



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

## **EFFECTO DE CÉLULAS DE ESTROMA NORMAL Y DE EPITELIO TUMORAL MAMARIO EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4+**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**Constanza Andrea Miller Vargas**

Directores del Seminario de Título:  
Jorge Martínez Winkler  
Dra. María Rosa Bono

Agosto 2014  
Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por:

***Constanza Andrea Miller Vargas***

### **“EFECTO DE CÉLULAS DE ESTROMA NORMAL Y DE EPITELIO TUMORAL MAMARIO EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4+”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dra. Maria Rosa Bono  
**Directora Seminario de Título**

Dr. Jorge Martinez Winkler  
**Director Seminario de Título**

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. Veronica Palma Alvarado  
**Presidenta Comisión**

Dra. Daniela Sauma Mahaluf  
**Evaluadora**

*A mi madre y a mi viejo,  
Quienes siempre me animaron a mejorar*

## AGRADECIMIENTOS

Existen muchas personas que han sido fundamentales en mi vida y particularmente en mi proceso de aprendizaje.

En primer lugar agradezco a mis seres queridos. A mi madre por su apoyo, amor e incondicionalidad, por ser quien siempre confía en mí, por ser mi guía, por inculcarme el esfuerzo y la perseverancia, por siempre anteponer mis necesidades a las suyas y por ser mi mejor amiga. A mi familia, mi abuela y mis tías, por estar siempre ahí, por sus palabras de aliento en mis peores momentos y por estar pendientes de mí y mi progreso. A mi viejo que aunque ya no está siempre me inspiró a seguir adelante, a dar todo de mí y a luchar por las oportunidades que él no tuvo. A mis hermanitos por los buenos momentos, la preocupación, la distracción, la paciencia y por estar siempre conmigo, pese a que veces mis quehaceres me hicieran dejarlos un poco de lado. A mis amigos, Felipe y Francisco, por ser los mejores *partners* que pude haber encontrado, por ser mis confidentes, por creer en mí y en mis capacidades, por darme claridad en mis momentos de oscuridad y aceptarme tal como soy. A Mauricio por su apoyo inagotable desde el principio de este proceso, por soportar con paciencia y afecto todos mis malos días, por ayudarme a levantarme en cada una de mis caídas, celebrar conmigo los triunfos y por apoyarme y respetar cada decisión que tomé.

En segundo lugar agradecer a las personas que participaron activamente en mi proceso de aprendizaje, a la Universidad de Chile y su cuerpo docente, pero principalmente a los laboratorios de Inmunología de la Facultad de Ciencias y al de Biología Celular del INTA. Muchas gracias a todos mis compañeros por entregar sus buenas vibras a mí y mis experimentos, por preguntar y ayudarme con la frustración

cuando las cosas no salían bien y por sus consejos y críticas constructivas que me permitían siempre mejorar. Especialmente, dentro del laboratorio de biología celular, gracias Nico Méndez y Nico Tobar por hacer tan grato el trabajo y por ayudarme en todo lo que podían. Dentro del laboratorio de Inmunología gracias Leo, por ser tan buen amigo y por estar ahí siempre para hablar y ayudarme cuando lo necesitaba. Muchas gracias Jocy por tu disposición, tu buena vibra, tu enseñanza, tu cariño y tu consuelo en los malos momentos. Muchas gracias Cote por las conversaciones, la confianza y la buena onda.

Muchas gracias también a mi comisión evaluadora, a la Dra. Daniela Sauma y a la Dra. Verónica Palma, por su tiempo y amabilidad, sus comentarios y su retroalimentación positiva.

Por último, muchas gracias a mis directores de tesis Dra. María Rosa Bono y Jorge Martínez Winkler, y al Dr. Mario Roseblatt, por su preocupación en mi avance, por las lecciones que me entregaron reunión a reunión y por ser firmes y críticos cuando fue necesario. Gracias Dra. Bono por guiarme en este proceso, por enseñarme rigurosamente y por permitirme crecer como persona y como profesional en su laboratorio.

Gracias a todos los que están, o estuvieron ahí conmigo y gracias a todos los que creyeron y siguen creyendo en mí.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>Dedicatoria</b>	ii
<b>Agradecimientos</b>	iii
<b>Índice de contenido</b>	v
<b>Índice de figuras y tablas</b>	viii
<b>Lista de abreviaturas</b>	ix
<b>Resumen</b>	xi
<b>Abstract</b>	xiii
<b>I. Introducción</b>	1
1.1 Introducción al Sistema Inmune.	1
1.1.1 Respuesta Inmune Adaptativa Celular.	2
1.1.2 Linfocitos T CD4+.	3
1.1.2.1 Linfocitos T reguladores.	4
1.2 Cáncer.	6
1.2.1 Cáncer de mama.	8
1.2.1.1 Modelos de estudio cáncer mamario.	9
1.3 TGF- $\beta$ .	10
1.3.1 El rol de TGF- $\beta$ en el cáncer.	12
1.3.2 El rol de TGF- $\beta$ en el sistema inmune.	13
1.4 El rol del sistema inmune en el cáncer.	14
<b>II. Hipótesis</b>	17

<b>III. Objetivos</b>	17
3.1 Objetivo General.	17
3.2 Objetivos Específicos.	17
<b>IV. Materiales y Métodos</b>	18
4.1 Anticuerpos y Reactivos.	18
4.2 Líneas celulares y preparación de medios condicionados.	19
4.3 Separación de PBMCs desde sangre periférica.	19
4.4 Aislamiento de Linfocitos T CD4+.	20
4.5 Preparación Experimentos de Co-Cultivo.	20
4.6 Cultivo de linfocitos T CD4+ en contacto directo con las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231, o con sus medios condicionados.	21
4.7 Determinación del porcentaje de linfocitos T cooperadores (Th1 y Th17).	21
4.8 Determinación del porcentaje de linfocitos T reguladores.	22
4.9 Determinación de la proliferación de los linfocitos T CD4+.	23
4.10 Determinación del patrón de secreción de citoquinas.	23
4.11 Determinación de la abundancia de TGF- $\beta$ .	24
4.12 Análisis y procesamiento de datos.	25
<b>V. Resultados</b>	26
5.1 Producción de TGF- $\beta$ de las líneas RMG-EG, MCF-7 y MDA-MB-231.	26
5.2 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 en la proliferación de linfocitos T CD4+.	29
5.3 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia T reguladores.	31
5.4 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en la	35

expresión de Foxp3 en linfocitos T CD4+.	
5.5 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia T cooperadores (Th1 y Th17).	38
5.6 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en el patrón de secreción de citoquinas de linfocitos T CD4+.	42
5.6.1 Producción de IL-17A.	43
5.6.2 Producción de IFN- $\gamma$ .	45
5.6.3 Producción de TNF- $\alpha$ .	47
5.6.4 Producción de IL-10.	49
5.6.5 Producción de IL-6.	51
5.6.6 Producción de IL-4.	53
5.6.7 Producción de IL-2.	55
5.6.8 Resumen de resultados del patrón de secreción de citoquinas.	57
<b>VI. Discusión</b>	<b>58</b>
6.1 Células tumorales y producción de TGF- $\beta$ .	58
6.2 Efecto de las células tumorales sobre la proliferación de los linfocitos T CD4+.	60
6.3 Efecto de las células tumorales en la diferenciación de linfocitos T reguladores.	61
6.4 Efecto de las células tumorales en la diferenciación de linfocitos cooperadores.	64
<b>VII. Conclusión</b>	<b>74</b>
<b>VI. Referencias</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Vía de señalización de TGF- $\beta$ .	11
<b>Figura 2.</b> Producción de TGF- $\beta$ por las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231.	28
<b>Figura 3.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 en la proliferación de linfocitos T CD4+.	30
<b>Figura 4.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Tregs.	33
<b>Figura 5.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la expresión de Foxp3 en linfocitos T CD4+.	36
<b>Figura 6.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Th1.	40
<b>Figura 7.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la producción de IL-17A de linfocitos T CD4+.	44
<b>Figura 8.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 en la producción de IFN- $\gamma$ de linfocitos T CD4+.	46
<b>Figura 9.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la producción de TNF- $\alpha$ de linfocitos T CD4+.	48
<b>Figura 10.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la producción de IL-10 de linfocitos T CD4+.	50
<b>Figura 11.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la producción de IL-6 de linfocitos T CD4+.	52
<b>Figura 12.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la producción de IL-4 de linfocitos T CD4+.	54
<b>Figura 13.</b> Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ en la producción de IL-2 de linfocitos T CD4+.	56
<b>Tabla 1.</b> Resumen de resultados del patrón de secreción de citoquinas.	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Células presentadoras de antígeno.

