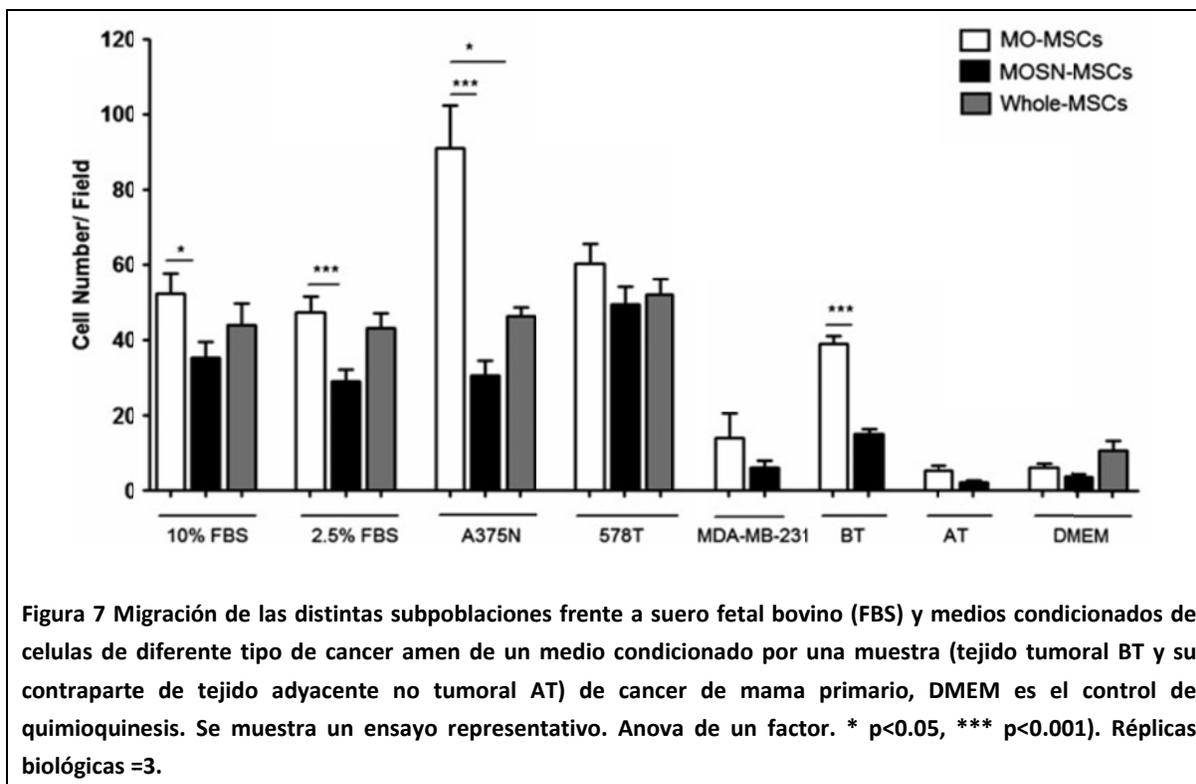


Figura 6 Ensayo de adhesión de las subpoblaciones MO-MSCs / MOSN-MSCs sobre una monocapa de células microendoteliales (HMEC-1). Las células fueron teñidas con el colorante fluorescente CMDiI (Invitrogen) para permitir la visualización de las células adheridas a la monocapa a diferentes tiempos. Se cuantificaron las células positivas para CMDiI. Las subpoblaciones se diferencian en su capacidad de adhesión a partir de los 15 minutos de plaqueadas. ANOVA de dos factores. *** P <0.001. Réplicas biológicas =3.

Como parte de la caracterización funcional evaluamos la capacidad quimiotáctica en cultivo frente a suero fetal bovino (SFB) medios condicionados por líneas celulares tumorales (A375, 578T y MDA-MB-231) así como también frente a una muestra tumoral obtenida de cirugía. La subpoblación MO-MSCs exhibe una capacidad migratoria mayor que la MOSN-MSCs frente a concentraciones de suero 10% o 2,5% para las tres muestras testeadas mientras que la Naval 10 también presenta diferencias frente a suero al 100%. La subpoblación MO-MSCs presenta mayor migración frente a MC por A375 y MC por una muestra tumoral (BT: T09-3178) (Figura 7).



6.3 LA SUBPOBLACIÓN MO-MSCs LOGRA UNA MAYOR LOCALIZACIÓN TUMORAL A NIVEL LOCO-REGIONAL.

Los datos anteriores tomados en conjunto sugieren que la subpoblación MO-MSCs posee una mayor capacidad para migrar hacia un entorno tumoral en comparación con las MOSN. Para evaluar la capacidad de migración *in vivo*, se pre-tiñeron ambas subpoblaciones mediante fluorescencia con el colorante lipofílico DIR (carbocianina de emisión infrarroja) y se inyectaron de manera peritumoral a xenoinjertos de tumores humanos establecidos en ratones “nude”. Durante el seguimiento de células marcadas *in vivo* (IVIS) las MO-MSCs demostraron una mayor direccionalidad hacia la zona tumoral comparado con las MOSN-MSCs al día 5 luego de la administración (Figura 8A.). El mayor nivel de migración de las MO-MSCs se observó en los 3 tipos tumorales analizados (Figura 8B.).

A los efectos de definir si la migración de las MO-MSCs hacia la masa tumoral interior era dependiente de la degradación de matriz se tiñeron con DIR MO-MSCs y se inyectaron en la periferia de un tumor de melanoma (A375) establecido. Las células fueron inyectadas con o sin el inhibidor de metaloproteasas de matriz 1,10-fenantrolina. El agregado de 1,10-fenantrolina redujo en casi un 50% el reclutamiento de las MO-MSCs dentro de la zona interior del tumor en desarrollo ($P < 0,05$) lo que sugiere que las MO-MSCs penetran la masa tumoral a través de un proceso proteolítico activo (Figura 8C. y D.).

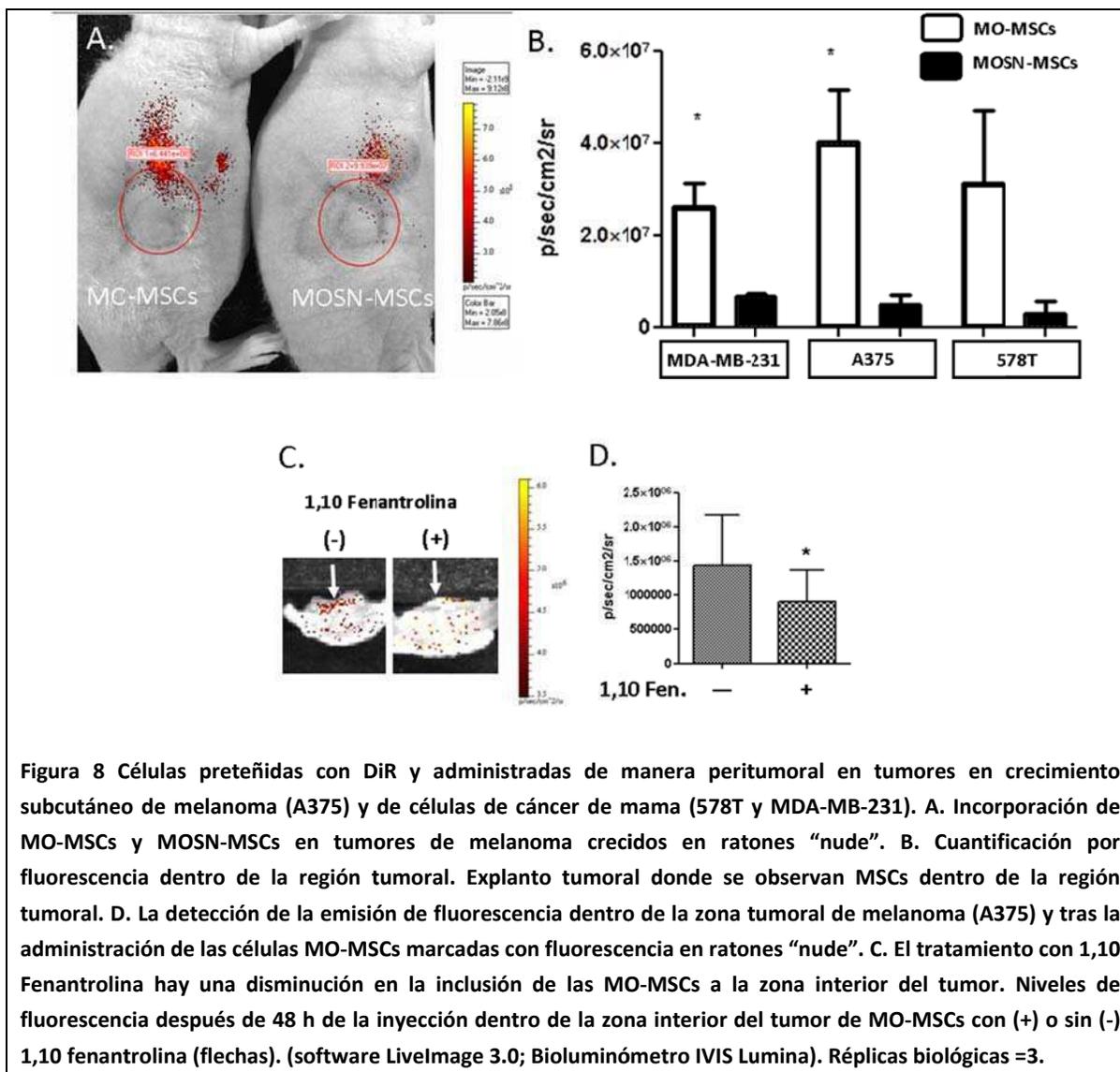


Figura 8 Células preteñidas con DiR y administradas de manera peritumoral en tumores en crecimiento subcutáneo de melanoma (A375) y de células de cáncer de mama (578T y MDA-MB-231). A. Incorporación de MO-MSCs y MOSN-MSCs en tumores de melanoma crecidos en ratones “nude”. B. Cuantificación por fluorescencia dentro de la región tumoral. Explanto tumoral donde se observan MSCs dentro de la región tumoral. D. La detección de la emisión de fluorescencia dentro de la zona tumoral de melanoma (A375) y tras la administración de las células MO-MSCs marcadas con fluorescencia en ratones “nude”. C. El tratamiento con 1,10 Fenantrolina hay una disminución en la inclusión de las MO-MSCs a la zona interior del tumor. Niveles de fluorescencia después de 48 h de la inyección dentro de la zona interior del tumor de MO-MSCs con (+) o sin (-) 1,10 fenantrolina (flechas). (software LiveImage 3.0; Bioluminómetro IVIS Lumina). Réplicas biológicas =3.

7 RESULTADOS - PARTE II

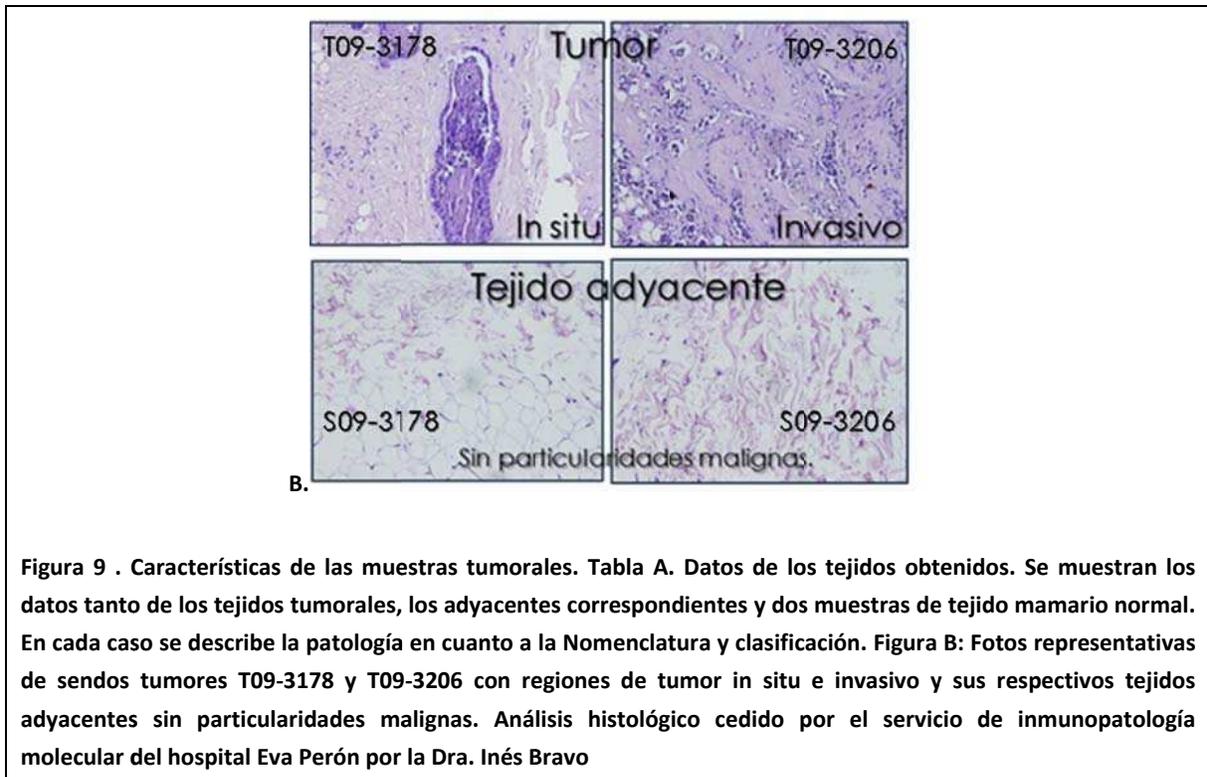
Como una estrategia alternativa a la obtención de subpoblaciones con mayor capacidad de redireccionamiento hacia la masa tumoral, decidimos en paralelo identificar los factores responsables del reclutamiento de MSCs hacia la zona del tumor. Para ello abordamos este estudio utilizando muestras de tumores frescos de cáncer de mama y muestras de tejido no maligno adyacente a éste. Esta parte de la tesis nos llevó a identificar nuevos factores con potencial para ser usados incluso en abordajes terapéuticos.

7.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES

Las muestras de adenocarcinomas mamarios fueron obtenidas y tipificadas por el Servicio de Patología del hospital Eva Perón a cargo de la Dra. Inés Bravo.

Las muestras obtenidas bajo consentimiento informado fueron todas estadios IIA o IIB correspondientes a tumores in situ o infiltrantes. Se evaluó la expresión de receptores de estrógenos, progesterona y Erb (ErbB2) (Figura 9) (ver Metodología). Además no poseen tratamiento alguno previo a la cirugía como neoadyuvancias. Dado que el objetivo de esta parte del proyecto consiste en la identificación de los factores quimiotácticos diferencialmente producidos por el tejido maligno, era de absoluta relevancia confirmar que el tejido que se recibía correspondía a tejido maligno o adyacente no maligno.

Tejido	Molecular		Expresión de receptores			Tipo histológico / Clasificación
	Prot	IHQ N°	RE	RP	Erb	
Tumor	09-3169	6967	75	75	Neg 1+	NOS 2-3-2
Adyacente	09-3169					Sin particularidades
Tumor	09-3178	7022	80	25	Neg 1+	Ductal 2-2-1 y lobulillar atípico 3-2-2
Adyacente	09-3178					Sin particularidades
Tumor	09-3206	7042	90	65	1+	NOS 2-1-2
Adyacente	09-3206					Sin particularidades
Tumor	09-3219	7049	70	70	1+	NOS 3-3-2
Adyacente	09-3219					Sin particularidades
Tumor	09-3237	7067	80	0	1+	NOS 3-2-2
Adyacente	09-3237					Sin particularidades
Tumor	09-3372	7122	70	60	3+	NOS 3-2-1
Adyacente	09-3372					Sin particularidades
Tumor	10-3472	7262	60	40	1+	NOS 2-1-2
Adyacente	10-3472					Sin particularidades
Tumor	10-3497	7368	0	0	2+	NOS 3-2-1
Adyacente	10-3497					Sin particularidades
Tumor	10-3534	7414	95	70	1+	Mucinoso
Adyacente	10-3534					Sin particularidades
Tumor	10-3574	7491	70	40	1+	tumor in situ
Tumor	10-3578	7492	0	0	3+	tumor infiltrante. NOS 3-2-2
Tumor	10-3591	7481	0	0	0	NOS 3-3-2
Adyacente	10-3591					Sin particularidades
NORMAL	MAMA1					Tejido mamario de carácter conservada típico.
A. NORMAL	MAMA2					Tejido mamario de carácter conservada típico.



Durante el proceso de confirmación histopatológica también se obtuvo el porcentaje y tipo de celularidad de las diferentes muestras tumorales que incluyo la proporción de estroma tomado como tejido fibroso, células neoplásicas, células inflamatorias, células benignas ubicadas en el tejido no maligno, y células tejido graso. Como análisis del contenido de células tumorales y tejido fibroso, en promedio tienen la misma proporción de ambos tejidos: 39% (CV%=47) de tejido fibroso y 42% (CV%=44) de células tumorales. Estos datos fueron luego utilizados en el modelo *in vivo*.

En la Figura 10 se muestra el análisis histopatológico de las muestras de tejido maligno incluidas en el análisis funcional. Para 8 de las muestras se determinó el perfil de citoquinas y quimioquinas utilizando arreglos de anticuerpos.

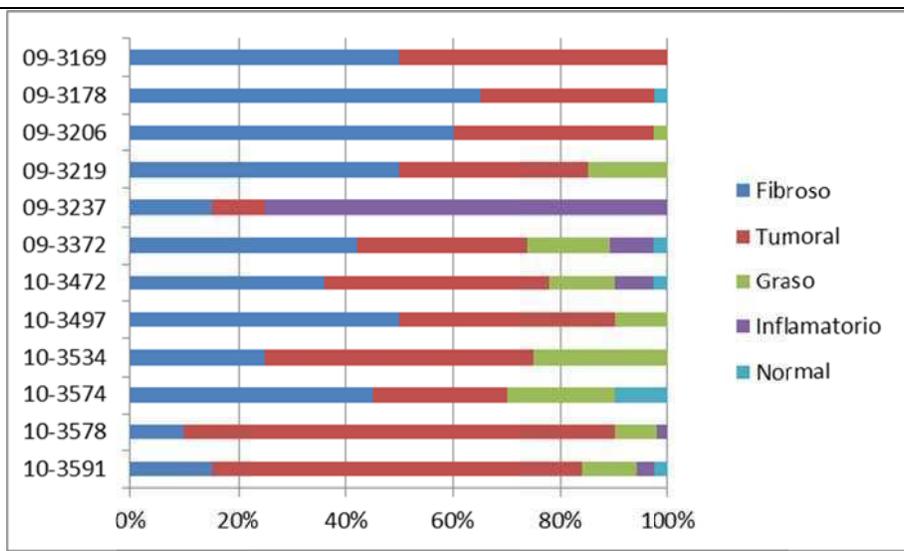
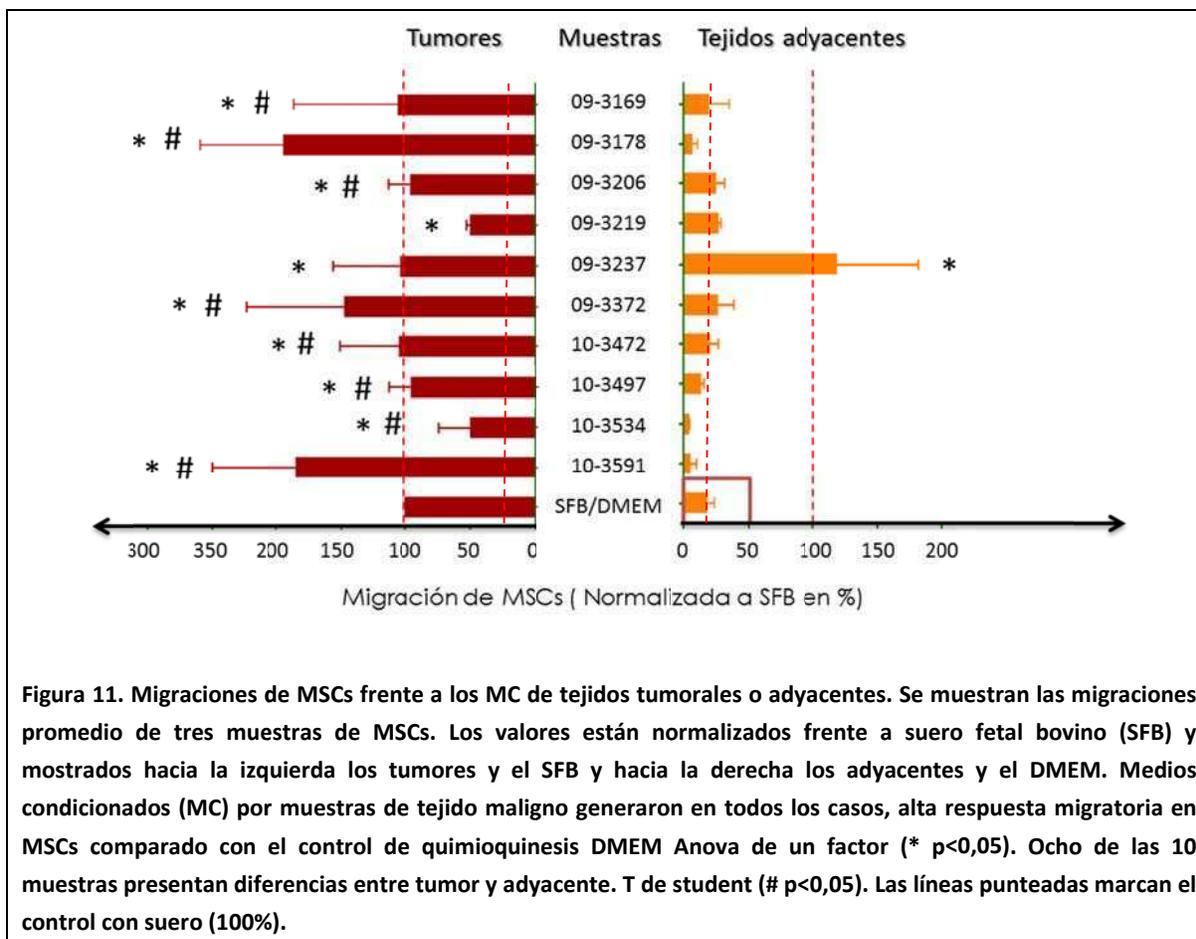


Figura 10 Características histopatológicas de las muestras tumorales incluidas en el estudio funcional. Se grafican los porcentajes relativos de los diferentes tipos celulares que componen cada muestra. Tejido fibroso, representado por fibroblastos, Tejido tumoral por células epiteliales ya sea en carcinoma in situ o infiltrante. Tejido graso como porcentaje en superficie ocupada.

7.2 QUIMIOTAXIS DE MSCS FRENTE A LOS MC DE TUMORES Y TEJIDOS ADYACENTES

Sobre la evidencia de migración de MSCs hacia tumores presentada anteriormente postulamos que las MSCs migrarían activamente en ensayos de quimiotaxis frente a los MC por tumores. A pesar de esto no teníamos evidencia previa acerca de cómo sería la respuesta migratoria de las MSCs hacia los MC por tejidos adyacentes al tumor, ya que no se tenían referencias bibliográficas del uso de este tejido.

Se examinó la migración de MSCs utilizando como quimioattractante medios condicionados obtenidos de 10 muestras de tejidos frescos, tanto de tumoral como de su correspondiente tejido adyacente no maligno (Figura 11). Se grafican los promedios de las migraciones para 3 muestras de MSCs normalizados frente a suero. En todos los casos los MC por tumores indujeron una migración significativa en MSCs (respecto del control de quimioquinesis). Comparativamente con los tejidos adyacentes, la migración de MSCs resultó diferencial en 8 de los casos. Un solo caso de tejido adyacente indujo la migración de MSCs significativamente (Figura 11). Se puede concluir que los MC generados por el tejido maligno de mama tomado como grupo poseen al menos 4 veces mayor capacidad de inducir el “reclutamiento” de MSCs que los tejidos adyacentes no malignos.



7.3 PRUEBA DE CONCEPTO. LLEGADA DE MSCs EN UN MODELO IN VIVO.

La ventaja de utilizar muestras humanas radica en poder estudiar un modelo en el cual los resultados obtenidos podrían trasladarse a una aplicación clínica.

Con el fin de obtener la prueba de concepto de la llegada de MSCs a tumores de mama nos planteamos, en paralelo a los estudios funcionales para los ejes quimiotácticos, la implementación de un modelo *in vivo* de tumores de mama humanos ortotópico en ratones que remede la migración de MSCs. Además, la implementación de este modelo, tendrá la finalidad de validar *in vivo* el aporte de los ejes quimiotácticos estudiados en cultivo.

Para ello nos propusimos establecer tumores en ratones que remedan la migración de MSCs y el aporte de factores de las muestras tumorales.

En primera instancia evaluamos la progresión de fragmentos obtenidos de tres muestras tumorales (T10-3497, T10-3534 y T10-3591) implantados de manera ortotópica en el tejido mamario de ratones “nude” hembra. De la primer muestra evaluada (T10-3497) se injertaron diez fragmentos en sendos ratones sin observarse crecimiento luego de 60 días de implantados.

De dos muestras malignas adicionales (T10-3534 y T10-3591) se prosiguió de la misma manera esta vez combinando la inclusión de diez fragmentos injertados ortotópicamente o habiendo disgregado el tumor con mezcla de enzimas proteolíticas. Además se combinó en algunos casos con Matrigel. Tampoco pudimos observar crecimiento tumoral utilizando esta metodología. No se observó en ningún caso cambios en el volumen del fragmento observable a simple vista. Los fragmentos se tornaron blanquecinos y no se observó aumento de la vascularización en la zona. No se observó crecimiento tumoral en ningún caso.

Planteamos entonces un modelo alternativo en base a líneas tumorales preestablecidas. Para ello evaluamos cuatro líneas celulares de cáncer de mama con el fin de identificar aquella que se asemeje a los análisis previos en las muestras de pacientes. Dada la importancia del estroma planteamos en representación de este el uso de fibroblastos de líneas y de fibroblastos asociados a tumor obtenidos de la disgregación y posterior centrifugación diferencial de 2 muestras analizadas.

7.3.1 Migración de MSCs hacia líneas tumorales y fibroblastos

Se evaluó la respuesta migratoria de dos cultivos de MSCs (Naval 34 y Cucaiba 38) hacia los MC por las líneas de cáncer de mama IBH-6, 578T, MCF7 y MDA-MB-231 y las líneas de fibroblastos humanos fetales (HFL1) y adultos (FhA) y fibroblastos asociados a tumor (FAT) obtenidos de la disgregación de muestras tumorales analizadas (T10-3534 y T10-3591).

En tres ensayos independientes las MSCs migraron significativamente hacia los medios condicionados por las líneas tumorales de mama IBH-6 y 578T. Todos los MC por fibroblastos FhA, HFL1 y FAT10-3534 y FAT10-3591 mostraron migración significativa en MSCs comparando con el control de quimioquinesis. ANOVA de un factor comparando con el control de quimioquinesis (DMEM) (Figura 12).

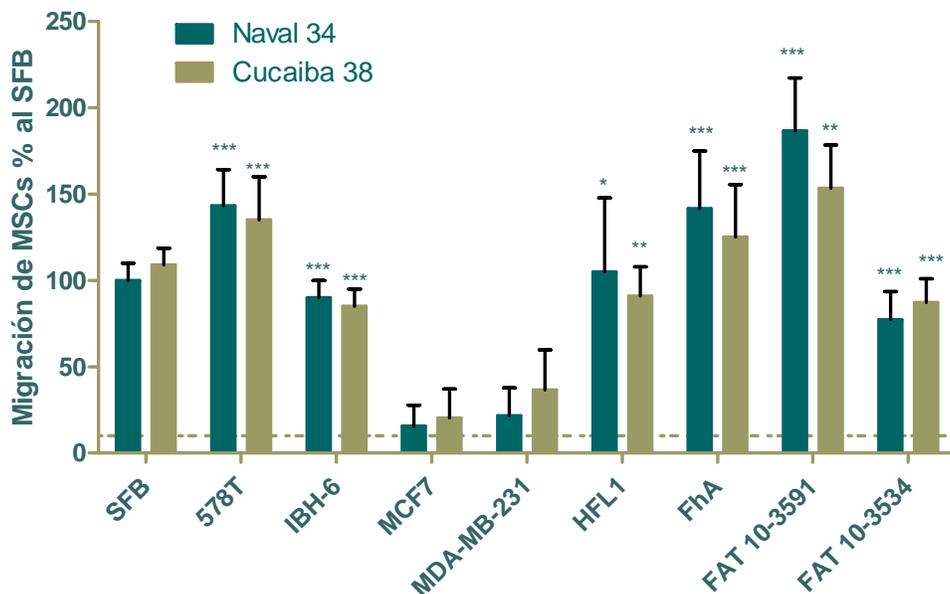


Figura 12 Migración de MSCs frente a MC por líneas celulares de Cáncer de mama y Fibroblastos. A. De las 4 líneas de cáncer de mama, IBH-6, 578T, MCF7 y MDA-MB-231 solo la IBH-6 y la 578T desarrollaron migración en MSCs significativa respecto del control de quimioquinesis (línea punteada). Los MC por fibroblastos humanos adultos (FhA), fetales (HFL1) y asociados a tumor (FAT10-3534 y FAT10-3591) dan respuesta significativa sobre la migración de MSCs. ANOVA de un factor comparando con control de quimioquinesis (línea punteada).

7.3.2 Un modelo *in vivo* que aporta el estroma tumoral humano.

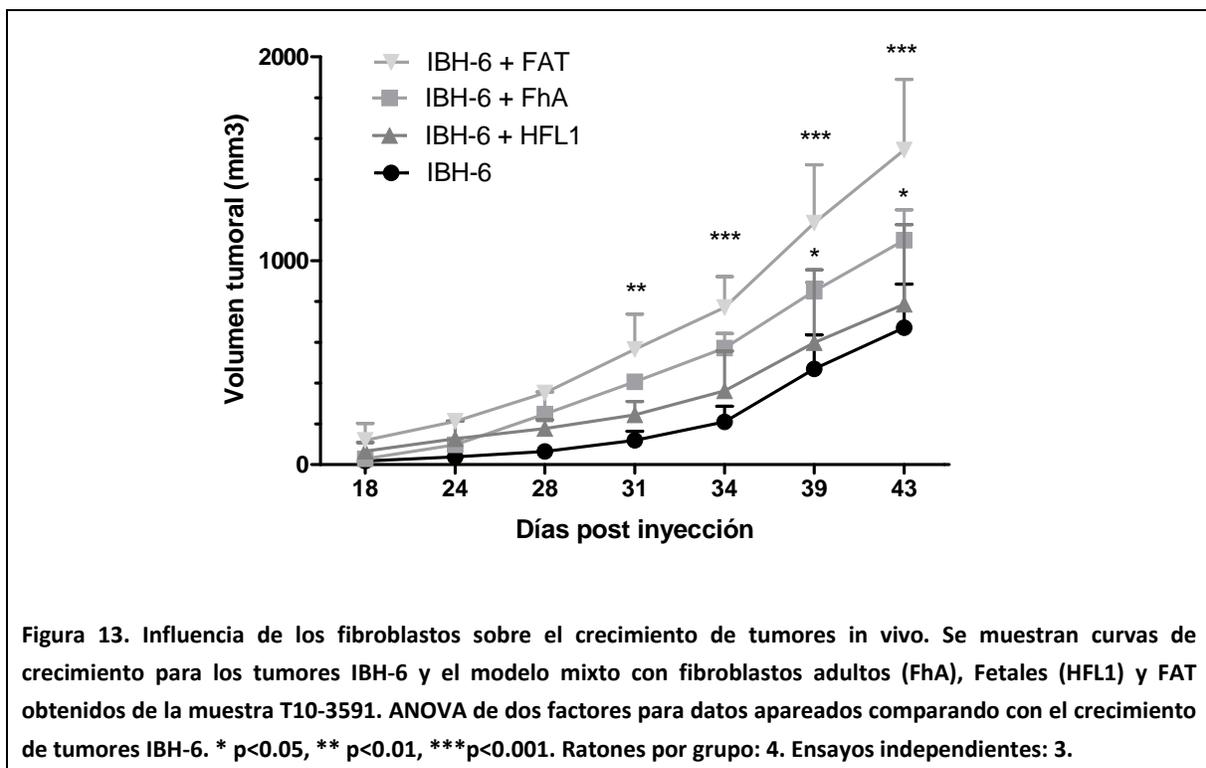
Los fibroblastos asociados a tumor son un componente principal del estroma, con lo cual se decidió establecer un modelo tumoral que involucre tanto una línea tumoral humana de cáncer de mama como componente parenquimal y origen de la enfermedad, con el agregado de fibroblastos humanos como componente estromal. Siguiendo estas premisas y con el fin de definir el mejor modelo *in vivo* para evaluar la llegada de MSCs al estroma tumoral, se estudió el crecimiento tumoral en forma secuencial en los siguientes modelos ortotópicos:

1. Línea celular IBH-6 combinada con FhA (IBH-6+FhA)
2. IBH-6 con HFL1 (IBH-6+HFL1)
3. IBH-6 con FAT 10-3591 (IBH-6+FAT).

Estos modelos se compararon con el establecido utilizando la línea IBH-6 sola. Se utilizaron las condiciones de establecimiento de los tumores de IBH-6 del trabajo fundacional de la línea IBH-6 (Bruzzone, Vanzulli et al. 2009) y se adaptaron las condiciones de inoculación y de finalización

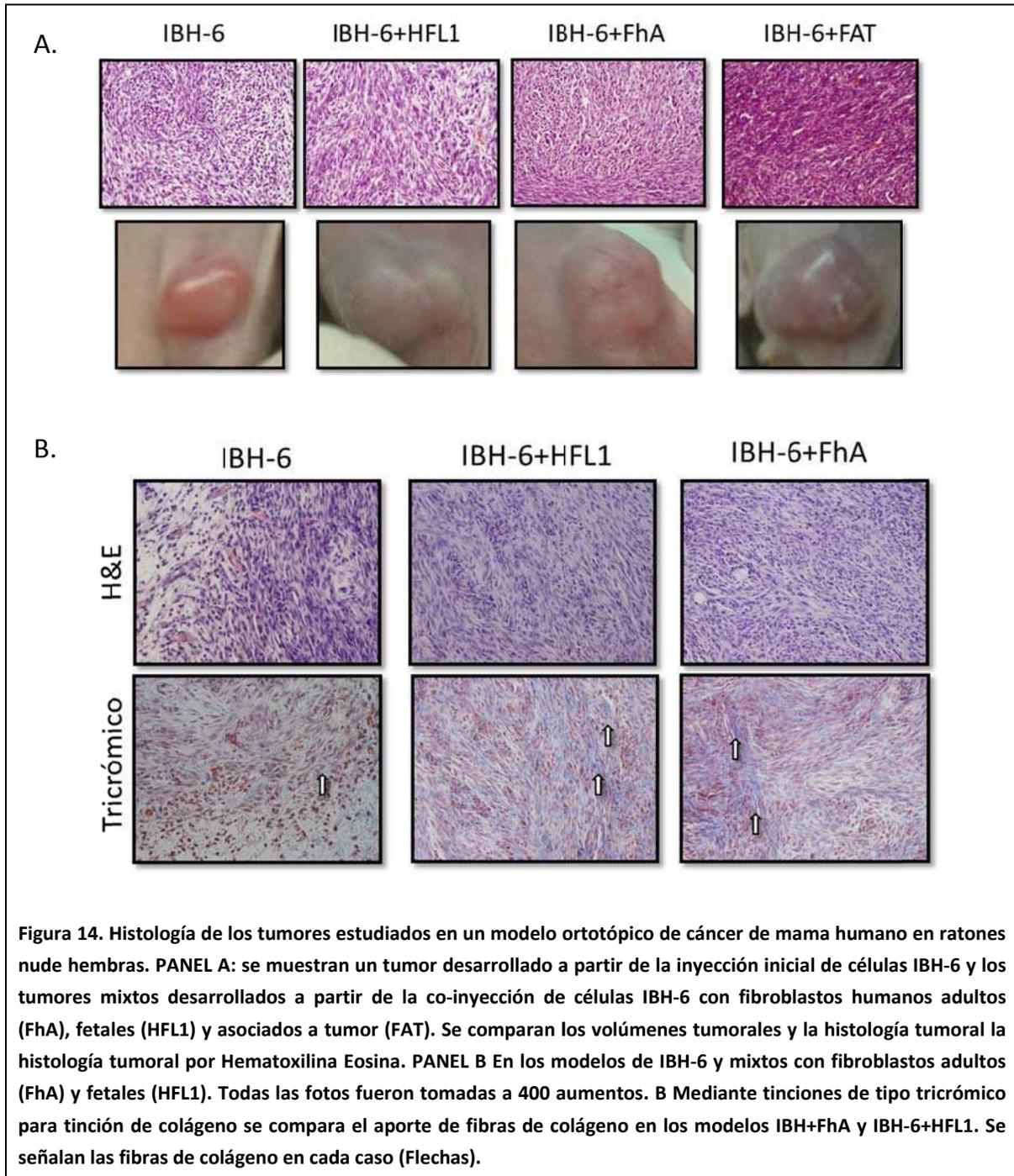
del crecimiento de tumores mixtos a distintas dosis de células inyectadas manteniendo la proporción de 50% para cada línea (del resultado del análisis de la patología). Se inyectaron $6 \cdot 10^6$ células de IBH+6 + $6 \cdot 10^6$ células de cada línea de fibroblasto o cultivo de FAT (no mostrado). Dada la poca disponibilidad de fibroblastos asociados a tumor solo se pudo determinar el crecimiento tumoral en el modelo con FAT en un experimento comparando 4 ratones por cada modelo.

Los tumores desarrollados a partir de la co-inyección de células tumorales IBH-6 + FAT fueron los que presentaron un crecimiento más rápido en comparación a los de la línea tumoral IBH6 sola siendo significativo desde el día 31 de crecimiento (Volumen tumoral 566mm^3 , CV=30%). El crecimiento de IBH-6 + FhA fue diferente del IBH-6 al día 39, (volumen tumoral 598mm^3 CV=59%). El crecimiento de IBH-6 + HFL1 no resultó diferente del establecido por la línea IBH-6 sola. El mayor crecimiento tumoral alcanzado por todos los tipos de tumores mixtos desarrollados sugiere la importancia del estroma en la progresión tumoral (Figura 13).



La generación de tumores mixtos con FAT depende de la obtención de muestras y su procesamiento. Además, debido a su rápido crecimiento *in vivo*, los tumores presentaron zonas necróticas, característica que limitó la producción de medio condicionado.

A partir del análisis histológico de estos tumores se observó que los tumores mixtos desarrollados a partir de la co-inyección de células tumorales IBH-6 + fibroblastos humanos adultos (FhA) tienen mayor cantidad de estroma y fibras de colágeno mayores y más densas tal como lo sugerido por tinciones de tipo tricrómico (Figura 14). Para este último estudio no se dispuso de FAT con lo cual se compararon los modelos IBH-6 con IBH-6+FhA y IBH-6+HFL1.



7.3.3 Los tumores crecidos en ratones nude indujeron respuesta migratoria de MSCs en cultivo

Tumores originados a partir de IBH6 + FhA fueron disecados y se procedió a coleccionar los MC al igual que lo realizado para las muestras humanas. Se evaluó la capacidad quimiotáctica sobre MSCs.

Los tumores, tanto del modelo IBH-6 + HFL1 como del IBH-6 + FhA indujeron respuesta migratoria en MSCs.