CBA: *Cytometric Bead Array*.

CD: *Cluster* o grupo de Diferenciación.

CCL: Ligando de quimioquina motivo C-C.

CFSE: Succinimidil éster de carboxi-fluoresceína.

DC: Célula Dendrítica.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FCS: Suero fetal bovino.

ECM: Matriz Extracelular.

EMT: Transición epitelial- mesenquimal.

ER: Receptor de estrógeno.

IFN: Interferón.

IL: Interleuquina.

LAP: Péptido asociado a latencia.

LC: Línea Celular.

LTBP: Proteína de unión a TGF- $\beta$  latente.

MC: Medio Condicionado.

MHC-I: Complejo principal de histocompatibilidad de clase I.

MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad de clase II.

MMP: Metaloproteinasas de matriz.

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica.

PBS: Tampón de fosfato salino.

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato.

PR: Receptor de Progesterona.

TCR: Receptor de células T.

Tregs: Linfocitos T reguladores.

ROR $\gamma$ t: Receptor huérfano relacionado a RAR  $\gamma$  isoforma t.

T $\beta$ R: Receptor de TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

Th: *T helper*, T cooperadores.

TNF: *Tumor necrosis factor*, Factor de necrosis tumoral.

## RESUMEN

El microambiente inflamatorio en los tumores está caracterizado por la presencia de leucocitos en el sitio del tumor, los cuales inicialmente han sido asociados con un rol protector. Sin embargo trabajos recientes han descrito que las células tumorales son capaces de modificar su microambiente para suprimir la respuesta inmune y favorecer su propio crecimiento. La generación de un microambiente inmunomodulador, que incluye la participación de células inmuno reguladoras como los linfocitos T reguladores, disminuye la respuesta inmune efectora anti-tumoral, aumenta los procesos pro-tumorales y la respuesta inmune supresora.

Una de las citoquinas claves involucradas en este efecto es el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el cual está altamente expresado en células de cáncer de mama y puede alterar la activación, maduración y diferenciación de células del sistema inmune innato y adaptativo. En relación al sistema inmune adaptativo, numerosas evidencias demuestran que TGF- $\beta$  tiene diversos efectos en todos los subtipos de los linfocitos T CD4+, los cuales son centrales en orquestar la respuesta inmune.

En un intento de caracterizar el rol inmunosupresor producido en el cáncer de mama, se analizó el efecto de células mamarias de estroma normal y de epitelio tumoral en la diferenciación de los linfocitos T CD4+, y el rol que juega TGF- $\beta$  en este fenómeno. Para ello se utilizó la línea celular de estroma mamario normal, RMF-EG, y las líneas celulares de epitelio tumoral mamario, MCF-7 (levemente invasiva) y MDA-MB-231(altamente invasiva).

Los resultados de la investigación indican que existe una correlación entre el nivel de malignidad y el efecto inmunosupresor/pro-tumoral inducido por las líneas

celulares de epitelio tumoral en los linfocitos T CD4+. Sin embargo se observó que los fibroblastos normales presentan una predisposición a generar un microambiente regulador en ausencia de otros componentes del estroma. No se encontró una relación directa entre los fenómenos descritos y la abundancia de TGF- $\beta$ .

Nuestros resultados sugieren que las líneas celulares de epitelio tumoral mamario favorecen la generación de un microambiente inmunosupresor, aumentando la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T reguladores y promoviendo un cambio en el patrón de secreción de citoquinas hacia un perfil pro-tumoral.

## ABSTRACT

Inflammatory microenvironment in tumors is characterized by the presence of leukocytes at the tumor, which initially has been associated with a protective role. However recent studies have shown that tumor cells are capable of modifying their microenvironment in order to suppress the immunological response and favor their own growth. The generation of an immunomodulatory microenvironment, including the involvement of immunoregulatory cells such as regulatory T cells, decreases the anti-tumor effector immune response, increases the pro-tumor processes and suppressive immune response.

One of the key cytokines involved in this effect is transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), which is highly expressed in breast cancer cells and has been shown to alter the activation, maturation and differentiation of cells of both the innate and adaptive immune system. Regarding the adaptive immune responses, several evidences show that TGF- $\beta$  has different effects in all subtypes of CD4+ T lymphocytes, which are central in orchestrating immune responses.

In an attempt to characterize the immunosuppressive role produced on breast cancer, we analyzed the effect of mammary cells from normal stroma and tumor epithelium in the differentiation of CD4 + T lymphocytes, and the role of TGF- $\beta$  in this phenomenon. For this purpose, stromal normal mammary cell line RMF-EG, and tumor mammary cell lines, MCF-7 (slightly invasive) and MDA-MB-231 (highly invasive) were used.

The results of this study indicate that there is a correlation between the level of malignancy and the immunosuppressive/pro-tumoral effect induced by epithelial tumor

cell lines on CD4 + T lymphocytes. However it was found that normal fibroblasts show a predisposition to generate an immunosuppressive microenvironment in absence of other stromal components. However, a direct relationship between the phenomena described and the abundance of TGF- $\beta$  was not found.

Our results, suggest that tumor epithelium mammary cell lines favor the establishment of an immunosuppressive microenvironment by increasing the differentiation of CD4 + T lymphocytes to regulatory T cells and promoting a change in the cytokine secretion pattern towards a pro-tumor profile.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Introducción al Sistema Inmune

El sistema inmune es el conjunto de órganos, tejidos, células y factores solubles, cuya función fisiológica es defender el organismo. La respuesta inmune es la acción coordinada del sistema inmune desplegada contra un antígeno, el cual puede inducir una respuesta de tolerancia hacia lo propio, o de inmunidad frente a macromoléculas (proteínas, polisacáridos, etc.) y compuestos químicos que sean reconocidos como ajenos, o no propios, por el organismo. La respuesta inmune inicial comienza a través de la inmunidad innata que contempla las primeras reacciones de defensa que se desencadenan frente al daño de tejidos o al reconocimiento de un agente patógeno. Está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos compuestos por barreras físicas y químicas (epitelios y sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies), células fagocíticas (células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y linfocitos *natural killer*) y factores solubles (el sistema del complemento, moléculas mediadoras de inflamación, citoquinas, quimioquinas, etc.). Estos mecanismos son específicos contra estructuras comunes de microorganismos patógenos y no distinguen diferencias sutiles entre los antígenos derivados de éstos, pero producen una respuesta rápida que elimina el patógeno y/o repara el tejido. Por otra parte, además de la respuesta inmune innata existe la respuesta a través de la inmunidad adaptativa que posee una gran especificidad frente a una alta diversidad de antígenos y la propiedad de responder con una mayor eficacia gracias a la creación de memoria a partir de exposiciones repetidas a un antígeno. Está compuesta por los linfocitos T y B y sus

productos de secreción (citoquinas, anticuerpos, etc.), que desencadenan la respuesta inmune celular y humoral, respectivamente (Abbas, y col., 2008a).