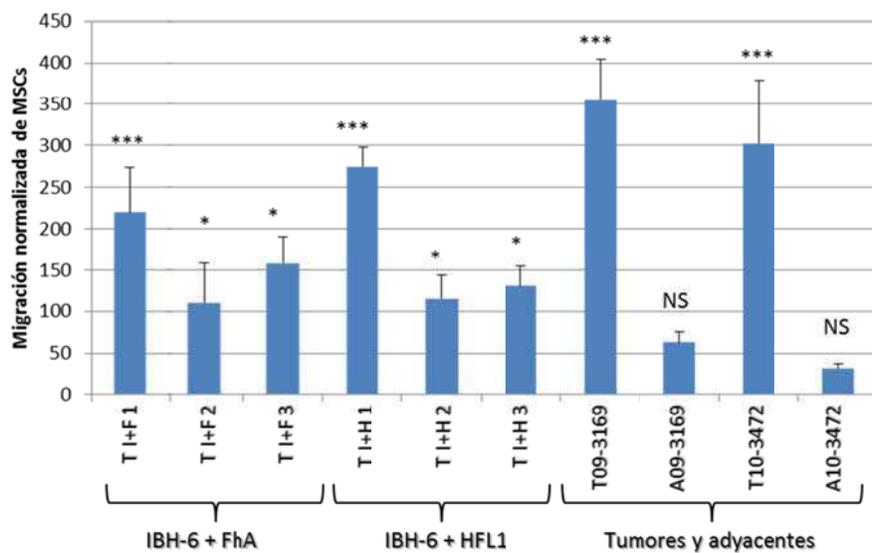


Figura 15. Se estudió la migración de MSCs frente a los MC por los tumores extraídos de las coinyecciones de IBH-6+FhA (T I+F) o de IBH-6+HFL1 (T I+H). Las MSCs migraron significativamente hacia los tres casos analizados para cada modelo. ANOVA de 1 factor comparando con el control de quimioquinesis (DMEM) * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

Sin embargo se utilizó el modelo mixto de IBH-6 con fibroblastos adultos (FhA) para estudiar la llegada de MSCs al estroma tumoral dado que el MC por este modelo desarrolló migración significativa sobre MSCs y presentó crecimiento tumoral in vivo mayor al de la línea IBH-6 sola a diferencia del modelo IBH-6+HFL1.

7.4 CAPACIDAD DE RECLUTAMIENTO DE MSCs POR TUMORES MAMARIOS MIXTOS CRECIDOS EN RATONES “NUDE”. SEGUIMIENTO IN VIVO Y CUANTIFICACIÓN.

De modo de evaluar la llegada al tumor de las MSCs exógenas administradas en ratones portadores de tumores las mismas fueron marcadas previamente mediante fluoróforos vitales o mediante transducción con un sistema que expresa F-luciferasa. Su llegada al tumor se detectó mediante el uso de bioluminómetro (IVIS, Caliper ex Xenogen).

El seguimiento *in vivo* en tiempo real mediante la detección de la emisión de fotones monitoreando la presencia de células marcadas con colorantes fluorescentes del tipo carbocianinas, es específico de las células marcadas. Esto se debe a que estos colorantes vitales lipofílicos no difunden a membranas de células vecinas ya que establecen enlaces covalentes en la membrana plasmática de las células marcadas. Otra ventaja de la fluorescencia es que permite la combinación de varios fluoróforos para marcar distintas poblaciones de células. Una desventaja es que puede ser utilizado en tiempo real solo con células que posean un bajo tiempo de duplicación. En este sentido esta técnica permite la detección de MSCs *in vivo* hasta 15 días luego de la inoculación debido a que el tiempo de duplicación poblacional es de 3 a 4 días.

En el caso de la bioluminiscencia la luz generada por enzimas como la Luciferasa otorga mayor sensibilidad a la detección de células *in vivo* en comparación con los marcadores fluorescentes, pudiendo detectarse tan pocas como 10 células (Kidd, Spaeth et al. 2009) implantadas de manera subcutánea. Otra ventaja importante es que la marca bioluminiscente es específica de células viables y metabólicamente activas ya que depende de la expresión del gen que codifica para la enzima. Para poder determinar la migración de MSCs por bioluminiscencia y tener un método para el seguimiento de la llegada de las MSCs al estroma tumoral se buscó un sistema reportero que pudiera ser revelado *in vivo* sin la necesidad del sacrificio de los animales.

Con el fin de obtener la expresión de bioluminiscencia nos propusimos transducir las MSCs con adenovirus desarrollados en nuestro laboratorio que otorgaran expresión de la enzima *F-Luc*.

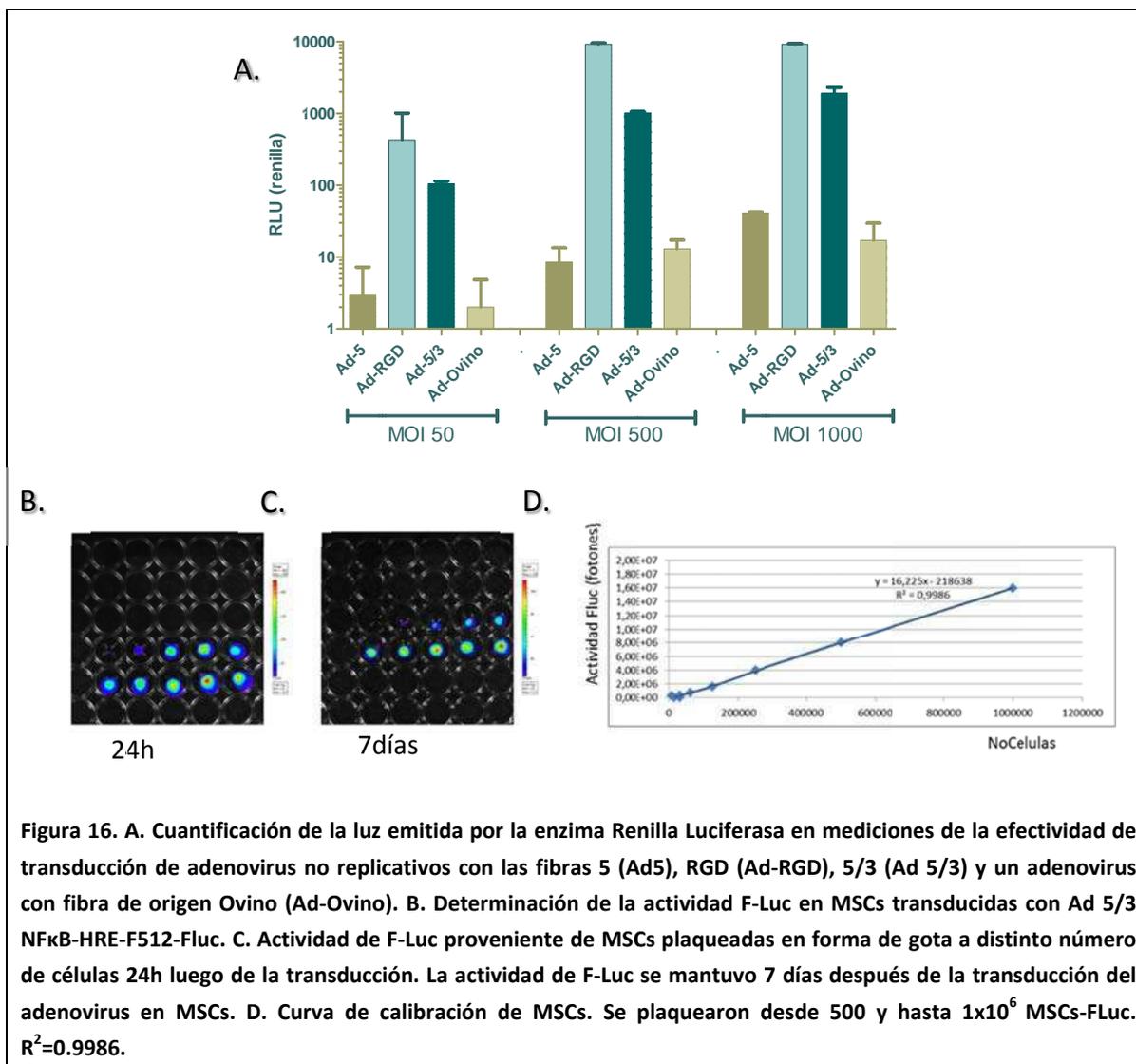
Los adenovirus proveen un sistema de infección (o transducción si no son replicativos) que puede ser modificado artificialmente por ingeniería genética y de esta forma regular el tropismo, la replicación y la expresión de reporteros en la células blanco. Si bien la expresión del reportero es transiente aproximadamente por siete días, esto alcanza para poder determinar la migración de MSCs en los tiempos utilizados en nuestro modelo.

Con el objeto de elegir las condiciones de transducción con adenovirus reporteros tanto en la fibra como en la multiplicidad de infección (MOI), se transdujeron MSCs con adenovirus modificados con diferentes fibras. Se utilizaron diferentes adenovirus que otorgan la expresión transiente de la enzima R-Luciferasa (*R-Luc* o Luciferasa de Renilla) como reportero, que permite determinar la producción de luz en un sistema *in vitro* tras la incubación con su sustrato específico (la luciferina coelenteracina) (ver Determinaciones *in vitro* e *in vivo* de la actividad de luciferasa en estrategias y metodologías).

Se transdujeron MSCs con adenovirus con la modificación en las fibras tipo 5, una fibra quimera 5/3, una fibra RGD, de unión a integrinas y otro adenovirus conteniendo una fibra de origen ovino con el fin de estudiar el tropismo y la efectividad de transducción. Tanto la fibra RGD como la 5/3 resultaron efectivas en cuanto a la transducción de MSCs y la expresión de R-Luc *in vitro*, mientras que la fibra 5 y la ovina la transducción la actividad fue mucho menor (Figura 16A.).

Para el seguimiento de MSCs *in vivo* por bioluminiscencia se utilizó un adenovirus no replicativo diseñado en nuestro laboratorio basado en la modificación de la fibra quimera 5/3 y con la expresión de otra luciferasa "*Firefly luciferase*" (o *F-Luc*) bajo la actividad transcripcional de elementos respondedores a hipoxia y a NFκB (Ad 5/3 NFκB-HRE-F512-Fluc , o simplemente Ad F512 F-Luc) (Viale, Cafferata et al. 2013) para transducir MSCs en los estudios *in vivo*.

El adenovirus utilizado, contiene un promotor mínimo para la proteína SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteines) llamado F512 (por contener 512 nucleótidos). El gen de SPARC tiene actividad transcripcional alta en nuestros cultivos de MSCs comprobada por PCR en tiempo real (no mostrado). Luego de transducir las MSCs con el adenovirus y antes de cada experimento se realizó una curva de calibración con distinto número de MSCs transducidas de modo de probar la sensibilidad, el rango dinámico y la linealidad en la respuesta bioluminiscente. Se prueba la sensibilidad desde 500 y el rango dinámico hasta 1.000.000 de células obteniendo un coeficiente de correlación de $R^2=0.9986$. Además la marca permanece en las MSCs hasta 7 días el cual es el tiempo de corte para los ensayos *in vivo* (Figura 16 B.).



Dado que las MSCs llegaron a incorporarse a tumores de cáncer de mama luego de migración local (Bolontrade, Sganga et al. 2012) planteamos el objetivo de determinar la llegada en las mismas condiciones y lograr cuantificar MSCs incluidas en nuestro modelo mixto en base a una metodología que permitiera dar la prueba de concepto de la llegada de MSCs en nuestro modelo.

Para esto utilizamos el sistema de reportero descrito anteriormente mediante la expresión transiente de la enzima F-Luc por transducción adenoviral para detectar una señal cuantificable asociada a la llegada de MSCs circulantes hacia el estroma tumoral por bioluminiscencia y a su vez poder corroborar mediante inmunofluorescencia las células Fluc incorporadas.

Se siguió el crecimiento tumoral medido por calibre y mediante fluorescencia para poder determinar la localización respecto de las MSCs inyectadas en la periferia (Figura 17). Se utilizaron para el seguimiento tumoral por fluorescencia células IBH-6 con la expresión estable de la proteína verde fluorescente mediante transducción lentiviral (IBH-6 LE GFP). El tumor mixto se estableció con la coinyección de FhA premarcados con DiR (Figura 18). Cuando se estudió la localización de MSCs-Fluc por inmunofluorescencia los tumores no se encontraban marcados dada la interferencia con la señal del anticuerpo secundario. Se inoculó la mezcla de $6 \cdot 10^6$ IBH-6 con $6 \cdot 10^6$ FhA con o sin marca fluorescente de manera ortotópica en ratones nude como describimos anteriormente. Se siguió el crecimiento tumoral hasta un volumen promedio de 100mm^3 momento en el cual se inocularon de manera peritumoral $1 \cdot 10^4$ células MSCs previamente transducidas con el Ad F512 FLuc. Se siguió la marca de bioluminiscencia inyectando el sustrato de la luciferasa D-Luciferina de forma intraperitoneal. Luego de 7 días se sacrificaron los animales y se disecaron los tumores con el sitio de inyección y piel adyacente para determinar la posición relativa de las MSCs-FLuc por bioluminiscencia. Se pudo separar el sitio de inyección visible a simple vista como un pellet laxo mostrando la marca bioluminiscente remanente en el sitio de inyección. Al separar y disecar la pieza tumoral se observó marca bioluminiscente en el borde tumoral del lado del sitio de inyección (Figura 19).

Los tumores se fijaron y se realizaron cortes por congelación. Se incubaron los cortes con un anticuerpo primario anti-FLuc hecho en cabra (Promega) y como secundario se utilizó un anticuerpo anti-cabra hecho en burro acoplado al fluoróforo Cy3 (Rojo). Como resultado se pudo determinar por inmunofluorescencia MSCs incluidas en el estroma tumoral luego de migración desde el sitio de inyección (Figura 20).

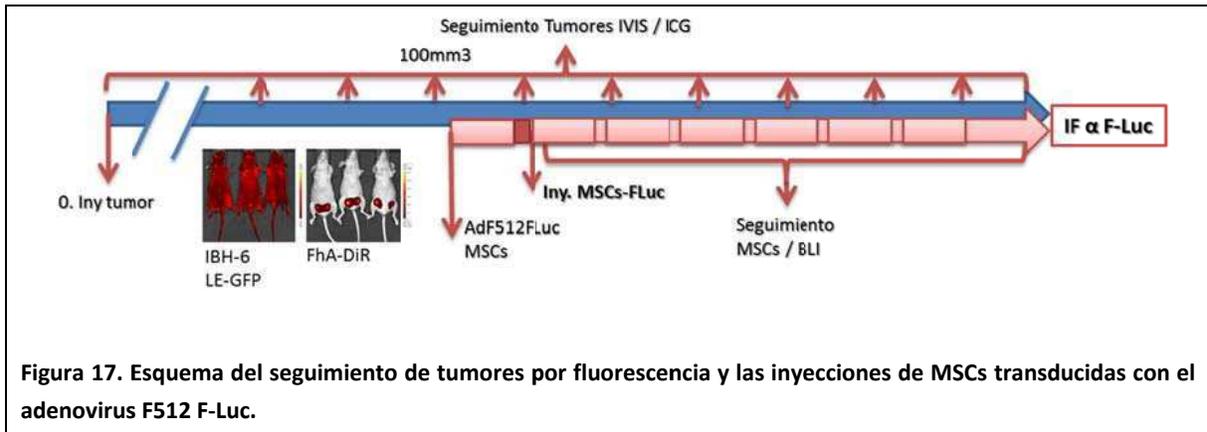


Figura 17. Esquema del seguimiento de tumores por fluorescencia y las inyecciones de MSCs transducidas con el adenovirus F512 F-Luc.

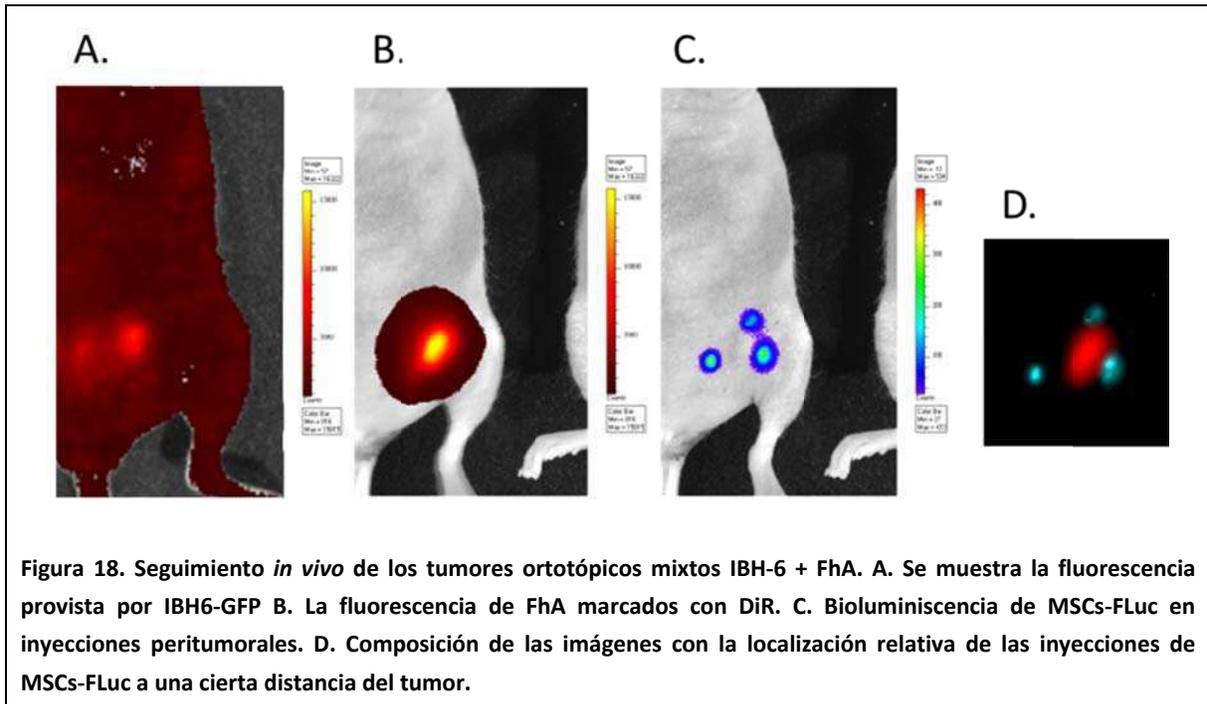


Figura 18. Seguimiento *in vivo* de los tumores ortotópicos mixtos IBH-6 + FhA. A. Se muestra la fluorescencia provista por IBH6-GFP B. La fluorescencia de FhA marcados con DiR. C. Bioluminiscencia de MSCs-FLuc en inyecciones peritumorales. D. Composición de las imágenes con la localización relativa de las inyecciones de MSCs-FLuc a una cierta distancia del tumor.

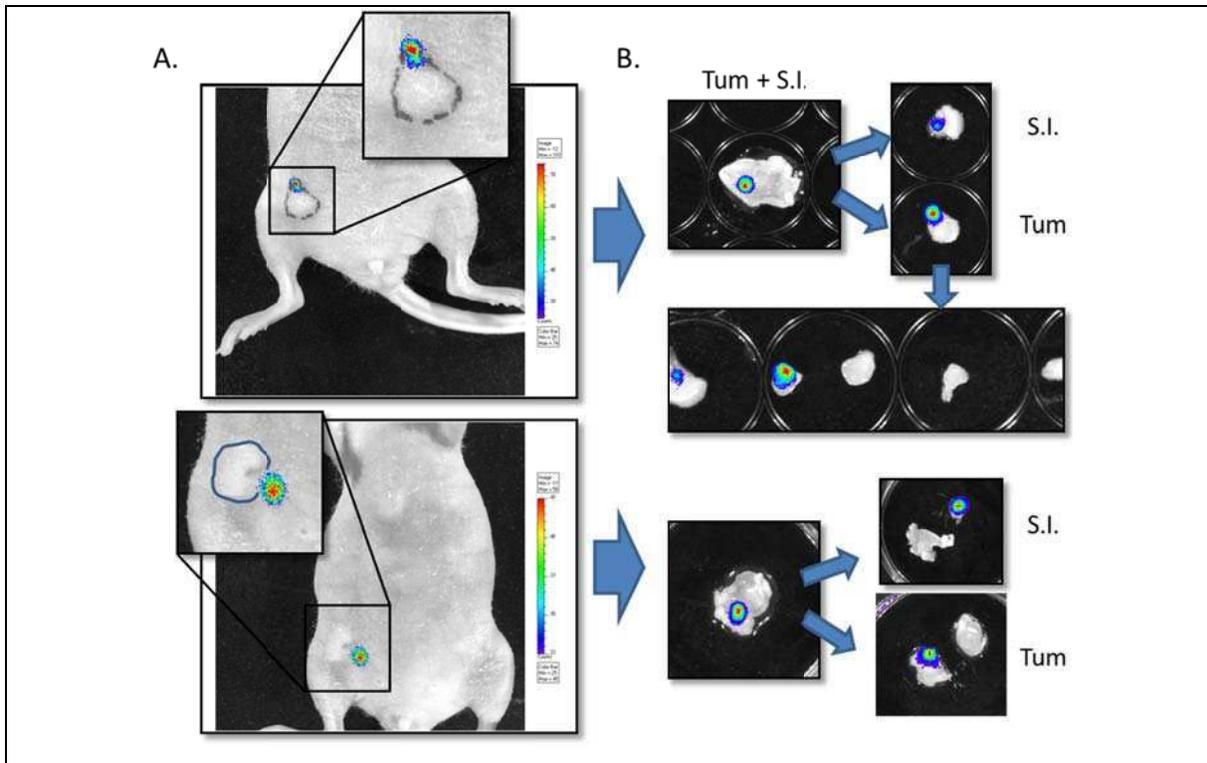


Figura 19. Seguimiento por bioluminiscencia de inyecciones peritumorales de MSCs. PANEL A. Se muestran imágenes de la zona tumoral y el sitio de inyección en dos ratones. Detalle de nube de MSCs en la periferia del tumor. PANEL B. Sendos explantos de toda la zona incluyendo tumor, sitio de inyección y piel adyacente donde se visualiza la marca bioluminiscente de MSCs. De la disección del tejido tumoral se observó el sitio de inyección por separado (S.I.) y el tumor (Tum) con marca bioluminiscente. Se muestran los tumores disecados quedando la marca bioluminiscente del lado donde estaba la inyección.

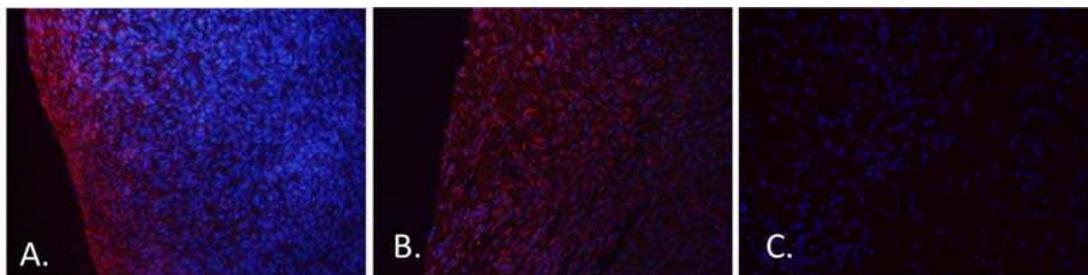


Figura 20. Estudio de la inclusión de MSCs en el estroma tumoral luego de inyecciones peritumorales. Immunofluorescencias utilizando un anticuerpo anti FLuc (Rojo). Mediante marcación con el colorante nuclear Hoetsch 33342 se marcaron los núcleos del total de las células presentes en los cortes histológicos. A y B. Los tumores mostrados en la (Figura 19). C. Composición de los canales rojo y azul para un control negativo sin MSCs-Fluc.

En el estudio anterior logramos verificar la inclusión de MSCs en el entorno tumoral a pesar de no haber podido determinar MIP-3 α en el secretoma en nuestro modelo *in vivo*. En base a esto nos propusimos cuantificar la llegada por citometría de flujo con el fin de tener una metodología que permita validar el eje en otro modelo que logre superar este contratiempo.

El uso de colorantes fluorescentes lipofílicos (Carbocianinas) DiO y DiR permite la tinción de las células al mismo tiempo pudiendo detectar marca positiva doble siendo la misma característica de identificación de las células marcadas *ad hoc*.

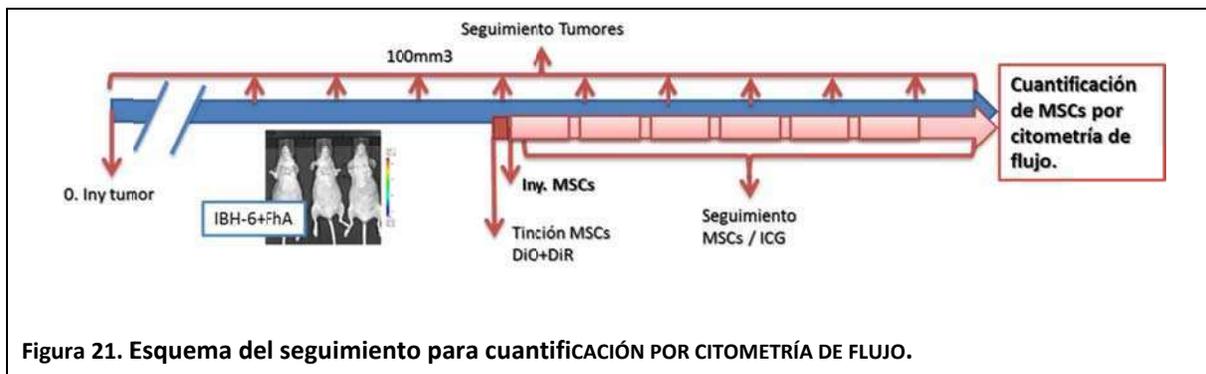


Figura 21. Esquema del seguimiento para cuantificación POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Los tumores fueron crecidos a partir de coinyecciones de células tumorales IBH-6 y fibroblastos. Se siguió el crecimiento tumoral y cuando éstos llegaron a un tamaño de 100mm² se inocularon 10000 MSCs coteñidas con DiO y DiR en 7 ratones por experimento. Luego de 7 días se extrajeron los tumores, se disgregaron y se analizaron en citómetro de flujo (FACSCalibur, BD). Se cuantificaron los eventos del cuadrante superior derecho correspondientes a las MSCs localizadas en el interior de las muestras tumorales.

De esta manera se logró cuantificar la presencia de MSCs incorporadas en el estroma tumoral mediante inyecciones peritumorales y se pudo determinar la variabilidad en este tipo de ensayos (Figura 22). Se muestra un gráfico representativo de controles en citómetro de los tumores disgregados a 5 días de la inyección peritumoral de MSCs (Figura 22 A) y de una determinación representativa de las inyecciones peritumorales (Figura 22 B). El promedio de MSCs incluidas es de 0,12% (CV% =71,62)

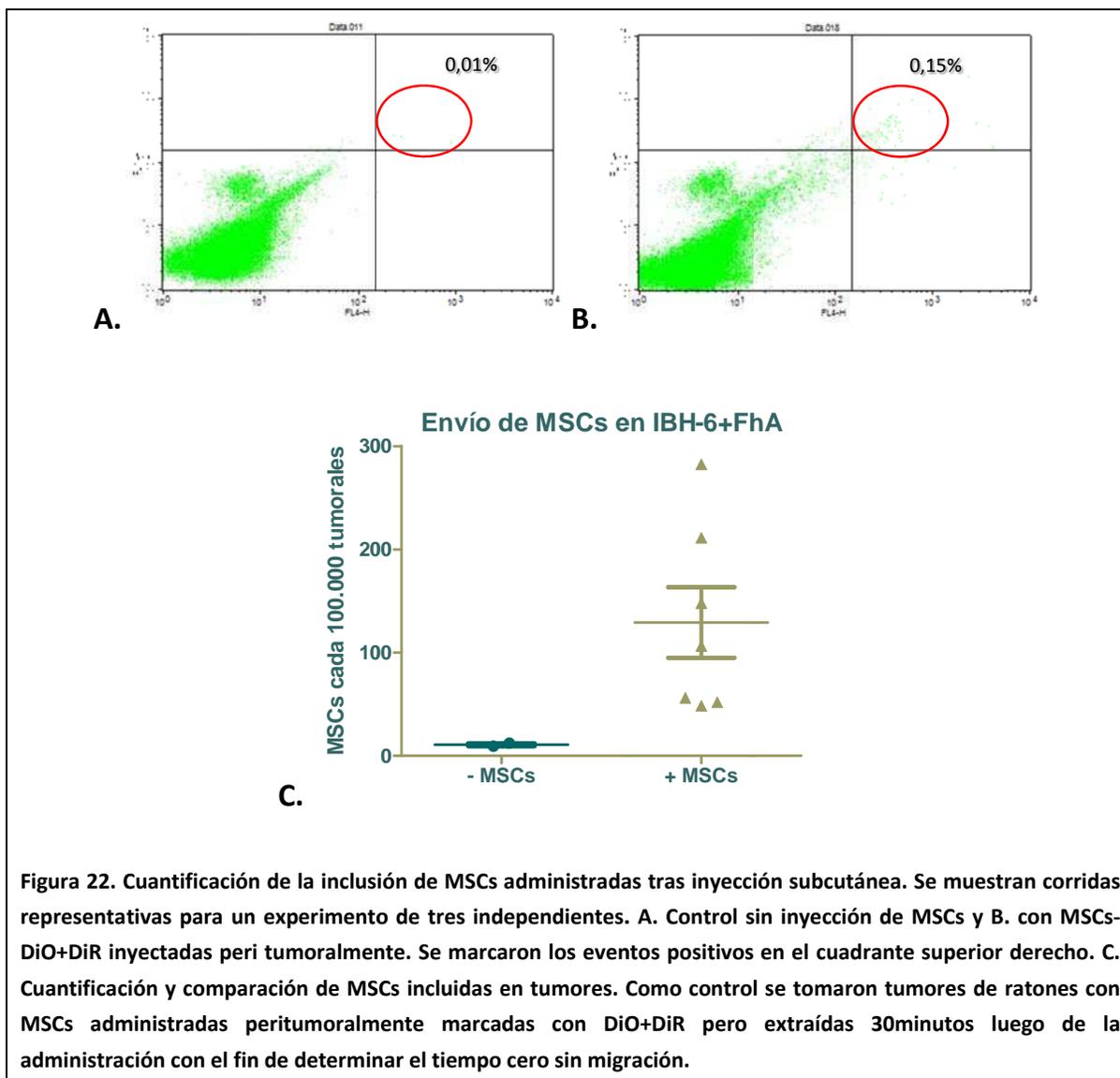


Figura 22. Cuantificación de la inclusión de MSCs administradas tras inyección subcutánea. Se muestran corridas representativas para un experimento de tres independientes. A. Control sin inyección de MSCs y B. con MSCs-DiO+DiR inyectadas peri tumoralmente. Se marcaron los eventos positivos en el cuadrante superior derecho. C. Cuantificación y comparación de MSCs incluidas en tumores. Como control se tomaron tumores de ratones con MSCs administradas peritumoralmente marcadas con DiO+DiR pero extraídas 30 minutos luego de la administración con el fin de determinar el tiempo cero sin migración.

7.5 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LOS MC POR TUMORES Y TEJIDOS ADYACENTES MEDIANTE EL USO DE ARREGLOS DE ANTICUERPOS

El próximo objetivo consistió en intentar identificar los factores solubles responsables de la mayor migración de MSCs inducida por los MC de tejidos malignos de cáncer de mama. Antes de analizar los datos resultantes del análisis proteómico en las muestras tumorales plantearemos los criterios tanto para la elección de las técnicas que permitieron validar estos resultados como la selección de los factores en base a criterios ya sea biológicos y/u orientados a una futura aplicación en terapia antitumoral.

Los resultados obtenidos de técnicas que ofrecen gran cantidad de datos o técnicas de “mediano rendimiento”, como en el caso de los arreglos de anticuerpos, se pueden validar de varias maneras: Técnicamente, mediante el uso de otra técnica que permita cuantificar los resultados. Biológicamente, mediante análisis que permita establecer las posibles interacciones entre los resultados obtenidos y los mecanismos que se quieren estudiar. Y funcionalmente, donde se evaluó una respuesta biológica para establecer una relación entre las entidades estudiadas y la función que se quiere estudiar. Para continuar se requiere una selección de los factores más pertinentes mediante diferentes criterios para una posterior validación ya sea técnica, biológica o funcional.

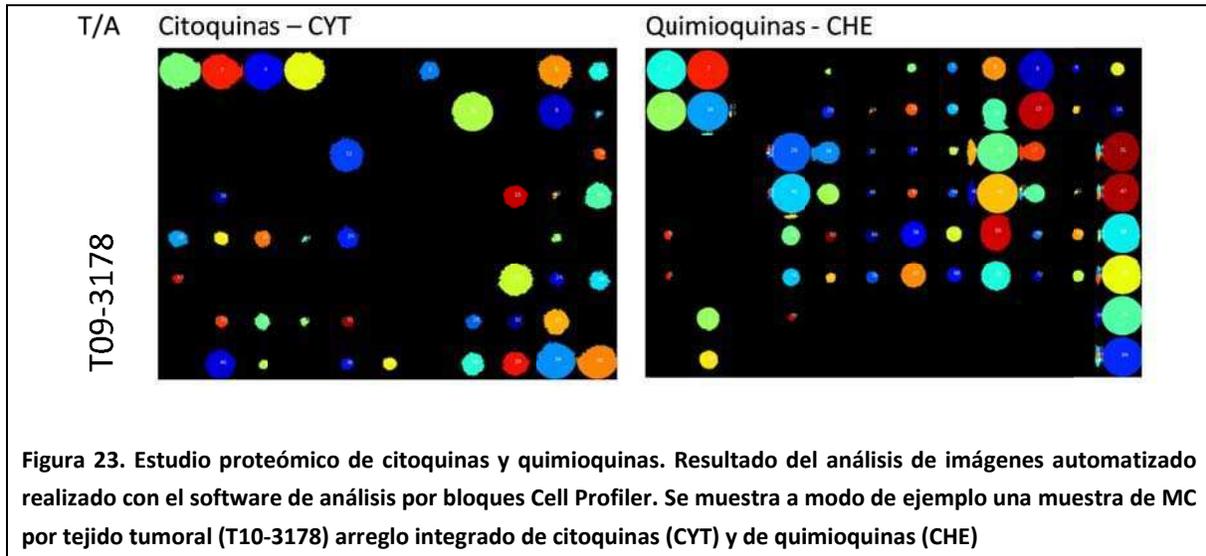
Una vez realizado el estudio de proteómica con arreglos de anticuerpos utilizados con cada muestra se realizó un análisis densitométrico automatizado por medio de un programa de análisis de imágenes. Se utilizó el programa Cell Profiler (de esta manera utilizamos un método objetivo para analizar todos los resultados de la misma manera, con el mismo tratamiento de la imagen, el mismo umbral de detección, etc.)

El primer criterio de selección se basó simplemente en el promedio de los resultados del análisis densitométrico para las muestras tumorales y la elección de los factores mayormente representados, los cuales consideramos que al encontrarse en mayor proporción frente al resto podrían tener un efecto más notorio en la función estudiada.

Como discutíamos en la introducción, múltiples factores podrían estar mediando la migración de MSCs hacia el entorno tumoral, sin embargo las citoquinas y quimioquinas podrían ser los principales factores involucrados en la migración observada.

Luego de evaluar la respuesta migratoria de las MSCs frente a los Medios condicionados (MC) por tumores y tejidos adyacentes (Figura 11) se procedió a analizar el perfil de citoquinas y quimioquinas mediante arreglos de anticuerpos disponibles comercialmente (RayBiotech Inc.).

7.5.1 Análisis densitométrico y estadístico de los arreglos de anticuerpos y elección de los ejes quimiotácticos a ser validados.



En la Tabla 2 se muestra el resultado de la normalización de los arreglos de citoquinas y quimioquinas para medios condicionados por muestras tumorales (tumorales ordenados según su nivel de expresión y, para su mejor visualización, con tamaños de letra indicando su nivel de expresión relativa. En base a esta normalización de los datos para MC por tejidos tumorales se eligieron los factores mayormente representados, los cuatro primeros factores para continuar con la validación tanto técnica como funcional: IL-6, GRO, MCP-1 e IL-8. Además de ser los más representados, éstos se encuentran representados en los 8 tumores analizados y existe un umbral de separación entre ellos y el resto de los factores. En un promedio de los datos normalizados los más representados en los medios tumorales resultan ser IL-6, GRO, MCP-1 e IL-8 los cuales además están representados en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo el solo hecho de ser los más expresados no los hace responsables de la migración de MSCs, sin embargo los efectos de éstos, de existir, estarían siendo dominantes sobre el resto y es por este motivo por el cual resulta válido este de análisis de tipo cualitativo.

T09-3169	T09-3178	T09-3206	T09-3372	T10-3472	T10-3497	T10-3534	T10-3591	Orden	FACTOR
IL-6	IL-8	IL-6	IL-6	IL-6	IL-6	IL-6	MCP-1	1	IL-6
GRO	IL-6	IL-8	IL-8	IL-8	MCP-1	MCP-1	GRO	2	GRO
MCP-1	HGF	GRO	GRO	GRO	GRO	Ang	IL-8	3	MCP-1
OPN	MCP-1	TIMP-1	MCP-1	MCP-1	Ang	GRO	IL-6	4	IL-8
IL-8	GRO	MCP-1	HGF	NAP-2	TIMP-1	OPN	TIMP-1	5	TIMP-1
OSM	OPN	HGF	Leptin	MIP-1 beta	OPN	HGF	Ang	6	HGF
HGF	NAP-2	TGF beta 2	GRO-a	Eotaxin-2	IGFBP-2	TIMP-2	BDNF	7	NAP-2
Ang	TIMP-2	TIMP-2	ENA-78	CXCL16	TIMP-2	NAP-2	TIMP-2	8	TIMP-2
NAP-2	EGF	ENA-78	EGF	MIP-1 alfa	IL-8	IL-8	TGF beta 2	9	ENA-78
ENA-78	TIMP-1	NAP-2	NAP-2	MIPF-1	ENA-78	Leptin	GRO-a	10	Ang
MIP-1 beta	IGFBP-2	Ang	TGF beta 2	RANTES	NAP-2	TIMP-1	IGFBP-2	11	OPN
LIF	ENA-78	MIP-1 beta	TIMP-1	IP-10	HGF	IGFBP-2	NT3	12	IGFBP-2
IP-10	VEGF	IGFBP-2	MIP-3 alfa	TIMP-1	MIF	LIF	IL-3	13	Leptin
PGF	Leptin	OSM	IGFBP-2	ENA-78	Leptin	OSM	NAP-2	14	IGFBP-2
VEGF	GRO-a	OPN	VEGF	Lymphotactin	IL-16	Osteoprotegerin	LIF	15	GRO-a
IGFBP-4	OSM	TNF beta	TIMP-2	I-TAC	LIF	MIP-1 beta	TNF beta	16	OSM
IL-16	CXCL16	LIF	IGFBP-1	TECK	MIP-3 alfa	ENA-78	EGF	17	MIP-3 alfa
TIMP-2	MIF	IP-10	LIF	MIP-3 alfa	GDNF	MIF	OSM	18	LIF
MIP-3 alfa	IL-16	NT3	MIP-1 beta	SDF-1 beta	OSM	CXCL16	IPN-gamma	19	IP-10
GRO-a	MIP-3 alfa	VEGF	MIP-1 alfa	MIP-3 beta	TGF beta 2	MIP-3 alfa	GDNF	20	EGF
BDNF	RANTES	PGF	IP-10	Eotaxin	IP-10	PGF	FGF9	21	MIP-1 beta
BLC	Thrombopoietin	MIF	BLC	C-TACK	PGF	VEGF	TNF alpha	22	MIF
CC128	TGF beta 2	GRO-a	TNF beta	HCC-4	RANTES	IL-16	Leptin	23	VEGF
Ck beta 8-1	IP-10	Leptin	OSM	MDC	GRO-a	IGFBP-4	HGF	24	RANTES
C-TACK	IGFBP-4	FGF4	GCP-2	TIMP-2	Eotaxin-2	RANTES	TARC	25	IL-16
CXCL16	MIP-1 alfa	RANTES	RANTES	SDF-1 alpha	IGFBP-1	GRO-a	MIF	26	PGF
EGF	IGFBP-1	MIP-3 alfa	NT3	Ck beta 8-1	BLC	IP-10	PDGF-BB	27	Eotaxin-2
Eotaxin	MIP-1 beta	Ang	IGFBP-3	Ang	TNF alpha	BDNF	TGF beta 1	28	MIP-1 alfa
Eotaxin-2	MDC	Osteoprotegerin	GDNF	HGF	IL-3	BLC	ENA-78	29	IGFBP-1
Eotaxin-3	MIPF-1	Eotaxin-2	PGF	Eotaxin-3	MIP-1 alfa	CC128	IP-10	30	CXCL16
FGF4	PGF	IGFBP-1	IL-16	TARC	EGF	Ck beta 8-1	Eotaxin	31	NT3
FGF6	Eotaxin-2	MIG	MIP-1 delta	PARC	CXCL16	C-TACK	BLC	32	TNF beta
FGF7	C-TACK	Ck beta 8-1	Flt-3 Ligand	CC128	MCP-2	EGF	CC128	33	GDNF
FGF9	LIF	SDF-1 beta	MDC	MIG	MIPF-1	Eotaxin	Ck beta 8-1	34	BLC
Flt-3 Ligand	MIP-3 beta	SDF-1 alpha	FGF4	Fractalkine	NT3	Eotaxin-2	C-TACK	35	MIPF-1
Fractalkine	Osteoprotegerin	NT4	BDNF	I-309	MIP-3 beta	Eotaxin-3	CXCL16	36	Osteoprotegerin
GCP2	FGF4	MDC	CC128	GRO-a	FGF9	FGF4	Eotaxin-2	37	FGF4
GCSF	I-TAC	FGF6	Ck beta 8-1	GCP-2	Osteoprotegerin	FGF6	Eotaxin-3	38	IL-3
GDNF	HCC-4	C-TACK	C-TACK	BLC	IL-10	FGF7	FGF4	39	MDC
GM-CSF	IL-10	MIP-1 alfa	CXCL16	MCP-2	FGF4	FGF9	FGF6	40	BDNF
HCC-4	IGF1	HCC-4	Eotaxin	MCP-4	LIGIT	Flt-3 Ligand	FGF7	41	C-TACK
I-309	PDGF-BB	SCF	Eotaxin-2	BDNF	Lymphotactin	Fractalkine	Flt-3 Ligand	42	TNF alpha
IPN-gamma	Ck beta 8-1	IL-16	Eotaxin-3	EGF	BDNF	GCP-2	Fractalkine	43	SDF-1 beta
IGFBP-1	MIG	IL-1 alpha	FGF6	FGF4	C-TACK	GCSF	GCP-2	44	MIP-3 beta
IGFBP-2	I-309	BLC	FGF7	FGF6	I-TAC	GDNF	GCSF	45	GCP-2
IGFBP-3	BLC	FGF9	FGF9	FGF7	SDF-1 beta	GM-CSF	GM-CSF	46	HCC-4
IGF1	MCP-2	GCP-2	Fractalkine	FGF9	Eotaxin	HCC-4	HCC-4	47	Ck beta 8-1
IL-1 alpha	Eotaxin	Thrombopoietin	GCSF	Flt-3 Ligand	MDC	I-309	I-309	48	FGF9
IL-1 beta	SDF-1 beta	MCSF	GM-CSF	GCSF	HCC-4	IPN-gamma	IGFBP-1	49	Eotaxin
IL-10	CC128	IPN-gamma	HCC-4	GDNF	TECK	IGFBP-1	IGFBP-3	50	MIG
IL-12 p40p70	Lymphotactin	TGF beta 3	I-309	GM-CSF	GCP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	51	I-TAC
IL-13	Ang	EGF	IPN-gamma	IPN-gamma	Ck beta 8-1	IGF1	IGF1	52	IGFBP-4

Tabla 2 Factores provistos por los tumores. Representación de factores en las distintas muestras tumorales ordenados por nivel de expresión de mayor a menor. Del promedio normalizado de todos los tumores se ordenan finalmente en una sola lista en la columna de la derecha.

Otro tipo de análisis que nos permitió enfocar la búsqueda a factores que pudieran dirigir las MSCs al se basó en estudiar las diferencias en la expresión de citoquinas y quimioquinas en el secretoma tumoral en comparación con el del tejido adyacente. Es así que en un segundo abordaje decidimos establecer cuáles de estos factores eran diferentes entre ambos tejidos.

En el estudio estadístico por un Modelo de mezclas de distribuciones los datos analizados provinieron de los arreglos de MC por tumores y tejidos adyacentes donde se evaluó las

diferencias entre estos provenientes de 8 réplicas biológicas de pacientes con cáncer de mama. Así, se ordenaron los resultados siendo el más relevante aquel menor p estadístico. De los diferenciales entre maligno y adyacente se incluyó los que se encontraron más representados en tumores que en tejidos adyacentes (tomados como T/A: Promedio normalizado en tumor/promedio normalizado en Adyacente).

En la Tabla 3 se muestran los factores que resultaron diferenciales del análisis estadístico entre Tumores y Adyacentes ordenados en un primer nivel por grado de significancia y luego por veces de aumento en tumores sobre adyacentes (T/A) calculado como el promedio de los valores normalizados para Tumores/Promedio de valores normalizados para adyacentes. Los datos fueron filtrados para un nivel de confianza del 99% es decir teniendo en cuenta un valor del estadístico de p menor a 0,01. De esta lista de factores elegimos las quimioquinas MIP-3 α , MDC, Eotaxina, MIP-1 α , NAP-2, CXCL16, TARC, IP-10, ENA-78, HCC-4, IL-8 y GCP-2.

Del estudio estadístico de tumores vs adyacentes tomamos como resultado diferencial aquel con p menor a 0.01.

MIP-3 α es, de los factores con menor valor del estadístico p, el 8vo en expresión en los tumores y el de mayor expresión diferencial T/A. Además sobresalen PLGF (Placental growth factor) y las quimioquinas MDC (CCL22), Eotaxina (CCL11), MIP-1 α (CCL3), NAP-2 (CXCL7), CXCL16, TARC (CCL17), IP-10 (CXCL10), ENA-78 (CXCL5), HCC-4 (CCL16), IL-8 (CXCL8) nuevamente y GCP-2 (CXCL6). Estos factores se destacan en este análisis y se incluyen en la validación técnica para proseguir la selección hacia una validación funcional que permita acotar la responsabilidad de los posibles ejes quimiotácticos utilizados por las MSCs en la migración hacia tumores.

Factor	Símbolo	Otro nombre	p val (TvsA)	T/A
MIP-3 alfa	CCL20	CCL20	0,00001	10,3
PIGF	PIGF	PGF	0,00001	5,3
MDC	CCL22	CCL22	0,00001	4,3
IGFBP-2	IGFBP2		0,00001	4,2
OPN	SPP1	OPN	0,00001	3,3
Osteoprotege	TNFSF11	TNFSF11	0,00001	0,7
NT-3	NTF3	Neurotrophin3	0,00010	4,8
Eotaxin	CCL11	CCL11	0,00010	2,1
MIP-1 alfa	CCL3	CCL3	0,00020	2,0
IGFBP-1	IGFBP1		0,00030	#jDIV/0!
NAP-2	PPBP	CXCL7	0,00050	1,3
CXCL16	CXCL16	CXCL16	0,00240	3,0
HGF	HGF	HGF	0,00260	1,4
OSM	OSM	OSM	0,00350	1,8
TNF-beta	LTA	LTA	0,00360	1,8
IL-16	IL16	IL16	0,00430	15,3
TARC	CCL17	CCL17	0,00560	3,9
IP-10	CXCL10	CXCL10	0,00560	1,6
ENA-78	CXCL5	CXCL5	0,00570	1,9
HCC-4	CCL16	CCL16	0,00820	2,5
IL-8	IL8	CXCL8	0,00820	1,1
IGFBP-4	IGFBP4		0,00880	#jDIV/0!
GCP-2	FOLH1	CXCL6	0,00990	2,1

Tabla 3: Factores diferenciales de los secretados por muestras tumorales y de tejidos adyacentes. Se muestran los valores de los factores con $p < 0,01$ del análisis entre tumores y adyacentes (TvsA) ordenados en base a la significancia y a un valor expresado como T/A (veces de expresión en medios tumorales sobre los adyacentes) que otorga un valor numérico al promedio de los tumores respecto de los adyacentes utilizando los valores normalizados (T/A: Promedio normalizado en la muestra tumoral/promedio normalizado en adyacente)

Agregamos a esta selección el estudio de los receptores de los factores de crecimiento EGF y VEGF que ya habían sido descriptos con expresión por células malignas y que poseen capacidad de quimioatracción de MSCs (Sato, Kuwashima et al. 2005) (Ball, Shuttleworth et al. 2007).

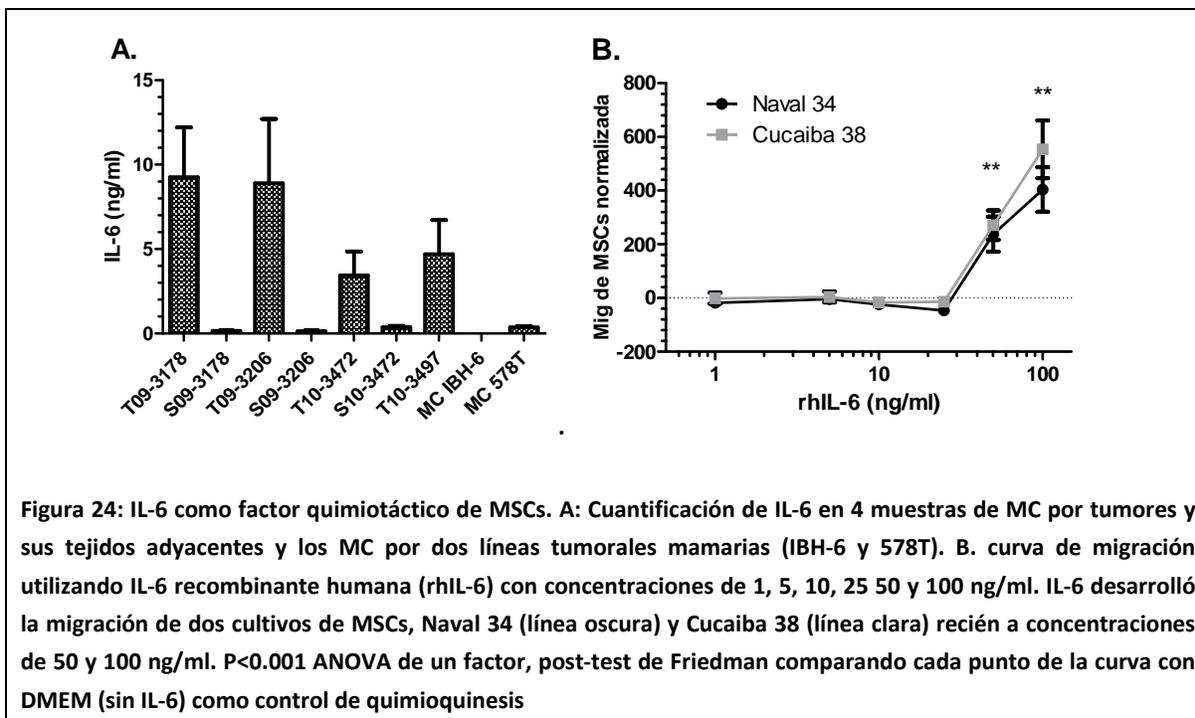
7.6 VALIDACIÓN FUNCIONAL DE IL-6.

Habiendo elegido IL-6 del análisis densitométrico previo decidimos directamente pasar a una validación técnica y funcional separado del resto de los factores ya que en un trabajo reciente se la describió como factor quimiotáctico para MSCs (Rattigan, Hsu et al. 2010). Era de nuestro interés saber si IL-6 tenía un efecto sobre la migración observada sin la intención de repetir esa validación.

La interleuquina 6 es una citoquina multifuncional, normalmente involucrada en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria y es un disparador de cascadas de citoquinas en la polarización de la respuesta por linfocitos T hacia un perfil Th1 o Th17 en combinación con IFN-gamma. Adicionalmente el señalamiento por IL-6 ha sido implicado en tumorigénesis y migración celular como en el trabajo de (Walter, Liang et al. 2009) donde se sugiere el rol de IL-6 en la migración de células de cáncer de mama y, posteriormente en (Rattigan, Hsu et al. 2010) como señalábamos antes, presentan evidencia de que en condiciones de hipoxia (1,5% de O₂), las células de cáncer de mama secretan altos niveles de IL-6, que sirven para activar y atraer a las MSCs. En este trabajo demuestran que IL-6 secretada actuaría de manera parácrina sobre MSCs estimulando la activación de las cascadas de Stat3 y MAPK y aumentando el potencial migratorio y la supervivencia celular.

Con el fin de confirmar el resultado de los arreglos de anticuerpos nos preguntamos primeramente en qué rango estaba representada IL-6 en las muestras tumorales utilizando citometría de flujo con la técnica de CBA o arreglo de esferas como validación técnica de la concentración de IL-6. Mediante esta técnica se pudieron cuantificar simultáneamente además de IL-6; IL-1 β , IL-10, IFN- γ , IL-4 estando todas por debajo del límite de cuantificación, coincidentemente con los resultados de los arreglos para estas citoquinas.

Como se muestra en la (Figura 24 B) IL-6 resultó quimiotáctica solo a 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ mientras que a menores concentraciones no se observó un efecto. En nuestras muestras tumorales (8ng/ml promedio) no se alcanzaron los niveles necesarios (50 $\mu\text{g/ml}$) para desarrollar la respuesta quimiotáctica observada (Figura 24 A).



Se conoce que IL-6 se encuentra río arriba en la cascada de señalización de citoquinas y quimioquinas tanto a nivel parácrino como autócrino (Biswas, Delfanti et al. 1998) (Matsumoto, Sakao et al. 1998). Nos propusimos estudiar el efecto de IL-6 sobre la migración de MSCs a través de la modulación del microambiente generado por la línea tumoral mamaria

Para estudiar si IL6 tiene un efecto parácrino sobre la estimulación en la producción de otras citoquinas y quimioquinas se pre incubó células tumorales IBH6 provenientes del mismo tipo de patología con las mismas concentraciones de IL-6 que las evaluadas en los ensayos de quimiotaxis. Se eligió la línea tumoral IBH-6 ya que no logramos detectar IL-6 en el medio condicionado de ésta línea celular, no habiéndola detectado por arreglos de anticuerpos (ver anexo) ni por CBA. De existir expresión de IL-6 en el medio condicionado representaría un efecto endógeno difícil de analizar bajo este contexto.

Luego de 4 horas de pre incubación de cultivos de células tumorales IBH-6 con rhIL-6 a distintas concentraciones se lavaron las células con PBS y se condicionó medio mínimo DMEM baja durante 24h. Utilizando el medio condicionado por las células preincubadas con IL-6 se determinó la migración de MSCs Naval 34 y Cucaiba 38 (Figura 25).

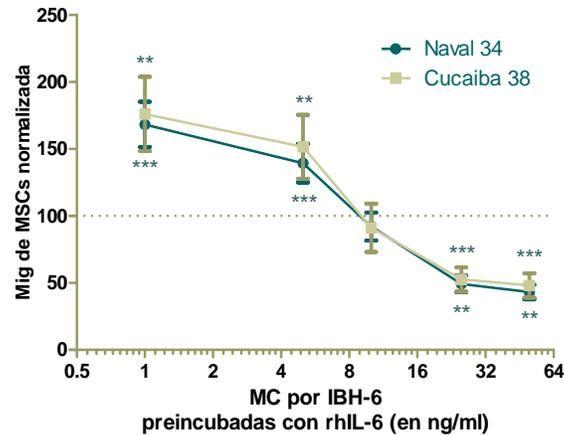


Figura 25. Efecto de la pre incubación de células tumorales con una curva de IL-6. Migración de MSCs frente a MC IBH-6 preincubadas con IL-6. Se grafica la migración de MSCs normalizada tomando el MC por IBH-6 sin estimular con IL-6.

Se observó una curva donde a bajas concentraciones (menores a 10 ng/ml) hay una estimulación y a concentraciones mayores existe una inhibición en la migración generada por el condicionamiento.

El medio generado a partir de células IBH-6 preincubadas con IL-6 a menores concentraciones que 10ng/ml activó la respuesta quimiotáctica en dos cultivos de MSCs. Los medios provenientes de la incubación de IBH-6 con IL-6 disminuyeron la respuesta quimiotáctica respecto del medio sin tratar mientras que, tras una incubación a 10ng/ml, no se observaron diferencias respecto del medio condicionado por IBH-6 sin tratamiento. La pre incubación de las células tumorales con IL-6 redujo la migración de MSCs a las mismas concentraciones en las cuales desarrolló migración cuando fue incubada de forma directa.

7.7 VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LAS QUIMIOQUINAS Y LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SELECCIONADOS.

7.7.1 Receptores de quimioquinas y factores de crecimiento en MSCs.

Para poder identificar inequívocamente interacciones de los factores seleccionados en busca de todos los posibles receptores realizamos una búsqueda en bases de datos.

Mediante una búsqueda bibliográfica y en bases de datos Entrez (Global Query Cross-Database Search System) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery> y de datos provenientes de KEGG (Kyoto encyclopedia for genes and genomes, (<http://www.genome.jp/kegg/>)) realizamos un análisis de las interacciones de cada factor con los posibles receptores conocidos que pudieran estar mediando su respuesta (Tabla 4 A.). Del análisis de interacciones mostrado en la tabla 3 se identificaron los posibles receptores de los factores seleccionados para una validación posterior (Tabla 4 B.).

En base a este análisis decidimos estudiar la expresión basal de los receptores en dos muestras diferentes de MSCs.

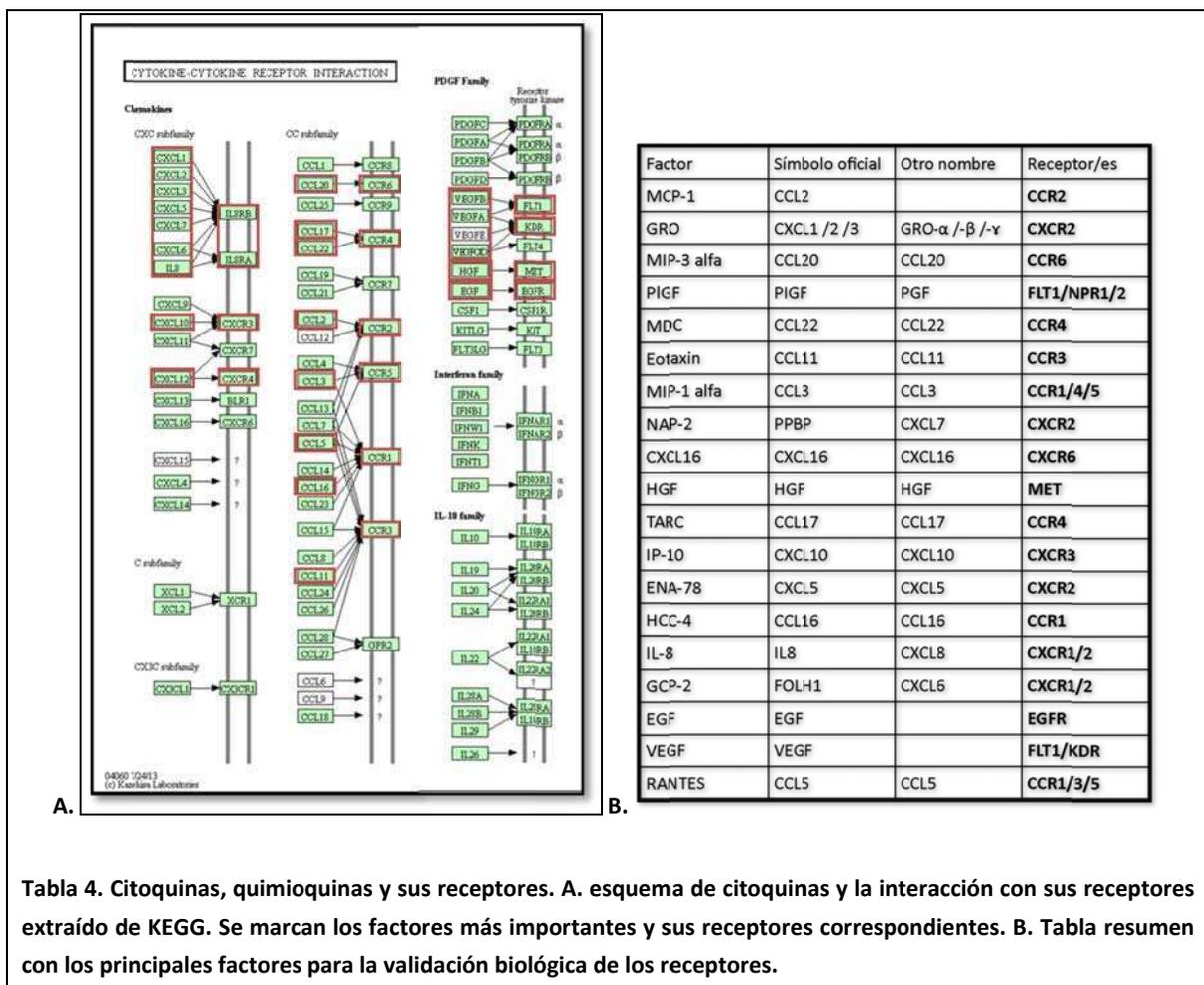


Tabla 4. Citoquinas, quimioquinas y sus receptores. A. esquema de citoquinas y la interacción con sus receptores extraído de KEGG. Se marcan los factores más importantes y sus receptores correspondientes. B. Tabla resumen con los principales factores para la validación biológica de los receptores.

Para continuar con la validación biológica de los resultados del estudio proteómico nos propusimos estudiar la expresión de los receptores de los factores seleccionados. Analizamos la expresión de los ARN mensajeros de los receptores utilizando PCR en tiempo real. Para esto diseñamos cebadores (primers) específicos para los receptores de CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2, CXCR3 (variantes transcripcionales A y B), CXCR4 y CXCR6 (Tabla 5). Además se incluyeron los receptores de los factores de crecimiento EGFR, Flt-1 (compartido entre VEGF y PLGF), KDR (VEGFR2), NPR1 y 2 (por PLGF), siendo la expresión de sus receptores un perfil de su “capacitación” para responder a los factores presentes en los MC analizados.

Expresión basal de receptores de quimioquinas seleccionadas para el análisis en MSCs.

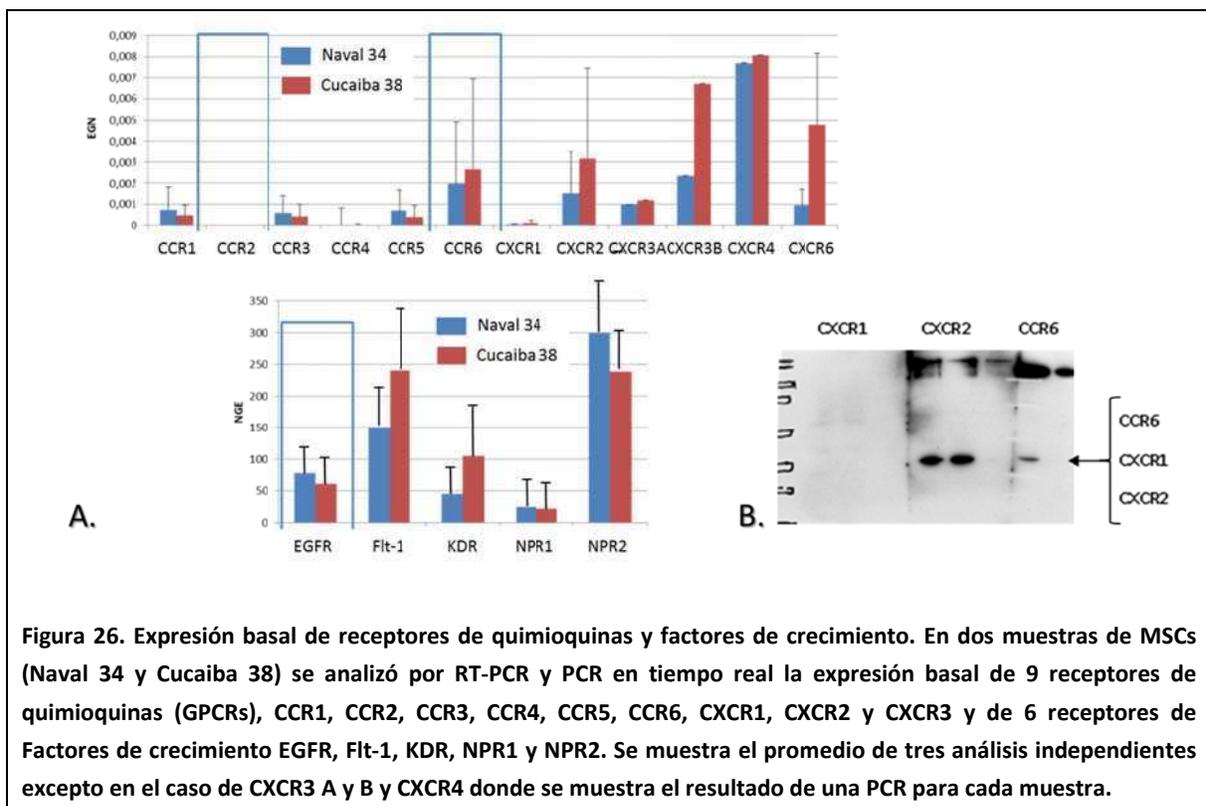


Figura 26. Expresión basal de receptores de quimioquinas y factores de crecimiento. En dos muestras de MSCs (Naval 34 y Cucaiba 38) se analizó por RT-PCR y PCR en tiempo real la expresión basal de 9 receptores de quimioquinas (GPCRs), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 y CXCR3 y de 6 receptores de Factores de crecimiento EGFR, Flt-1, KDR, NPR1 y NPR2. Se muestra el promedio de tres análisis independientes excepto en el caso de CXCR3 A y B y CXCR4 donde se muestra el resultado de una PCR para cada muestra.

Mediante este estudio pudimos observar que las MSCs expresan los receptores CCR1, CCR3, CCR5, CCR6, CXCR2, CXCR3 variantes transcripcionales A y B, CXCR4 de expresión característica en MSCs y CXCR6 con distintos niveles de expresión relativa (Ver los ligandos correspondientes en la (Tabla 4). Es interesante destacar que no observamos expresión de CCR2 (receptor de MCP-1) que había sido postulada como una de las citoquinas producidas por cáncer de mama capaces de reclutar MSCs (Dwyer, Potter-Beirne et al. 2007). Es interesante destacar también

que CXCR4 se expresa a altos niveles, sin embargo es de notar que SDF-1 (ligando de CXCR4), no es producido por los tejidos analizados (ni malignos, ni benignos).

Las dos muestras de MSCs Naval 34 y Cucaiba 38 presentaron valores de migración similares para cada MC de tejidos tumorales. Por otro lado la expresión de los receptores analizados entre Naval 34 y Cucaiba 38 resultó cualitativamente igual. Por estos motivos, para realizar los estudios funcionales de los ejes utilizamos la muestra Naval 34 en representación de éstas como se verá más adelante.

En base a los resultados obtenidos decidimos seleccionar los siguientes ejes quimiotácticos para validar los datos a nivel funcional:

- CXCR2 para determinar la responsabilidad de todos los ligandos que pasan por este eje: GRO- α y GRO (CXCL1, 2 y 3), NAP-2/CXCL7, ENA-78/CXCL5, IL-8/CXCL8 con menor afinidad, y GCP-2/CXCL6 con afinidad cruzada por CXCR1 y CXCR2
- MIP-3 α /CCL20 para el eje de CCR6
- MIP-1 α /CCL3 para el eje de CCR1
- RANTES/CCL5 para los ejes CCR1, 3 y 5.
- EGF por su interacción con su receptor EGFR
- VEGF por su interacción con Flt-1 y KDR
- HGF por su interacción con MET
- CXCL1/IL-8Ra de alta afinidad por IL-8 y baja por el resto de los ligandos del eje CXCR2 ya que si bien no se logra detectar, de existir la expresión en MSCs llevaría a un señalamiento por estas vías alternativas.
- Agregamos MCP-1 ya que queríamos validar que no estuviera implicado dada la falta de su receptor y además sirvió como control en muchos experimentos.

Realizamos neutralizaciones con anticuerpos (contra ligandos o receptores) con el fin de reducir la migración de las MSCs y así estimar la responsabilidad funcional de cada factor en la respuesta migratoria.

7.7.2 El bloqueo de quimioquinas CC y factores de crecimiento logra reducir la migración de MSC.

Proseguimos la validación funcional con una estrategia de neutralización utilizando una combinación de anticuerpos. Se preincubaron los MC con los anticuerpos anti ligandos para el

grupo de las Quimioquinas CC: MIP-3 α (ligando de CCR6), MIP-1 α (ligando de CCR1, 4 y 5) y RANTES (ligando de CCR1, 3 y 5)

De esta manera abarcaríamos los principales ligandos que representan a la mayoría de los receptores expresados en MSCs.

En caso del bloqueo de los factores de crecimiento combinamos los anticuerpos contra EGF y VEGF.

También combinamos anticuerpos anti receptores de CXC (CXCR1 y CXCR2) preincubando a las MSCs a en el estudio con esta combinación de anticuerpos debido a que sus ligandos reunían los factores principales GRO (CXCL1, 2 y3), ENA-78 (CXCL5), GCP-2 (CXCL6), NAP-2 (CXCL7), e IL-8.

Seleccionamos MC por tres tejidos malignos (T09-3178, T10-3472 y T10-3591) cuyos medios condicionados contienen los principales factores analizados.

No se observó efecto del bloqueo de CXCR1 y CXCR2 en ninguna de las tres muestras tumorales (Figura 27A.).

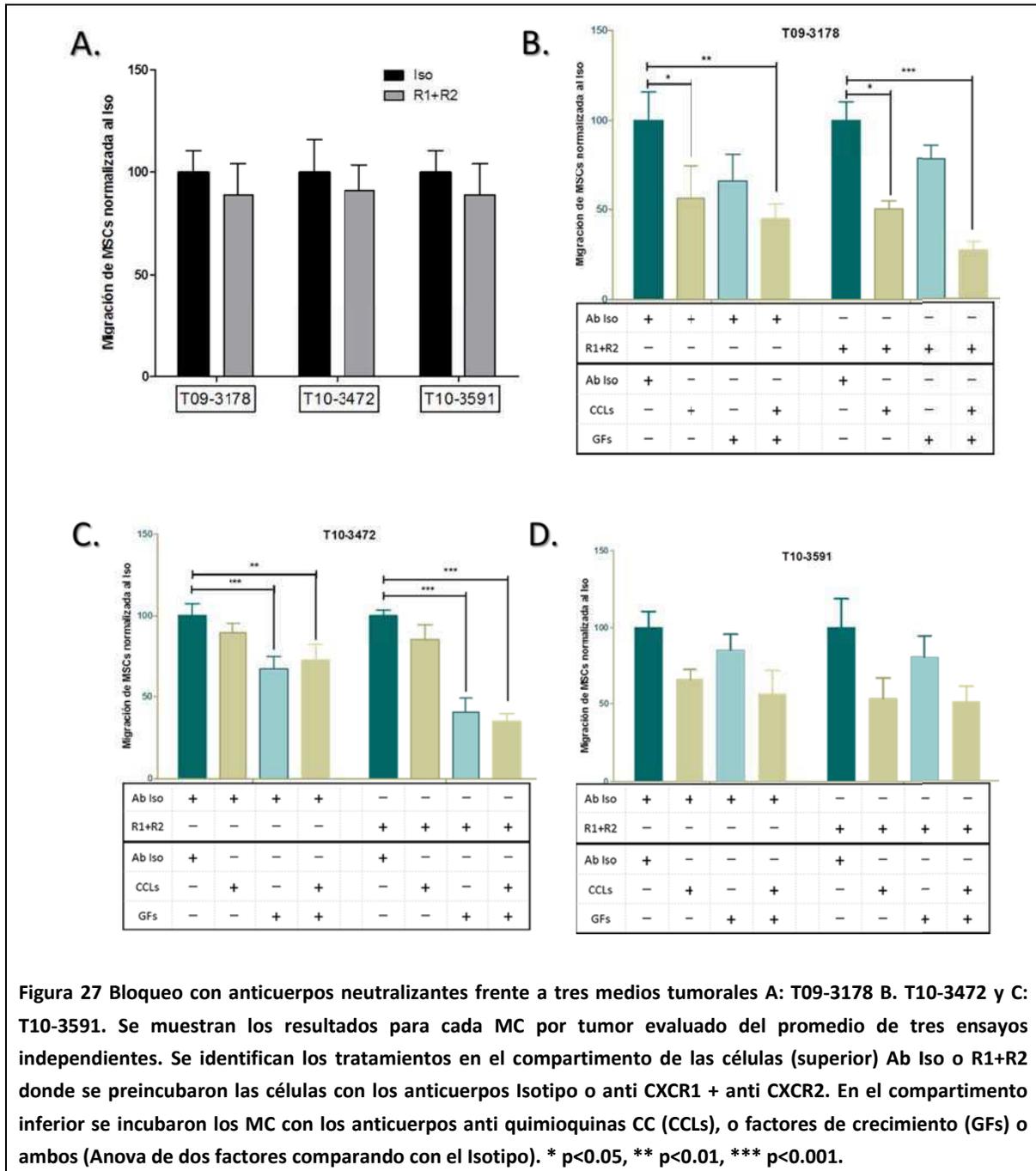
En el caso del MC de T09-3178 se logró reducir la migración cuando se incubaron los anticuerpos contra las quimioquinas CC combinando o no con anticuerpos anti CXCR1 y CXCR2 (receptores CXC). Además se observa una tendencia en el tratamiento con los anticuerpos anti factores de crecimiento (Figura 27B).

En el caso del T10-3472 se observa un efecto del bloqueo de los factores de crecimiento y el efecto es más notorio cuando se bloquean los receptores CXC cuando se mantiene el bloqueo sobre los factores de crecimiento (Figura 27C.).

En el caso del T10-3591, si bien los efectos tanto de quimioquinas CC como de factores de crecimiento no es significativo se observa una tendencia en el tratamiento de las quimioquinas CC combinando o no con los receptores CXC. (Figura 27D.).

El resultado del bloqueo de los ligandos es tumor dependiente en cuanto a la significancia de los tratamientos sobre la migración de MSCs. Sin embargo en todos los casos la menor migración se observó cuando se combinaron todos los tratamientos combinados.

Estos resultados tomados en forma conjunta demuestran que existe un efecto quimioattractante inducido por las quimioquinas CC como por los factores de crecimiento y además en forma cooperativa con los receptores de CXC quimioquinas. Por el contrario, no pudimos observar un aporte significativo de los ejes que pasan por los receptores de quimioquinas del tipo CXC en forma aislada.



7.7.3 El silenciamiento de CCR6 reduce la migración de MSCs hacia MC por tejido maligno.

Para verificar la responsabilidad de los ejes CCR1 (receptor de MIP-1 α , HCC4 y RANTES), CCR6 (receptor de MIP-3 α) y CXCR2 (receptor de GRO, ENA-78, GCP-2, NAP-2, e IL-8) (Ver ligandos en Tabla 4) mediante el uso de ARNs de interferencia pequeños se silenciaron los receptores CCR1, CCR6 y CXCR2. Utilizando un RNA doble cadena acoplado a un fluoróforo como control de la transfección, se observó una marca en el 90% de las células. Utilizando un siRNA específico se logró obtener un descenso de la expresión a 72h de la transfección de CCR6 en MSCs del 70% en promedio normalizando con Enolasa como control de carga

El silenciamiento de CCR6 redujo la migración en dos de tres tumores mientras que en el restante se redujo el promedio sin ser significativo. El silenciamiento de CCR1 o de CXCR2 no redujo significativamente la migración de MSCs en ningún caso (Figura 28).

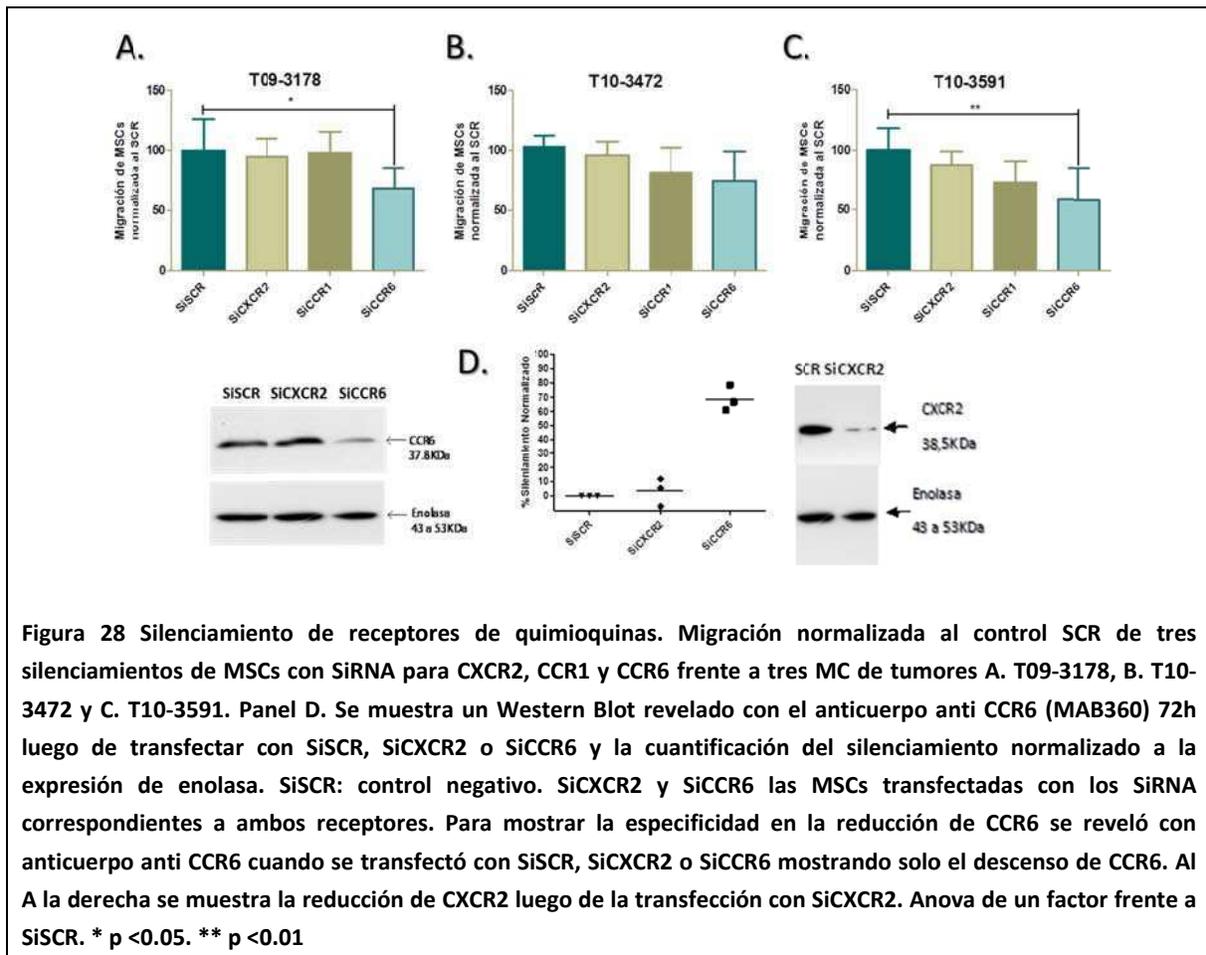


Figura 28 Silenciamiento de receptores de quimioquinas. Migración normalizada al control SCR de tres silenciamientos de MSCs con siRNA para CXCR2, CCR1 y CCR6 frente a tres MC de tumores A. T09-3178, B. T10-3472 y C. T10-3591. Panel D. Se muestra un Western Blot revelado con el anticuerpo anti CCR6 (MAB360) 72h luego de transfectar con SiSCR, SiCXCR2 o SiCCR6 y la cuantificación del silenciamiento normalizado a la expresión de enolasa. SiSCR: control negativo. SiCXCR2 y SiCCR6 las MSCs transfectadas con los siRNA correspondientes a ambos receptores. Para mostrar la especificidad en la reducción de CCR6 se reveló con anticuerpo anti CCR6 cuando se transfectó con SiSCR, SiCXCR2 o SiCCR6 mostrando solo el descenso de CCR6. Al a la derecha se muestra la reducción de CXCR2 luego de la transfección con SiCXCR2. Anova de un factor frente a SiSCR. * p <0.05. ** p <0.01

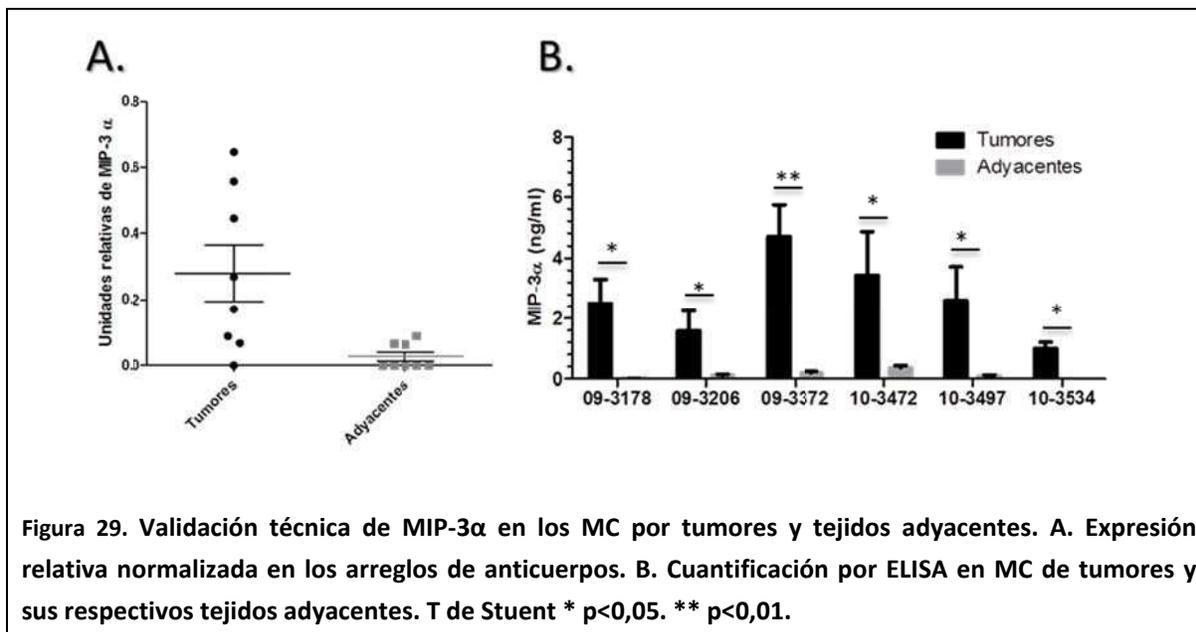
7.8 VALIDACIÓN FUNCIONAL DE MIP-3 α Y EGF.