### **1.1.1 Respuesta Inmune Adaptativa Celular**

La respuesta inmune celular corresponde a aquella que elimina las infecciones intracelulares, fomentando la destrucción de los microorganismos fagocitados por células especializadas (como macrófagos), o la destrucción de células infectadas para suprimir los reservorios de la infección. Esta labor la llevan a cabo los linfocitos T, los cuales pueden ser de ayuda o cooperadores (CD4+) o citotóxicos (CD8+).

Para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, los antígenos son en primer lugar presentados a linfocitos T vírgenes (linfocitos que no han estado previamente expuestos a su antígeno) por las células dendríticas, las que se caracterizan por ser células presentadoras de antígeno (APC) profesionales. Las células dendríticas se ubican en la periferia, donde ocurre el daño al tejido o la entrada del agente patógeno, y se encargan de captar los antígenos microbianos, procesarlos y sufrir un proceso de maduración que involucra la expresión de moléculas de co-estimulación y la migración hacia los órganos linfoides. En estos órganos las células dendríticas se encuentran con los linfocitos T vírgenes, los activan y desencadenan la respuesta inmune. Para tal efecto, las células presentadoras de antígeno cuentan con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II), mediante las cuales presentan fragmentos peptídicos a los linfocitos T. El reconocimiento del complejo MHC-péptido se realiza mediante el receptor de linfocitos T llamado TCR, que es de distribución clonal, es decir, clones de linfocitos T con diferentes especificidades expresan TCR distintos.

Además, los linfocitos T sufren un proceso de diferenciación, el cual les permite adquirir una función efectora de acuerdo a la amenaza que deben enfrentar. Para esto, requieren no sólo del reconocimiento antigénico ya mencionado, sino también de señales de coestimulación, que son proporcionadas por moléculas coestimuladoras expresadas en la superficie de las APC. La vía mejor caracterizada es mediada por CD28, un receptor de membrana de los linfocitos T que se une a moléculas coestimuladoras B7 expresadas en las APC profesionales. Una tercera señal que determina la funcionalidad de los linfocitos T son las citoquinas presentes al momento de la activación, lo que les permite diferenciarse en distintos linajes de acuerdo a la función que se necesite llevar a cabo.

El proceso descrito anteriormente es el que ocurre de manera natural en el organismo, sin embargo, se han desarrollado técnicas para activar y diferenciar los linfocitos *in vitro*, siendo una de las más conocidas la utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen las proteínas CD3, encargada de transducir la señal que lleva a la activación, y CD28, encargada de la coestimulación (Abbas, y col., 2008b).

### **1.1.2 Linfocitos T CD4+**

Los linfocitos T CD4+ juegan un rol central en el sistema inmune, ya que ayudan a la diferenciación de los linfocitos B para producir anticuerpos, regulan la función de los macrófagos, aumentan y mantienen las respuestas de los linfocitos T CD8+, dirigen respuestas inmunes contra una gran variedad de patógenos y regulan las respuestas inmunes para controlar la autoinmunidad y ajustar la magnitud y persistencia de las respuestas.

Su diversidad funcional se explica en la diferenciación que pueden sufrir los linfocitos T CD4+ vírgenes una vez que son activados bajo distintas condiciones de polarización, originando diversos linajes de linfocitos T *helper* o cooperadores (Th). Básicamente se reconocen al menos cuatro tipos de linfocitos T CD4+: Th1, Th2, Th17 y T reguladores (Tregs). En relación a los linfocitos Th1 y Th2, la polarización está determinada principalmente por las citoquinas interleuquina (IL) 12 e IL-4 respectivamente. Los linfocitos Th1 expresan T-bet como factor de transcripción maestro y producen interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  e IL-2, lo cual activa los sistemas de defensa contra patógenos intracelulares y las respuestas anti-tumorales. Los linfocitos Th2 expresan el factor de transcripción maestro GATA-3 y secretan IL-4, 13 y 5, que son esenciales para la producción óptima de anticuerpos y eliminación de patógenos extracelulares. Un exceso de estas respuestas sin embargo, puede llevar a inmunopatologías. Una exacerbación de la respuesta Th1 está asociada con diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, mientras que un exceso en la producción de citoquinas derivadas de los linfocitos Th2 está involucrado en enfermedades atópicas que incluyen el asma alérgica (Murphy & Reiner, 2002). La polarización de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Th17 está controlada por el factor de transcripción maestro ROR $\gamma$ t y ocurre en presencia de TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , mientras que IL-21 e IL-23 favorecen la estabilidad y mantención del fenotipo. Los linfocitos Th17 secretan IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y CCL20, y contribuyen a la inflamación y a la autoinmunidad, sin embargo su rol en el cáncer permanece sujeto a debate (Bailey, y col., 2014)

#### **1.1.2.1 Linfocitos T reguladores**

El último linaje principal de los linfocitos T CD4+, los linfocitos Tregs, representan alrededor del 2-4% de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales

(Baecher-Allan, y col., 2004). Son esenciales para mantener la homeostasis inmune y se han relacionado además con la tolerancia oral, la inmunidad intestinal y el cáncer (Bilate & Lafaille, 2012). Los linfocitos T reguladores se pueden generar en el timo durante el desarrollo (Treg naturales, nTreg) o en la periferia ante condiciones polarizantes que principalmente inducen la expresión de su factor de transcripción maestro, Foxp3 (Treg inducidos, iTreg). Mientras que en los ratones es claro que los iTregs se generan por TGF- $\beta$ , IL-2 y ácido retinoico (RA) y producen citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ , en humanos existen sólo algunas evidencias que apuntan a que la combinación de TGF- $\beta$ /IL-2 podría inducir iTregs, sin embargo no está del todo definido qué citoquinas producen (Laurence & O'Shea, 2007).

El factor de transcripción Foxp3 es el regulador clave de la generación y función de los linfocitos Tregs, lo que se evidencia en que mutaciones en este factor llevan a una carencia funcional de las células Tregs que desencadena múltiples enfermedades autoinmunes (Bilate & Lafaille, 2012). Otros reportes afirman que la expresión sostenida de Foxp3 en células activadas puede conferir capacidades regulatorias, y que su expresión alta y estable es requerida para la función supresora (Sakaguchi, y col., 2010). Foxp3 actúa mediante una regulación negativa de genes relacionados a la activación de linfocitos T y sus citoquinas, y una sobre regulación de citoquinas y de moléculas inmunosupresoras. Además se ha reportado que actúa en sinergia con otros factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, Nr4a y NFAT (Luo & Li, 2013).

En relación a la función supresora de los linfocitos Tregs se han descrito cuatro mecanismos generales: secreción de citoquinas inhibitorias, citólisis, disrupción metabólica y alteración de las células dendríticas (Vignali, y col., 2008). En humanos, se han descrito dos mecanismos principales: supresión dependiente de contacto que

incluye la lisis de linfocitos T convencionales mediada por granzima A e inducción de apoptosis en células convencionales mediante la interacción CD95-CD95L. Otro mecanismo recientemente descrito es la supresión mediada por citoquinas, que incluye la atenuación de la función de las células dendríticas y la conversión de células T convencionales a linfocitos Treg mediada por IL-10 (Sakaguchi, y col., 2010).