En base a los resultados previos se eligió intentar la validación del efecto de los factores de crecimiento utilizando a EGF.

Decidimos inmunoprecipitar EGF y MIP-3 α con el fin de reducir directamente la cantidad de proteína disponible en los MC y ver si eso generaría cambios en la migración de MSC.

Si bien los arreglos de anticuerpos contra citoquinas y quimioquinas utilizados tienen gran sensibilidad, en el orden de los picogramos por ml, y amplio rango de detección, no arrojan resultados cuantitativos sobre todo en niveles elevados donde posiblemente la señal esté cerca de la saturación. Por este motivo era necesario validar técnicamente los niveles de los factores que se querían estudiar con mayor profundidad.

Primero se validó técnicamente la concentración de MIP-3 α en los medios tumorales y adyacentes mediante arreglos de anticuerpos y por la técnica de ELISA utilizando la proteína recombinante humana rhMIP-3 α como estándar externo (Figura 29 A y B.). En todos los casos MIP-3 α resulta mayor en tumores que en las muestras tumorales respecto de los tejidos adyacentes (Figura 29 B.)



7.8.1 La inmunoprecipitación conjunta de MIP-3α y EGF redujo la migración de MSCs hacia MC por tumores.

Mediante el uso de esferas magnéticas de proteína A/G se inmunoprecipitó (IP) MIP-3α o EGF (o la combinación de ellos) con anticuerpos monoclonales utilizados como anticuerpos de captura tratando los MC por tres muestras tumorales T09-3178, T09-3372 y T10-3497. Las muestras elegidas tenían mayor cantidad de MIP-3α determinada por ELISA. Además, las tres muestras mostraron elevada presencia de EGF relativa en el estudio proteómico. Para validar técnicamente la inmunoprecipitación se determinó por western blot la rhMIP-3α antes y después del tratamiento (IP) con el anticuerpo monoclonal un anticuerpo específico anti MIP-3α. Se observó el descenso de la proteína en el medio luego de inmunoprecipitar MIP-3α mientras que se conservó la banda correspondiente a la proteína al tratar solamente con las esferas (beads) magnéticas con o sin anticuerpo no relacionado utilizado como control de isotipo (MAB330) (Figura 30 B.)

En las tres muestras tumorales elegidas Se observó una reducción en el promedio de la migración cuando se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-MIP-3α. De la misma manera se observó una reducción en el caso de inmunoprecipitar EGF. Sin embargo estas reducciones no son significativas.

Solo resultó significativa la inmunoprecipitación de ambos factores al mismo tiempo MIP-3α y EGF sobre la migración de MSCs frente al MC por T09-3178 mientras que en los MC por los tumores T09-3372 y T10-3497 este tratamiento mostró una tendencia (Figura 30 A.).

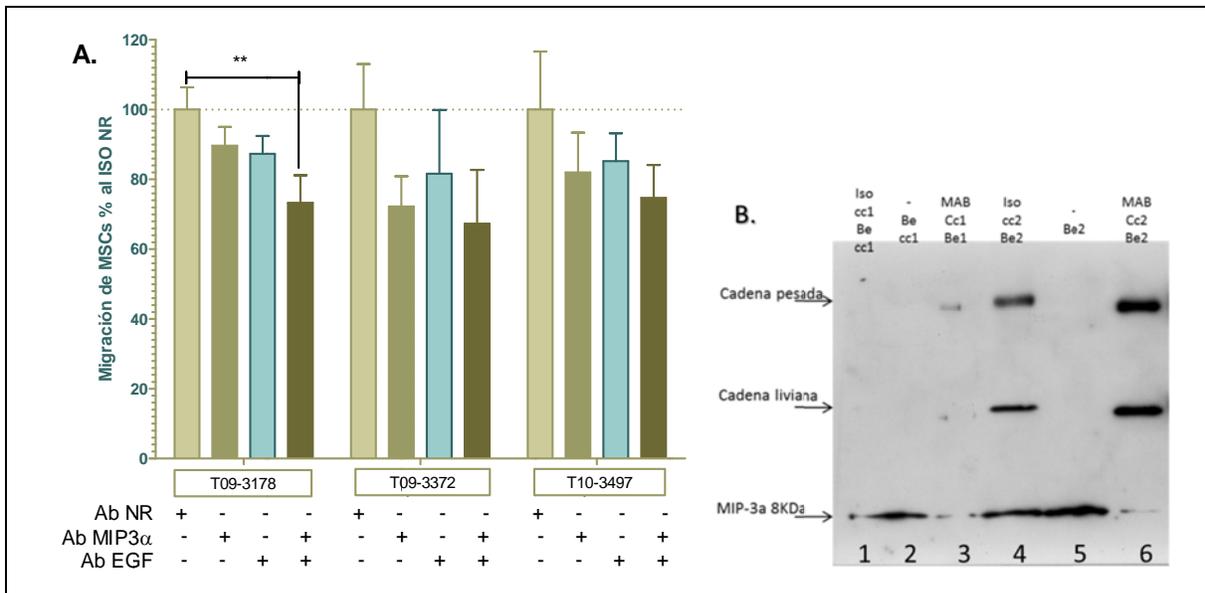


Figura 30 Inmunoprecipitaciones de MIP-3 α y EGF. A. Migraciones de MSCs frente a los MC luego de las inmunoprecipitaciones de MIP-3 α y EGF de MC por tumores. Se muestra el resultado de las migraciones de MSCs frente a tres tumores (T09-3178, T09-3372 y T10-3497) con Anti-CXCR1 como anticuerpo no relacionado (Ab NR) o control de isotipo. Ab MIP-3 α es MC tratado con anticuerpo contra MIP-3 α , Ab EGF es MC tratado con anticuerpo contra EGF. Anova de un factor frente al tratamiento normalizado con anticuerpo no relacionado (Ab NR, MAB330). B. Revelado por Western Blot de las Inmunoprecipitaciones de MIP-3 α . Líneas 1 a 3 IP con anticuerpos a 1 μ g/ml y Beads cc1. Líneas 4 a 6: IP con anticuerpos a 2 μ g/ml y Beads cc2. Se visualizan las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales utilizados en la inmunoprecipitación. Líneas 1 y 4 rhMIP-3 α + Anticuerpo no relacionado (MAB330) como control de isotipo. Líneas 2 y 5: Tratamiento de MIP-3 α con beads magnéticas solas, sin anticuerpo. Líneas 3 y 6 IP de rhMIP-3 α con anticuerpo anti MIP-3 α (MAB360).

Dada la evidencia sobre MIP-3 α como factor quimiotáctico nos propusimos verificar la quimiotaxis inducida por MIP-3 α utilizando la proteína recombinante humana (rhMIP-3 α) como quimioattractante en sendos ensayos para dos muestras de MSCs (Naval 34 y Cucaiba 38). De la misma manera se utilizó una curva de EGF recombinante humano (rhEGF, Invitrogen) para probar la quimiotaxis sobre MSCs.

En ensayos de migración de MSCs frente a MIP-3 α purificada, logramos ver migración significativa desde 0,5ng/ml y hasta 100ng/ml probando la acción directa de MIP-3 α como factor quimiotáctico en MSCs.

Cuando utilizamos una curva de EGF de 10, 50 y 10ng/ml no se observó migración significativa respecto del control de quimiotaxis DMEM (línea punteada inferior) (Figura 32 A.). Los datos se normalizan a la migración con SFB (100%). Como control de funcionalidad de la proteína EGF se probó el efecto sobre la proliferación de fibroblastos murinos 3T3 obteniéndose efecto significativo demostrando la funcionalidad de la proteína utilizada (Figura 32 B.).

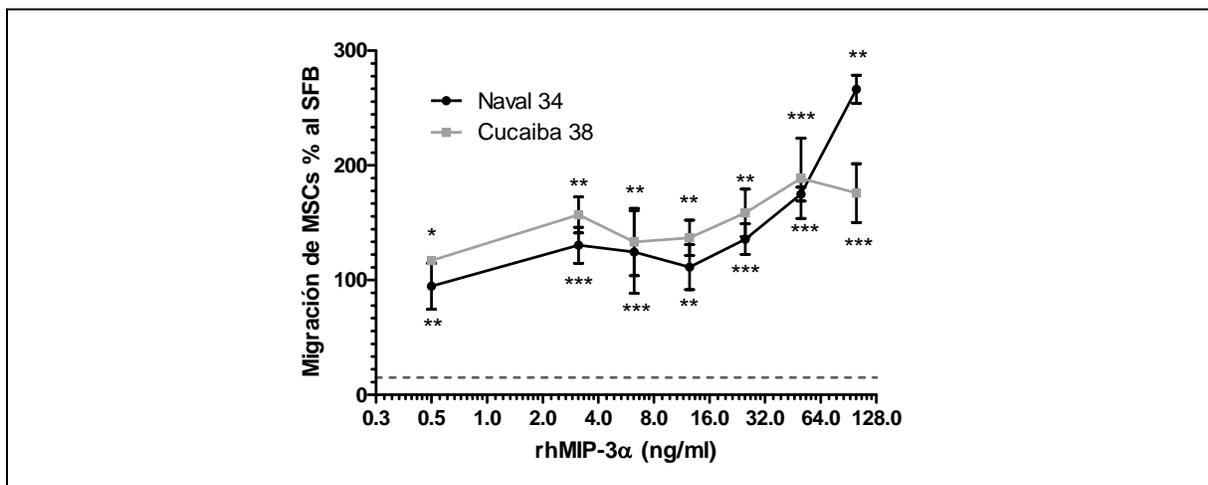
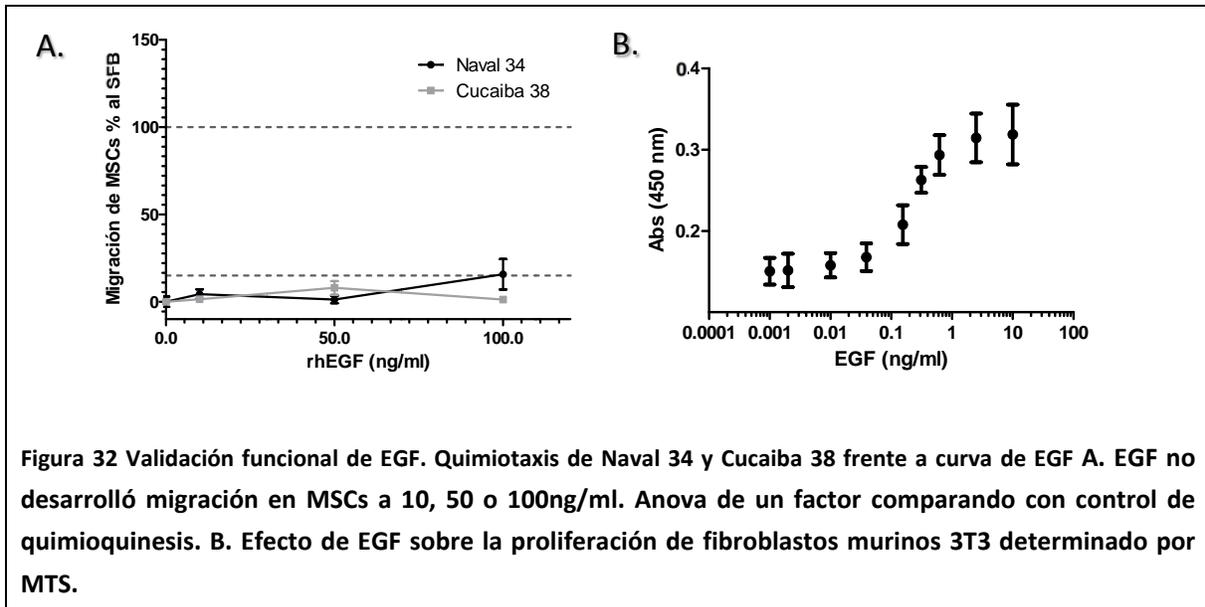


Figura 31: Quimiotaxis de Naval 34 y Cucaiba 38 frente a curva de MIP-3 α . Anova de un factor comparando con el control sin proteína DMEM. * p <0.05. ** p <0.01 * p <0.001.**

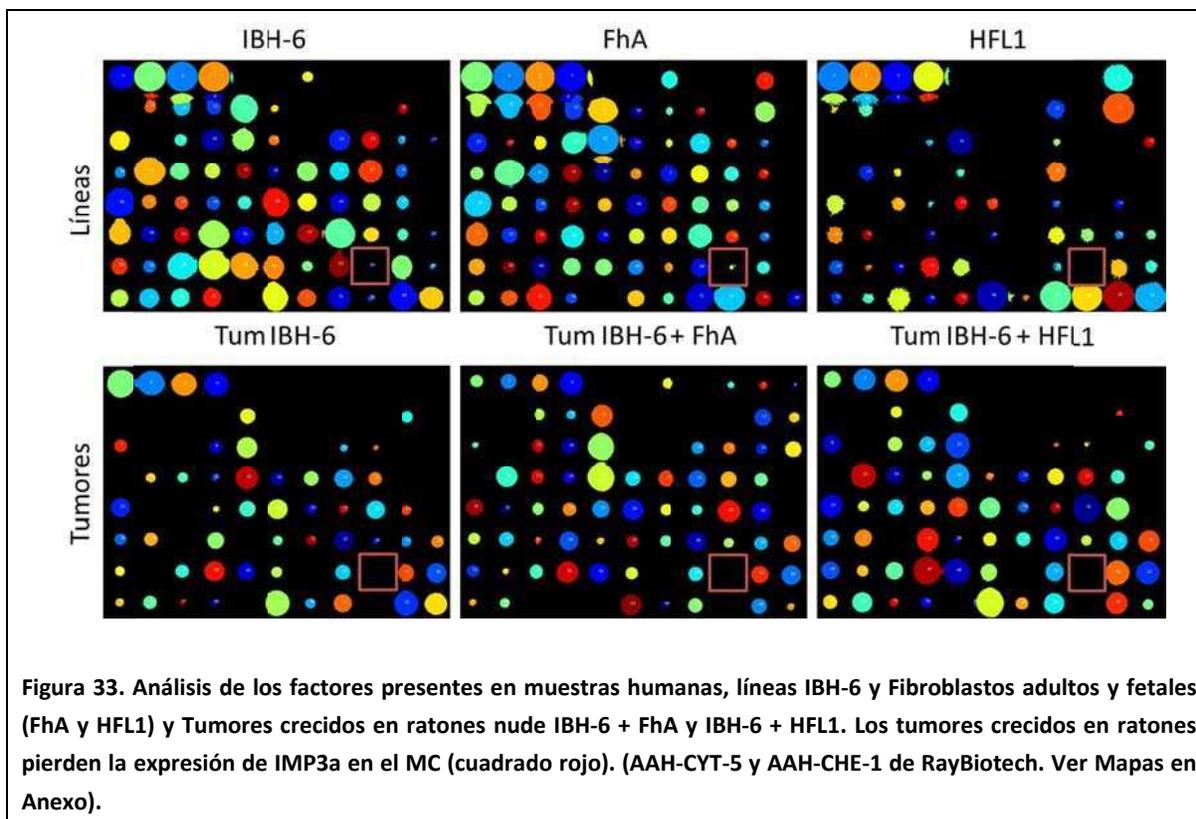


Estos resultados confirman que el eje MIP-3 α /CCR6 está implicado en la migración de MSCs hacia MC por tejidos malignos de cáncer de mama. Sorprendentemente, EGF no parece tener un efecto directo sobre la quimiotaxis de MSCs.

7.9 EN BUSCA DE UN MODELO QUE REMEDE EL APOORTE DE LOS FACTORES IDENTIFICADOS EN LAS MUESTRAS TUMORALES

Retomando el modelo *in vivo* estudiado anteriormente se procedió a comparar el perfil de expresión de los factores así identificados con el proveniente de los arreglos de anticuerpos en las muestras tumorales con las líneas a partir de las cuales éstos fueron obtenidos.

A partir del medio condicionado por los tumores crecidos en ratones tanto con la línea IBH-6 como con la combinación de FhA y HFL1 se estudió el aporte de factores en comparación con las líneas originarias (Figura 33).



Como resultado se observó que los MC por los tumores de IBH-6 como los mixtos con FhA y HFL1 no presentaron MIP-3 α . No pudimos detectar expresión de MIP-3 α por medio de arreglos de anticuerpos a pesar del aporte original por las líneas utilizadas, ya que el aporte de MIP-3 α está dado por la línea IBH6, y en tumores mixtos por fibroblastos adultos FhA, MIP-3 α también es sintetizada por este tipo celular. De todos modos, cualitativamente, la línea IBH-6, seleccionada debido a la presencia en su secretoma de MIP-3 α , junto con Los fibroblastos adultos FhA, continúan siendo los componentes celulares que aportan este factor. De esta manera, los FhA y los HFL-1 aportan IL-6, IL-8, GRO MCP-1 entre otros factores coincidentemente con los tumores originales.

Dado que ningún modelo de los evaluados presenta MIP-3 α en el MC se plantea a futuro sobreexpresar MIP-3 α en la línea IBH-6 y validar el eje CCR6/MIP-3 α en el modelo IBH-6+FhA y cuantificar la respuesta mediante la metodología por citometría de flujo utilizada en esta tesis.

7.10 INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE TUMORAL SOBRE LAS MIGRACIÓN DE MSCs

Para poder representar la migración de MSCs mediante un modelo que logre explicar la llegada de estas células al estroma tumoral es necesario identificar y analizar los varios pasos que debe atravesar la célula hasta alcanzar el microambiente tumoral. Una vez en el mismo, las células serán influenciadas por este nuevo nicho de modo de determinar ya sea un alojamiento permanente o temporario, diferenciación y/o la muerte celular.

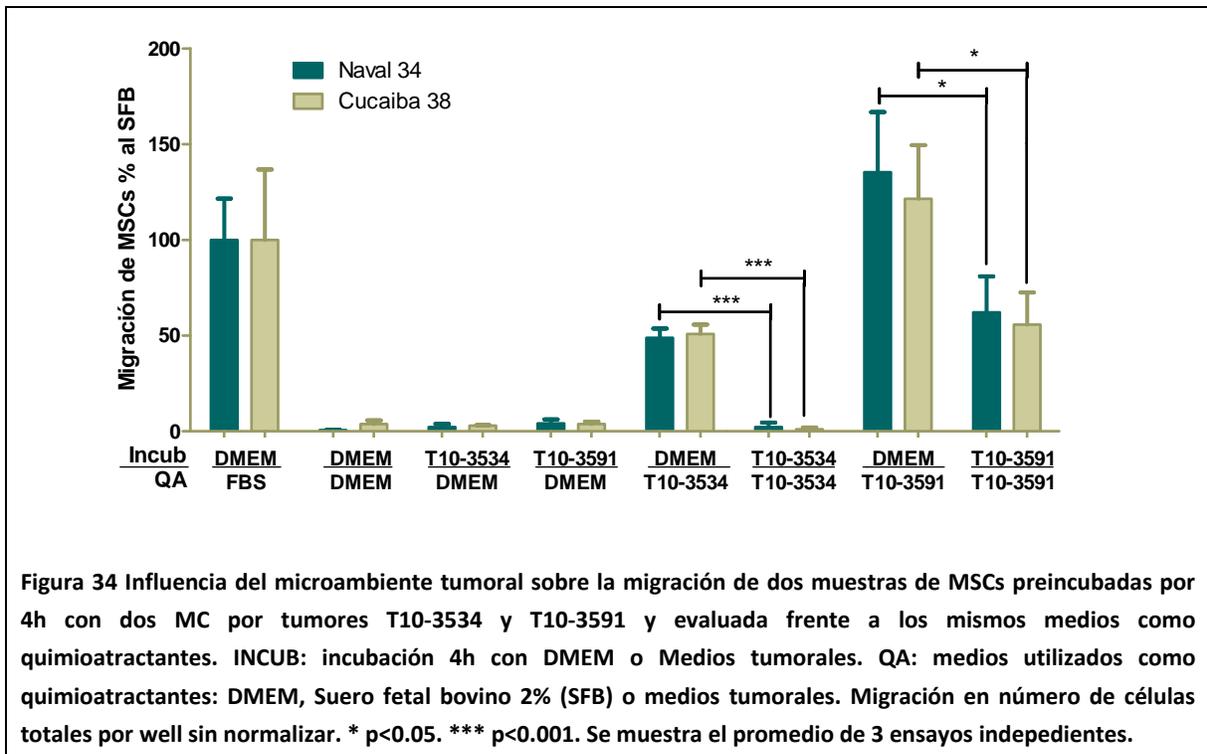
De este modo, una vez que las MSCs arriban a tejidos en remodelación y/o en condiciones de hipoxia, tal como ocurre con los tumores, las MSCs tendrán contacto con el nuevo nicho, esto es en nuestro modelo, el microambiente tumoral, constituido por células estromales y por la matriz extracelular; este contacto se establecerá en parte, a través de moléculas de adhesión celular. A su vez, señales parácrinas influenciarán las respuestas biológicas de las MSCs en este nuevo microambiente.

Para proceder a identificar la modulación ejercida por el microambiente tumoral en el compartimento migratorio de las MSCs, procedimos a realizar los siguientes estudios de migración *in vitro*.

7.10.1 Las MSCs redujeron su migración frente a MC por tumores cuando se preincubaron previamente con el mismo medio.

Dos muestras de MSCs humanas independientes (Naval 34 y Cucaiba 38) se preincubaron durante un periodo de 4 horas con dos medios condicionados provenientes de tumores humanos independientes (T10-3591 o T10-3534). Luego de esto, se realizaron ensayos de migración *en cultivo* frente a los mismos medios condicionados tumorales con los cuales se había pre incubado las MSCs utilizados como quimioattractantes.

La migración de MSCs hacia los medios tumorales se redujo fuertemente si las MSCs son preincubadas 4h con el mismo medio utilizado como quimioattractante. En ambos casos se observó una disminución de los niveles de migración de las MSCs cuando fueron preincubadas con el microambiente tumoral (Figura 34). Sin embargo esta disminución no estuvo asociada a muerte celular ni entrada en el ciclo celular (Figura 35).



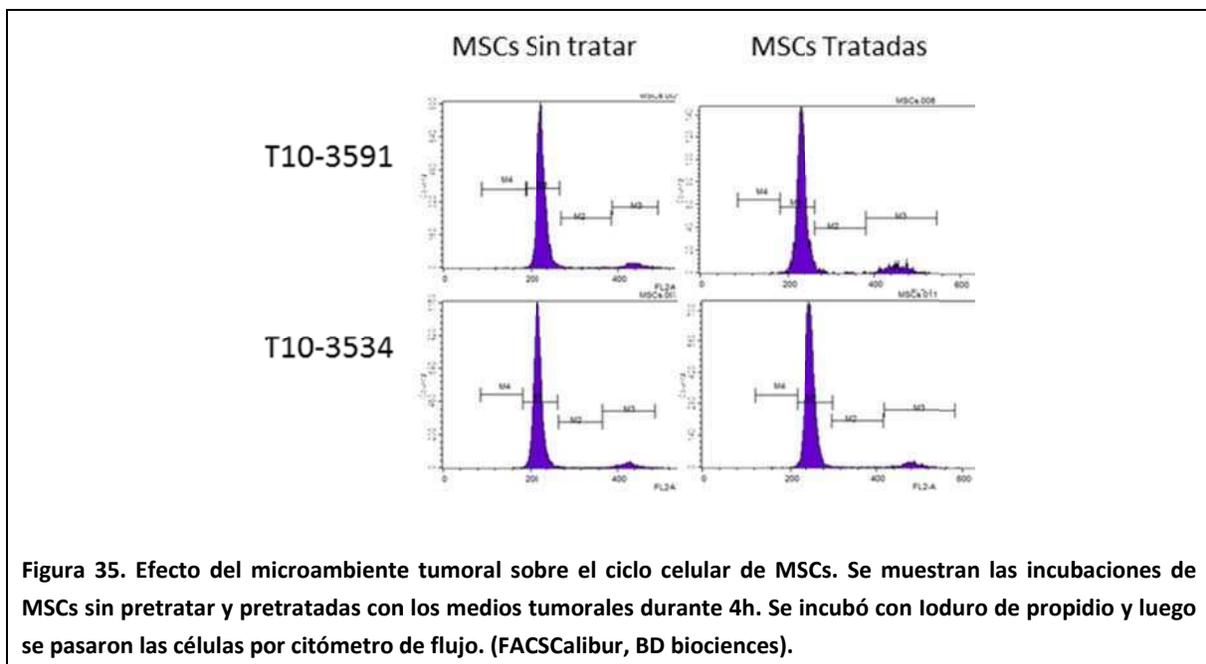
Dada la dificultad para conseguir muestras tumorales, además del volumen limitante del que se dispuso por cada muestra tumoral analizada en esta tesis (asociado con una única e irreplicable obtención de MC) este ensayo se pudo realizar solo dos veces con medios tumorales. En paralelo se extrajo el ARN mensajero de las MSCs pretratadas con estos mismos medios condicionados tumorales; siguiendo esta estrategia (ver materiales y métodos) logramos purificar una masa aproximada de 1µg de RNA total para realizar la RT seguida de PCR en tiempo real permitiendo realizar dos series completas de PCR para poder analizar los cambios en la expresión de los receptores.

7.10.2 La reducción en la migración no se debe a un aumento de la apoptosis o cambios en el ciclo celular.

La reducción de la migración podría deberse a que las células se encuentran atravesando un proceso apoptótico o de entrada al ciclo celular al haber estado en contacto con un medio de origen tumoral con citoquinas proinflamatorias y con factores de crecimiento para los cuales tiene receptores.

Posteriormente al ensayo de migración descrito, se constató que las MSCs preincubadas con los medios tumorales mantuvieron la viabilidad celular en valores superiores al 98% mediante método de exclusión del colorante Trypan Blue y conteo en cámara de Neubauer (datos no mostrados). Además se analizaron las MSCs pretratadas mediante incorporación de Ioduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo.

Se preincubaron las MSCs con dos medios condicionados tumorales (T10-3591 o T10-3534) por 4 horas. Seguidamente se incuban con Ioduro de Propidio y se determinó las fases del ciclo celular que atravesaban las MSCs mediante citometría de flujo. No se observaron ni un aumento en el porcentaje de células apoptóticas ni cambios en las fases del ciclo celular al tratar las MSCs con los medios condicionados tumorales.



7.10.3 La reducción en la migración no correlaciona con una reducción en la expresión génica de los receptores para los principales factores estudiados en cultivo.

Dado que la migración de MSCs se vio reducida en un contexto tumoral nos preguntamos si la expresión génica de los principales receptores estudiados podría resultar disminuida tras las 4h de pre incubación con los medios condicionados tumorales, lo cual podría estar modulando negativamente los niveles de migración observados. Como un acercamiento a lo que ocurriría en las MSCs incorporadas en el microambiente tumoral y con respecto a la modulación de la

migración se analizaron tanto los cambios en la expresión de ARN mensajeros de GPCRs y TKRs, como la migración de MSCs expuestas previamente a los medios tumorales

De este modo, en los dos cultivos independientes de MSCs previamente mencionados (Naval 34 y Cucaiba 38) se analizó por PCR en tiempo real el cambio en los niveles de expresión de 9 receptores de quimioquinas, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 y CXCR3 y tres receptores de factores de crecimiento EGFR1, FLT-1 (VEGFR1) y KDR (VEGFR2) cuando las MSCs fueron incubadas durante 4h con MC por dos muestras tumorales (T1: T10-3534 y T2: T10-3591) (Figura 36).

La expresión de varios de los receptores para los factores más relevantes para migración de MSCs al tumor, se encontraron estimulados en su expresión cuando se expusieron las MSCs a un entorno tumoral (microambiente tumoral aportado por los medios condicionados tumorales). Tal es el caso de CCR6, CCR3, CCR5, CXCR1, CXCR2 y los receptores de factores de crecimiento EGFR, Flt-1 entre otros, mientras que la expresión de CCR1 fue el único que se encontró disminuida en este mismo contexto.

Otros receptores que mostraron un aumento en su expresión luego de la modulación ejercida por los medios condicionados tumorales fueron CCR3, CCR5, CXCR1 y CXCR2.

CCR2, receptor del factor MCP-1, no se detecta basalmente ni se estimula tras la incubación con los medios condicionados por tumores. Esto sugiere que si bien MCP-1 se encuentra entre los principales factores secretados por los tumores, este no tendría una función en la modulación de la migración de MSCs en nuestro modelo. Al igual que CCR2, CCR4 se encontró basalmente por debajo del límite de detección de la técnica y además la pre incubación de las MSCs con los medios tumorales no indujo la expresión del mismo.

CCR1 fue el único receptor de quimioquinas que vio reducida su expresión en ambas muestras de MSCs y para los dos medios tumorales.

La expresión del receptor CXCR3 aumentó luego del Precondicionamiento con el T10-3534 y se redujo con el T10-3591 tanto para Naval 34 como para Cucaiba 38.

En cuanto a los receptores de los factores de crecimiento, tanto el receptor de EGF como los receptores de VEGF (Flt-1 y KDR) aumentan su expresión entre 2 y 4 veces con respecto a los niveles basales luego de la pre incubación de las MSCs con ambos medios condicionados tumorales.

La mayoría de los receptores CXCR analizados, y todos los receptores para GFs analizados aumentaron su expresión cuando fueron expuestos al microambiente parácrino tumoral (Figura 36).

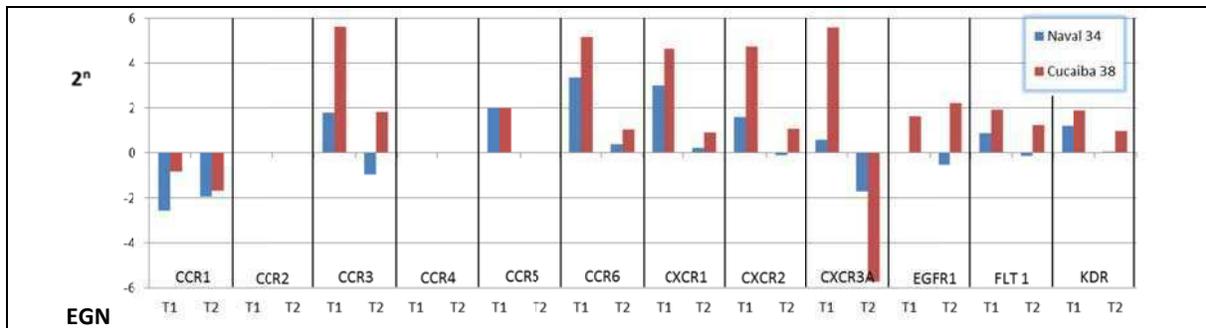
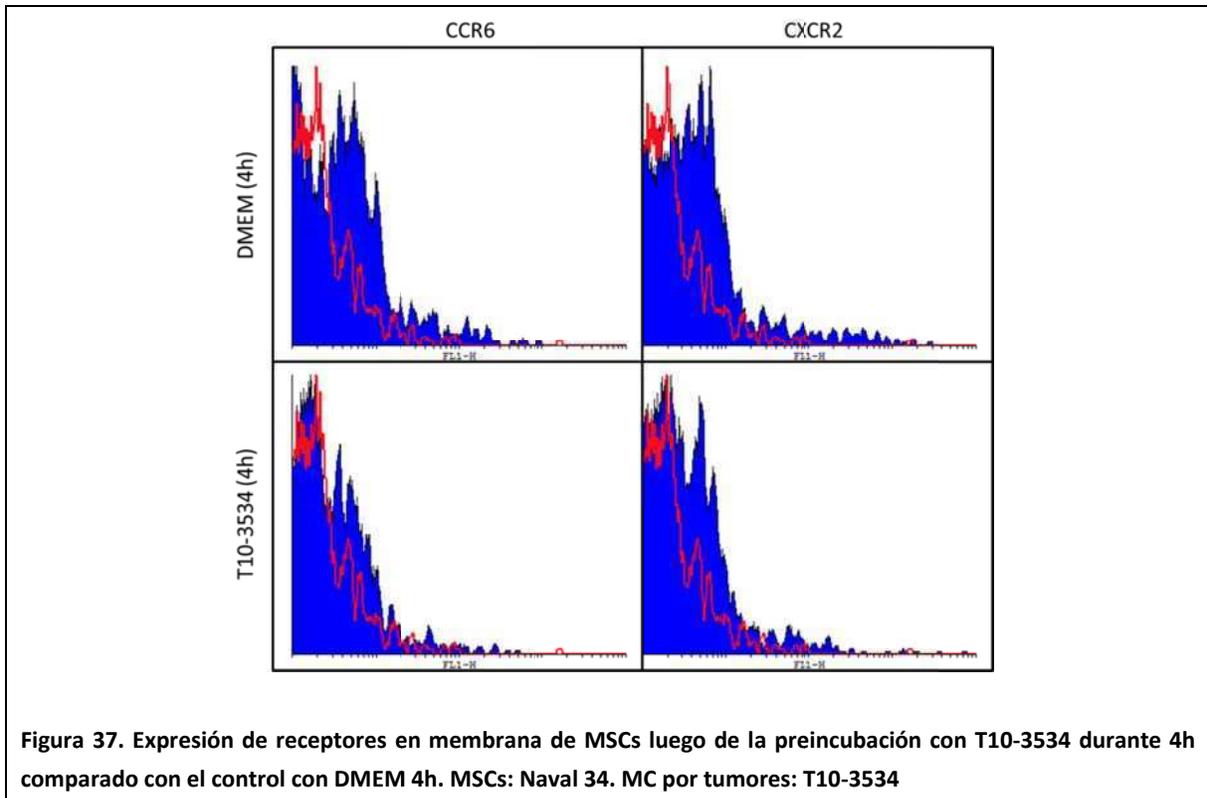


Figura 36. A. Análisis por PCR cuantitativa de la expresión de los receptores luego de 4h de incubación con MC por A. 2 tumores o B. 2 tejidos mamarios normales. Expresión génica normalizada (EGN) relativa en MSCs tras la pre incubación con medios condicionados de tumor, mostrando solo el resultado frente a los tumores T1: T09-3178 y T2: 10-3591. Se compara la expresión relativa frente al basal no estimulado (incubado con DMEM sin SFB) de CXCR1, CXCR2 y CCR6 como cambio relativo al incubado con DMEM. MSCs: Naval 34 y Cucaiba 38.

7.10.4 Luego del preconditionamiento hay una reducción de CXCR2 y CCR6 en superficie en MSCs.

Dado que los niveles de expresión génica no correlacionaron con la disminución de la migración luego del preconditionamiento de MSCs en medios tumorales, nos propusimos a determinar la expresión de los receptores CXCR2 y CCR6 en superficie preincubando 4h con el MC por T10-3534. Luego de 4h de preincubación se evaluó la expresión de los receptores mediante anticuerpos por citometría de flujo.

Se observó una disminución en la marca para ambos receptores en la superficie de las MSCs reducción en la expresión en superficie de receptores involucrados o no en la migración.



Este resultado, si bien preliminar, sugiere que una vez que las MSCs se encuentran en el microambiente tumoral la reducción en la expresión de los receptores de quimioquinas en membrana induce el descenso de la migración con el consiguiente posicionamiento final en el tejido.

8 CONCLUSIONES

1. Logramos identificar una subpoblación a la que denominamos MO-MSCs dentro de la heterogeneidad de los cultivos de MSCs que posee mayor adherencia tanto a componentes de matriz extracelular como a microendotelio, y que presenta una mayor migración e incorporación hacia tumores *in vivo* que la población restante llamada MOSN-MSCs.
2. Identificamos los principales factores, con funciones quimiotácticas entre otras, que constituyen el secretoma de adenocarcinomas mamarios.
3. Logramos establecer en nuestro modelo una metodología que permitió determinar cuantitativamente las MSCs incorporadas en el estroma tumoral luego de un proceso de migración local o migración *in vivo*.
4. Demostramos que IL-6 en el microambiente tumoral ejerce un efecto parácrino sobre la estimulación de células tumorales y que esto afecta la migración de MSCs hacia el MC producido por la línea tumoral IBH-6.
5. EGF tendría una responsabilidad parcial en la quimiotaxis de MSCs hacia el microambiente tumoral en cáncer de mama aunque no se resolvió si tiene una función directa sobre la migración de MSCs.
6. Los ejes quimiotácticos que utilizan los receptores CXCR1 y CXCR2 no estarían implicados en la migración de MSCs en nuestro modelo.
7. Los ejes quimiotácticos que utilizan el receptor CCR1 no muestran un efecto significativo sobre la migración de MSCs observada.
8. Logramos validar en cultivo al eje conformado por MIP-3 α y su receptor CCR6 el cual sería responsable de la migración dirigida al microambiente tumoral en cáncer de mama.
9. No pudimos determinar la responsabilidad MIP-3 α en un modelo *in vivo* debido a la falta del factor en los tumores crecidos en ratones "nude". Este punto será continuado en estudios futuros, mediante la sobreexpresión de MIP-3 α en los xenotumores mixtos IBH-6+FhA.

9 MODELO PROPUESTO

A partir de los resultados mostrados durante la elaboración de esta tesis, proponemos un modelo en el cual IL-6 es secretado por el estroma tumoral, al menos por los fibroblastos asociados a tumor, y que estaría afectando de manera parácrina a las células tumorales, estimulando un aumento en la expresión de citoquinas y/o quimioquinas las cuales en términos generales guiarían la migración de las MSCs hacia el tumor.

EGF, secretado en el microambiente tumoral, actuaría favoreciendo la migración aunque no estaría ejerciendo un efecto directo dadas las concentraciones estudiadas.

MIP-3 α /CCL20, secretada ya sea por las células tumorales o estromales, sería suficiente para guiar a las MSCs hacia el microambiente tumoral en cáncer de mama.

De acuerdo a un mecanismo reportado en la bibliografía los receptores de quimioquinas activados por la presencia de su ligando guían la migración a través de la MEC remodelando el citoesqueleto por medio de la señalización por la subunidad α_i de la proteína G heterotrimérica y por medio de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G activando las integrinas presentes en la superficie celular, componentes de los contactos focales. (Alon and Shulman 2011; Alon and Feigelson 2012; Dixit and Simon 2012). De este modo, el mismo mecanismo podría estar involucrado en nuestro modelo favoreciendo la adhesión de MSCs a colágeno provisto en el estroma tumoral.

Las integrinas en superficie presentes en las MSCs, principalmente $\alpha3\beta1$ y $\alpha5\beta1$, serían capaces de unirse al colágeno (I y IV) presente en la matriz extracelular del carcinoma secretado principalmente por las células estromales en el tumor mamario, favoreciendo de este modo la adhesión de las MSCs y colaborando con un paso fundamental de la migración dirigida por el gradiente de quimioquinas en base al repertorio de receptores expresados en las MSCs.

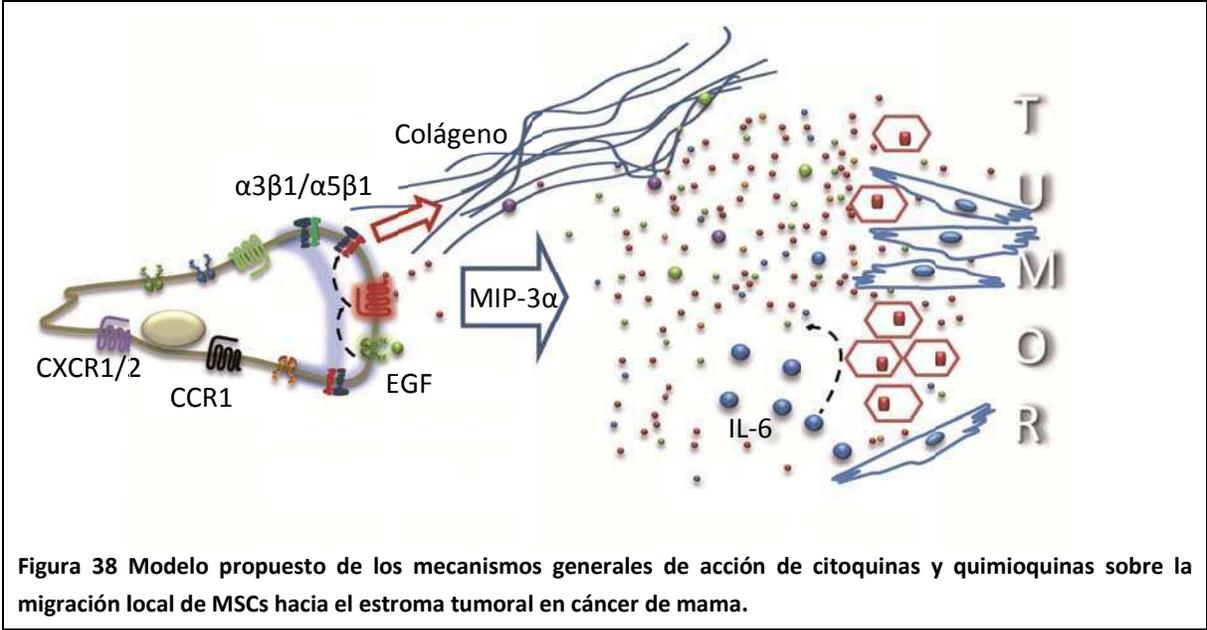


Figura 38 Modelo propuesto de los mecanismos generales de acción de citoquinas y quimioquinas sobre la migración local de MSCs hacia el estroma tumoral en cáncer de mama.

10 DISCUSIÓN

10.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SUBPOBLACIÓN CON ALTA CAPACIDAD DE LLEGADA A TUMOR.

Como parte de la estrategia para identificar y/o generar MSCs con mayor capacidad de llegada al tumor, en la primera parte de este trabajo caracterizamos una nueva subpoblación de MSCs proveniente de médula ósea llamada MO-MSCs, con una mayor capacidad de llegada a tumores con respecto del resto de la población heterogénea llamada MOSN-MSCs. Esta subpoblación, llamada MO-MSCs fue inicialmente identificada y aislada por su capacidad adhesiva acelerada durante el aislamiento. La subpoblación fue caracterizada por su adhesión aumentada frente a diversos componentes de matriz extracelular, para lo cual se encontraban expresando integrinas específicas que son los receptores de dichos componentes. Esta subpoblación también mostró una migración aumentada frente a medios condicionados por células tumorales en cultivo y una mayor llegada al entorno tumoral *in vivo*.

Muchas estrategias se utilizaron para aislar una subpoblación de MSCs con características más homogéneas basadas en la expresión de marcadores de superficie como herramienta de selección como ser la integrina $\alpha 1$ (Deschaseaux, Gindraux et al. 2003) o mediante CD271, Stro-1, W8B2 o CD146 (Vogel, Grunebach et al. 2003; Buhning, Battula et al. 2007) las cuales a pesar de lograr una selección positiva de MSCs purificadas no permitieron una ventaja en mejorar la eficiencia terapéutica. En términos de obtener una mayor eficiencia en la llegada de MSCs al estroma tumoral hemos hipotetizado que una estrategia basada en una mayor adherencia llevaría al aislamiento de una subpoblación con características biológicas que resulten en una adhesión aumentada a componentes de matriz extracelular como ser diferentes tipos de colágeno que componen el estroma en la mayoría de los carcinomas. El hecho de que esta subpoblación haya presentado mayor expresión de varias integrinas es de relevancia en términos de una llegada exitosa de MSCs al estroma tumoral.

En el caso de MSCs en circulación, una vez en la proximidad de un tumor, serían atraídas por factores quimiotácticos que favorecerían la intravasación de MSCs hacia el estroma. El direccionamiento específico de tumor es dependiente de una adhesión mediada por integrinas caracterizada por una estabilización en la adhesión a endotelio (Ruster, Gottig et al. 2006; Ley, Laudanna et al. 2007).

En base a nuestros resultados la adhesión aumentada a endotelio provee una característica importante en este sentido a favor de la subpoblación caracterizada. Esto correlaciona con la

mayor afección por Vitronectina y Fibronectina, componentes de la MEC de endotelio. Además la subpoblación presentó una mayor migración hacia tumores en cultivo e *in vivo*. En coincidencia con nuestros resultados, estudios previos mostraron que la integrina $\alpha 5$ estaba involucrada en el direccionamiento de MSCs (Guo, Lee et al. 2002; Veevers-Lowe, Ball et al. 2011) y la integrina $\alpha 4\beta 1$ fue requerida para mediar la adhesión firme y la transmigración a través de endotelio (Steingen, Brenig et al. 2008).

Una vez que las MSCs han extravasado se enfrentan a un estroma cualitativamente diferente compuesto principalmente de diferentes tipos de colágeno, tal como colágeno I en la mayoría de los carcinomas (Mueller and Fusenig 2004). Nuevamente, observamos la expresión elevada de integrinas que unen diferentes tipos de colágeno incluyendo colágeno de tipo I en la subpoblación MO-MSCs.

Por último, la migración aumentada de MO-MSCs hacia medios condicionados tanto de melanoma como de cáncer de mama en cultivo e *in vivo* sugiere que la mayor adherencia de las MO-MSCs confiere además una ventaja en el proceso migratorio hacia varios tipos de carcinoma.

10.2 VALIDACIÓN TÉCNICA Y FUNCIONAL DE LOS EJES SELECCIONADOS QUIMIOTÁCTICOS.

En la segunda parte de este trabajo, y como parte de la estrategia para posteriormente generar MSCs con mayor capacidad de llegada al tumor, hemos planteado la identificación de diversos componentes del microambiente tumoral que estén involucrados en la migración de MSCs hacia muestras tumorales de cáncer de mama. El microambiente tumoral se representó por medio de condicionamientos a partir de muestras de tumores seleccionadas en base a un perfil patológico similar, estadios II A o II B. Tal como se expuso en la sección de clasificación de tumores de mama, este tipo de tumores son los más comunes clinicopatológicamente dentro de la población, por lo cual su secretoma tiene gran relevancia tanto experimental como preclínica. En los medios condicionados por las muestras de tumores y tejidos adyacentes al mismo, las proteínas secretadas representan la parte soluble del microambiente.

La técnica de arreglos de anticuerpos contra citoquinas y quimioquinas junto con la aplicación de un software para el análisis densitométrico de imágenes con una programación de módulos para la automatización del análisis fueron elegidos para el análisis proteómico de este microambiente. Los análisis de mediana eficiencia o del inglés “medium throughput” donde se adquiere una cantidad importante de datos como el estudio proteómico con arreglos de

anticuerpos utilizados en este trabajo, arrojan muchos datos que provienen de pocas muestras biológicas. Esto conlleva a una dificultad de los métodos estadísticos para dar verdadera solución y con confiabilidad en los resultados. Por ello, en nuestro análisis establecimos dos criterios complementarios para la selección de factores.

Primeramente se seleccionaron los factores de mayor expresión que surgieron del ordenamiento de los promedios luego de la normalización del análisis por densitometría de las imágenes de los arreglos. En general los factores principales aportados por el tumor también aparecen en los MC por tejidos adyacentes, tal es el caso de IL-6, IL-8, MCP-1 y GRO.

Si bien se determinaron las intensidades para cada factor en los arreglos, el rango para todos los factores no es lineal, saturándose la señal en los más intensos este tipo de análisis no es cuantitativo ya que los arreglos de anticuerpos no contienen una curva de expresión para cada factor. De la cuantificación de IL-6 por citometría de flujo se logra obtener una curva con concentraciones conocidas de IL-6 recombinante humana.

En segunda instancia pudimos comparar dos tejidos diferentes provenientes del mismo individuo que representan, el tumor propiamente dicho y un tejido adyacente al mismo pero sin patología tumoral. El hecho de contar con muestras apareadas (tumor y adyacente del mismo individuo) en este estudio confiere un alto nivel en la confianza al estudio estadístico. Si las muestras no estuvieran apareadas sería necesario un número de réplicas biológicas mucho mayor para dar validez a este estudio. Además, el hecho de poder comparar entre tejido tumoral y no patológico nos brindó candidatos que darían especificidad hacia el tejido tumoral.

La validación funcional radicó en la reducción en los parámetros que estuvieran influyendo en la función biológica observada. El hecho de obtener medios condicionados reduce la representación del microambiente tumoral a los factores solubles, con la reducción del efecto de las moléculas de adhesión y la interacción célula-célula en la migración observada.

De esta manera pudimos obtener un efecto que dependió solamente de los factores solubles durante el momento de la migración. Sin embargo, quedaron implícitas las interacciones entre dichos factores y sus receptores. La mayoría de los receptores son promiscuos y poseen distinta afinidad para cada ligando. A su vez, las vías de señalización a través de segundos mensajeros como el Inositol trifosfato y el Calcio hacen que la señal de cada receptor sea aditiva o pueden depender de la activación de vías de señalización en paralelo por otros factores también presentes en el microambiente tumoral.

Hasta el momento de inicio de esta Tesis la bibliografía detallaba el rol de diversos factores quimiotácticos sobre la migración de MSCs. Éstos eran provistos en forma artificial en los primeros trabajos y luego fueron aportados con medios condicionados por líneas tumorales. Sin embargo no era común el uso de muestras humanas en estudios de migración de MSCs. En ese mismo año se publicó un trabajo con el mismo esquema experimental con el que estábamos trabajando usando muestras obtenidas de cirugía y utilizando tejido normal mamario como control a diferencia del tejido adyacente utilizado en nuestro trabajo (Dwyer, Potter-Beirne et al. 2007).

En nuestro trabajo, de manera consistente las MSCs migraron de forma dirigida (quimiotaxis) hacia los medios condicionados por tumores de mama humanos. En base a esto pudimos identificar el rol de varios factores presentes en los MC por tumores en relación a la migración de MSCs. Revisemos los casos más destacados:

10.2.1 Interleuquina 6 y la migración de MSCs.

Al comienzo de esta tesis en 2008 se identificaron nuevas funciones para IL-6 en la migración de monocitos induciendo la activación de integrinas, la adhesión celular y la quimiotaxis (Clahsen and Schaper 2008). A pesar de esto en 2008 se publicó que IL-6 no tendría un efecto sobre la quimiotaxis de MSCs (Kalwitz, Endres et al. 2009). Un año más tarde se validó el efecto quimiotáctico de IL-6 sobre MSCs en tumores hipóxicos (Rattigan, Hsu et al. 2010). Sin embargo, en este trabajo IL-6 se encontró en los tumores en un rango mucho menor al cual ejerció su efecto como factor quimiotáctico aislado.

En nuestro trabajo, IL-6 presentó un efecto quimiotáctico en concentraciones mayores a las encontradas en los tumores. Sin embargo la preincubación de las células tumorales con IL-6 reduce la migración de MSCs hacia el medio condicionado por células tumorales a las mismas concentraciones en las cuales la propia IL-6 resulta ser quimiotáctico *per se*.

A concentraciones menores a 10ng/ml IL-6, coincidentes con las encontradas en los MC por tumores, no ejerció un efecto directo sobre la quimiotaxis de MSCs.

El efecto parácrino de IL-6 a esas mismas concentraciones sobre una línea tumoral se observó con el aumento de la migración de MSCs frente a ese medio en comparación con el MC por la línea sin estimular. Esto sugiere que IL-6 en el microambiente tumoral modula la expresión de quimioquinas u otros mediadores quimiotácticos para lo cual hay evidencia anterior a los

trabajos mencionados (Biswas, Delfanti et al. 1998). Tampoco podemos descartar el efecto directo de IL6 sobre MSCs durante el tiempo de migración donde podría estar ejerciendo una estimulación en la expresión de receptores de quimioquinas y de esta manera modulando ya sea positiva o negativamente la migración durante las 4h de análisis. No realizamos ningún estudio de modulación de receptores utilizando como inductor a IL-6 sola aunque sí con medios tumorales completos.

Se eligieron los medios condicionados por IBH-6 pre tratados con IL-6 a 1 y 50µg/ml como continuidad de este trabajo analizando los cambios en la expresión de citoquinas y quimioquinas.

10.2.2 El eje MCP-1/CCR2.

El siguiente es un caso paradójico ya que se encontró en el trabajo de Dwyer y colaboradores antes mencionado que se logró reducir la migración neutralizando con anticuerpos anti MCP-1 en medios condicionados de tumores mamarios a pesar de que en dicho estudio no analizan la expresión de los receptores de MCP-1. Por otro lado, en un trabajo de Ringe y colaboradores (Ringe, Strassburg et al. 2007) no ven responsabilidad de MCP-1 como factor quimiotáctico a pesar de estar expresado el receptor CCR2.

MCP-1 es uno de los principales factores secretados por tumores en nuestro modelo de estudio, sin embargo su receptor CCR2 no estaba siendo expresado basalmente ni se logró la estimulación cuando se preincubaron las MSCs con los medios condicionados por tumores, tejidos adyacentes o tejidos mamarios normales. Además, en curvas de neutralización con anticuerpo monoclonal contra MCP1 no logramos reducir la migración de las MSCs frente a los medios condicionados por 2 tumores. Es necesario trabajo adicional sumando la inmunoprecipitación del factor (al igual que para MIP-3α) y la determinación de los niveles de CCR2 en la superficie por citometría de flujo con el fin de corroborar la falta de responsabilidad de MCP-1 en la quimioatracción de nuestros cultivos de MSCs hacia adenocarcinomas mamarios. Desconocemos si existe alguna particularidad asociada a la expresión diferencial de receptores de quimioquinas y/o de su regulación en función de la población tomada como muestra.

10.2.3 Los ejes que involucran el receptor CCR1

Mediante sobreexpresión de CCR1 se ha visto implicado en la supervivencia y migración de MSCs a tejido infartado (Sordi, Malosio et al. 2005) sugiriendo que no solo modula la migración sino que además la acumulación de MSCs modificadas mejora la función del tejido cardíaco respecto del control con MSCs nativas.

En nuestro estudio in vitro, si bien el bloqueo del conjunto seleccionado de las quimioquinas CC (RANTES, MIP-3 α y MIP-1 α) mostró una reducción en la respuesta en dos de tres tumores, el silenciamiento del receptor CCR1 (receptor de RANTES y MIP-1 α) no mostró un rol preponderante en ninguno de los casos analizados.

Curiosamente, al preincubar las MSCs con medios tumorales, CCR1 fue el único receptor que mostró una reducción en los niveles transcripcionales sugiriendo que la reducción en la expresión de este receptor podría estar involucrada con la reducción de la migración en el microambiente tumoral.

Se necesitan experimentos de destino celular y cascada de señalamiento si se desea estudiar el rol de CCR1 una vez que la célula se encuentra en el microambiente tumoral.

10.2.4 Los ejes quimiotácticos de IL8 - CXCR1 y GRO - CXCR2.

En un modelo in vitro de células de glioma se ha sugerido que los mayores niveles de los receptores CXCR1 y 2 en MSCs derivadas de cordón umbilical comparadas con las provenientes de médula ósea pueden estar influyendo en el señalamiento afectando la migración elevada hacia esa patología dada la diferencia encontrada en cuanto a la migración de estas células de los diferentes orígenes (Kim, Kim et al. 2009). En un trabajo siguiente muestran que IL-8 expresado en el modelo de glioma mostró estar implicado en la migración de MSCs provenientes de cordón umbilical que expresaron el receptor CXCR1 tanto natural como artificialmente (Kim, Kim et al. 2011).

En nuestro modelo de muestras de tumores de mama IL-8 es uno de los factores mayormente representados dentro de los arreglos de citoquinas. Tiene como receptor de alta afinidad a CXCR1 o IL8Ra. La afinidad de los receptores CXCR1 y CXCR2 está cruzada con sus ligandos; CXCR2 resulta de alta afinidad para CXCL1, 2, 3 (la serie de factores GRO), CXCL5 (ENA-78) y CXCL7, el cual en nuestro caso no está representado en el microambiente tumoral.

El receptor CXCR1, si bien se encuentra por encima del nivel de detección (LOD) en el análisis de PCR en tiempo real, es uno de los receptores de menor expresión relativa comparado con el resto de los receptores GPCR de quimioquinas analizados en esta tesis, habiendo resultado negativa en una determinación de las tres realizadas. A pesar de estas diferencias en la expresión de los receptores, la pre incubación de MSCs con el medio condicionado por tumores T1 y T2 estimula hasta 8 veces la expresión de CXCR1 en ambas muestras de MSCs. Por este motivo se agregó a CXCR1 en el análisis funcional y se procedió a incluirlo en el bloqueo con anticuerpos neutralizantes

Por otro lado, CXCR2 es uno de los receptores de mayor expresión relativa comparado al resto de los receptores de quimioquinas analizados. Los ligandos de CXCR2 se encontraron entre las quimioquinas más representadas en los medios tumorales (es el caso de GRO (CXCL1, 2 y3) y ENA78 (CXCL5) o bien resultaron diferenciales entre tumores y adyacentes (es el caso de GCP-2 (CXCL6), NAP-2 (CXCL7) y ENA-78 (CXCL5). Por estos motivos se eligió CXCR2 para continuar con la validación funcional.

A pesar de estos resultados no se logró bloquear el efecto de los MC por tumores sobre la migración de MSCs neutralizando ambos receptores CXCR1 y CXCR2. Además no se logró determinar el rol de CXCR2 en la migración de MSCs a los MC de tumores ya que no se observó la reducción significativa de la migración luego de que fuera silenciado CXCR2 con ARN de interferencia pequeños. Estos resultados sugieren que no solo la presencia del receptor es condición para determinar que la vía se encuentre implicada en la migración a tumores de mama.

10.2.5 EGF

EGF se agregó al estudio dada la implicancia en el avance de la patología tumoral mamaria y debido a que en un trabajo de 2005 se observó el receptor de EGF implicado en la migración de MSCs a tumores de cerebro en ratones (Sato, Kuwashima et al. 2005).

En base a los resultados presentados el efecto de EGF es poco claro. No podemos descartar un efecto directo de EGF sobre la migración de MSCs, es decir, si bien como factor aislado no llegaría a alcanzar el umbral a las concentraciones de los tumores, el efecto podría ser aditivo con otros ligandos y sumarse a los efectos de otros ligandos que posean su receptor y de esta manera integrarse la señal intracelular.

EGF estaría mediando la migración de MSCs por mecanismos que no pudimos develar ya sea directamente a través de la interacción con su receptor como la activación intracelular de receptores GPCR de quimioquinas lo cual aumentaría la afinidad y sensibilidad de los GPCR frente a sus ligandos.

Hacen falta estudios combinados de interacción con quimioquinas y de señalización de los receptores implicados para poder continuar estudiando el rol de EGF sobre la migración de MSCs.

10.2.6 El eje de CCR6 y MIP-3 α .

Si tuviéramos que elegir un eje quimiotáctico ideal para enviar células a un destino en particular, en nuestro caso de interés un tumor, y que solamente vayan al tumor, éste debería reunir las siguientes características:

El ligando debería estar siendo expresado exclusivamente en tumores y no en otros tejidos ya que esto último dirigiría a las células hacia éstos otros destinos los cuales competirían con el tumor por el vehículo terapéutico. Es decir, este eje debería ser selectivo de tumores o idealmente ser específico de tumores.

No ser un eje promiscuo, es decir que tenga la menor cantidad de ligandos posibles. De esta manera, al modificar las células con una sobreexpresión del receptor, aumentaría la migración y por ende la terapia hacia ese sitio donde se encuentra expresado el ligando (siendo selectivo como en el punto anterior).

El ligando debería tener dicho receptor como único ya que de no ser así el ligando competiría por otros receptores y sería secuestrado por éstos bajando así su disponibilidad para las células utilizadas en la terapia.

El ligando debería ser suficiente para desarrollar la respuesta quimiotáctica por sí solo, es decir que el umbral de respuesta dado por su receptor requiera solamente la interacción con su ligando.

En el caso de CCL20/MIP-3 α se encontró por bibliografía y bases de datos (KEGG) que tiene a CCR6 como único receptor descripto y a su vez el receptor CCR6 tiene a MIP-3 α como único ligando. El ligando no interacciona con otros receptores de 7 pasos transmembrana acoplados a

proteína G que puedan ejercer función quimiotáctica, es decir no cruza con otros receptores de quimioquinas, y en particular con ninguno de los otros receptores analizados.

En nuestro trabajo pudimos demostrar mediante distintas estrategias tales como inmunoprecipitación del ligando MIP-3 α y silenciamiento del receptor CCR6 una responsabilidad al menos parcial en la migración de MSCs hacia el microambiente tumoral en cáncer de mama. Además MIP-3 α resulta ser suficiente a concentraciones muy bajas para desarrollar una respuesta quimiotáctica significativa de los cultivos de MSCs.

Si bien no hay estudios que definan a CCL20/MIP-3 α como marcador tumoral en cáncer de mama (Cassier, Treilleux et al. 2011), el hecho de que tenga cierta especificidad o selectividad por el tejido tumoral es de suma importancia si se desea redirigir células al tumor como target terapéutico ya que disminuiría la llegada de MSCs a otros tejidos no tumorales que potencialmente podrían competir por las MSCs con el tumor y reducir la efectividad de la llegada y por ende de la terapia.

CCR6/MIP-3 α es el eje quimiotáctico candidato para la modificación de las MSCs y la modulación de la migración hacia el entorno tumoral en estudios futuros.

10.3 SEGUIMIENTO DE MSCs EN EL MODELO IN VIVO.

En los últimos años se están desarrollando cada vez más y mejores tecnologías que permiten seguir células a través de un organismo y poder detectar pequeños grupos tanto en sitios de metástasis o en órganos ya sea para estudiar la biodistribución o para detectar migración hacia tumores en modelos animales. Y, particularmente, es el caso de las MSCs que establecieron un paradigma en busca de su destino en envíos sistémicos tanto en modelos de cáncer humano en ratones como en ensayos clínicos en humanos con la última la tecnología puesta en pos de la detección *in vivo*. (Reagan and Kaplan 2011).

A pesar de esto no existen muchos trabajos donde logren cuantificar MSCs incorporadas en tejidos de manera reproducible. La mayoría de los trabajos se basan en observaciones parciales utilizando técnicas microscópicas con una baja representatividad del tejido completo.

Mediante citometría de flujo pudimos cuantificar MSCs marcadas con fluorescencia incorporadas en los tumores de mama en nuestro modelo. Validaremos de esta manera la responsabilidad del eje MIP-3 α luego de reemplazar la línea tumoral IBH-6 en el modelo mixto

empleado estudiando la inclusión de MSCs con el receptor silenciado en comparación con las SCR.

10.4 DESTINO CELULAR DE MSCs EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.

Como un acercamiento a lo que ocurriría en las células inmersas en el microambiente tumoral respecto de la modulación de la migración se analizaron tanto la respuesta migratoria de MSCs expuestas previamente a los medios tumorales como los cambios en la expresión de GPCRs y TKRs tanto por la determinación de los cambios en la expresión de ARN mensajeros como de los receptores en membrana. Solo los cambios de los receptores en membrana (analizados para CXCR2 y CCR6) correlacionan con el descenso de la migración aunque no se descarta el aumento en el perfil de expresión en superficie de otros receptores no analizados en esta tesis que involucren la posterior migración de MSCs hacia otros tejidos que expresen los ligandos correspondientes. En el caso de los receptores para los factores de crecimiento, esto podría estar relacionado con una regulación sobre mecanismos tumorales independientes de la migración de las MSCs, tales como angiogénesis.

Estos resultados sugieren que una vez que las MSCs se encuentran en el microambiente tumoral y se incorporen dentro del tejido la reducción en la expresión de los receptores de quimioquinas en membrana induce el descenso de la migración con el consiguiente "homing" en su nicho final en el tejido.

Podríamos discutir si la migración sería susceptible de ser alterada por cualquier variación en los componentes del microambiente que lo regula. Sin embargo, a pesar de modificar selectivamente los componentes principales que, a nuestro entender, debían tener la responsabilidad en la respuesta, resultó muy difícil disminuir la migración dirigida a muestras tumorales. Todavía falta mucho para comprender como estos mecanismos logran mantener la migración de manera inequívoca frente al microambiente tumoral en cáncer de mama respecto de otros microambientes no tumorales.

Mientras que la comprensión de los mecanismos que subyacen la migración de MSCs está siendo descifrado de a poco, el potencial para la mejora de terapias dirigidas por MSCs es, por lo menos, prometedor.

11 ESTRATEGIAS Y METODOLOGÍA

11.1 TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR Y ENSAYOS FUNCIONALES

Líneas celulares derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos: IBH-6 fue cedida gentilmente por la Dra Isabel Lüthy del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) (Bruzzone, Vanzulli et al. 2009). Esta línea se creció en medio D-MEM F12 suplementada con 10% de suero fetal bovino. Las líneas de carcinomas mamarios primarios 578T, MCF7 y las derivadas de metástasis de ganglio MDA-MB-231, de melanoma, A375 y la línea de fibroblastos: fibroblastos fetales (HFL1) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). La línea de fibroblastos humanos adultos normales (FhA), gentilmente cedida por el Dr. Dimitris Kletsas, (Laboratory of Cell Proliferation & Ageing. Institute of Biology NCSR "Demokritos", Atenas Grecia fue obtenida a partir de una muestra de biopsia de un hombre de 22 años. Los fibroblastos asociados a tumor (FAT) fueron obtenidos de la disgregación de dos muestras de adenocarcinoma mamarios utilizadas en esta tesis. Los fibroblastos humanos adultos (FhA), las células microendoteliales humanas transformadas (HMEC1) (Ades, Candal et al. 1992), fueron crecidas en DMEM alta glucosa (DMEM alta) (4g/L) suplementado con 10% v/v de SFB inactivado por calor (Natocor, Argentina) y antibióticos (penicilina: 2.5 unidades/ml y estreptomycin: 2.5 mg/ml). Las líneas de fibroblastos diploides normales WI38, HFL1, las de carcinomas mamarios primarios 578T MCF7 y MDA-MB-231 fueron crecidas en el medio correspondiente según ATCC. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C, en atmósfera saturada de agua y 5 % de CO₂ y regularmente fueron evaluados para verificar la ausencia de contaminación por micoplasma mediante marcación fluorescente con Hoechst 1µg/ml.

Los reactivos generales de cultivo de células eucariotas fueron obtenidos de Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), o Invitrogen / Live technologies. En general, los reactivos químicos fueron comprados en Sigma (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos secundarios y los reactivos de detección fueron obtenidos en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) y Dako Corporation (Carpentaria, CA, USA). El material de plástico necesario para el cultivo de las células eucariotas fue importado de las firmas Greiner (Frickenhausen, Germany) y Orange (Braine-l'Alleud, Bélgica), mientras que los filtros de policarbonato y las membranas para la esterilización de soluciones pertenecen a Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Las membranas de nylon, PVDF y nitrocelulosa para Western Blot fueron obtenidas de la empresa GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA).

11.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE/ESTROMALES MESENQUIMALES DE MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA.

Se obtuvieron quince muestras de médula ósea (MOA) humana adulta, mayoritariamente de donantes masculinos sanos de entre 18 y 40 años de edad, a partir de las cuales se extrajeron las Células Madre/Estromales Mesenquimales (MSCs). Cada muestra de médula ósea se procesó por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque y la capa de células mononucleares se cultivaron en medio de crecimiento básico (DMEM) baja glucosa 1g/l (DMEM baja) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios. S.A. Argentina). Las células adherentes fueron expandidas en cultivo y conservadas en nitrógeno líquido para su posterior utilización. A los cultivos de las muestras obtenidas se las caracterizó por expresión de marcadores de superficie mediante Citometría de flujo (CF) y por su capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico. Los estudios de migración fueron realizados con dos muestras de MSCs seleccionadas *a priori* por sus cualidades en la proliferación en cultivo además de cumplir con los requerimientos mínimos de expresión de marcadores de superficie y capacidad de diferenciación consensuados para MSCs según ISSCT.

Al momento del primer plaqueo se obtuvieron las diferentes subpoblaciones utilizadas en la primera parte de esta tesis (Bolontrade, Sganga et al. 2012). Se identificó una subpoblación de MSCs que se adhirió a la superficie del plástico en cultivo, en presencia de suero fetal bovino (SFB) al 20% en el medio de cultivo (primer punto de cultivo). Brevemente, se plaquearon las células mononucleares obtenidas a partir de médula ósea y se permitió su adhesión durante la primer hora de cultivo (primer punto de cultivo). Inmediatamente después de esto, el sobrenadante que contenía la fracción celular no adherente en primer punto de cultivo, se recolectó de la placa de cultivo y se sembró permitiendo la adhesión de manera independiente hasta el final de un período de 3 días; posteriormente, ambos cultivos se lavaron y se mantuvieron de forma independiente en condiciones de cultivo de MSCs hasta lograr una confluencia del 80 a 90% para el primer pasaje de cultivo. Nos referimos a la población celular obtenida después del primer punto de tiempo del cultivo como MO-MSCs. Las células obtenidas después de la siembra del sobrenadante recogido se denominaron MOSN-MSCs. Los cultivos a los cuales se hace referencia aquí como MSCs original o "whole", son los descriptos anteriormente y en el trabajo citado como *protocolo estándar*, realizado en paralelo al plaqueo diferencial por las propiedades de adherencia. Estas MSCs originales se utilizaron en la segunda parte del trabajo para la identificación de ejes quimiotácticos en adelante.

11.3 MUESTRAS DE TUMORES HUMANOS. TUMOR Y TEJIDO ADYACENTE.

Por otro lado se obtuvieron muestras de adenocarcinomas mamarios provenientes de cirugías, junto con las cuales también se obtuvo su contraparte de tejido adyacente libre de enfermedad. Se logró una estrategia conjunta con el servicio de inmunopatología molecular del Hospital Eva Perón (a cargo de la Dra. Inés Bravo) de donde se obtuvieron las muestras de tumores.

Dado que la cirugía es el tratamiento principal en caso de tumores mamarios de estadios tempranos, el éxito del tratamiento depende de si se logró extraer todo el tejido que contiene células tumorales. En este sentido el patólogo evaluó no solo la patología del tejido tumoral en sí sino también los límites del tejido disectado. Durante la intervención el cirujano extrajo un tejido que no forma parte del tumor propiamente dicho sino que se encuentra ciertamente distanciado (de forma variable) y se evaluó la ausencia de patología en dicho tejido. La muestra utilizada en investigación se compone del tejido tumoral y una fracción mínima de tejido adyacente el cual resulta de valiosa información al ser un tejido que no contiene células tumorales y a su vez proviene del mismo individuo del cual se tiene el tejido tumoral.

Por otra parte se recibieron muestras de reducciones mamoplásticas obtenidas de cirugías de carácter estético o preventivo, consideradas tejido normal mamario utilizado como control a los experimentos de migración. Estas muestras sin patología tumoral se componen de tejido normal mamario a diferencia de los tejidos adyacentes aunque, también a diferencia de éstos, no provienen de los mismos individuos.

Controles: Con el fin de establecer un sistema de control de calidad de las muestras procesadas con fines experimentales, se realiza un muestreo aleatorio de los fragmentos tumorales obtenidos a partir de las muestras recibidas y de los tejidos adyacentes, para fijarlos en Formol y luego devolverlos al servicio de patología a fin de confirmar:

1. Los fragmentos tumorales son efectivamente tumorales y los adyacentes no poseen zonas patológicas.
2. El tejido tumoral, antes y después del condicionamiento se mantiene en las mismas condiciones descartando si hay necrosis desarrollada por el tratamiento efectuado.

11.3.1 Análisis histopatológico y datos analizados.

El análisis histopatológico estuvo a cargo de la Dra Inés Bravo, directora del área de inmunopatología del Hospital interzonal Eva Perón del partido de San Martín, Pcia de Buenos Aires. Para el diagnóstico se tuvo en cuenta la clasificación WHO (World Health Organization: classification of breast tumours) y el grado histológico de acuerdo a Nottingham- Histologic score.

La información de cada una de las muestras analizadas se organizó de la siguiente manera: Origen del tumor: *ductal* o *lobulillar*; progresión del tumor: *In situ* o *infiltrante*; Presencia de infiltrado inflamatorio; Metástasis ganglionares: *Positivo* o *negativo*; Cuantificación de los ganglios: Número de ganglios positivos o negativos en función de los ganglios aislados. Además se incluyó la información de la histología en cuanto a proporción de células tumorales epiteliales, estroma fibroso y fibroblastos, tejido graso, tejido normal mamario y células inflamatorias en general.

11.4 CITOMETRÍA DE FLUJO PARA CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA

Para la inmunofenotipificación de las muestras de MSCs por citometría de flujo las células fueron crecidas en DMEM baja con 20% se SFB. Las células fueron despegadas con EDTA 0,1 mM en PBS y lavadas con medio de cultivo a 4 grados centígrados (4C). Posteriormente, las células fueron mantenidas a 4C e incubadas 1 hora con 10% v/v de suero normal de cabra in PBA (PBS, 5 mg/ml BSA y 0,01% p/v de azida sódica). Luego, se las incubó 30 minutos con cada anticuerpo primario conjugado a ficoeritrina (PE) para los antígenos evaluados (Ver en Caracterización de MSCs obtenidas de médula ósea.). Posteriormente, se lavaron las células dos veces con PBA y se fijaron en 4% p/v de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de los lavados con PBA (PBS con 0,1% p/v de seroalbúmina bovina) se evaluó por citometría de flujo la marca fluorescente proveniente del fluoróforo Ficoeritrina (PE) acoplado a los anticuerpos utilizados. En el caso del anticuerpo anti CD105 no conjugado las muestras se incubaron 30 minutos con 5µg/ml de anticuerpo IgG2a secundario de cabra anti-ratón conjugado con el fluoróforo Fluoresceína isotiocianato (FITC) (BD) diluido en PBS. Finalmente las células fueron lavadas 3 veces en PBS frío, resuspendidas en PBS, protegidas de la luz y sujetas a citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (BD Bioscences). Para cada marcador se analizaron 10.000 eventos.

11.5 OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS POR TUMORES HUMANOS Y TEJIDOS ADYACENTES, CÉLULAS TUMORALES Y NORMALES.

Los medios condicionados (MC) se obtuvieron incubando fragmentos de tejidos tumorales o tejidos adyacentes a éstos obtenidos a partir de cirugías, o células tanto de líneas como de cultivos primarios en monocapa según correspondiere, con medio mínimo libre de suero y con seroalbúmina bovina (DMEM + BSA 0.1%) para aportar a la estabilidad de los factores proteicos durante 24h a 37°C 5% CO₂ (Normoxia). En el caso de los tejidos tumorales y adyacentes se lavaron los fragmentos con PBS con el agregado de Fungizona (actinomicina D), luego se cortaron con bisturí en fragmentos de entre 1 y 2 mm de lado y se incubaron 24h a 37°C 5% CO₂ con DMEM + BSA 0,1%. En el caso de las células se condicionaron medios tanto de distintas líneas tumorales, microendotelio y fibroblastos normales, como de tumores de mama (adenocarcinomas mamarios). Las células fueron sembradas primeramente en medio completo en presencia de SFB; al llegar a una confluencia adecuada (entre 80 y 90%) se lavaron 3 veces con PBS y se agregó medio DMEM + BSA 0,1%. en ausencia de suero durante 24 hs a 37°C 5% CO₂. Luego se levantaron los medios y se mantuvieron en hielo, los MC se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm en centrifuga clínica para eliminar las células no adheridas y los detritos remanentes; luego se filtraron con filtros de nylon de 0,45um pasivados con el medio sin preincubar. El pasivado es necesario ya que las drogas o moléculas pequeñas se pegan al filtro por cargas electrostáticas reteniéndose en el filtro y eliminándolo del medio; la BSA entonces se pega al filtro eliminando las cargas y permitiendo la recuperación de moléculas en baja concentración en el medio condicionado. Finalmente, los MC así clarificados se almacenaron alicuotados a -80 °C hasta su uso. El medio condicionado (MC) fué utilizado en los estudios proteómicos y ensayos de migración.

11.6 OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMOR (FAT) PROVENIENTES DE MUESTRAS TUMORALES, DISGREGACIÓN DE TEJIDOS TUMORALES OBTENIDOS A PARTIR DEL CRECIMIENTO DE TUMORES EN EL MODELO *IN VIVO*.

Para aislar fibroblastos asociados a tumor y obtener una suspensión de células solas derivadas de los tumores crecidos in vivo, tanto las muestras obtenidas de cirugía ya sean tumores, tejidos adyacentes, tejidos mamarios normales, tumores crecidos en ratones fueron disectadas mecánicamente con tijeras y bisturí, incubadas desde 90 minutos hasta 16 horas en presencia de suero con una mezcla de enzimas degradativas: colagenasa tipo I 3mg/ml (Roche) y Hyaluronidasa 100U/ml (Sigma). Los fragmentos remanentes se sometieron a disgregación final con pipeta de 100µl y luego se resuspendió por 1 minuto en tripsina-EDTA 0.25%, luego del

lavado con PBS se incubaron las células por 5 min en Dispasa 5mg/ml (Roche) y DNAsa I 0.1mg/ml (Sigma) seguido por filtrado por malla de nylon de 70µM (BD, Falcon) (Clahsen and Schaper 2008). Para lisar los glóbulos rojos se trataron con solución de NH₄Cl.

En el caso de las muestras de tumores crecidos en ratones para determinar las MSCs incluidas luego de migración peritumoral y antes de la disociación mecánica, se lavaron los tumores dos veces por 5 minutos con tripsina-EDTA 0.25% con el fin de liberar las células adheridas al borde del tumor pero que no hayan migrado o no se hayan incluido en el estroma tumoral.

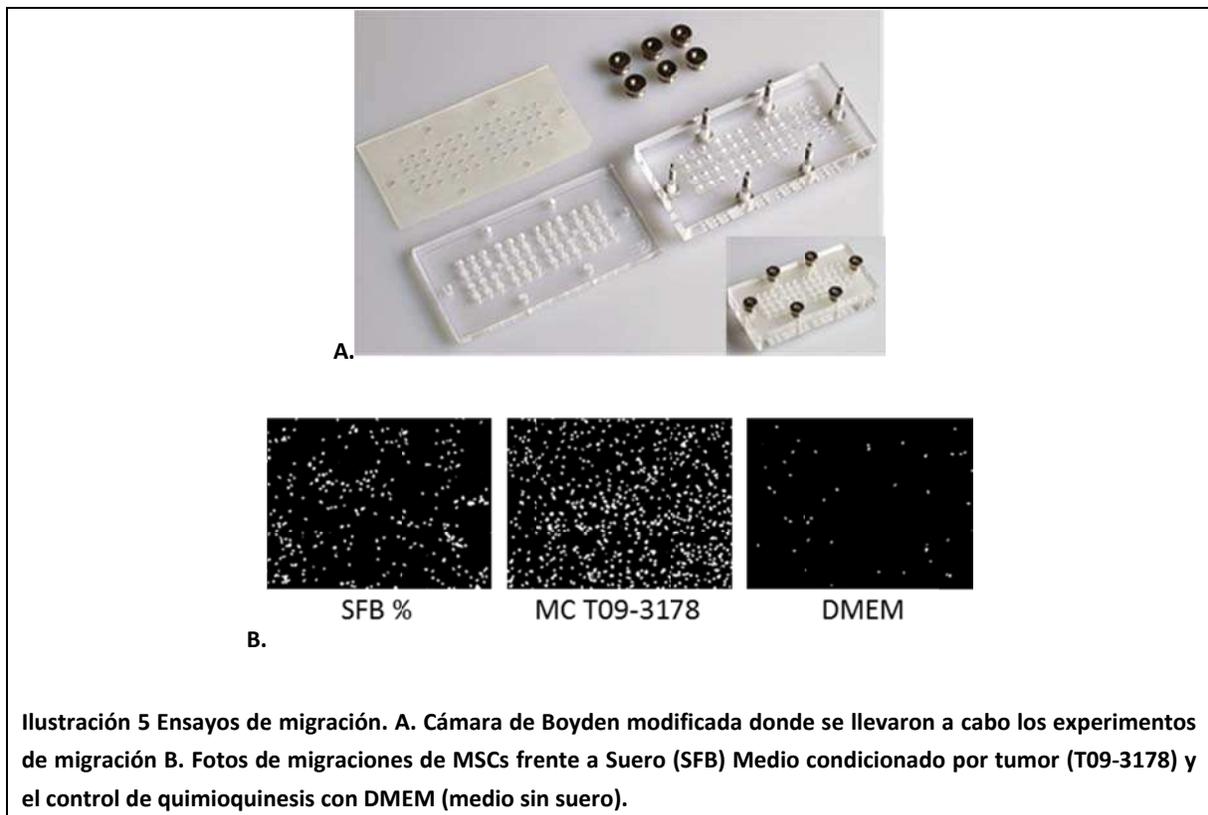
En el caso de las muestras tumorales humanas se separaron las células epiteliales de los fibroblastos asociados a tumor por centrifugación diferencial y se establecieron sendos cultivos de corto plazo en medios selectivos según (Ball, Shuttleworth et al. 2007).