## **1.2 Cáncer**

Cáncer, es el término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier órgano. Su característica principal es la proliferación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales, pudiendo invadir zonas adyacentes o propagarse a otros órganos (metástasis).

De acuerdo a estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial, causando 8,2 millones de defunciones en el año 2012, cifra que se estima seguirá aumentando. Los que tienen un mayor índice de mortalidad anual son los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. A nivel nacional y de acuerdo a estadísticas del Ministerio de Salud, en el año 2011 el cáncer se ubicó como la segunda causa principal de muerte y la tasa de mortalidad por cáncer mamario en mujeres fue de un 15,5%.

En la literatura se han descrito ciertas propiedades características o capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo tumoral. Hasta el año 2000 se habían descrito seis atributos principales: señal proliferativa sostenida, evasión de los supresores del crecimiento, activación de la invasión y metástasis, capacidad de inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2000). Investigaciones más recientes han añadido dos

características emergentes: la desregulación energética celular, que permite modificar o reprogramar el metabolismo para respaldar la proliferación neoplásica, y la evasión inmune que permite evitar la destrucción inmunológica por linfocitos T y B, macrófagos y células *natural killer*. Asimismo, se han descrito dos características consecuentes de la neoplasia que facilitan la adquisición de estas capacidades biológicas: inflamación promotora de tumor y mutación e inestabilidad en el genoma (Hanahan & Weinberg, 2010). Así, actualmente se acepta la existencia de un microambiente tumoral, que incluye no sólo las células neoplásicas, sino también el estroma y las células del mismo asociadas al tumor que juega un papel central en el desarrollo tumoral.

El estroma está formado por la matriz extracelular (MEC), compuesta de proteoglicanos, ácido hialurónico, colágeno, fibronectina, laminina, y de células estromales. Éstas últimas incluyen las células mesenquimales de soporte, como fibroblastos, adipocitos, etc.; células del sistema vascular y células del sistema inmune (Egeblad, y col., 2010). Bajo condiciones fisiológicas, la MEC brinda soporte e información contextual a las células y es producida por los fibroblastos y por las células epiteliales, las cuales se asocian en capas polarizadas; las células endoteliales proveen nutrientes y oxígeno y las células del sistema inmune combaten patógenos y remueven células apoptóticas. Ocasionalmente, las señales intracelulares que definen el contexto normal fallan y ocurren alteraciones que pueden llevar al movimiento de las capas epiteliales y a su proliferación, por ejemplo ante una herida. Esas condiciones son temporales y reversibles, sin embargo cuando la inflamación es persistente, ocurre un aumento en la producción de proteasas, tales como las metaloproteinasas de matriz (MMPs) producidas por los fibroblastos, que pueden degradar la MEC, y junto con factores producidos por las células del sistema inmune, promover la proliferación

anormal. Una vez que este proceso progresa, la organización normal del órgano es reemplazada por un desorden estructural y funcional, donde células epiteliales pre existentes que tuvieran potencial tumorigénico pueden comenzar a proliferar, o las interacciones anormales pueden causar inestabilidad genómica y la adquisición de un potencial tumorigénico (Bissell & Radisky, 2001). Finalmente el microambiente tumoral puede favorecer la transición epitelial-mesenquimal (EMT), usualmente asociada con la pérdida de la diferenciación y polarización epitelial y la ganancia de un fenotipo mesenquimal. Si bien este proceso juega un papel fundamental durante el desarrollo, se ha descubierto que también tiene un rol en la progresión tumoral, ya que induce un aumento en la motilidad y la invasión, permitiendo a las células tumorales adquirir la capacidad de infiltrar tejidos adyacentes y luego generar metástasis en sitios distantes (Kong, y col., 2011). De este modo, la asociación funcional de las células cancerígenas con el tejido que las rodea forma un “nuevo órgano” que cambia de acuerdo al progreso de la malignidad y puede llevar al desarrollo de metástasis y a la muerte.

### **1.2.1 Cáncer de mama**

El cáncer de mama es la neoplasia que posee mayor índice de mortalidad en mujeres en Chile, y pese a que existen tratamientos como la quimioterapia o la radioterapia, la heterogeneidad de este tipo de cáncer dificulta el desarrollo de una terapia generalizable a toda la población de mujeres que padecen la enfermedad.

Una clasificación que facilita el estudio del cáncer de mama está basada en la caracterización molecular, principalmente basada en los receptores a hormonas. Los receptores principales son el de progesterona (PR) y el de estrógeno (ER) y cuando cualquiera de ellos está presente, se dice que el cáncer es receptor hormonal positivo.

Estos cánceres suelen crecer más lentamente y usualmente responden a la terapia hormonal. Otra característica molecular es el nivel de expresión del oncogen Erb-B2 que codifica la proteína Her2/neu, que está sobre expresada en alrededor de uno de cada cinco cánceres, y se relaciona con un mayor nivel de agresividad, crecimiento y rapidez de propagación. Tanto los receptores como el oncogen, se consideran marcadores útiles en la determinación del tratamiento idóneo de los pacientes.

#### **1.2.1.1 Modelos de estudio de cáncer mamario**

Las líneas celulares han sido un elemento clave en el estudio de la carcinogénesis tumoral, de las vías de transducción de señales y de nuevos blancos terapéuticos para el cáncer de mama. Dos líneas celulares de cáncer mamario ampliamente utilizadas son MCF-7 y MDA-MB-231. La línea MCF-7 es una línea humana de adenocarcinoma mamario derivada de una efusión pleural, que posee morfología epitelial y expresa receptores de estrógeno y progesterona. Si bien se ha reportado que esta línea es tumorigénica en ratones sólo se produce metástasis con suplementación de estrógeno, por lo que se considera débilmente invasiva (Subik, y col., 2010). Por otra parte, la línea MDA-MB-231 es una línea humana de adenocarcinoma mamario derivada de una efusión pleural, de morfología epitelial triple negativa, ya que no expresa ER, PR, ni Her2/neu. Además presenta altos niveles de expresión de Ki-67, una proteína expresada durante el ciclo celular en células en proliferación. Esta línea se considera fuertemente invasiva (Subik, y col., 2010). Por otra parte, el desarrollo de líneas del tipo estromal ha permitido estudiar la potencial influencia de esos componentes en el fenómeno tumoral. Una de ellas es RMF-EG, una línea de fibroblastos estromales mamaros humanos inmortalizados con telomerasa humana, desarrollada a partir de una muestra de mamoplastías reductivas

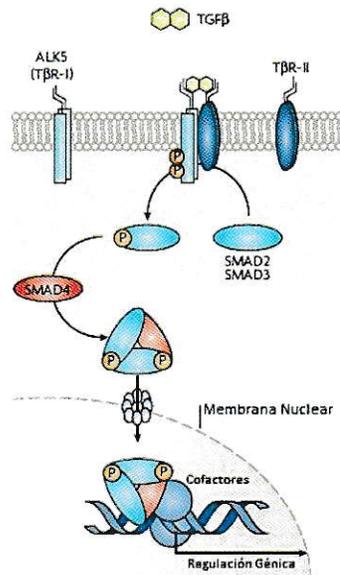
y donada a nuestro laboratorio por la Dra. Ch. Kupperwasser de Tufts University. Los fibroblastos son diploides, comparten las características de los fibroblastos normales y no son tumorigénicos (Kupperwasser, y col., 2004). Como los mencionados, existen múltiples modelos de estudio que intentan dilucidar los procesos biológicos complejos involucrados en el cáncer de mama.