11.7 ENSAYOS DE MIGRACIÓN EN CULTIVO

La capacidad quimiotáctica de los medios condicionados se evaluó por la migración de MSCs en un esquema en 2 dimensiones utilizando microcámaras de chemotaxis de 48 pocillos (Ilustración 5) (AP48, Neuroprobe Inc.) (Funk and Sage 1993). Se utilizaron membranas de policarbonato con poros de 8µm de diámetro sin recubrimiento o recubierta con 10µg/ml de Colágeno tipo I (SIGMA) en agua, 1 µg/ml de Fibronectina humana (SIGMA) o polímero tipo Fibronectina (SIGMA) en PBS durante 12-16hs a 4°C con posterior secado al aire en esterilidad. Dicha membrana se colocó entre dos compartimentos. En el compartimento inferior se colocaron los factores quimioattractantes o los controles en las concentraciones indicadas y en el compartimento superior se colocaron 12.000 células en 50µL del medio (DMEM, 0,1% seroalbúmina bovina) por pocillo. En cada experimento se sembraron tres pocillos por condición como réplica técnica. Se incubó durante 4hs a 37C en 5% de CO₂ y se procedió a desarmar el dispositivo fijando la membrana con las células migradas en una solución de paraformaldehído (PFA) 4% durante 15min. Posteriormente se removieron con hoja de rasurar las células remanentes de la cara superior y se tiñeron los núcleos de las células migradas con una solución de 1 µg/ml Hoechst en PBS durante 20min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados de 5min con PBS se montaron las membranas teñidas en solución de montaje (Gelvatol) entre dos portaobjetos y se tomaron 2 imágenes digitales por pocillo las cuales representan el 75% del pocillo, capturadas una cámara Olympus DP71 montada sobre un microscopio de fluorescencia con objetivo de 10X dando 100X como aumento total y obteniéndose 6 imágenes por tratamiento por experimento. Se contaron los núcleos enteros presentes en cada imagen mediante recuento automático utilizando el programa CellProfiler (Carpenter, Jones et al. 2006)

con parámetros apropiados para dicho recuento optimizados *ad hoc*. Se determinó la migración sobre dos muestras de MSCs, llamadas Naval 34 y Cucaiba 38 para 10 muestras tumorales y sus respectivos tejidos adyacentes. Se realizó el análisis estadístico utilizando la suma de las células contadas por pocillo y el promedio de los tres pocillos de células migradas como resultado por tratamiento para cada experimento. Se realizaron tres ensayos independientes en cada determinación o experimento a menos que se indique lo contrario.

Para determinar la concentración óptima de quimioatracción para células mesenquimales, se realizó el ensayo de migración descrito utilizando una curva de concentraciones crecientes de suero fetal bovino (SFB) de 2 100%, en medio DMEM baja glucosa con 0,1% de seroalbúmina bovina (SAB). Se utilizó DMEM con SFB al 2% como control normalizador entre las migraciones a menos que se indique que la normalización se realizó frente a otro control. Para determinar la potencia de los medios condicionados se probaron curvas de dilución entre 100% y 1% de MC por tumores o líneas celulares con el fin de determinar la dilución óptima para bloquear con anticuerpos.

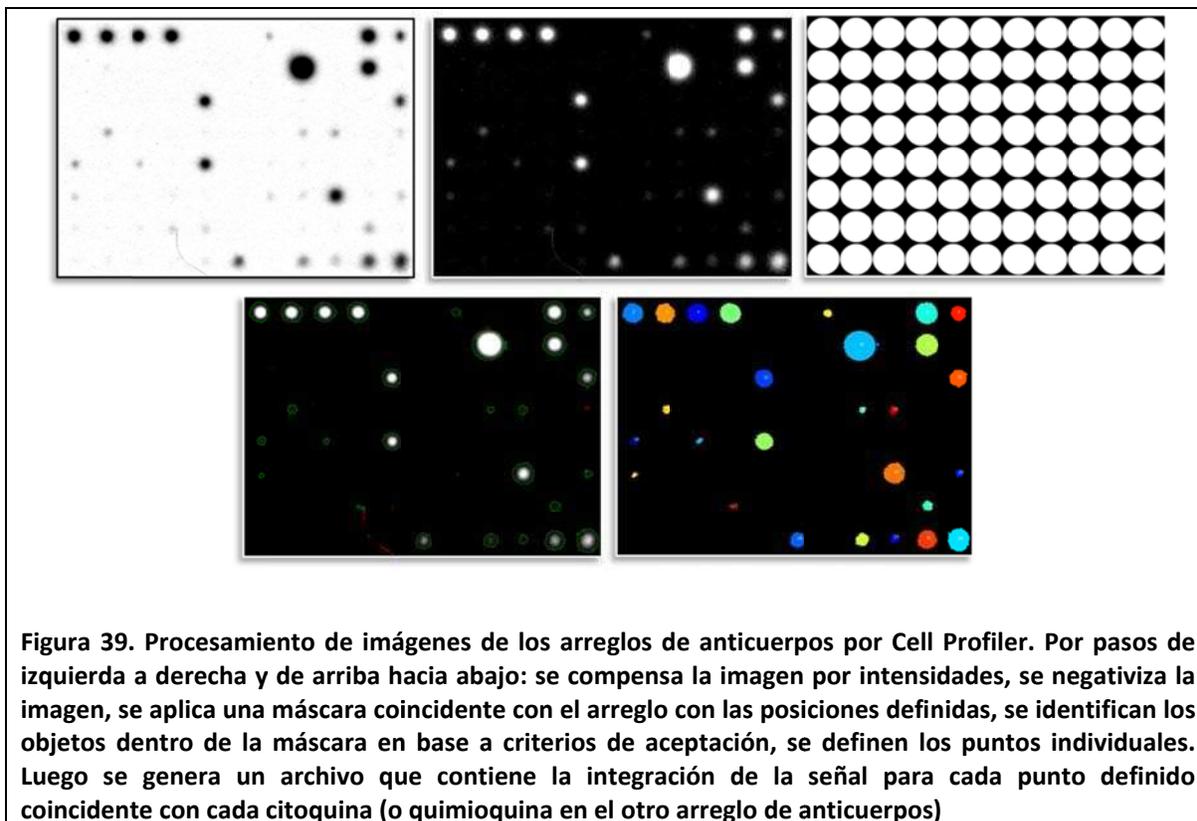


11.8 DETECCIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS PRESENTES EN LOS MEDIOS CONDICIONADOS UTILIZANDO ARREGLOS DE ANTICUERPOS.

Se utilizaron arreglos de anticuerpos comerciales (RayBiotech Inc.) contra 80 citoquinas (AAH-CYT-5) y contra 35 Quimioquinas (AAH-CHE-1) que contienen anticuerpos fijados a una membrana a modo de arreglo con posiciones establecidas arbitrariamente con identidad para cada factor a analizar y de los cuales se obtuvieron en total 96 factores analizados promediando los coincidentes en ambos arreglos.

Esta metodología se encuentra validada por el proveedor en cuando a especificidad de cada anticuerpo lo cual se logró incubando con las citoquinas de manera independiente a fin de evaluar la unicidad de la respuesta en cada punto correspondiente a cada factor en particular descartando que haya señal cruzada con el resto de las posiciones.

Brevemente: se incubó para cada muestra 1ml de medio condicionado en DMEM baja glucosa con 0.1% condicionados por 8 tumores y sus respectivos tejidos adyacentes. Paralelamente se incubaron MC de líneas tumorales de mama, IBH-6 (cedida por la Dra I. Lüthy. IByME), 578T, MCF7 y MDA-MB-231 (ATCC). Además se incubaron MC por fibroblastos fetales (HFL1), adultos normales (FhA) así como los fibroblastos obtenidos de dos muestras de adenocarcinoma mamarios (FAT). Primeramente se bloquearon las membranas con el buffer de bloqueo provisto por el fabricante durante 30 minutos. Luego se incubaron para cada muestra en cada arreglo 1ml de medio condicionado durante 2 horas y se lavaron tres veces con buffer de lavado I y dos veces con buffer de lavado II, durante 5 minutos por lavado. Se resuspendió la mezcla de anticuerpos primarios biotinilados contra citoquinas o quimioquinas en cada caso en buffer de bloqueo y se agregó a cada membrana, se dejó incubando con rotación durante 1 hora. Se repitieron los lavados. Se incubaron las membranas con Streptavidina conjugada a peroxidasa y se lo dejó toda la noche con rotación en frío (4-8C). Se reveló por incubación con reactivos de detección provistos para electroquimioluminiscencia (ECL) y se exponen placas radiográficas con el fin de capturar la luz emitida por los puntos en las membranas. Se escanea por transiluminación y se analiza con software específico para el análisis de imágenes por lote, (Cell Pfiller) mediante una programación realizada *ad hoc*. Las lecturas de cada punto fueron normalizadas en relación a puntos controles internos positivos dispuestos en cada arreglo a través del cociente entre la intensidad medida en cada punto y el promedio de los controles positivos por arreglo. Luego de obtener los principales factores secretados por los tumores se realizó un estudio estadístico para estudiar las diferencias entre la expresión de factores entre los medios tumorales y los respectivos adyacentes utilizando un modelo de mezclas de distribuciones. Ver: Análisis estadístico.



11.9 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN MEDIOS CONDICIONADOS

Para estandarizar la carga proteica de Western blots se cuantificaron proteínas totales de medios condicionados mediante el kit fluorimétrico de alta sensibilidad NanoOrange (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubó el reactivo NanoOrange en una dilución apropiada junto con una alícuota de 100 μ L del medio condicionado puro y otra de medio diluido a la mitad con agua destilada, por 10 min a 96 °C. Luego de 20 min del enfriamiento, se midió la fluorescencia en un fluorímetro de placa GENius (Tecan Instruments, Salzburg, Austria), utilizando como longitud de onda de excitación 485 nm y de emisión 590 nm. La concentración se determinó por comparación con una curva estándar construida con albúmina sérica bovina (SAB) entre 10 ng/ml y 10 μ g/ml.

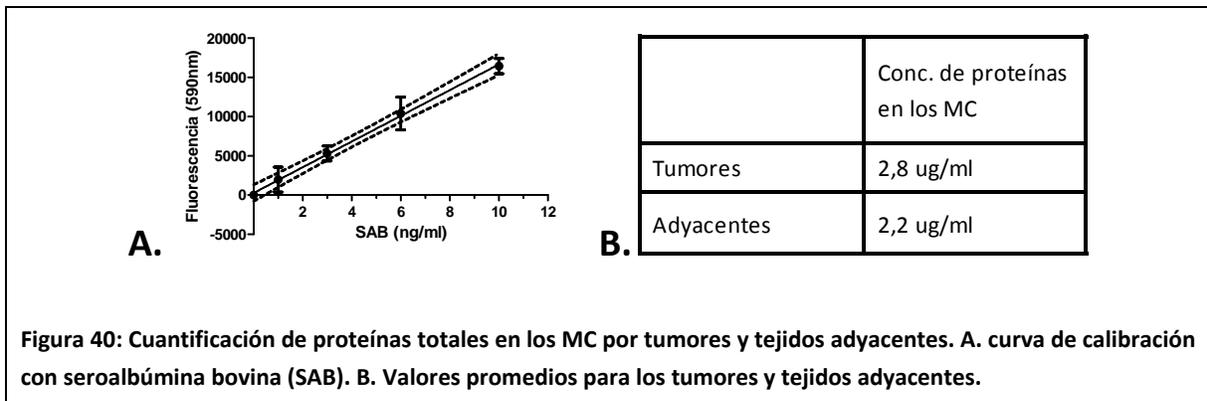


Figura 40: Cuantificación de proteínas totales en los MC por tumores y tejidos adyacentes. A. curva de calibración con seroalbúmina bovina (SAB). B. Valores promedio para los tumores y tejidos adyacentes.

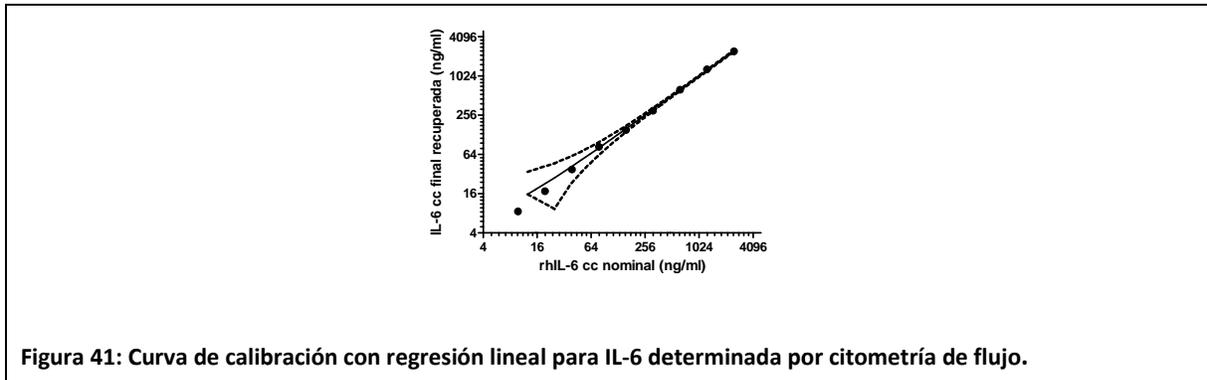
11.10 DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La concentración de IL-6 en MC por muestras tumorales y tejidos adyacentes se analizó utilizando el sistema de arreglo de esferas para el análisis por citometría o “Citometric Beads array” (CBA) (Becton Dickinson Co. o BD) que utiliza conjuntos de perlas espectralmente distintas, conjugadas a una molécula de captura específica. Las perlas se mezclaron con las muestras y se incubaron a reaccionar con los analitos específicos. Una serie de anticuerpos de detección biotinilados específicos para el analito y estreptavidina-PE (Ficoeritrina como fluoróforo) completó el inmunoensayo de tipo sándwich.

Los estándares de quimioquinas están liofilizados y se reconstituyen y diluyen en forma seriada, inmediatamente antes de la mezcla con las esferas (o beads) de captura y el reactivo de detección conjugado con el fluoróforo Ficoeritrina (PE). Los estándares no se pueden conservar, deben prepararse antes de cada uso.

Se transfieren las esferas estándar a utilizar a un tubo de polipropileno de 15ml y se reconstituyen en 4ml de diluyente A. provisto. Se rotula: “Top Standard 2”. Se dejó equilibrar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se pipetea para mezclar. Se rotulan 8 tubos para las diluciones seriadas de los estándares.: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, y 1:256.4. Se pipetea 300µL de diluyente A. en cada tubo y se realizó una dilución seriada comenzando con 300µL de Top Standard 2 en el tubo 1:2. Se mezcla por pipeteo. Se mezclaron las esferas de captura. Se vortexó vigorosamente cada suspensión durante 3 a 5 s. antes de mezclar. Se agregaron a la mezcla de reacción las muestras que se utilizan tal cual y diluidas 1:10 para determinar las citoquinas de mayor concentración que pueden estar por encima del límite superior de cuantificación. Se realizó la calibración del instrumento para el ensayo combinando las diferentes beads provistas con los fluoróforos para la compensación de los canales de detección. (bdbiosciences.com/cbasetup) Con procesadores de señal digital del FACSCalibur,

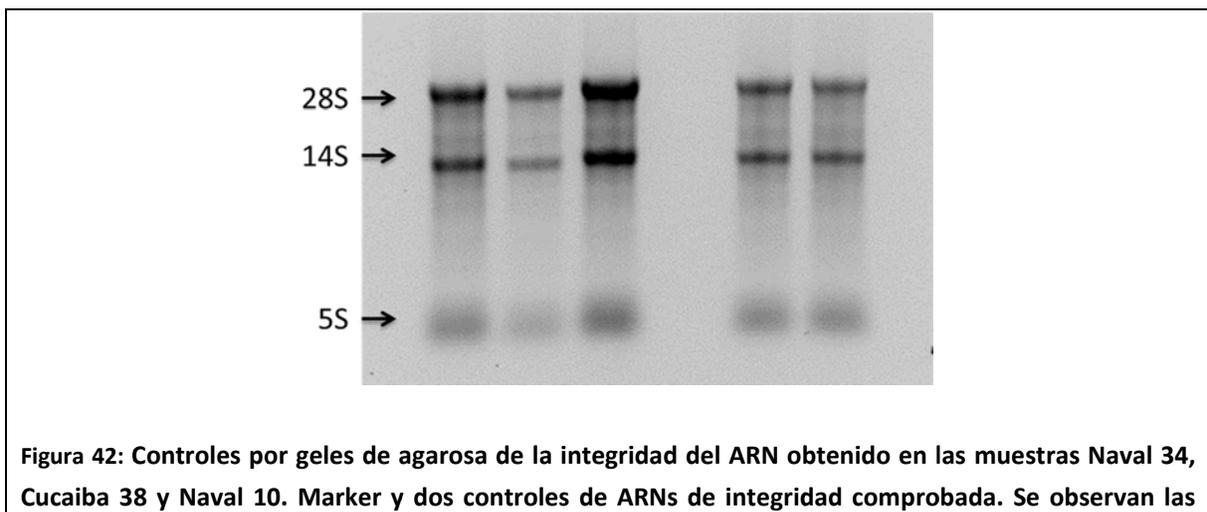
mediante el software Cell Quest Pro (BD) se registraron las señales de fluorescencia después de la excitación con láser y se cuantificó la cantidad de analito capturado en cada muestra. Se registraron cerca de 250 eventos para la curva estándar y cerca de 500 para cada muestra. Ver anexo.



11.11 CUANTIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DEL ARN

Los ARNs obtenidos de los cultivos de MSCs, fueron cuantificados utilizando un espectrofotómetro para micromuestras (Nanodrop ND-1000), la integridad del RNA fue evaluada en geles de agarosa 1% (Figura 42) y por la relación entre las absorbancias 268/280, si la misma es mayor a 1,7 y se ven bien definidas las bandas de 14S y 28s en el gel, el RNA está apto para ser retrotranscripto.

Control de la integridad del RNA en las muestras Naval 10, Naval 34, Cucaiba 38 y dos ARN como control de integridad.



bandas de 28S, 14S y 5S. ARN utilizado para las reacciones de Retrotranscripción (RT) y PCR en tiempo real.

11.12 DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE GPCRS Y TKRS EN MSCs POR RT Y PCR EN TIEMPO REAL.

Dos µg de ARN fueron retro-transcriptos utilizando 200 U de la enzima Transcriptasa Reversa (SuperScript II, Invitrogen) y 500ng de cebadores oligo dT. Posteriormente se procedió a la degradación alcalina del ARN sometiendo a las muestras a un tratamiento con NaOH durante 10 minutos a 65°C. Luego, los ADN copia fueron precipitados con acetato de sodio y etanol y finalmente resuspendidos en agua para ser cuantificados.

En el caso de que los ADN copia fueran utilizados para la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real previamente fueron cuantificados utilizando el reactivo Oligreen (Invitrogen). Este reactivo fluorescente, se intercala entre las moléculas de ADN copia de manera proporcional a la concentración. Brevemente se prepara una curva de calibrado con un ADN copia de concentración conocida que va de 0 a 100ng/ml. Se prepara una dilución del reactivo Oligreen 1/200 en buffer TE. En una placa de 96 pocillos negra, se siembran 100 µl de TE, 1mM de muestra o punto de la curva de calibrado y 100µM de Oligreen. Luego se mide la fluorescencia en un espectrofotómetro a 485/535 nm. Se grafica la curva de calibrado y se calcula la concentración de la muestra por extrapolación de los puntos. Cada medición se realizó por duplicado.

Los ADNs complementarios fueron sujetos a la reacción de PCR en tiempo real en un aparato PCR Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, Agilent Technologies).

Cada 25 µl de volumen de reacción contenían 1 unidad en enzima Taq Platinum DNA Polimerasa (Invitrogen), 1X de buffer de reacción de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1X fluoróforo de referencia ROX, 1.5 mM Mg₂Cl₂, 2.5 mg BSA, 0.01% Glicerol, 200 mM of dNTPs, 0.3 X solución SYBR Green y 0.4 mM de cebadores específicos. Las condiciones de la reacción fueron configuradas de la siguiente manera: 90 segundos a 94 grados centígrados, 30 ciclos de 30 segundos a 94 grados centígrados, 30 segundos a 60 grados centígrados y 30 segundos a 72 grados centígrados. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado y se estudiaron en todos los casos dos muestras de MSCs Naval 34 y Cucaiba 38 como réplicas biológicas. Los resultados obtenidos fueron normalizados con los obtenidos para los genes normalizadores o “housekeeping” HPRT (hipoxantinfosforibosiltransferasa) y B2M (beta2microglobulina) y

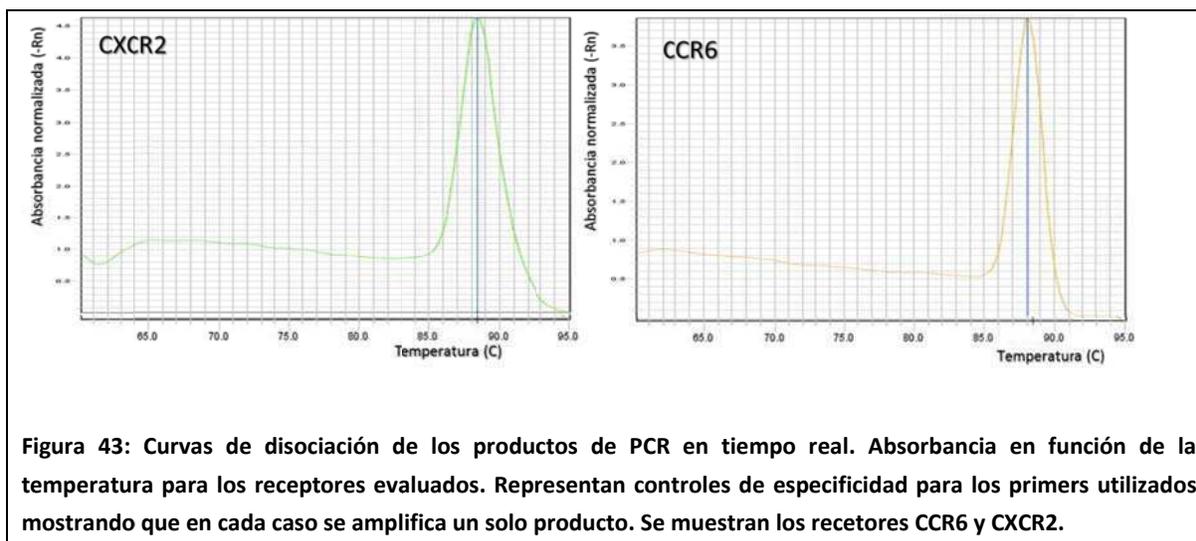
expresados como fracción de los niveles de expresión de los receptores basales que fueron configurados como valor de referencia 1.0 para cada receptor estudiado.

Gen	Secuencia sentido	Secuencia anti sentido
BEta2Micro	ATTCACCCCACTGAGACTGA	CTCGATCCCAGTAGACGGTC
Actina	AGAAAATCTGGCACCACACC	CAGAGGCGTACAGGGATAGC
HPRT	AGACTGAAGAGCTATTGTAAT	CAGCAGTCTGCGACCTTGAC
CCR1	TCACGGACAAAGTCCCTTGAACC	TTCTGGCACGGAGTTGCATCCC
CCR2	CCTGAGACAAGCCACAAGCTGAACA	TGGCCCAATTTGCTTCACGT
CCR3	TCGGACCTGCTCTTCTCGTCA	CGGGCTCGAAGGGCAAACACA
CCR4	GCCTGGCATTGCCTCACAGACC	GCAGGAAGAGCTCCCCAATGCC
CCR5	AGAGCTGAGACATCCGTTCCCCT	CGGGCTGCGATTTGCTTCACA
CCR6	CCACCGGTGCGTGGGTTTTCA	GGCAGATGATTTTGTGCGCGG
CXCR1	GGGCCGCCTCCAAGGTGAAT	TTTGATGGTAAGCCTGGCGGA
CXCR2	TAAGTGCAGCCCCGTGGGGT	TGGGCTCAGGGGCAGGATGG
CXCR3 TVA	GGTCCTTGAGGTGAGTGACCACCA	GGCCCCGTCTGAAGTTCAGGC
CXCR3 TVB	AGTTGAGGAAGTACGGCCCTGGA	GGTCACTCACCTGTGAGGGCG
CXCR4	ACTACACCGAGGAAATGGGCTCAG	CGGCATCAACTGCCCAGAAGGG
CXCR6	CCCTGCTGGTTTCCTTGCCCC	CCCAGTGTGTGCTGCGGATGA
EGFR	GACTGCCTGGTCTGCCGCAA	CGGCAAGGCCCTTCGCACT

Flt-1	TCCCTGCCGGGTACGTCACC	TTTGACTGGGCGTGGTGTGCTT
KDR	GCACGGCATCTGGGAATCCCC	GGCAATCACCGCCGTGCCTA
NPR1	CGTCCTCGTTCTCCCGCGTCT	TCTGGTATGGGTCCGGAGCCTGA
NPR2	ACTCAGGAGGGAAACGCTGACCA	TCAAACGACCTCCGCACGGTG
MET	GGAGTGGCAGCACCCATCGT	CCTGGCGCGCAGCTGTAAAC

Tabla 5 Secuencia de los cebadores utilizados para PCR en tiempo real.

Como control, al final de cada corrida de PCR en tiempo real se evaluó la temperatura de disociación para los productos obtenidos y se utilizaron como controles de especificidad de los primers utilizados. Estos resultados muestran que todas las amplificaciones se tratan de un solo producto por poseer una temperatura de disociación única (un solo pico definido).



11.13 DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE GPCRS EN SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Es posible calibrar métodos de Citometría de flujo (CF) para determinar número absoluto de receptores, aunque este método es usado generalmente para cuantificar cambios relativos. Brevemente, los anticuerpos monoclonales contra CCR6 y CXCR2 mediante un anticuerpo

secundario acoplado a Fluoresceína isotiocianato es usado para detectar los receptores accesibles en la superficie en las células.

Utilizando placas MW6 se tratan las células, ya sea por transfección de SiRNAs o por incubación con distintos medios condicionados. Se lavaron las células con PBS, se tratan con EDTA, se levantan mecánicamente y se incubaron con los anticuerpos monoclonales primarios CXCR2 y CCR6 durante 2h a 4C, se lavaron 3 veces con PBS frío manteniendo en hielo y Se tiñen las células por 1h en solución de anticuerpo secundario hecho en cabra anti ratón acoplado al fluoróforo fluoresceína isotiocianato FITC (BD). Se lavaron las células dos veces con PBS frío en hielo se pasan a tubos de citometría y se mantienen en frío hasta el final de las incubaciones. Se agregaron 0,5ml de buffer de fijado, Formaldehído 1% y se analiza la expresión de fluorescencia en superficie utilizando un citómetro de flujo adecuado (FACScalibur, BD).

11.14 NEUTRALIZACIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS CON ANTICUERPOS BLOQUEANTES

En los ensayos de neutralización los medios condicionados fueron pre-incubados a 4°C por 12-16hs con anticuerpos neutralizantes descritos en la Tabla 6 y utilizados en las diluciones que figuran en el texto. Luego, los MC fueron utilizados como quimioattractantes en ensayos de migración en cultivo.

Ligando	Nombre	Cat.	Ligando	Nombre	Cat.
MCP-1	CCL2	MAB279	IL8RA	CXCR1	MAB330
MIP-1alfa	CCL3	MAB270	IL8RB	CXCR2	MAB331
MIP-1beta	CCL4	MAB271	EGF	EGF	MAB236
RANTES	CCL5	MAB278	VEGF	VEGF	MAB293
MIP-3 α	CCL20	MAB360			

Tabla 6: anticuerpos utilizados en los ensayos funcionales. Todos de R&D systems.

11.15 INMUNOPRECIPITACIÓN DE QUIMIOQUINAS USANDO ANTICUERPOS ESPECÍFICOS Y BEADS MAGNÉTICAS - PROTEÍNA G.

Se parte de Medio condicionado, Idealmente 1mg/ml de proteína total en buffer IP. La capacidad de unión a Anticuerpos es de 400µg de anticuerpo por cada 1ml de beads.

y revelando con un anticuerpo anti ratón hecho en cabra acoplado a HRP (peroxidasa) como secundario. Para realizar la inmunoprecipitación utilizamos una concentración de rhMIP-3α de 150ng/ml. Las IP se realizaron con 1µg/ml y 2µg/ml de anti CXCR1 como control de isotipo no relacionado (MAB330), anti MIP-3α (MAB 360) y anti EGF (MAB236).

Para neutralización se usó 1µg/ml de Ab anti MIP-3α y EGF (por separado o combinados) en MC. Antes de empezar se lavaron las beads con DMEM baja BSA 0,1%. Se incubaron 50µl de las beads con 1000µl de DMEM baja BSA 0,1% y se aplicó magnetismo. Se descartó el sobrenadante justo antes de agregarle a las beads el medio preincubado con los anticuerpos. Se resuspendió en 50µl de DMEM baja BSA 0.1%. Se agregó 1µg/ml Anticuerpo isotipo hecho en ratón. (suero preimmune) Se vortexeó y se incubó 1h a 4C con rotación. Se agregaron 25µl de beads. Se vortexeó y se incubó 1h a 4C con rotación. Pueden hacerse en un solo paso, se incubaron 1h a 4C con rotación. Se aplicó un pulso magnético de 30s. Se pasó el sobrenadante (SN) a otro tubo. A las beads se las sigue como para WB en paralelo con las Beads para el factor. Al SN se agregaron 1 a 5µg (1µg/ml) de Anticuerpo contra factor o (Isotipo de nuevo como control+). Se vortexeó y se incubó 1h a 4C con rotación. Para monoclonales: Se agregaron 5µg de Rabbit anti mouse Ig. Se vortexeó y se incubó a 4C por 30min adicionales. Se agregaron 25µl (5ul/ml) de beads. Se vortexeó y se incubó 1h a 4C con rotación. Se dió un pulso magnético 30s. Se pasó el SN a otro tubo y se usa en MIGRACIÓN. A las BEADS se las siguió como en 9 para WB en paralelo con las Beads para el isotipo. A las BEADS se agregaron 500µl de Buffer IP. Se le dio un pulso magnético y se descartó el sobrenadante. Se repitió el lavado 2 veces más. Se resuspendió las BEADS en 30µl de 3X SDS Sample Buffer. Se Incubó a 70C por 5 min. Se da un pulso magnético por 30s y el sobrenadante se lo carga en el gel para WESTERN BLOT. Laemmli buffer 5X: 3X SDS Sample Buffer: 187.5mM Tris-HCl (pH6.8), 6% (p/v) SDS, 30% Glicerol, 150 mM DTT, 0.03% (p/v) azul bromofenol, 2% Betamercaptoetanol.

11.16 SILENCIAMIENTO POSTTRANSCRIPCIONAL DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS POR TRANSFECCIÓN DE ARN PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA (SiRNAs) DE DOBLE CADENA EN MSCs

Para reducir la expresión de receptores seleccionados de quimioquinas para evaluar su rol en la migración de MSCs se transfectaron ARNs de interferencia pequeños o SiRNA por sus siglas en inglés (OriGENE) en cultivos de MSCs.

Se adquieren tres secuencias A, B y C por separado y luego se mezclan en un solo stock de reactivo. Según el proveedor cada secuencia se encuentra validada para reducir en un 70% o más la expresión del ARN mensajero del gen blanco.

Stock del SiRNA: ARN doble cadena de 27nt 3 secuencias diferentes (A, B, C) para cada gen.

Reactivo stock original en viales 2nmoles.

Dilución madre A, B, y C por separado:

Dilución de uso: A+B+C

Buffer de transfección utilizado: Buffer jetPRIME

Se diluyen 22 a 110 pmoles de siRNA (a una concentración final de 10 a 50nM por well) en 200µl de buffer jetPRIME. Se Vortexeó 10s. Se agregaron 4µl de reactivo jetPRIME. Se Vortexeó por 10s. Se centrifuga brevemente. Se incubó a Temperatura ambiente por 10 – 15 min. Se agregaron los 200µl gota a gota a cada well con células.

Secuencias de los siRNAs.

SCRUMBLE (SCR) o control negativo: Se trata de una secuencia aleatoria la cual se comprueba mediante análisis informático que no posee secuencias blanco para el silenciamiento en humanos.

SR30004: rCrGrUrUrArArUrCrGrCrGrUrArUrArArUrArCrGrCrGrUrArT

CCR1

SR300869A - rArGrUrUrGrArGrArCrCrUrArArCrGrArGrArArUrArGaa

SR300869B - rGrGrGrArUrArGrArGrArGrGrArArUrGrUrArArUrGrGtg

SR300869C - rGrCrArCrGrGrGrCrCrArUrArUrGrArArUrArArCrArUrGgt

CCR6

SR300874A - rCrCrArUrUrGrUrArCrArGrGrCrGrArCrUrArArGrUrCrAtt

SR300874B - rArGrArCrCrGrCrArGrArUrArArCrGrArCrArArUrGrCrGtc

SR300874C – rCrArUrGrUrUrUrArArArCrCrUrGrArCrArArUrGrGrUrGtt

CXCR2

SR300874A - rCrCrUrCrArArGrArUrUrCrUrArGrCrUrArUrArCrArUrGgc

SR300874B - rCrCrCrArGrUrCrArGrGrArUrUrUrArArGrUrUrUrArCrCtc

SR300874C - rGrCrCrArUrArArUrUrArCrUrArUrGrUrCrArUrUrUrGrCtg

Procedimiento: Se crecieron en cultivo MSCs en P100 hasta confluencia 70%. Se tripsinizaron las células y se plaquearon en MW6 a 150.000 células/well. Se incubaron 24h en medio de cultivo. Se transfectaron con siRNA – jetPRIME acorde al protocolo del fabricante (JetPrime, Polyplus), usando 10nM como concentración del siRNA. Se cambió el medio a las 6 horas desde la transfección. Se determinó la eficiencia de transfección por microscopía con un control de transfección con siRNA doble cadena fluorescente. Se lavaron las células en frío con PBS dos veces con 1ml de PBS y se tratan con 50µl de Buffer Laemmli manteniendo el frío. Se colectó el buffer mediante raspado del fondo de la placa de cultivo con un raspador plástico. Se colectó el RNA con solución TRIZOL (Invitrogen) y proteínas con Laemmli buffer a las 24, 48 y 72 h. Se determinó la reducción de la expresión de los receptores, por Western Blot a las 72h desde la transfección

En paralelo de otra placa MW6 se levantaron las células para ensayo de migración en el tiempo óptimo 24h posteriores a la bajada de la proteína.

11.17 GELES DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOTS

Los medios condicionados, como las fracciones provenientes de filtraciones o concentraciones se mezclaron directamente (sin precipitación o dilución previa) con buffer muestra 6x (10 % v/v glicerol, 62.5 mM Tris-HCL (pH 6.8), 2 % w/v SDS, 0.01 mg/mL ABF) conteniendo 400 mM de DTT como agente reductor (Sambrook and Russell 2001). De cada muestra se sembraron 25 μ L en geles de SDS-PAGE al 10-12 % según el caso, y se corrió la electroforesis a 180 V hasta que el ABF llegó al 95% de la longitud del gel. Los geles resultantes se tiñeron con coloración de Azul Coomassie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham GE) para su posterior procesamiento por Western blot (Sambrook and Russell 2001). Luego de transferir los geles, se bloquearon las membranas con 3 % w/v de leche descremada en PBS Tween 20 0,05% por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Seguidamente, las membranas bloqueadas se incubaron durante 16 hs a 4 °C en agitador con el anticuerpo monoclonal.

Para detectar factores en los medios condicionados: Se incubó con anticuerpos monoclonales hechos en ratón para MIP-3 α y EGF, (R&D systems) primarios 2 μ g /ml en PBS leche 10% Tw 0.05% ON a 4C o 2h a T. amb.

Para detectar los receptores en las MSCs: se plaquearon MW 6 en cultivo con 100.000 a 150.000 células previamente transfectadas para los SiRNAs correspondientes. Se pasan y se mantienen en hielo se lavaron con PBS frío y se agregaron 50 μ L de Laemmli Buffer. Se carga en geles de PAGE SDS al 12% Se incubó con anticuerpos monoclonales hechos en ratón para CCR6 o CXCR2, según corresponda al tratamiento del silenciamiento, (R&D systems) primarios 2 μ g/ml en PBS leche 10% Tw 0.05% ON a 4C o 2h a T. amb.

Para el revelado: Se lavó tres veces con PBS Tween 20 al 0,05%. Se incubó con Ac secundario anti ratón hechos en cabra conjugados a peroxidasa (HRP) 1/5000 en PBS Tw 0.05% 1h a Temp. ambiente, ambos en las diluciones recomendadas por el laboratorio comercial. Las bandas reactivas se detectaron mediante la utilización de un sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa siguiendo las indicaciones del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Se lavó tres veces con PBS tween 0.05%. Se reveló con reactivo ECL Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate: Thermo Scientific. Se mezclan 1000 μ l de reactivo A con 25 μ l reactivo B y se homogeneiza. Se incubó la membrana 5 min de cada lado y luego se vuelve al PBS. Se reveló con placas autorradiográficas

11.18 CUANTIFICACIÓN DE MIP-3A MEDIANTE ELISA.

Para la validación técnica de MIP-3 α se utilizó la técnica de ELISA de tipo sándwich en donde un anticuerpo de captura monoclonal (MAB360, R&D) anti MIP-3 α se adhiere a una placa MW96. Se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos y se incubó con la curva de proteínas entre 0,5 a 100 ng/ml ON a 4C luego se lavó en paralelo con los MC por tumores, tejidos adyacentes y células de línea de cáncer de mama IBH-6 y 578T. Luego se lavó tres veces con PBS y se incubó con un anticuerpo anti MIP-3 α policlonal (Abnova) utilizado como anticuerpo de revelado. Se lavó cuatro veces con PBS y se reveló con el sistema de revelado provisto en el kit. Con 200 μ l de la mezcla de los reactivos A y B. La reacción colorimétrica se detuvo por adición de 200 μ l de Ácido sulfúrico 2N. Se determinó la absorbancia en cada punto en lector de placas a 450nm. Se graficaron los puntos de la curva y se extrapolan los valores de las muestras analizadas por triplicado.

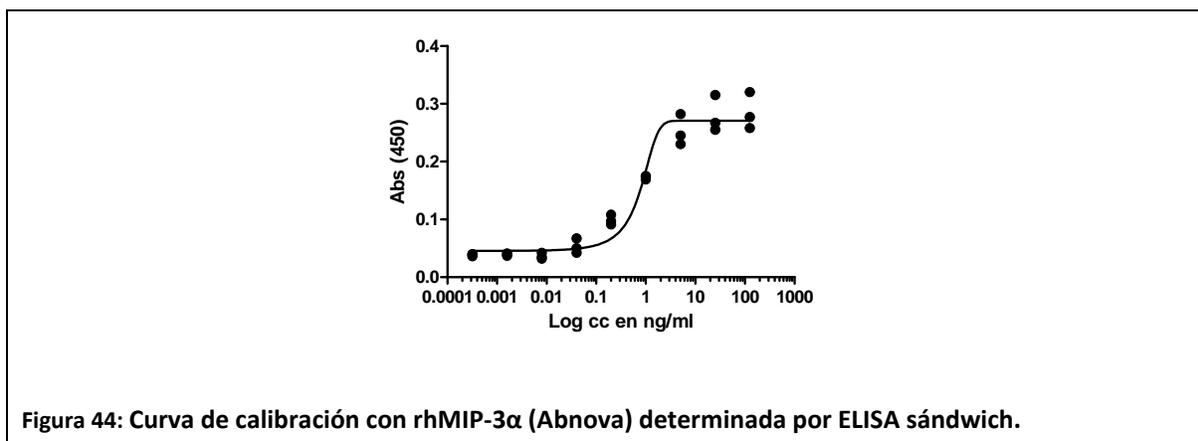


Figura 44: Curva de calibración con rhMIP-3 α (Abnova) determinada por ELISA sándwich.

11.19 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN IN VITRO

La proliferación de las células in vitro crecidas sobre plástico se realizó mediante el método colorimétrico del MTS (Promega) (Cory, Owen et al. 1991). El ensayo se basa en la conversión del MTS a formazán soluble por acción de la enzima dehidrogenasa presente en células metabólicamente activas. La medición de formazán a 490nm es directamente proporcional al número de células viables. Experimentalmente el ensayo consistió en sembrar entre 500 y 1000 células por pocillo en placas multiwell de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo adecuado. Al momento del análisis, se agregaron 20 μ l de MTS/PMS preparado según las especificaciones del fabricante a cada pocillo conteniendo 100 μ l de medio de cultivo. Luego de tres horas de incubación, la absorbancia de cada pocillo fue leída en un lector de Elisa de microplacas a 490nm. Cada condición experimental fue realizada por cuadruplicado.