### **1.3 TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  es una citoquina pleiotrópica perteneciente a la familia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), que se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, siendo expresado por células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas, neuronales y células del tejido conectivo, como los fibroblastos. Existen tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, 2 y 3) que son codificadas por genes distintos y son expresadas específicamente de acuerdo al tejido y al período del desarrollo. TGF- $\beta$ 1 es expresado en células del tejido conectivo, endoteliales y hematopoyéticas; TGF- $\beta$ 2 en células epiteliales y neuronales y TGF- $\beta$ 3 inicialmente en células mesenquimales. TGF- $\beta$  tiene múltiples funciones: regula la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos y la angiogénesis (Blobe, y col., 2000). Además se le ha asociado un rol regulador en el sistema inmune (Flavell, y col., 2010).

La forma activa de TGF- $\beta$  es un dímero de 25kDa en el que dos cadenas polipeptídicas interactúan mediante un enlace disulfuro e interacciones hidrofóbicas. Es inicialmente sintetizado como una proteína precursora, la cual es procesada a una forma inactiva (latente) compuesta de TGF- $\beta$  maduro unido no covalentemente al remanente amino terminal del precursor llamado péptido asociado a latencia (LAP). Para poder ejercer su función, TGF- $\beta$  debe ser liberado mediante activación

proteolítica, lo que puede ser realizado por múltiples proteasas, entre las que se encuentran las metaloproteinasas (MMPs) u otros mecanismos como la integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ . Además el TGF- $\beta$  latente puede ser unido a la matriz extracelular por la proteína de unión a TGF- $\beta$  latente (LTBP; Munger, y col, 1997). Para desencadenar sus efectos biológicos, TGF- $\beta$  se une a los receptores de TGF- $\beta$  tipo I (T $\beta$ R-I) y tipo II (T $\beta$ R-II), que contienen Ser-Thr kinasas en su dominio intracelular, capaces de señalizar a través de proteínas Smad. Éstas, junto con otros factores de transcripción, finalmente regulan la transcripción de genes de respuesta a TGF- $\beta$ . La vía de señalización y sus distintos componentes se muestran en la figura 1.



**Figura 1. Vía de Señalización de TGF- $\beta$ .** TGF- $\beta$  se une al receptor de TGF- $\beta$  tipo II (T $\beta$ R-II), que recluta y fosforila al receptor de TGF- $\beta$  tipo I (T $\beta$ R-I), ALK5. El T $\beta$ R-I activado induce la fosforilación de las proteínas Smad2 o Smad3 (Smad2/3), las cuales forman un complejo heteromérico con Smad4. El complejo es translocado desde el citoplasma al núcleo, en el cual interactúa de manera célula específica con otros factores de transcripción para regular la expresión de genes de respuesta a TGF- $\beta$  y mediar los efectos celulares de esta citoquina (Schmierer & Hill, 2007)

### 1.3.1 El rol de TGF- $\beta$ en el cáncer

TGF- $\beta$  juega un rol dual y paradójico en el cáncer, debido a su pleiotropía y acción altamente dependiente del contexto. En células normales, es decir, es una fase pre-maligna de la carcinogénesis, actúa a través de su vía de señalización y bloquea el ciclo celular en estadio G1 para inhibir la proliferación, inducir la diferenciación y promover la apoptosis. Durante la transformación de una célula normal a una célula tumoral, ésta puede volverse resistente al efecto inhibitorio de TGF- $\beta$ , debido, entre otras causas, a que varios componentes de la vía de señalización de TGF- $\beta$  pueden sufrir mutaciones. Tales células resistentes proliferan de manera desregulada y junto con las células estromales que las rodean (como fibroblastos) incrementan la producción de TGF- $\beta$ , el que actúa en las células estromales circundantes, células inmunes y células endoteliales, causando inmunosupresión, angiogénesis, y por tanto aumentando la invasividad del tumor (Blobe, y col., 2000). Esta dualidad también ha sido observada en un estudio en cáncer de mama en el que se observó que la activación de la señalización de TGF- $\beta$  retrasa significativamente la aparición de tumores, sin embargo en etapas posteriores de la enfermedad provoca un aumento importante de focos metastásicos hacia pulmón (Siegel, y col., 2003). Así, se ha concluido que TGF- $\beta$ 1 está frecuentemente sobre expresado en el cáncer mamario, lo que se ha correlacionado con una mayor agresividad, pobre pronóstico y progresión hacia metástasis en estadios avanzados de la enfermedad (Ivanovic, y col., 2003).

Datos de nuestro laboratorio, indican que la producción de TGF- $\beta$  por la célula epitelial está asociada directamente con la malignidad de la célula productora (Guerrero et al, 2010). Sin embargo, resulta interesante investigar si la

biodisponibilidad de ese TGF- $\beta$  también se correlaciona con la malignidad, ya que como se mencionó, TGF- $\beta$  se encuentra usualmente asociado a un complejo proteico que lo mantiene inactivo. Para determinar la abundancia del TGF- $\beta$  biodisponible o activo se han desarrollado ensayos basados en vectores que contienen promotores sensibles a TGF- $\beta$ , que inducen una respuesta lumínica que se puede correlacionar con la abundancia de TGF- $\beta$  biodisponible o activo (Abe, y col., 1994).

### **1.3.2 El rol de TGF- $\beta$ en el sistema inmune**

Múltiples células del sistema inmune producen y se ven afectadas por los efectos de TGF- $\beta$ , ya que esta citoquina juega un rol fundamental en la regulación de las respuestas inmunes durante homeostasis, infección y diversas enfermedades. La isoforma más altamente expresada en células del sistema inmune es TGF- $\beta$ 1, y se ha visto que ratones que carecen de ésta, mueren en etapas tempranas por inflamación multisistémica (Shull, y col., 1992). TGF- $\beta$  ejecuta diversos efectos en las células del sistema inmune, que son modulados por el estado de diferenciación de la célula y por la presencia de citoquinas inflamatorias y moléculas de coestimulación. TGF- $\beta$  puede suprimir o alterar la activación, maduración y/o diferenciación de las células *natural killer*, células dendríticas (DCs), macrófagos, neutrófilos y linfocitos B, T CD4+ y T CD8+ (Flavell, y col., 2010).

TGF- $\beta$  tiene múltiples efectos en los linfocitos T CD4+. En relación al efecto en la proliferación de los linfocitos T CD4+ humanos se ha visto que tiene un efecto estimulador o inhibitorio dependiendo del estado de diferenciación, estimulando la proliferación de los linfocitos T CD4+ vírgenes, y suprimiendo la de los linfocitos T

CD4+ de memoria (de Jong, y col., 1994). Otro efecto en el que TGF- $\beta$  estaría involucrado es la promoción de la supervivencia en la periferia de los linfocitos T CD4+ vírgenes que interactúan con baja afinidad hacia los auto-antígenos, con la finalidad de mantener un repertorio diverso de células T. Además, se ha identificado que regula la tolerancia periférica mediante supresión inmune activa o regulación directa de los linfocitos efectores (Th1, Th2). En relación a la diferenciación de los linfocitos T CD4+, existen evidencias que apuntan a que TGF- $\beta$  inhibe los subtipos Th1 y Th2 suprimiendo sus factores de transcripción maestros T-bet (Neurath, y col., 2002) y GATA-3 respectivamente (Kawahara, y col., 2012). Además, TGF- $\beta$  combinado con otras citoquinas, puede inducir la diferenciación de células T CD4+ vírgenes a linfocitos Th17 o bien a iTreg, lo que las lleva a adquirir actividad supresora, principalmente mediada por la inducción de la expresión de Foxp3 (Chen, y col., 2003).

#### **1.4 El rol del sistema inmune en el cáncer**

El microambiente tumoral está caracterizado por la presencia de leucocitos del huésped en las áreas del tumor y del estroma. Inicialmente esto se relacionó sólo con un rol protector, en el cual las células del sistema inmune reconocen y destruyen clones de células propias transformadas antes de que se conviertan en tumores, o las matan después que se hayan transformado (Burnet, 1970). A este rol protector se han asociado los linfocitos Th1, ya que secretan IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, citoquinas que activan las respuestas anti-tumorales en las células reclutadas del sistema inmune innato, y en los linfocitos T citotóxicos, favoreciendo la destrucción del tumor (DeNardo & Coussens, 2007). Además, un estudio realizado en pacientes con cáncer gastrointestinal demostró que los linfocitos de sangre periférica (PBL) y los del

linfonodo drenante (LNL) de pacientes con cáncer contenían una menor proporción de linfocitos Th1 en relación a los PBL de donantes sanos (Nakayama, y col., 2000).

Por otra parte, si las células no son eliminadas en esta primera fase, el sistema llega a un equilibrio, en el que el tumor persiste, pero su expansión es prevenida por la presión inmune. Finalmente, ocurre un desbalance que permite el desarrollo tumoral como resultado de la extenuación o inhibición de la respuesta inmune o de mecanismos de evasión inmune desplegados por el tumor (Gavin, y col., 2006). Este rol dual de la respuesta inmune se ha encontrado tanto en el sistema inmune innato, como en el sistema inmune adaptativo, sin embargo se ha descrito que las respuestas inducidas por linfocitos T y B son capaces de regular la bioactividad y la progresión tumoral asociada a células del sistema inmune innato, lo que sitúa a las células linfoides como reguladores centrales de la respuesta inmune. Particularmente, la falla en el control de la progresión tumoral se ha asociado principalmente con la presencia de linfocitos Tregs en el microambiente tumoral (Whiteside, 2008).

El estudio de los linfocitos infiltrantes del tumor realizado en un modelo de melanoma murino reveló que tanto los linfocitos Th17 como los Tregs se encontraban incrementados, siguiendo el desarrollo del tumor y alcanzando su máximo nivel en tumores avanzados (Kryczek, y col., 2007). Otro estudio, realizado en pacientes con carcinoma ductal invasivo (IDC) de mama, encontró un aumento en la infiltración de linfocitos CD4+Foxp3+ en el microambiente tumoral, los cuales tenían una expresión incrementada de Foxp3 y otras moléculas relacionadas con su función supresora como GITR y CTLA-4. En este estudio el aumento en la infiltración de células CD4+Foxp3+ se atribuyó al reclutamiento de estas últimas mediado por la interacción CCR4/CCL22 expresados por los linfocitos Tregs y por las células del tumor respectivamente. Otro

hallazgo relevante de este estudio fue que la estimulación *in vitro* de linfocitos CD4+ y CD8+ de pacientes con IDC producía mayores cantidades de IL-17A, y dado que esta citoquina se ha relacionado con un aumento en la producción de mediadores de la angiogénesis como VEGF y de metaloproteinasas claves en la metástasis como MMP-2 y MMP-9, IL-17A también podría tener un rol pro tumoral. Así la acumulación de células Th17 y de Tregs en el sitio del tumor contribuiría a la progresión de la enfermedad (Benevides, y col., 2013). Otro estudio de los linfocitos infiltrantes del tumor en cáncer de mama, mostró un incremento en la población Th17 que sería producto del reclutamiento de estas células mediado por la expresión de CCL-2 y CCL-5 de parte de las células del tumor y de los fibroblastos del microambiente tumoral, las cuales además producirían citoquinas pro-inflamatorias que contribuirían con la expansión de los linfocitos Th17 (Su, y col., 2010).

De este modo, el aumento en los linfocitos Tregs y Th17 infiltrantes del tumor ha sido relacionado con un aumento en el reclutamiento de éstas células hacia el sitio del tumor, sin embargo se sabe muy poco sobre el efecto de las celulares tumorales en la diferenciación de los linfocitos T CD4+. De hecho, en cáncer de mama no existen reportes al respecto, sin embargo un estudio realizado con líneas celulares de cáncer gástrico, demostró que éstas son capaces de inducir linfocitos Tregs mediante la inducción de la expresión de Foxp3+ en linfocitos T CD4+, y que éste efecto estaría mediado por TGF- $\beta$ 1 (Yuan, y col., 2011). Así, sería interesante estudiar si el aumento en los linfocitos Tregs y Th17 sólo es causado por el reclutamiento de estas células, o si además las células tumorales mamarias son capaces de inducir la diferenciación de los linfocitos TCD4+ hacia estos fenotipos que favorecen al desarrollo del tumor.

## **2 HIPÓTESIS**

La producción de TGF- $\beta$  por el epitelio tumoral mamario favorece la generación de un microambiente inmunosupresor que modula la diferenciación de los linfocitos T CD4+.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo General**

Estudiar el efecto de estroma mamario normal y de epitelio tumoral en la diferenciación de los linfocitos T CD4+.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la abundancia de TGF- $\beta$  bioactivo en cultivos de células humanas de estroma normal y de epitelio tumoral.
- Determinar el patrón de secreción de citoquinas en co-cultivos de linfocitos T CD4+ con células de estroma normal, de epitelio tumoral o con los medios condicionados por las líneas celulares.
- Determinar el fenotipo de las distintas poblaciones de linfocitos T CD4+, diferenciados desde co-cultivos con células de estroma mamario normal, de epitelio tumoral o con medios condicionados por las líneas celulares.
- Determinar la influencia de TGF- $\beta$  en el efecto del estroma normal y del epitelio tumoral en la diferenciación de los linfocitos T CD4+.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Anticuerpos y Reactivos.

Para los análisis con citometría de flujo, se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-humano: CD4-FITC (Biolegend), CD4-APC (Biolegend), IL-17A-Alexa488 (BD Pharmingen), IFN- $\gamma$ -PE (Biolegend) y Foxp3-APC (eBioscience). Para los experimentos de activación policlonal *in vitro* de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados, se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD3 ( $\alpha$ CD3; eBioscience) y anti-CD28 ( $\alpha$ CD28; Biolegend). Para la curva de dosis respuesta a TGF- $\beta$ , se utilizó TGF- $\beta$ 1 recombinante (R&D systems). Para los experimentos de determinación de linfocitos T reguladores, se utilizó el “Human Regulatory T Cell Staining Kit #2” (eBioscience). Para los experimentos de determinación de citoquinas intracelulares se utilizó el “BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit with BD GolgiStop™ protein transport inhibitor containing monensin” (BD Biosciences), Ionomicina (Sigma-Aldrich) y PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato, Sigma). Para la determinación del patrón de citoquinas secretado por las células, se utilizó el “BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit” (BD Biosciences). Para los experimentos de proliferación se utilizó CFSE (Succinimidil éster de carboxi-fluoresceína, eBioscience). Otros reactivos utilizados para descartar las células muertas fueron *Viability Dye (Fixable Viability Dye* eFluor 780, eBioscience) y PI (yoduro de propidio, Sigma-Aldrich). En algunos experimentos se utilizó el inhibidor del receptor tipo I de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-I), SB431542 (TOCRIS bioscience) y como control del vehículo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). Para los experimentos de determinación de TGF- $\beta$  se utilizó el “Dual-Luciferase® Reporter Assay” (Promega).