11.20 INMUNOHISTOQUÍMICAS E INMUNOFLUORESCENCIAS

Se evaluaron cortes tumorales de 8 μm de espesor de tacos en parafina correspondientes a todas las muestras tumorales y de los tumores crecidos en ratones nude. Estos cortes fueron desparafinados en xileno y rehidratados en gradiente de etanol. Para desenmascarar los antígenos, los cortes fueron inmersos en buffer citrato (pH=6) y calentados con vapor de agua en microondas durante 20 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada mediante incubación de los cortes en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 15 minutos. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados por incubación en suero normal de cabra al 10% en volumen en PBS.

El exceso de suero fue removido y se procedió a incubar los cortes durante toda la noche en cámara húmeda a 4 grados centígrados con diluciones 1: 50 en solución bloqueante de anticuerpos monoclonales contra MIP-3 α /CCL20 (RnD systems, Promega, Santa Cruz Biotechnology). Luego, los vidrios donde se encontraban fijados los cortes fueron lavados 2 veces en PBS durante 10 minutos e incubados durante 45 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de cabra anti ratón o burro anti-cabra (Jackson Immune Research), en dilución 1:400. Posteriormente se lavaron los cortes 2 veces con PBS por 5 minutos y se los incubó con el reactivo Vectastain ABC reagent (Vector Laboratories), que se basa en un complejo streptavidina-peroxidasa, durante 45 minutos a temperatura ambiente .

El color de la reacción fue desarrollado mediante el agregado del sustrato específico de la peroxidasa, la diaminobencidina (DAB) (Substrate Chromogen System, DakoCytomation). Alternativamente se utilizaron reactivos para revelado con anticuerpos secundarios para monoclonales de ratón o para policlonales hechos en cabra (Dako). Finalmente las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina para poder evidenciar los núcleos y la histología en general, se deshidrató y se montaron en portaobjetos.

11.21 HISTOLOGÍA

Para los estudios histológicos las muestras tumorales fueron fijadas en buffer neutral conteniendo 3,7% de formaldehído antes de la inclusión en parafina y cortado en secciones de 5 μm . Después de la hidratación las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina y fotografiadas en un microscopio Olympus BX60. Para las inmunofluorescencias las muestras tumorales fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) 4% por 1 hora e incubadas por una noche en sacarosa 30% y crio-preservadas en OCT, y conservadas a -20°C. Las secciones de 9 μm

obtenidas mediante corte por criostato fueron montadas en portaobjetos gelatinizados. Se realizó la inmunofluorescencia para Fluc utilizando un anticuerpo anti-Fluc hecho en cabra (Promega) seguido de un anticuerpo anti cabra hecho en burro acoplado al fluoróforo Cy3 como secundario.

11.22 MODELOS *IN VIVO*. SEGUIMIENTO DE MSCs Y TUMORES *IN VIVO*.

11.22.1 *Análisis del crecimiento tumoral in vivo*

Los tumores *in vivo* se generaron en ratones atímicos N:NIH(S)-nude mice (o ratones Nude) hembras de entre 8 y 10 semanas de vida. Ratones nude recibieron una inyección de 6×10^6 células de cáncer de mama IBH-6 solas o con cantidades equivalentes de Fibroblastos, en forma ortotópica bajo el segundo pezón abdominal en el tejido mamario o Fat Pad, en un volumen total de 100 μ l de PBS. Cuando se inyecta en ratones nude la línea IBH-6 típicamente da origen a carcinomas poco diferenciados sin diferenciación glandular con una alta tasa de proliferación. Las células expresan receptor de progesterona B y citoqueratinas. La expresión del receptor de estrógeno sólo está presente en el núcleo de algunas células y resultan negativas para vimentina (Bruzzone, Vanzulli et al. 2009).

Para determinar el crecimiento tumoral, se midió el diámetro perpendicular mayor y menor, para establecer el tamaño tumoral de acuerdo a la ecuación $Vol=d1^2 \times (d2/2)$, donde d1 es el diámetro menor y d2 es el diámetro mayor. Dependiendo del experimento en cuestión el tamaño tumoral fue evaluado además por fluorescencia utilizando el bioluminómetro (Xenogen / IVIS Lumina / Perkin Elmer). Para la determinación del tiempo de análisis para la extracción de las muestras tumorales y demás tejidos se tomó en cuenta a (Bentzon, Stenderup et al. 2005). Los ratones fueron monitoreados durante 2 meses o hasta que alcanzaron el tamaño tumoral de 2 cm^3 , momento en el cual fueron sacrificados de acuerdo a los protocolos aprobados por CICAL.

11.22.2 *Determinaciones in vitro e in vivo de la actividad de luciferasa*

Para realizar este ensayo se utilizó el kit Renilla Luciferase Assay System (Promega Corp., Madison, WI). Este sistema reportero implica la expresión de la enzima reportera del celenterado Renilla (*Renilla reniformis*). La detección *in vitro* de esta enzima se realiza mediante el agregado del sustrato específico, la luciferina *coelenteracina* (Promega). La luz emitida se analiza en un luminómetro de placa GENius (Tecan Instruments, Salzburg, Austria).

Para determinar la actividad *in vivo* producida por las enzimas luciferasa de la luciérnaga (Firefly) (*Photinus pyralis*) se administraron en forma intraperitoneal 100µl (1µg por kg de animal) del sustrato específico para sistemas *in vivo* *D-Luciferina* (invitrogen).

11.22.3 Seguimiento de MSCs en un sistema de imágenes *in vivo* (IVIS)

Las inyecciones en ratones nude de células tumorales junto con fibroblastos se realizaron como se explica en: Análisis del crecimiento tumoral *in vivo*. Las células tumorales y/o los fibroblastos se tiñeron previamente con colorantes fluorescentes lipofílicos, las carbocianinas DiO, DiR, CMDiI (Molecular probes) para el monitoreo de tumores por IVIS. Los tumores se siguieron en un equipo de imágenes *in vivo* (IVIS LUMINA Xenogen) sin la necesidad de matar a los ratones lo cual posibilita reducir el n experimental a un mínimo siendo cada ratón su propio control en el tiempo. Para las inyecciones tumorales se inyectaron 10.000 células de manera de dejar un espacio y formando un botón cercano al tumor. Las MSCs se siguieron por Bioluminiscencia luego de ser transducidas con un adenovirus pAd-kBF512HRE-Luc donde la expresión de la enzima F-Luc está controlada por el promotor mínimo de SPARC (un gen que codifica para la proteína de matriz extracelular, de alta expresión en nuestras MSCs) y regulado por elementos potenciadores o “enhancer” sensibles a hipoxia HRE (Viale, Cafferata et al. 2013). Para el seguimiento *in vivo* al momento de la medición se inyectaron de forma intraperitoneal 10µg/g de *D-Luciferina*, sustrato de la enzima Firefly Luciferasa ; luego de 5 minutos la señal bioluminiscente permaneció constante por más de 30 minutos tiempo suficiente para realizar las determinaciones.

11.22.4 Cuantificación de MSCs incorporadas en tumores por Citometría de flujo.

Para la cuantificación de MSCs incorporadas en los tumores en el modelo *in vivo* se utilizaron los colorantes lipofílicos del tipo carbocianinas DiO y DiR (Molecular probes) tanto para realizar el monitoreo por IVIS (DiR) como por citometría (DiO y DiR) en paralelo. Para la cuantificación de los eventos doble-positivos (MSCs DiO+DiR+) se combinó la marca de DiO y DiR. Un control fundamental en este tipo de análisis mediante citometría de flujo es la determinación de señal inespecífica asociada a células muertas, detritos celulares como así también células apareadas como dobletes o tripletes. Con el compromiso de descartar los eventos fallidos y solo tener en cuenta las células diploides como eventos únicos, se trataron las muestras con el colorante nuclear 7 aminoactinomicina D (7AAD) el cual no superpone su espectro de emisión con los otros fluoróforos (Ilustración 6). El 7AAD se utiliza para marcar eventos correspondientes a células ya que fluoresce solo cuando está intercalado en el ADN. Es detectado en el citómetro

por un canal adicional a los mencionados para DiO y DiR. Como control se utilizaron células o tumores disgregados sin incubar con el colorante y se determinó el marcador M1 el cual permite identificar los eventos deseados.

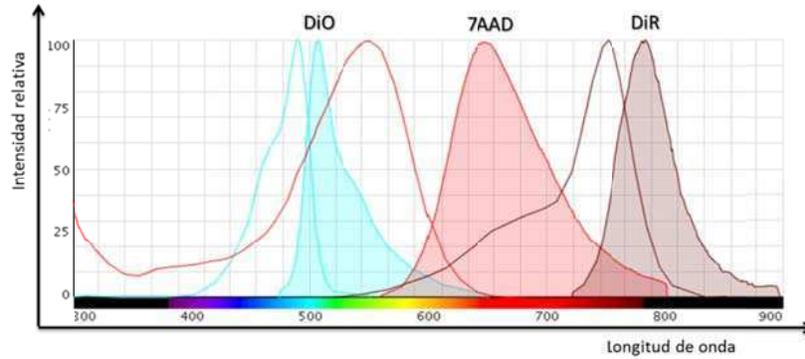


Ilustración 6 Elección de fluoróforos para el seguimiento de MSCs por Citometría.

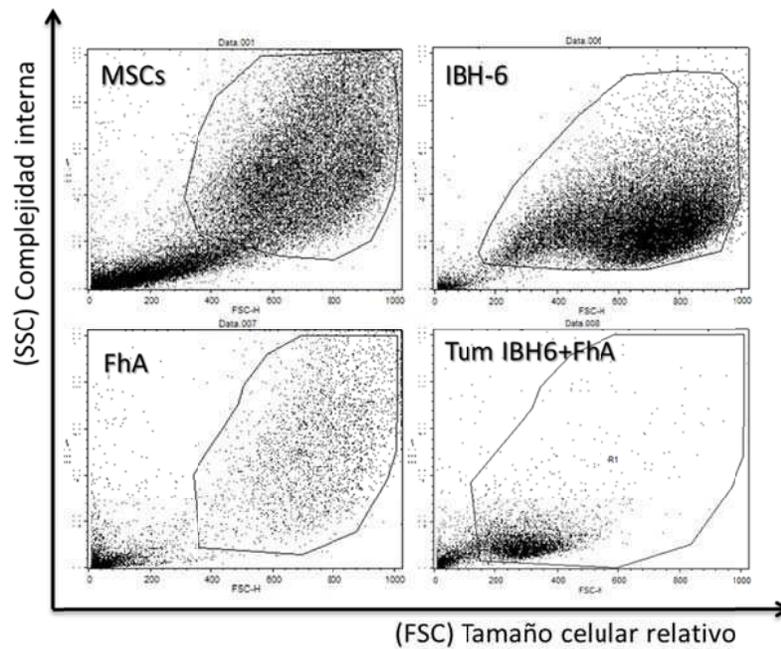


Figura 45 Determinación de la región para las poblaciones de células en cultivo y tumores disgregados *ex vivo*. Se muestra en el eje vertical el detector SSC (Side Scatter) que determina la granulosis o complejidad interna celular y en el eje horizontal el FSC (Forward Scatter) que determina el tamaño relativo de los eventos adquiridos.

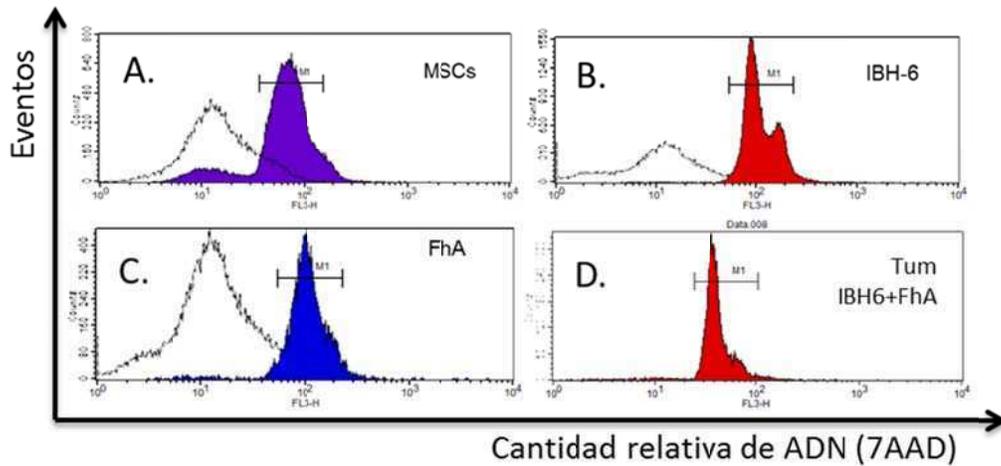


Figura 46 Se grafican como histogramas los eventos adquiridos tras la incubación con 7AAD, A. MSCs, B. IBH-6 C. fibroblastos D. Tumor con MSCs inyectadas 30min antes de la disección (control de las inyecciones peritumorales)

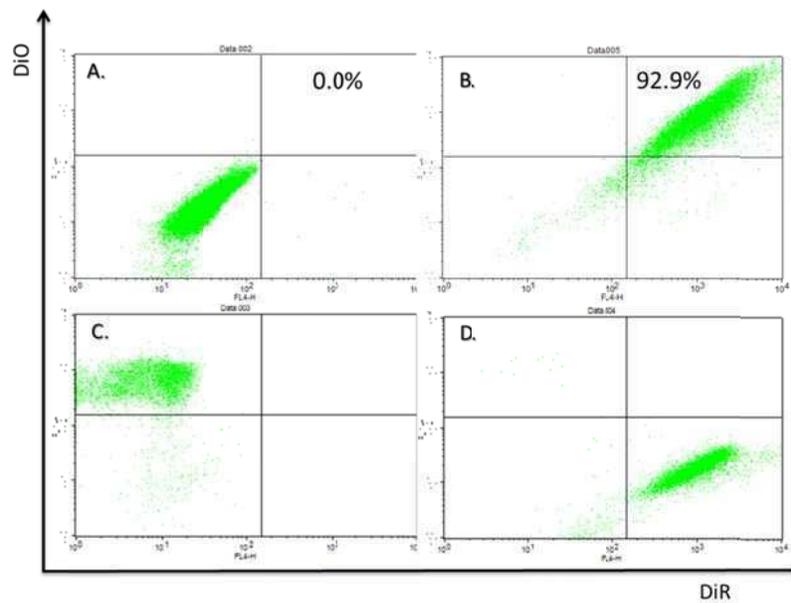


Figura 47. Criterio de positividad para MSCs marcadas en cultivo. Se muestran las MSCs A. Sin teñir B. Coteñidas con DiO y DiR al igual que las MSCs inyectadas en el modelo *in vivo*. C. Teñidas solo con DiO D. Teñidas solo con DiR. Se determinan los cuadrantes en función de dejar 0 (cero) eventos en el cuadrante superior derecho en el caso de las MSCs sin teñir. Se mantienen los cuadrantes así configurados para el resto de las muestras.

11.23 NORMAS DE BIOÉTICA EN EL USO DE MUESTRAS HUMANAS Y ANIMALES DE LABORATORIO.

En cada caso de obtención de las muestras humanas, tanto los tumores obtenidos de cirugías como de las muestras de médula ósea obtenidas de donantes sanos, se firmó un consentimiento informado y tanto éste como el protocolo usado para la obtención de las muestras fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Fundación Instituto Leloir (CBFIL). En el caso del trabajo con animales se siguieron los protocolos para el trabajo con animales de bioterio aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) formada *ad hoc* en la Fundación Instituto Leloir. Estas comisiones, de acuerdo con las normas internacionales, están formadas tanto por miembros pertenecientes a la Institución como por miembros externos.

11.24 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media y su desvío estándar. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía y contrastes de Bonferroni. Previo a la realización del ANOVA, se comprobó que los datos cumplieran con los principios de normalidad y homocedacea. Los resultados de las neutralizaciones se analizaron por ANOVA de dos factores debido a que se combinaron los tratamientos con anticuerpos anti ligandos y anti receptores en las células. Los experimentos de crecimiento *in vivo* fueron analizados mediante ANOVA de mediciones repetidas. El test t de student fue aplicado para calcular la significancia estadística cuando se contrastaron dos condiciones.

Para el análisis estadístico de la distribución de factores comparativo entre las muestras tumorales y los tejidos adyacentes se utilizó un Modelo de mezclas de distribuciones. Este modelo resuelve la gran cantidad de ceros encontrados en las muestras y de difícil interpretación por los modelos estadísticos comunes. Este análisis estuvo a cargo del grupo de trabajo del Bioingeniero Dr. Elmer Fernández de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Católica de Córdoba.

Descripción del análisis: los modelos de mezclas finitas permiten el desarrollo de herramientas de análisis estadístico de gran flexibilidad, aptas para aplicaciones en genética y medicina. El modelo consiste en asumir que los datos observados provienen de una distribución cuya densidad de probabilidad es una combinación de dos o más distribuciones. Si una variable aleatoria “y” es una mezcla de k distribuciones, entonces su función de probabilidad es una suma de k distribuciones cada una ponderada según la participación de casos en la mezcla que

siguen una distribución particular. Dicha ponderación se realizó a través de pesos w_j que están en el intervalo $(0, 1]$ que indicó la proporción del componente j en la mezcla, con $j=1, \dots, k$. Las distribuciones pueden ser tanto simétricas como asimétricas e incluso degeneradas (por ejemplo una parte de las observaciones estar concentradas en cero sin variabilidad alguna). Un caso de mezclas que ha encontrado numerosas aplicaciones en la genética, por ej. el análisis de QTL (de quantitative trait loci), es el caso de la mezcla de normales, principalmente por las propiedades de estabilidad de esta distribución y el teorema central del límite. Los datos de este tipo proporcionan información sobre la expresión de cada proteína en ambos tipos de tejido (caso-control o, en nuestro caso, Tumor-Adyacente) y el análisis estadístico, típicamente, es basado en las diferencias de la expresión normalizada, proteína por proteína, evaluada a través de un test t. Este tipo de tratamiento estadístico es adecuado cuando las distribuciones de las expresiones normalizadas son gaussianas. Sin embargo, debido a limitaciones técnicas y/o a la existencia de proteínas con niveles de expresión por debajo de los límites de detección, las distribuciones de las expresiones pueden estar contaminadas por valores cero y no responder a un modelo de distribución Normal. La propuesta es realizar la comparación estadística, proteína por proteína considerando los sujetos como bloques (para descontar el efecto sujeto) bajo un modelo de mezcla de dos distribuciones: una gaussiana y una distribución degenerada en cero. Este abordaje permitió incorporar en el análisis aquellas proteínas que presentan muchos ceros debido a que no superaron el umbral de detección mediante el software de interpretación de las imágenes (Cell Profiler). En abordaje habitual, estas proteínas usualmente se descartan del análisis, sin embargo nosotros suponemos que el hecho de no ser detectadas es información valiosa que solo puede recuperarse mediante la aplicación de estos modelos de mezcla finita de distribuciones.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- A Ktolic, J. C. (2002). "Cancer and aging a model for the cancer promoting effects of the aging stroma." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **34**: 1401-1414.
- Ades, E. W., F. J. Candal, et al. (1992). "HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line." J Invest Dermatol **99**(6): 683-690.
- Adini, A., O. Fainaru, et al. (2009). "Matrigel cytometry: a novel method for quantifying angiogenesis in vivo." J Immunol Methods **342**(1-2): 78-81.
- Alon, R. and S. W. Feigelson (2012). "Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts." Curr Opin Cell Biol **24**(5): 670-676.
- Alon, R. and Z. Shulman (2011). "Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers." Exp Cell Res **317**(5): 632-641.
- Ball, S. G., C. A. Shuttleworth, et al. (2007). "Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors." J Cell Biol **177**(3): 489-500.
- Barcellos-Hoff, M. H. (1998). "The potential influence of radiation induced microenvironments in neoplastic progression." Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia **3**(2).
- Behbod, F. and J. M. Rosen (2005). "Will cancer stem cells provide new therapeutic targets?" Carcinogenesis **26**(4): 703-711.
- Bentzon, J. F., K. Stenderup, et al. (2005). "Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene." Biochem Biophys Res Commun **330**(3): 633-640.
- Bianchi, G., A. Muraglia, et al. (2001). "Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells." Wound Repair Regen **9**(6): 460-466.
- Bilbao, G., J. Gomez-Navarro, et al. (1998). "Targeted adenoviral vectors for cancer gene therapy." Adv Exp Med Biol **451**: 365-374.
- Biswas, P., F. Delfanti, et al. (1998). "Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line." Blood **91**(1): 258-265.
- Blaese, M., T. Blankestein, et al. (1995). "Vectors in cancer therapy: how will they deliver?" Cancer Gene Ther **2**(4): 291-297.
- Boltonrade, M. F., L. Sganga, et al. (2012). "A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus." Stem Cells Dev **21**(14): 2689-2702.
- Buder, S. P., D. J. Fink, et al. (1994). "Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy." J Cell Biochem **56**(3): 283-294.

- Bruzzo ne, A., S. I. Vanzulli, et al. (2009). "Novel human breast cancer cell lines IBH-4, IBH-6, and IBH-7 growing in nude mice." J Cell Physiol **1219**(2): 477-484.
- Buhring, H. J., V. L. Battula, et al. (2007). "Novel markers for the prospective isolation of human MSC." Ann N Y Acad Sci **1106**: 262-271.
- Carpenter, A. E., T. R. Jones, et al. (2006). "CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes." Genome Biol **7**(10): R100.
- Cassier, P. A., I. Tilleux, et al. (2011). "Prognostic value of the expression of C-Chemokine Receptor 6 and 7 and their ligands in non-metastatic breast cancer." BMC Cancer **11**: 213.
- Clahsen, T. and F. Schaper (2008). "Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration." J Leukoc Biol **84**(6): 1521-1529.
- Cory, A. H., T. C. Owen, et al. (1991). "Use of an aqueous soluble tetrazolium/fofomazana assay for cell growth assays in culture." Cancer Commun **3**(7): 207-212.
- Crigler, L., R. C. Robey, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis." Exp Neurol **198**(1): 54-64.
- Denox, P. F. (1959). "[Methods of early diagnosis of human cancer]." Prese Med **67**(1): 15-17.
- Descaseaux, F., F. Gindraux, et al. (2003). "Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med,low phenotype." Br J Haematol **122**(3): 506-517.
- Dittmar, T., C. Heyder, et al. (2008). "Adhesion molecules and chemokines: the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner." Clin Exp Metastasis **25**(1): 11-32.
- Dixit, N. and S. I. Simon (2012). "Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest." Front Immunol **3**: 188.
- Dwyer, R. M., S. M. Potter-Beime, et al. (2007). "Monocyte Chemotactic Protein-1 Secreted by Primary Breast Tumors Stimulates Migration of Mesenchymal Stem Cells." Clinical Cancer Research **13**(17): 5020-5027.
- El-Haibi, C. P. and A. E. Kamoub (2010). "Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia **15**(4): 399-409.
- Escobar, P. F., R. J. Patrick, et al. (2007). "The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups." Ann Surg Oncol **14**(1): 143-147.
- Fattaneh A, T., Devilee Peter (2003). World Health Organization: Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of the Breast and Female Genital Organs.
- Fiedler, J., F. Leucht, et al. (2005). "VEGFA and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells." Biochem Biophys Res Commun **334**(2): 561-568.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja, et al. (1976). "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs." Exp Hematol **4**(5): 267-274.

- Fiedl, P., K. S. Zancker, et al. (1998). "Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function." *Microsc Res Tech* **43**(5): 369-378.
- Funk, S. E. and E. H. Sage (1993). "Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts." *Journal of Cellular Physiology* **154**: 53-63.
- Gunzer, M., P. Fiedl, et al. (2000). "Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines." *J Leukoc Biol* **67**(5): 622-629.
- Guo, H. B., I. Lee, et al. (2002). "Aberrant N-glycosylation of beta1 integrin causes reduced alpha5beta1 integrin clustering and stimulates cell migration." *Cancer Res* **62**(23): 6837-6845.
- Hanahan, D. and Robert A. Weinberg (2011). "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hansell, C. A., C. E. Hurson, et al. (2011). "DARC and D6: silent partners in chemokine regulation?" *Immunol Cell Biol* **89**(2): 197-206.
- Hecker, T. P. and C. L. Gladson (2003). "Focal adhesion kinase in cancer." *Front Biosci* **8**: s705-714.
- Horwitz, A. R. and J. T. Parsons (1999). "Cell migration--moving on." *Science* **286**(5442): 1102-1103.
- Humphries, J. D., A. Byron, et al. (2006). "Integrin ligands at a glance." *J Cell Sci* **119**(Pt 19): 3901-3903.
- Hung, S. C., R. R. Pochampally, et al. (2007). "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis." *Stem Cells* **25**(9): 2363-2370.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2009). "Cancer statistics, 2009." *CA Cancer J Clin* **59**(4): 225-249.
- Kalwitz, G., M. Endres, et al. (2009). "Gene expression profile of adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells stimulated by the chemokine CXCL7." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(3): 649-658.
- Kamangar, F., G. M. Dores, et al. (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." *J Clin Oncol* **24**(14): 2137-2150.
- Kamoub, A. E., A. B. Dash, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." *Nature* **449**(7162): 557-563.
- Kamoub, A. E., A. B. Dash, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." *Nature* **449**(7162): 557-563.
- Kidd, S., E. Spaeth, et al. (2009). "Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging." *Stem Cells* **27**(10): 2614-2623.
- Kim, D. S., J. H. Kim, et al. (2009). "Overexpression of CXC chemokine receptors is required for the superior glioma-tracking property of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev* **18**(3): 511-519.

- Kim, S. M., D. S. Kim, et al. (2011). "CXCR4 chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas." Biochem Biophys Res Commun **407**(4): 741-746.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.
- Kolett, O., S. Shvitz, et al. (2003). "HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver." J Clin Invest **112**(2): 160-169.
- Komarova, S., Y. Kawakami, et al. (2006). "Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses." Mol Cancer Ther **5**(3): 755-766.
- Koob, T. J., R. Rennert, et al. (2013). "Biological properties of dehydrated human amnion/chorion composite graft: implications for chronic wound healing." Int Wound J **10**(5): 493-500.
- La Monica, K., M. Bass, et al. (2009). "The planar cell polarity pathway directs parietal endoderm migration." Dev Biol **330**(1): 44-53.
- Lang, K., T. L. Drèll, et al. (2003). "Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells." Immunol Lett **90**(2-3): 165-172.
- Le Blanc, K., H. Samuelsson, et al. (2007). "Generation of immunosuppressive Mesenchymal Stem Cells in Allogeneic Human Serum." Transplantation **84**(8): 1055-1059.
- Ledley, F. D. (1995). "Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products." Hum Gene Ther **6**(9): 1129-1144.
- Ley, K., C. Laudanna, et al. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.
- Li, Y., J. Chen, et al. (2001). "Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease." Neurosci Lett **316**(2): 67-70.
- Liu, D. and P. J. Homsby (2007). "Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion." Cancer Res **67**(7): 3117-3126.
- Lyons, M., D. Onion, et al. (2006). "Adenovirus type 5 interactions with human blood cells may compromise systemic delivery." Mol Ther **14**(1): 118-128.
- Masson, S., D. J. Harrison, et al. (2004). "Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review." Stem Cells **22**(6): 897-907.
- Matsumoto, M., Y. Sakao, et al. (1998). "Inducible expression of nuclear factor IL-6 increases endogenous gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha, osteopontin and CD14 in a monocytic leukemia cell line." Int Immunol **10**(12): 1825-1835.
- McGrail, D. J., D. Ghosh, et al. (2012). "Differential mechanical response of mesenchymal stem cells and fibroblasts to tumor-secreted soluble factors." PLoS One **7**(3): e33248.

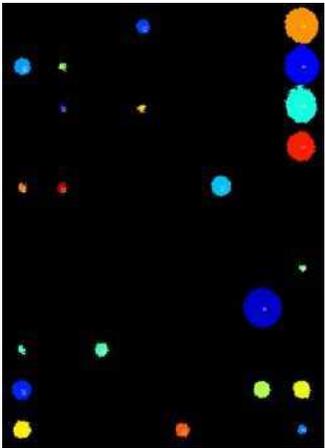
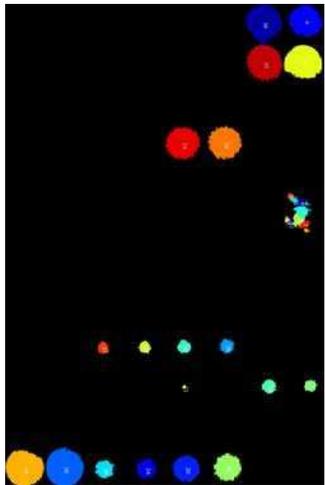
- Miranda, J. P., E. Flipo, et al. (2013). "The human umbilical cord tissue-derived MSC population UCX(R) promotes early motogenic effects on keratinocytes and fibroblasts and G-CSF-mediated mobilization of BM-MSCs when transplanted in vivo." Cell Transplant.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." Nat Rev Cancer 4(11): 839-849.
- Naitoh, J. and A. Beldegrun (1998). "Gene therapy for prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis 1(4): 189-196.
- Nakamura, K., Y. Ito, et al. (2004). "Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model." Gene Ther 11(14): 1155-1164.
- Nielsen, T. O., F. D. Hsu, et al. (2004). "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma." Clin Cancer Res 10(16): 5367-5374.
- Noreddini, S. C. and D. T. Curiel (2005). "Genetic targeting strategies for adenovirus." Mol Pharm 2(5): 341-347.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science 194(4260): 23-28.
- Pawelek, J. M. and A. K. Chakraborty (2008). "The cancer cell-leukocyte fusion theory of metastasis." Adv Cancer Res 101: 397-444.
- Pereboeva, L., S. Komarova, et al. (2003). "Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles." Stem Cells 21(4): 389-404.
- Pittenger, M. F. (1999). "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells." Science 284(5411): 143-147.
- Poggi, A. and M. R. Zocchi (2008). "Role of bone marrow stromal cells in the generation of human CD8+ regulatory T cells." Hum Immunol 69(11): 755-759.
- Polyak, K. (2007). "Breast cancer: origins and evolution." J Clin Invest 117(11): 3155-3163.
- Polyak, K. (2007). "Breast cancer: origins and evolution." The Journal of Clinical Investigation 117: 3155.
- Polyak, K. (2011). "Heterogeneity in breast cancer." J Clin Invest 121(10): 3786-3788.
- Polyak, K. and R. Kalluri (2010). "The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol 2(11): a003244.
- Ponte, A. L., E. Marais, et al. (2007). "The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities." Stem Cells 25(7): 1737-1745.
- Prockop, D. J. (2009). "Repair of Tissues by Adult Stem/Progenitor Cells (MSCs): Controversies, Myths, and Changing Paradigms." Molecular Therapy 17(6): 939-946.
- Rattigan, Y., J. M. Hsu, et al. (2010). "Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu." Exp Cell Res 316(20): 3417-3424.

- Reagan, M. R. and D. L. Kaplan (2011). "Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Tumor-Homing: Detection Methods in Disease Model Systems." Stem Cells **29**(6): 920-927.
- Reya, T, S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Ringe, J., S. Strassburg, et al. (2007). "Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2." Journal of Cellular Biochemistry **101**(1): 135-146.
- Ruster, B., S. Gottig, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells." Blood **108**(12): 3938-3944.
- Sambrook, J. and D. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, H., N. Kuwashima, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor-transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors." Cancer Gene Ther **12**(9): 757-768.
- Schmidt, A., D. Ladage, et al. (2006). "Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells." Stem Cells **24**(7): 1750-1758.
- Segers, V. F., I. Van Riet, et al. (2006). "Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(4): H1370-1377.
- Sordi, V., M. L. Malosio, et al. (2005). "Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets." Blood **106**(2): 419-427.
- Sotiriou, C., Lajos P. (2009). "Gene-Expression Signatures in Breast Cancer." The New England Journal of Medicine **360**: 790-800.
- Spaeth, E., A. Klopp, et al. (2008). "Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells." Gene Ther **15**(10): 730-738.
- Steingen, C., F. Brenig, et al. (2008). "Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells." J Mol Cell Cardiol **44**(6): 1072-1084.
- Stoff-Khalili, M. A., P. Dall, et al. (2006). "Gene therapy for carcinoma of the breast." Cancer Gene Ther **13**(7): 633-647.
- Studený (2002). "Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon-Delivery into Tumors."
- Studený, M., F. C. Marini, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents." J Natl Cancer Inst **96**(21): 1593-1603.
- Tolar, J., K. Le Blanc, et al. (2010). "Concise Review: Hitting the Right Spot with Mesenchymal Stromal Cells." Stem Cells **28**(8): 1446-1455.

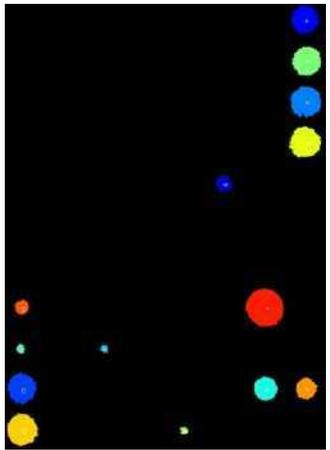
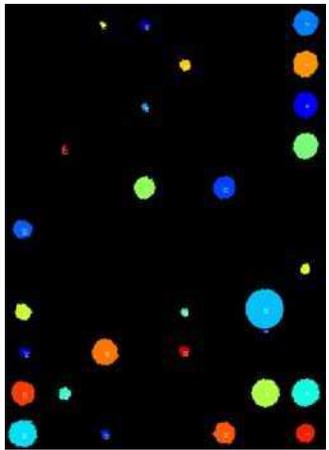
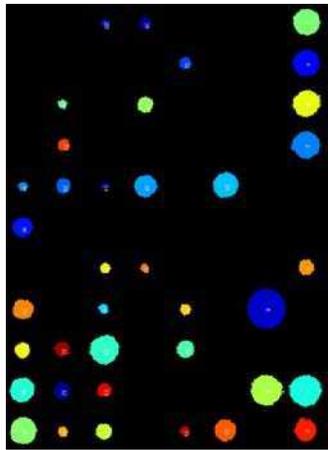
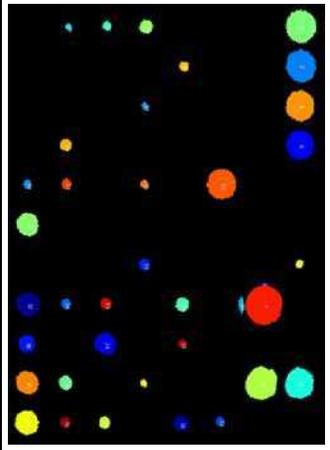
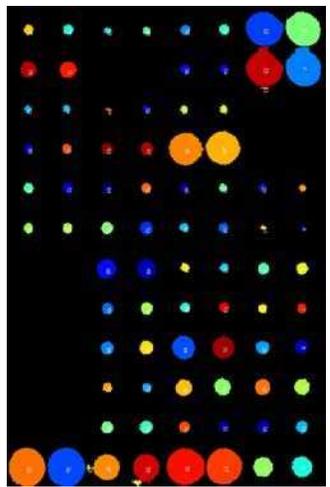
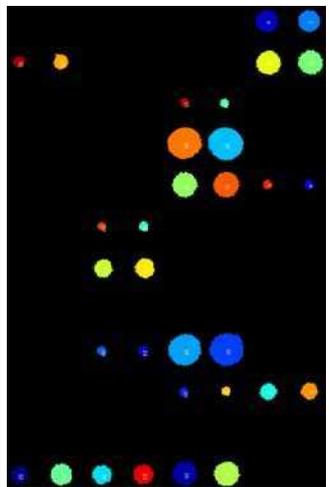
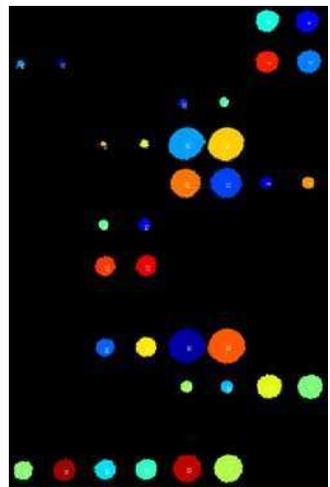
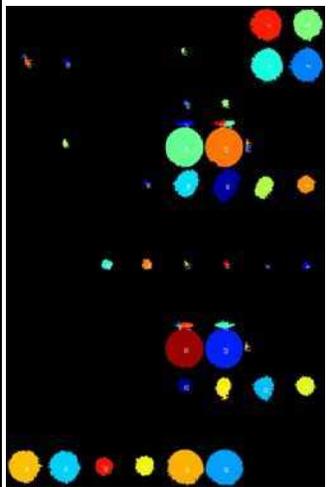
- Veevers-Lowe, J., S. G. Ball, et al. (2011). "Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through alpha5beta1-integrin-mediated activation of PDGFR-beta and potentiation of growth factor signals." J Cell Sci **124**(Pt 8): 1288-1300.
- Viale, D. L, E. G. Cafferata, et al. (2013). "Therapeutic Improvement of a Stroma-Targeted CRAd by Incorporating Motives Responsive to the Melanoma Microenvironment." J Invest Dermatol.
- Vogel, W., F. Grunebach, et al. (2003). "Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells." Haematologica **88**(2): 126-133.
- Walter, M., S. Liang, et al. (2009). "Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells." Oncogene **28**(30): 2745-2755.
- Wolf, D., H. Rumpold, et al. (2005). "Re: Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents." J Natl Cancer Inst **97**(7): 540-541; author reply 541-542.
- Wright, C. S., M. A. van Steensel, et al. (2009). "Connexin mimetic peptides improve cell migration rates of human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in vitro." Wound Repair Regen **17**(2): 240-249.
- Yang, J., D. Watkins, et al. (2012). "Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and mesenchymal stem cells act synergistically to prevent experimental necrotizing enterocolitis." J Am Coll Surg **215**(4): 534-545.
- You, D. H. and M. J. Nam (2013). "Effects of human epidermal growth factor gene-transfected mesenchymal stem cells on fibroblast migration and proliferation." Cell Prolif **46**(4): 408-415.
- Zepeda-Castilla Ernesto, M.-M. E. (2008). "Clasificación molecular del cáncer de mama." Circuj **76**: 87-93.
- Zhu, W., W. Xu, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo." Experimental and Molecular Pathology **80**(3): 267-274.