#### **4.2 Líneas celulares y preparación de medios condicionados.**

Las células de epitelio tumoral mamario humano MCF-7 y MDA-MB-231, fueron obtenidas desde ATCC (Manassas, VA, USA), y se cultivaron en medio DMEM/F12 (GIBCO, Life technologies), suplementado con 10% FCS. Las células RMF-EG de estroma mamario normal inmortalizado fueron amablemente donadas por la doctora Charlotte Kuperwasser (Tufts University, Boston, MA, USA). Las células AD-293 (células derivadas de HEK293 con mayor capacidad de adhesión) fueron obtenidas desde Agilent Technologies (Santa Clara, California, USA). Las células RMF-EG y las AD-293 fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Life technologies) suplementado con 10% FCS. Todas las células fueron mantenidas en una atmósfera humidificada a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Para preparar los medios condicionados, las células fueron cultivadas en las condiciones previamente mencionadas a una densidad aproximada de 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>. Cuando el cultivo alcanzó un 80% de confluencia, las células se lavaron con PBS (GIBCO, Life Technologies) y posteriormente se incubaron por 48 horas en medio libre de suero. Transcurrido este tiempo el medio se colectó y centrifugó por 5 minutos a 800 x g a 4°C. Los medios condicionados fueron filtrados con filtros de 0,45µm (Biofil, TCL) y almacenados a -20°C para su posterior utilización.

#### **4.3 Separación de PBMCs desde sangre periférica.**

Se obtuvo sangre periférica de trece voluntarios sanos mediante venopunción. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas por un gradiente de densidad de Ficoll, utilizando el Lymphocyte Separation Medium (GeneXpress). Para realizar el gradiente, 20mL de sangre se diluyeron 1:1 en PBS y se agregaron cuidadosamente sobre 10mL de Ficoll en un tubo de 50mL. Posteriormente el tubo se centrifugó 20 minutos a 450 x g en una centrifuga Beckman

TJ-6. Se rescató el anillo de PBMCs y se lavaron las células dos veces con 30mL de PBS para descartar los restos de Ficoll. Las PMBCs se contaron y se separaron  $1,2 \times 10^6$  células para la determinación del fenotipo inicial.

#### **4.4 Aislamiento de linfocitos T CD4+.**

Las PMBCs restantes se utilizaron para separar linfocitos T CD4 mediante selección inmunomagnética utilizando *anti-human CD4 microbeads* (Miltenyi Biotec). Para tal efecto las PBMCs se centrifugaron a  $600 \times g$  por 7 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , y el pellet se resuspendió en 80ul de buffer MACS (verseno + 0,5%FCS) por cada  $10^7$  células. Luego se agregaron 10ul de MACS CD4 por cada  $10^7$  células y se incubaron por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$  en rotación. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con 10mL de buffer MACS. El pellet se resuspendió en 1mL de buffer MACS y las células se separaron utilizando columnas LS (Miltenyi Biotec) y el imán MACS MultiStand con el QuadroMACS™ Separator (Miltenyi Biotec). La columna se lavó previamente con 3mL de buffer MACS, luego se pasó la muestra, y se realizaron tres lavados con 3mL de buffer MACS, lo que originó la fracción negativa de la separación. Desde ésta se separaron  $0,2 \times 10^6$  células para el fenotipo inicial. La fracción positiva formada por los linfocitos T CD4 se eluyó con 6mL de buffer MACS. Los linfocitos T CD4 de la fracción positiva se contaron, y se separaron  $0,2 \times 10^6$  células para el fenotipo inicial.

#### **4.5 Preparación Experimentos de Co-Cultivo**

Las células RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 se sembraron en placas de 24 pozos P24 (Orange, TCL) en 1mL de medio DMEM/F12 suplementado con 10%FCS. Se sembraron  $0,02 \times 10^6$  células RMF-EG,  $0,04 \times 10^6$  células MCF-7 y  $0,02 \times 10^6$  células MDA-MB-231 por pozo respectivamente, 24 horas antes del co-cultivo.

#### **4.6 Cultivo de linfocitos T CD4+ en contacto directo con las líneas RMF-EG, MCF-7 Y MDA-MB-231, o con sus medios condicionados.**

Los linfocitos T CD4 fueron aislados como se describió previamente, y se lavaron del buffer MACS con DMEM/F12+10%FCS. Posteriormente, en los experimentos de co-cultivo se descartó todo el medio de cultivo de las células adherentes sembradas 24 horas antes y se agregaron cuidadosamente  $0,5 \times 10^6$  linfocitos T CD4 en DMEM/F12+5%FCS, con un volumen final de 1mL por pozo. En los experimentos de cultivo con los medios condicionados se utilizaron los condicionados por RMF-EG, MCF-7 o MDA-MB-231 al 50% (concentración óptima tras probar 25%, 50% y 75%) en placas de 24 pozos (P24), y luego se agregaron  $0,5 \times 10^6$  linfocitos T CD4+, de modo de dejar un volumen final de 1mL con medio DMEM/F12+5%FCS. En los experimentos de diferenciación a linfocitos T cooperadores, los linfocitos se activaron con los anticuerpos  $\alpha$ CD3 (1 $\mu$ g/mL) y  $\alpha$ CD28 (2 $\mu$ g/mL). En algunos experimentos, se utilizó el inhibidor de T $\beta$ R-I, SB431542, diluido en DMSO con una concentración final de 10 $\mu$ M. Como control de vehículo se agregó en otro cultivo la misma cantidad de DMSO.

Transcurridos cinco días, se colectaron los sobrenadantes de los cultivos para determinar la concentración de citoquinas por CBA y las células para determinar las distintas poblaciones de linfocitos T CD4+ (linfocitos Th1, Th17 y Treg).

#### **4.7 Determinación del porcentaje de linfocitos T cooperadores (Th1 y Th17)**

Transcurridos cinco días, se colectaron las células de los experimentos de co-cultivo (linfocitos T CD4+ cultivados con las líneas celulares o con los medios condicionados por las líneas celulares) y se centrifugaron a 800 x g por 5 minutos a 4°C para separar el sobrenadante y las células. Además se tripsinizaron los pozos a 37°C por 5 minutos para rescatar los restos de células adheridos en la placa.

Posteriormente las células se activaron con PMA (0,25 $\mu$ M), Ionomicina (1 $\mu$ g/mL) y Monensina (2,0 $\mu$ M) por 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS+2%FCS y se marcaron por 30 minutos a 4°C en la misma solución utilizando el anticuerpo de superficie CD4-APC (1/100) y el reactivo Viability Dye (1/1000). Posteriormente se realizó marcaje intracelular de las células utilizando el "BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit" de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se fijaron y permeabilizaron por 20 minutos a 4°C, utilizando la solución Fixation/Permeabilization. Luego, las células se lavaron con Perm Wash Buffer, y se marcaron en el mismo buffer utilizando los anticuerpos IFN- $\gamma$ -PE (1/100) e IL-17A-Alexa488 (1/50) por 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo las células se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences).

#### **4.8 Determinación del porcentaje de linfocitos T reguladores.**

Transcurridos cinco días, se colectaron las células de los experimentos de co-cultivo (linfocitos T CD4+ cultivados con las líneas celulares o con los medios condicionados por las líneas celulares) y se centrifugaron a 800 x *g* por 5 minutos a 4°C para separar el sobrenadante y las células. Además se tripsinizaron los pozos a 37°C por 5 minutos para rescatar los restos de células adheridos en la placa. Las células se analizaron para determinar el porcentaje de células CD4+Foxp3+, y para ello se utilizó el "Human Regulatory T Cell Staining Kit #2" de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron marcadas en Staining Buffer utilizando el anticuerpo CD4-FITC (1/100) y el reactivo Viability Dye (1/1000) por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas por tres horas a 4°C, utilizando el Fixation/Permeabilization Buffer. Transcurridas las tres horas, las células

se lavaron con Permeabilization Buffer, y se marcaron en el mismo buffer por 18 horas a 4°C, utilizando el anticuerpo Foxp3-APC (1/50). Finalmente, las células se lavaron en buffer de permeabilización, se resuspendieron en staining buffer y se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences).