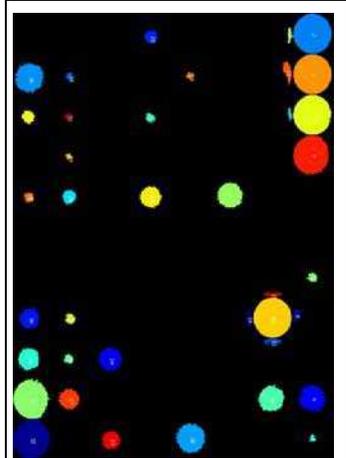
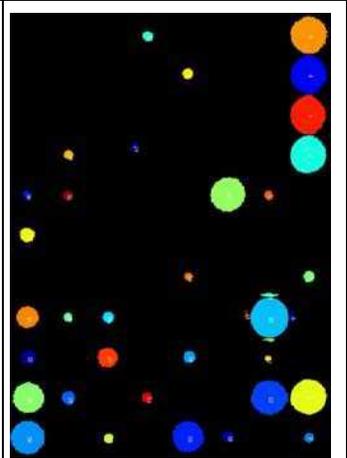
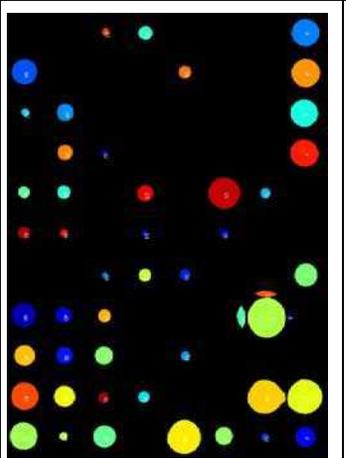
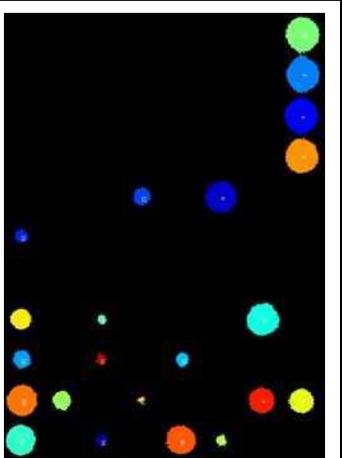
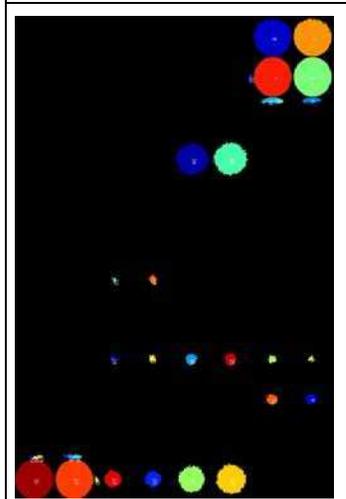
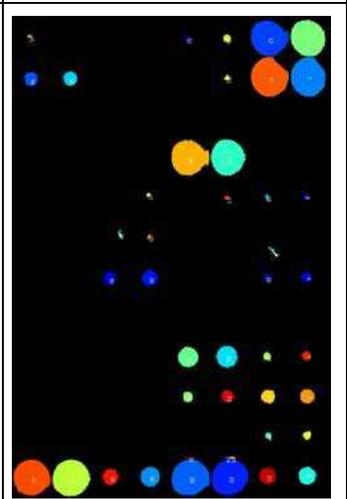
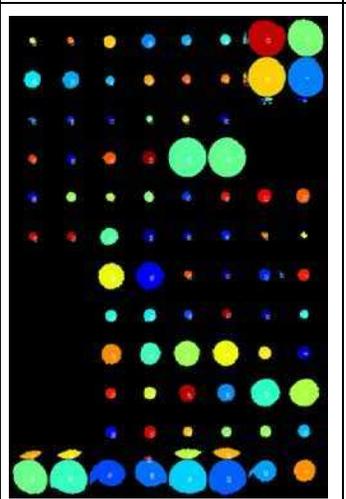
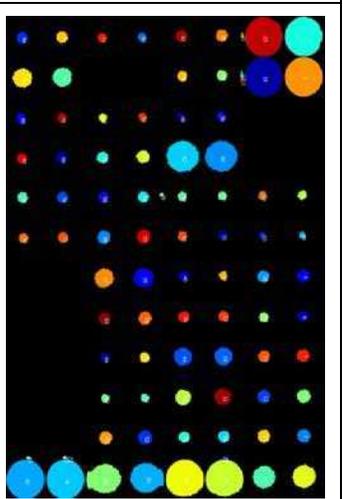
13 ANEXO I

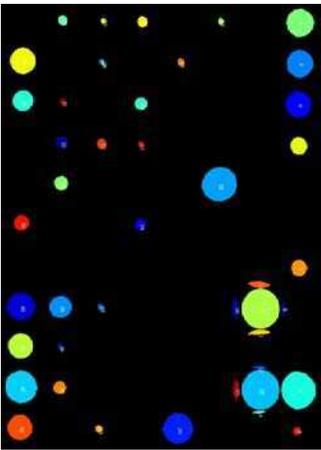
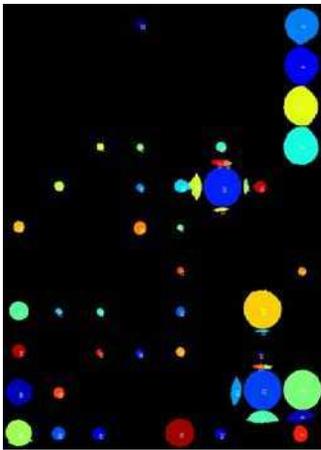
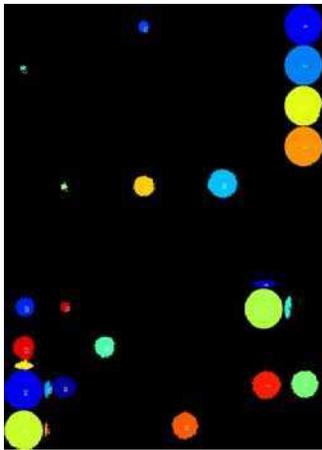
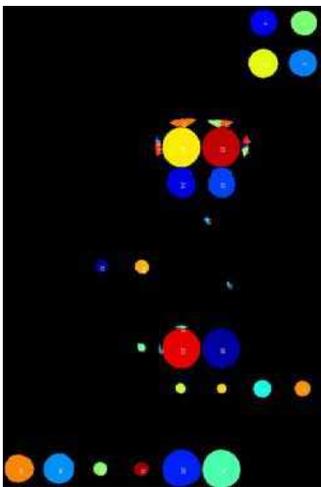
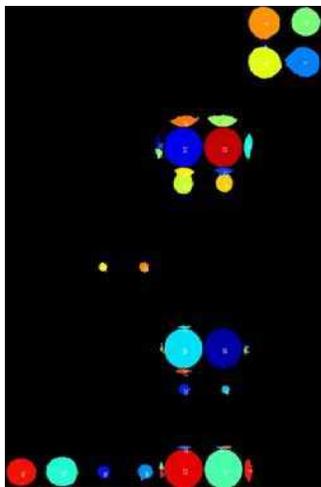
13.1 ARREGLOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN MUESTRAS TUMORALES Y TEJIDOS ADYACENTES.

	T09-3169	T/A																																																																																																																																			
		Citoquinas – CYT	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>h</th> <th>g</th> <th>f</th> <th>e</th> <th>d</th> <th>c</th> <th>b</th> <th>a</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>NT-4</td> <td>IGFBP-3</td> <td>FGF-4</td> <td>Oncostatin M</td> <td>MIP-1 delta</td> <td>IL-12 p40p70</td> <td>I-309</td> <td>Pos</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Osteopontin</td> <td>IGFBP-4</td> <td>FGF-6</td> <td>Thrombopoietin</td> <td>RANTES</td> <td>IL-13</td> <td>IL-1 alpha</td> <td>Pos</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Osteoprotegerin</td> <td>IL-16</td> <td>FGF-7</td> <td>VEGF</td> <td>SCF</td> <td>IL-15</td> <td>IL-1 beta</td> <td>Pos</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>PARC</td> <td>IP-10</td> <td>FGF-9</td> <td>PDGF-BB</td> <td>SDF-1</td> <td>IFN-gamma</td> <td>IL-2</td> <td>Pos</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>PIGF</td> <td>LIF</td> <td>Flt-3 Ligand</td> <td>Leptin</td> <td>TARC</td> <td>MCP-1</td> <td>IL-3</td> <td>Neg</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>TGF-beta 2</td> <td>LIGHT</td> <td>Fractalkine</td> <td>BDNF</td> <td>TGF-beta 1</td> <td>MCP-2</td> <td>IL-4</td> <td>Neg</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>TGF-beta 3</td> <td>MCP-4</td> <td>GCP-2</td> <td>BLC</td> <td>TNF-alpha</td> <td>MCP-3</td> <td>IL-5</td> <td>ENA-78</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>TIMP-1</td> <td>MIF</td> <td>GDNF</td> <td>Ck beta 8-1</td> <td>TNF-beta</td> <td>MCSF</td> <td>IL-6</td> <td>GCSF</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>TIMP-2</td> <td>MIP-3α</td> <td>HGF</td> <td>Eotaxin</td> <td>EGF</td> <td>MDC</td> <td>IL-7</td> <td>GM-CSF</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>Pos</td> <td>NAP-2</td> <td>IGFBP-1</td> <td>Eotaxin-2</td> <td>IGF-I</td> <td>MIG</td> <td>IL-8</td> <td>GRO</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>Pos</td> <td>NT-3</td> <td>IGFBP-2</td> <td>Eotaxin-3</td> <td>Angiogenin</td> <td>MIP-1beta</td> <td>IL-10</td> <td>GRO-alpha</td> <td>11</td> </tr> </tbody> </table>		h	g	f	e	d	c	b	a		1	NT-4	IGFBP-3	FGF-4	Oncostatin M	MIP-1 delta	IL-12 p40p70	I-309	Pos	1	2	Osteopontin	IGFBP-4	FGF-6	Thrombopoietin	RANTES	IL-13	IL-1 alpha	Pos	2	3	Osteoprotegerin	IL-16	FGF-7	VEGF	SCF	IL-15	IL-1 beta	Pos	3	4	PARC	IP-10	FGF-9	PDGF-BB	SDF-1	IFN-gamma	IL-2	Pos	4	5	PIGF	LIF	Flt-3 Ligand	Leptin	TARC	MCP-1	IL-3	Neg	5	6	TGF-beta 2	LIGHT	Fractalkine	BDNF	TGF-beta 1	MCP-2	IL-4	Neg	6	7	TGF-beta 3	MCP-4	GCP-2	BLC	TNF-alpha	MCP-3	IL-5	ENA-78	7	8	TIMP-1	MIF	GDNF	Ck beta 8-1	TNF-beta	MCSF	IL-6	GCSF	8	9	TIMP-2	MIP-3α	HGF	Eotaxin	EGF	MDC	IL-7	GM-CSF	9	10	Pos	NAP-2	IGFBP-1	Eotaxin-2	IGF-I	MIG	IL-8	GRO	10	11	Pos	NT-3	IGFBP-2	Eotaxin-3	Angiogenin	MIP-1beta	IL-10	GRO-alpha	11										
	h	g	f	e	d	c	b	a																																																																																																																													
1	NT-4	IGFBP-3	FGF-4	Oncostatin M	MIP-1 delta	IL-12 p40p70	I-309	Pos	1																																																																																																																												
2	Osteopontin	IGFBP-4	FGF-6	Thrombopoietin	RANTES	IL-13	IL-1 alpha	Pos	2																																																																																																																												
3	Osteoprotegerin	IL-16	FGF-7	VEGF	SCF	IL-15	IL-1 beta	Pos	3																																																																																																																												
4	PARC	IP-10	FGF-9	PDGF-BB	SDF-1	IFN-gamma	IL-2	Pos	4																																																																																																																												
5	PIGF	LIF	Flt-3 Ligand	Leptin	TARC	MCP-1	IL-3	Neg	5																																																																																																																												
6	TGF-beta 2	LIGHT	Fractalkine	BDNF	TGF-beta 1	MCP-2	IL-4	Neg	6																																																																																																																												
7	TGF-beta 3	MCP-4	GCP-2	BLC	TNF-alpha	MCP-3	IL-5	ENA-78	7																																																																																																																												
8	TIMP-1	MIF	GDNF	Ck beta 8-1	TNF-beta	MCSF	IL-6	GCSF	8																																																																																																																												
9	TIMP-2	MIP-3α	HGF	Eotaxin	EGF	MDC	IL-7	GM-CSF	9																																																																																																																												
10	Pos	NAP-2	IGFBP-1	Eotaxin-2	IGF-I	MIG	IL-8	GRO	10																																																																																																																												
11	Pos	NT-3	IGFBP-2	Eotaxin-3	Angiogenin	MIP-1beta	IL-10	GRO-alpha	11																																																																																																																												
		Quimioquinas - CHE	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>h</th> <th>g</th> <th>f</th> <th>e</th> <th>d</th> <th>c</th> <th>b</th> <th>a</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>PARC</td> <td>PARC</td> <td>MCP-2</td> <td>MCP-2</td> <td>Eotaxin-3</td> <td>Eotaxin-3</td> <td>POS</td> <td>POS</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>RANTES</td> <td>RANTES</td> <td>MCP-3</td> <td>MCP-3</td> <td>Fractalkine</td> <td>Fractalkine</td> <td>POS</td> <td>POS</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>SDF-1α</td> <td>SDF-1α</td> <td>MCP-4</td> <td>MCP-4</td> <td>GCP-2</td> <td>GCP-2</td> <td>NEG</td> <td>NEG</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>SDF-1β</td> <td>SDF-1β</td> <td>MDC</td> <td>MDC</td> <td>GRO</td> <td>GRO</td> <td>NEG</td> <td>NEG</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>TARC</td> <td>TARC</td> <td>MIG</td> <td>MIG</td> <td>GROα</td> <td>GROα</td> <td>BLC</td> <td>BLC</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>TECK</td> <td>TECK</td> <td>MIP-1α</td> <td>MIP-1α</td> <td>HCC-4</td> <td>HCC-4</td> <td>CCL28</td> <td>CCL28</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>BLANK</td> <td>BLANK</td> <td>MIP-1β</td> <td>MIP-1β</td> <td>I-309</td> <td>I-309</td> <td>Ckβ8-1</td> <td>Ckβ8-1</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>BLANK</td> <td>BLANK</td> <td>MIP-16</td> <td>MIP-16</td> <td>I-TAC</td> <td>I-TAC</td> <td>CTACK</td> <td>CTACK</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>BLANK</td> <td>BLANK</td> <td>MIP-3α</td> <td>MIP-3α</td> <td>IL-8</td> <td>IL-8</td> <td>CXCL16</td> <td>CXCL16</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>BLANK</td> <td>BLANK</td> <td>MIP-3β</td> <td>MIP-3β</td> <td>IP-10</td> <td>IP-10</td> <td>ENA-78</td> <td>ENA-78</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>BLANK</td> <td>BLANK</td> <td>MPIF-1</td> <td>MPIF-1</td> <td>Lymphotactin</td> <td>Lymphotactin</td> <td>Eotaxin</td> <td>Eotaxin</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>POS</td> <td>POS</td> <td>NAP 2</td> <td>NAP 2</td> <td>MCP-1</td> <td>MCP-1</td> <td>Eotaxin-2</td> <td>Eotaxin-2</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>		h	g	f	e	d	c	b	a		1	PARC	PARC	MCP-2	MCP-2	Eotaxin-3	Eotaxin-3	POS	POS	1	2	RANTES	RANTES	MCP-3	MCP-3	Fractalkine	Fractalkine	POS	POS	2	3	SDF-1α	SDF-1α	MCP-4	MCP-4	GCP-2	GCP-2	NEG	NEG	3	4	SDF-1β	SDF-1β	MDC	MDC	GRO	GRO	NEG	NEG	4	5	TARC	TARC	MIG	MIG	GROα	GROα	BLC	BLC	5	6	TECK	TECK	MIP-1α	MIP-1α	HCC-4	HCC-4	CCL28	CCL28	6	7	BLANK	BLANK	MIP-1β	MIP-1β	I-309	I-309	Ckβ8-1	Ckβ8-1	7	8	BLANK	BLANK	MIP-16	MIP-16	I-TAC	I-TAC	CTACK	CTACK	8	9	BLANK	BLANK	MIP-3α	MIP-3α	IL-8	IL-8	CXCL16	CXCL16	9	10	BLANK	BLANK	MIP-3β	MIP-3β	IP-10	IP-10	ENA-78	ENA-78	10	11	BLANK	BLANK	MPIF-1	MPIF-1	Lymphotactin	Lymphotactin	Eotaxin	Eotaxin	11	12	POS	POS	NAP 2	NAP 2	MCP-1	MCP-1	Eotaxin-2	Eotaxin-2	12
	h	g	f	e	d	c	b	a																																																																																																																													
1	PARC	PARC	MCP-2	MCP-2	Eotaxin-3	Eotaxin-3	POS	POS	1																																																																																																																												
2	RANTES	RANTES	MCP-3	MCP-3	Fractalkine	Fractalkine	POS	POS	2																																																																																																																												
3	SDF-1α	SDF-1α	MCP-4	MCP-4	GCP-2	GCP-2	NEG	NEG	3																																																																																																																												
4	SDF-1β	SDF-1β	MDC	MDC	GRO	GRO	NEG	NEG	4																																																																																																																												
5	TARC	TARC	MIG	MIG	GROα	GROα	BLC	BLC	5																																																																																																																												
6	TECK	TECK	MIP-1α	MIP-1α	HCC-4	HCC-4	CCL28	CCL28	6																																																																																																																												
7	BLANK	BLANK	MIP-1β	MIP-1β	I-309	I-309	Ckβ8-1	Ckβ8-1	7																																																																																																																												
8	BLANK	BLANK	MIP-16	MIP-16	I-TAC	I-TAC	CTACK	CTACK	8																																																																																																																												
9	BLANK	BLANK	MIP-3α	MIP-3α	IL-8	IL-8	CXCL16	CXCL16	9																																																																																																																												
10	BLANK	BLANK	MIP-3β	MIP-3β	IP-10	IP-10	ENA-78	ENA-78	10																																																																																																																												
11	BLANK	BLANK	MPIF-1	MPIF-1	Lymphotactin	Lymphotactin	Eotaxin	Eotaxin	11																																																																																																																												
12	POS	POS	NAP 2	NAP 2	MCP-1	MCP-1	Eotaxin-2	Eotaxin-2	12																																																																																																																												

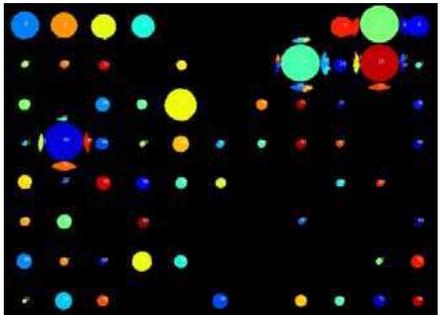
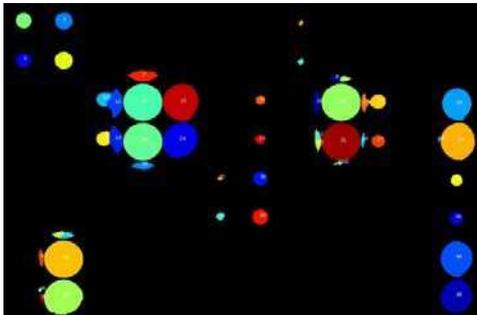
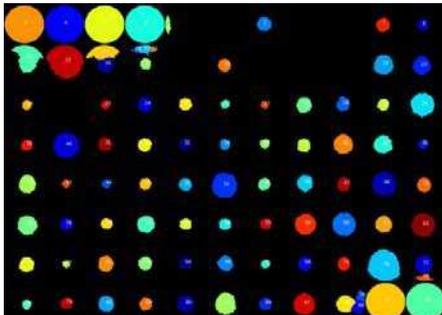
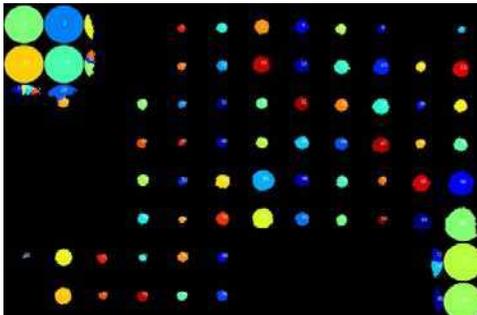
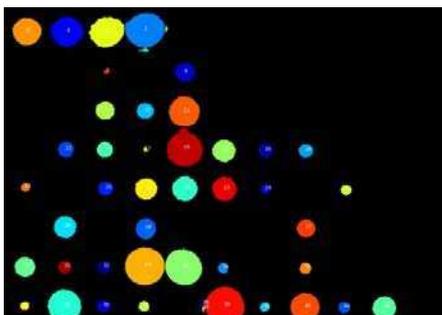
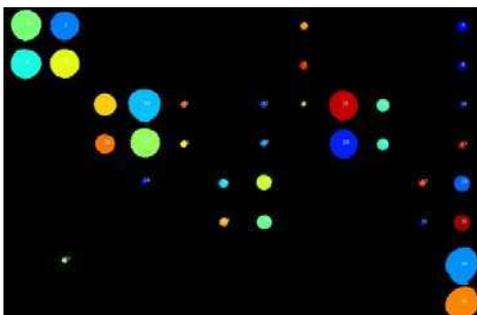
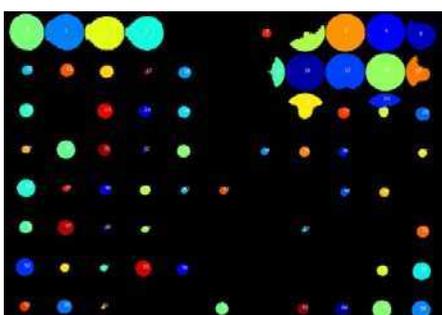
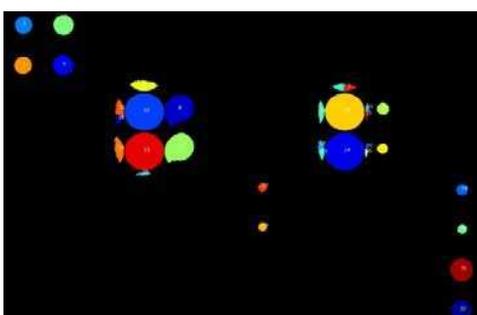
T/A	Citoquinas – CYT	Quimioquinas - CHE
S09-3169		
T09-3178		
S09-3178		
T09-3206		

T10-3472	S09-3372	T09-3372	S09-3206
			
			

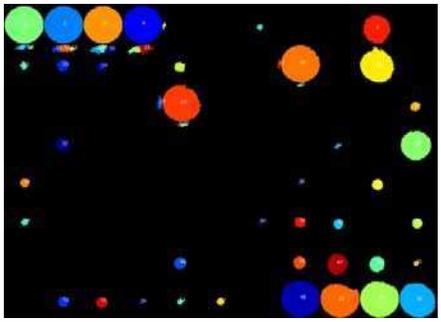
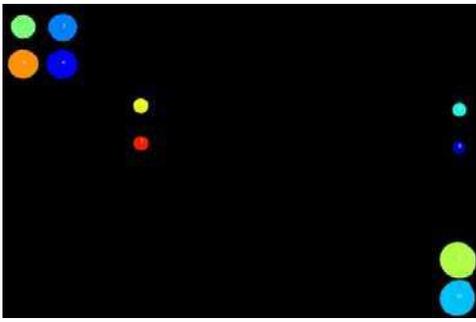
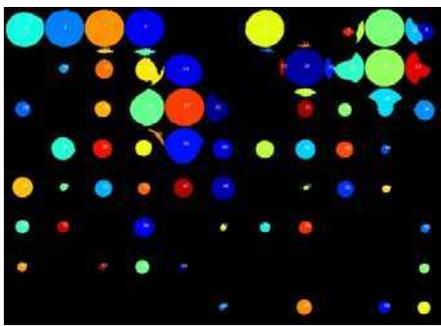
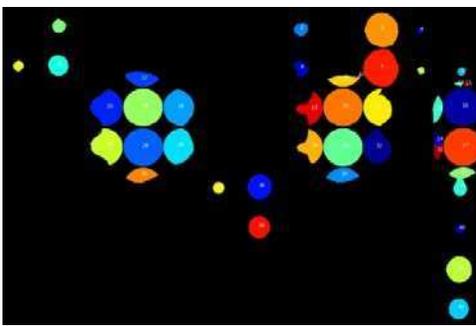
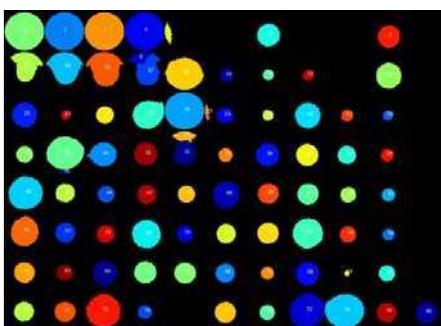
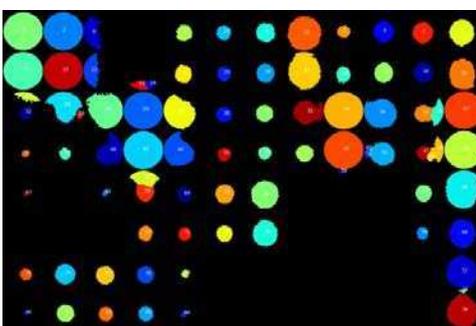
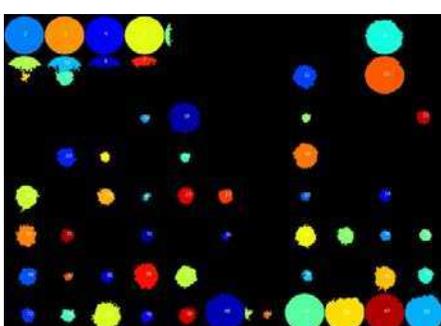
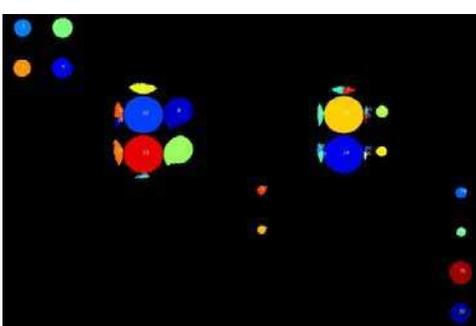
T10-3534	S10-3497	T10-3497	S10-3472
			
			

S10-3591	T10-3591	S10-3534
		
		

13.2 ARREGLOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÍNEAS DE CÁNCER DE MAMA.

	CYT	CHE
578T		
IBH-6		
MCF-7		
MDA		

13.3 ARREGLOS DE ANTICUERPOS CONTRA CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LÍNEAS DE FIBROBLASTOS Y FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMOR (FAT)

	CYT	CHE
Fib Tum T10-3591		
Fib Tum T10-3534		
FhA		
HFL1		

14 ANEXO II

14.1 TABLA RESULTADO DE LA CUANTIFICACIÓN DE IL-6 POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

A7 - Human IL-6														
Sample Name	Position	Clustering	Results File	Event #	MFI	SD	CV %	Nominal CC	Fitted CC	Final CC	Unit	Recovery %	Dilution	QC Result
Std001	1 - A1	Manual	STD.001	209	38,89	3,67	10,43%	0,00	0,00	0,00	pg/mL	0,00%	1,00	N/A
Std002	1 - A2	Manual	STD.002	254	46,56	5,06	10,93%	9,77	8,49	8,49	pg/mL	86,99%	1,00	N/A
Std003	1 - A3	Manual	STD.003	262	54,74	5,84	11,90%	19,53	17,45	17,45	pg/mL	89,33%	1,00	N/A
Std004	1 - A4	Manual	STD.004	285	72,99	10,82	14,78%	39,06	37,59	37,59	pg/mL	96,23%	1,00	N/A
Std005	1 - A5	Manual	STD.005	286	114,44	21,42	18,95%	78,13	83,59	83,59	pg/mL	107,00%	1,00	N/A
Std006	1 - A6	Manual	STD.006	286	176,24	34,11	19,07%	156,25	151,40	151,40	pg/mL	96,90%	1,00	N/A
Std007	1 - A7	Manual	STD.007	273	313,40	71,97	23,92%	312,50	299,07	299,07	pg/mL	95,70%	1,00	N/A
Std008	1 - A8	Manual	STD.008	282	620,82	190,06	30,16%	625,00	628,86	628,86	pg/mL	100,62%	1,00	N/A
Std009	1 - A9	Manual	STD.009	267	1207,90	258,61	21,86%	1250,00	1292,38	1292,38	pg/mL	103,39%	1,00	N/A
Std010	1 - A10	Manual	STD.010	269	2109,69	525,30	23,99%	2500,00	2450,65	2450,65	pg/mL	98,03%	1,00	N/A
T09-3178	1 - A11	Manual	MT.001	468	3078,09	892,73	29,52%		3927,34	3927,34	pg/mL		1,00	N/A
S09-3178	1 - A12	Manual	MT.002	474	104,60	30,34	29,06%		72,69	72,69	pg/mL		1,00	N/A
T09-3206	1 - B1	Manual	MT.003	456	3307,74	1039,04	31,09%		4317,70	4317,70	pg/mL		1,00	N/A
S09-3206	1 - B2	Manual	MT.004	534	598,89	256,64	44,62%		605,09	605,09	pg/mL		1,00	N/A
T10-3472	1 - B3	Manual	MT.005	462	1526,14	442,62	30,24%		1679,78	1679,78	pg/mL		1,00	N/A
S10-3472	1 - B4	Manual	MT.006	473	226,71	71,82	29,22%		206,07	206,07	pg/mL		1,00	N/A
T10-3497	1 - B5	Manual	MT.007	474	3428,91	1083,08	27,72%		4530,33	4530,33	pg/mL		1,00	N/A
MC IBH-6	1 - B6	Manual	MT.008	482	40,32	4,30	10,88%		1,14	1,14	pg/mL		1,00	N/A
MC 578T	1 - B7	Manual	MT.009	480	368,47	131,26	34,75%		357,90	357,90	pg/mL		1,00	N/A
MC MAMA1	1 - B8	Manual	MT.010	499	1730,94	558,29	30,49%		1941,01	1941,01	pg/mL		1,00	N/A
MC MAMA2	1 - B9	Manual	MT.011	432	6552,49	989,07	14,39%		11942,43	11942,43	pg/mL		1,00	N/A
T1 IBH-6+ FhA	1 - B10	Manual	MT.012	432	40,32	3,80	10,49%		1,14	1,14	pg/mL		1,00	N/A
T2 IBH-6+ FhA	1 - B11	Manual	MT.013	436	39,60	4,30	10,59%		0,00	0,00	pg/mL		1,00	N/A
Tum IBH-6 1	1 - B12	Manual	MT.014	270	41,05	4,98	14,60%		2,16	2,16	pg/mL		1,00	N/A
Tum IBH-6 2	1 - C1	Manual	MT.015	327	41,05	3,80	10,47%		2,16	2,16	pg/mL		1,00	N/A
T09-3178 1/10	1 - C2	Manual	MT.016	459	889,65	341,80	31,94%		925,42	925,42	pg/mL		1,00	N/A
S09-3178 1/10	1 - C3	Manual	MT.017	503	52,80	6,40	13,00%		15,33	15,33	pg/mL		1,00	N/A
T09-3206 1/10	1 - C4	Manual	MT.018	520	858,21	341,32	42,81%		890,17	890,17	pg/mL		1,00	N/A
S09-32061/10	1 - C5	Manual	MT.019	509	155,38	57,01	36,44%		128,64	128,64	pg/mL		1,00	N/A
T10-3472 1/10	1 - C6	Manual	MT.020	480	355,45	135,62	41,19%		344,00	344,00	pg/mL		1,00	N/A
S10-3472 1/10	1 - C7	Manual	MT.021	505	72,99	15,91	20,63%		37,59	37,59	pg/mL		1,00	N/A
T10-3497 1/10	1 - C8	Manual	MT.022	471	474,00	190,46	42,90%		470,69	470,69	pg/mL		1,00	N/A
MC IBH-6 1/10	1 - C9	Manual	MT.023	514	39,60	4,80	20,42%		0,00	0,00	pg/mL		1,00	N/A
MC 578T 1/10	1 - C10	Manual	MT.024	483	71,69	15,63	20,83%		36,15	36,15	pg/mL		1,00	N/A

14.2 FUNCIÓN CONOCIDA DE QUIMIOQUINAS Y SUS RECEPTORES EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

14.2.1 *Quimioquinas de la subfamilia CXC*

CXCL1 / GRO- α / MGSA α (MIP2 α /KC): Es un factor quimiotáctico inducible de neutrófilos. Se detecta en fibroblastos mamarios, células epiteliales mamarias, células endoteliales, monocitos activados, macrófagos y neutrófilos. CXCR2 (IL8RB)

CXCL2 / GRO- β / MGSA β (MIP2 β /KC): Promueve la quimiotaxis y desgranulación de neutrófilos y basófilos. CXCR2 (IL8RB)

CXCL3 / GRO- γ / MGSA γ (MIP2 γ /KC) : Induce la actividad quimiotáctica de neutrófilos. Pueden desempeñar un papel en la inflamación y afecta a las células endoteliales de forma autócrina. CXCR2 (IL8RB)

CXCL5 /ENA-78 : Expresado por fibroblastos. Inducida por lipopolisacáridos bacterianos. Quimioattractante para los neutrófilos y promueven su activación. Producido de forma concomitante con CXCL8 en respuesta a la estimulación con IL-1 o TNF alfa. CXCR2 (IL8RB)

CXCL6 GCP-2: Involucrado en el reclutamiento de neutrófilos a los sitios inflamatorios. CXCR1 (IL8RA), CXCR2 (IL8RB)

CXCL7 /NAP-2 : Potente quimioattractante y activador de neutrófilos. Estimula varios procesos celulares, incluyendo la síntesis de ADN, la mitosis, la glucólisis, la acumulación de AMPc intracelular, la secreción de prostaglandina E2 y la síntesis de ácido hialurónico y glicosaminoglicano sulfatado. También estimula la formación y secreción de activador de plasminógeno por las células sinoviales. CXCR2 (IL8RB)

CXCL8 /IL8 : Es un mediador principal en la respuesta inflamatoria, secretada por varios tipos de células en respuesta a estímulo inflamatorio. Un quimioattractante y también un potente factor angiogénico. Atrae neutrófilos, basófilos y células T (pero no los monocitos). Papel sugerido fuertemente en la regulación de la actividad angiogénica en el cáncer y en la fibrosis pulmonar idiopática. CXCR1 (IL8RA), CXCR2 (IL8RB), DARC

CXCL10 / IP-10: quimioattractante para células T CD4⁺. Inhibe la proliferación temprana de progenitoras hematopoyéticas normales y leucémicas. Producida por una amplia variedad de

tipos de células que van desde los neutrófilos a los hepatocitos, células endoteliales y queratinocitos. Involucrados en una variedad de patologías inflamatorias tales como encefalitis por VIH, linfoma cutáneo de células T y la hepatitis crónica. Participa en la regulación de la actividad angiogénica en cáncer. CXCR3 isoforma beta (CD183b)

CXCL12 SDF-1 α / β : Un fuerte quimioattractante para linfocitos. La unión a su receptor inhibe la entrada de VIH1. Durante la embriogénesis, CXCL12 dirige la migración de las células hematopoyéticas de hígado fetal a la médula ósea y la formación de vasos sanguíneos grandes. En la edad adulta juega un papel importante en la angiogénesis mediante el reclutamiento de las células progenitoras endoteliales. Un factor muy importante en la carcinogénesis y la neovascularización ligada a la progresión del tumor. CXCR4

CXCL16 citoquina B6 pequeña inducible : Actúa como un receptor scavenger en los macrófagos, ya que se une específicamente a la lipoproteína de baja densidad oxidada, lo que sugiere que puede estar involucrado en fisiopatologías tales como la aterogénesis. Producida por las células dendríticas se encuentran en las zonas de células T de órganos linfoides y por células que se encuentran en la pulpa roja del bazo, en respuesta a las citoquinas inflamatorias IFN gamma y TNF alfa. Expresado como una molécula unida de la superficie celular o una quimioquina soluble. Quimioattractante para varios subtipos de células T y NK. CXCR6

14.2.2 Receptores de quimioquinas CXC

CXCR1 IL8RA: Expresado en los neutrófilos. De alta afinidad para IL-8

CXCR2 IL8RB: Expresado en los neutrófilos. De baja afinidad para IL-8

CXCR3 isoforma beta CD183b : Predominantemente expresado en los linfocitos T, y también en otros linfocitos (algunas células B y células NK).

CXCR4: Está altamente expresado en cerebro, corazón, en células blancas de la sangre, células endoteliales vasculares y células endoteliales de cordón umbilical.

CXCR5: Se expresa específicamente en tejidos linfáticos, tales como folículos en los ganglios linfáticos, así como en el bazo. También se expresa en linfoma de Burkitt

14.2.3 Quimioquinas CC

CCL1 I-309 (TCA-3), Scya1: Glicoproteína secretada por las células T activadas. Atrae monocitos, células NK, células B inmaduras y células dendríticas mediante la interacción con el receptor CCR8, CCR11, DARC

CCL2 MCP-1 / MCAF (JE): Quimioattractante para monocitos y basófilos, pero no para neutrófilos o eosinófilos. Aumenta la actividad antitumoral de los monocitos. CCL2 está implicada en la patogénesis de enfermedades caracterizadas por infiltrados monocíticos como la psoriasis, la artritis reumatoide y la aterosclerosis. Puede estar involucrado en el reclutamiento de monocitos en la pared arterial durante el proceso de la aterosclerosis. CCR2

CCL3 MIP-1 α / LD78 α : Se expresa principalmente en células T, células B y monocitos después de la estimulación antigénica o por mitógenos. Efectos adhesivos sobre linfocitos. CCL3 puede inhibir la proliferación de células madre hematopoyéticas. CCR1, CCR5

CCL5 RANTES: Quimioattractante para monocitos, células T helper de memoria y eosinófilos. Provoca la liberación de histamina de los basófilos y activa eosinófilos. Uno de los principales factores supresores del VIH producidos por células T CD8+. CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, DARC

CCL7 MCP-3: Quimioquina secretada que atrae a los macrófagos durante la inflamación y la metástasis. La proteína es un sustrato *in vivo* de la matriz metaloproteínasa 2, una enzima que degrada componentes de la matriz extracelular. CCR1, CCR2, CCR3

CCL8 MCP-2. Quimiotáctica para monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos. Importante para las respuestas del huésped inflamatorias y se encuentra en la concentración más alta en el intestino delgado y células de la sangre periférica. CCR1, CCR2, CCR5, CCR11

Eotaxina CCL11: Regula el reclutamiento y la activación de los leucocitos inflamatorios, especialmente de eosinófilos. Pueden desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de respuestas alérgicas., CCR3

CCL19 MIP-3 β / ELC / Éxodo 3: Expresado constitutivamente en diversos tejidos linfoides. El nivel de expresión es fuertemente aumentado por señales inflamatorias, o disminuido por la citoquina anti-inflamatoria IL10. Atrae linfocitos humanos en cultivo, células dendríticas, células T y células progenitoras hematopoyéticas.

CCL20 MIP-3 α / LARC / Éxodo 1: Quimioattractante que atrae linfocitos y neutrófilos, pero no monocitos. CCL20 inhibe la proliferación de los progenitores mieloides en ensayos de formación de colonias. Puede estar implicada en la formación y función de los tejidos linfoides de la mucosa mediante la atracción de linfocitos y células dendríticas hacia las células epiteliales., CCR6

CCL21 6Ckine / SLC / Éxodo 2: CCL21 influye en el homing de Linfocitos a los órganos linfoides secundarios, y en la adherencia de los linfocitos mediada por integrinas, y puede actuar a través de CCR7. Quimioattractante de timocitos y células T activadas. CCL21 es un receptor conocido para la citoquinas inducible pequeña A19 (otro miembro de la familia de las citocinas). CCR7

CCL22 MDC / STCP-1 / ABCD-1: Quimioattractante para células NK, linfocitos T activados crónicamente, monocitos y células dendríticas. No tiene actividad quimiotáctica para los eosinófilos, neutrófilos o linfocitos T en reposo. Pueden desempeñar un papel en el tráfico de los linfocitos T activados a sitios inflamatorios y otros aspectos de su fisiología. CCR4

CCL23 MPIF-1 / MIP-3 / CK β -8: Quimioattractante para los monocitos, linfocitos T en reposo y neutrófilos. Inhibe la proliferación de células progenitoras mieloides y es altamente expresado en el pulmón adulto, hígado, músculo esquelético y páncreas. Hay niveles moderados de CCL23 en el hígado fetal, médula ósea de adultos y la placenta. CCR1.

14.2.4 Receptores de quimioquinas CC

CCR1 CD191: Expresado en linfocitos de sangre periférica y monocitos. Hay alguna sugerencia de que este receptor de quimioquinas está restringido a las células T de memoria dentro del pool de linfocitos.

CCR2 CD192: Expresado en la superficie de los monocitos, células T de memoria activadas, células B y basófilos en los seres humanos, y también en los macrófagos peritoneales en ratones. Es un receptor para varias proteínas quimioattractantes de monocitos (CCL2, CCL7, CCL13) que median específicamente la quimiotaxis de monocitos. CCR3

Receptor para CCL11 y CCL24. Expresado en sangre, cerebro, pulmón, médula ósea, riñón, hígado, ganglio linfático, placenta, piel, bazo, timo, tiroides y útero. Dentro de estos tejidos, CCR3 se expresa en tipos de células específicos, incluyendo eosinófilos, basófilos, células Th2, CD34 + hematopoyéticas progenitoras, queratinocitos y células cebadas. Los agonistas de CXCR3

(CXCL9, CXCL10, CXCL11) actúan como antagonistas de CCR3 al competir por la unión de CCL11 / CCL24 a CCR3. Se cree que desempeña un papel clave en las enfermedades alérgicas y es un co-receptor para el VIH 1 y 2.

CCR4: CCR4 se expresa preferentemente en las células de tipo Th2. En contraste con otros receptores de quimioquinas, la expresión de CCR4 y CCR8 se incrementa transitoriamente después de la activación del TCR y CD28. Las células Th1 activadas aumentan la expresión de CCR4 y la capacidad de la respuesta funcional a timo.

CCR5: Expresado en varios tipos de células, incluyendo las células derivadas de la sangre periférica dendríticas CD34 + células progenitoras hematopoyéticas y ciertos linfocitos Th1 de memoria activados. Co-receptor Mayor implicado en la susceptibilidad a la infección del VIH 1 y la enfermedad.

CCR6: Expresada por las células dendríticas inmaduras y células T de memoria. Importante para la y maduración y diferenciación del linaje B dependiente de antígeno.