#### **4.9 Determinación de la proliferación de los linfocitos T CD4+.**

Los linfocitos T CD4 fueron activados con los anticuerpos  $\alpha$ CD3 (1 $\mu$ g/mL) y  $\alpha$ CD28 (2 $\mu$ g/mL), marcados con CFSE (5 $\mu$ M) y co-cultivados con las líneas celulares o con los medios condicionados por las líneas celulares. Transcurridos cinco días, se colectaron las células de los cultivos y se centrifugaron a 800 x *g* por 5 minutos a 4°C para separar el sobrenadante y las células. Además se tripsinizaron los pozos a 37°C por 5 minutos para rescatar los restos de células adheridos en la placa. Las células se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro BD FACSCanto II. Las células muertas se descartaron utilizando yoduro de propidio (1,5 ng/ $\mu$ L por cada 0,5x10<sup>6</sup> células), el cual se agregó justo antes de pasar las muestras por el citómetro de flujo. Para el análisis de la proliferación se consideró la dilución del CFSE y se determinó el porcentaje de proliferación como la suma de todos los peaks de proliferación.

#### **4.10 Determinación del patrón de secreción de citoquinas**

Se colectaron los sobrenadantes de los experimentos de co-cultivo (linfocitos T CD4+ cultivados con las líneas celulares o con los medios condicionados por las líneas celulares) tras cinco días, y se centrifugaron a 800 x *g* por 5 minutos a 4°C para separar el sobrenadante libre de restos celulares. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C para sucesivos análisis de determinación del patrón de citoquinas. Para ello, se utilizó el "BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit" de acuerdo a las instrucciones de manufacturación. Este kit permitió medir la producción

de IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. Brevemente, se realizó una mezcla de beads marcadas con cada anticuerpo. 11ul de ésta mezcla se incubó con 11ul del sobrenadante a analizar y 11ul de reactivo de detección, por tres horas a temperatura ambiente en oscuridad. Después las muestras se lavaron y analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro BD FACSCanto II.

#### **4.11 Determinación de la abundancia de TGF- $\beta$ bioactivo**

Para determinar el contenido de TGF- $\beta$  se utilizó el “Dual-Luciferase® Reporter Assay” (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron  $0,75 \times 10^5$  células AD-293/pozo en placas de 48 pozos. Veinticuatro horas después las células fueron co-transfectadas con dos plasmidios: el vector pRL-CMV Vector (Promega), que tiene el promotor constitutivo CMV dirigiendo la transcripción del gen que codifica para la proteína luciferasa de *Renilla*; y el vector 3TP-Luc, que contiene tres elementos de respuesta a TPA consecutivos y una porción de la región promotora de PAI-1, gen blanco de la vía de TGF- $\beta$ , dirigiendo la transcripción del gen que codifica para la proteína luciferasa de Luciérnaga, clonado en el pGL2-Basic Vector (Promega). La mezcla de transfección contenía 400ng del vector 3TP-Luc, 10ng del vector pRL-CMV, 1,2 $\mu$ l de reactivo de transfección TransIT®-2020 (Mirus) en 40 $\mu$ l de DMEM sin suero, por pozo, y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente para que se formaran los complejos de transfección. Luego, las células se transfectaron por 6 horas agregando 40 $\mu$ l de mezcla en un volumen final de 300 $\mu$ l de DMEM por pozo. Pasadas las 6 horas, las células se lavaron con PBS y se estimularon con medio condicionado proveniente de las líneas celulares, en una relación 1:3 con respecto a medio fresco DMEM en un volumen final de 300 $\mu$ l. Las células se estimularon 16 horas

(tiempo óptimo de estimulación) y luego se lisaron utilizando el buffer de lisis pasiva del kit “Dual-Luciferase® Reporter Assay”. Posteriormente se determinó la luminiscencia en la muestra, agregando el reactivo LAR II del kit, que es sustrato de la luciferasa de luciérnaga. Luego, se detuvo la reacción utilizando el sustrato Stop&Glow, el cual además es sustrato de la luciferasa de *Renilla*. Finalmente se estableció la razón entre la luminiscencia generada por la luciferasa de luciérnaga y la de *Renilla*, y se normalizaron todos los resultados con respecto al control (estimulación de las células AD-293 sólo con medio fresco), obteniéndose las unidades relativas de luminiscencia (URL) para cada punto experimental.

#### **4.12 Análisis y procesamiento de datos**

Todos los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo v8.7. La única excepción fueron los datos del patrón de secreción de citoquinas, los cuales se analizaron en el BD FACS DIVA Software, y posteriormente en el BD CBA Software – CBA 8 Bead Analysis. Para todos los análisis de citometría de flujo se consideró una gate linfocítica de acuerdo a los parámetros de SSC-A y FSC-A, y se descartaron las células muertas utilizando Viability Dye o PI. Los análisis estadísticos, los gráficos y la regresión polinomial de tercer orden con la posterior interpolación de valores, fueron realizados en el software GraphPad Prism 5.0. Se descartaron los datos fuera de rango u *outliers* realizando la prueba de Grubbs, para lo cual se utilizó nuevamente el software GraphPad Prism 5.0. Para todos los análisis estadísticos se realizaron pruebas t de Student no paramétricas de dos colas (Mann-Whitney test), excepto para un análisis donde se utilizó la prueba de Wilcoxon. Se consideró una diferencia significativa entre dos grupos experimentales cuando se cumplía  $p < 0,05$  (\*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ , \*\*\*  $< 0,001$ ).

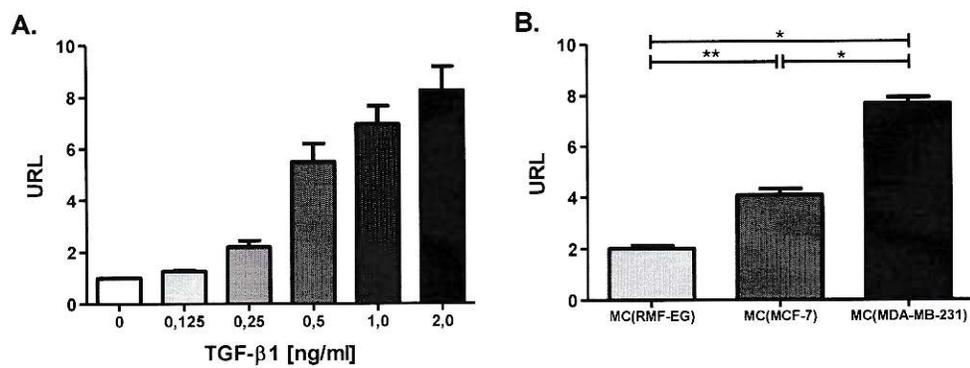
## V. RESULTADOS

### 5.1 Producción de TGF- $\beta$ de las líneas RMG-EG, MCF-7 y MDA-MB-231.

Debido a que TGF- $\beta$  juega un rol clave en el cáncer de mama y en la diferenciación de los linfocitos T CD4+, inicialmente se determinó la cantidad de TGF- $\beta$  biodisponible, es decir, con actividad biológica, producido por las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231. Para ello, se utilizó un bioensayo de luminiscencia basado en la transfección de células AD-293 con un vector que contenía un promotor sensible a TGF- $\beta$  acoplado a un gen que codifica la proteína luciferasa. La presencia del factor activo se determinó en medios condicionados por las líneas celulares previamente mencionadas, los que estimularon las células AD-293. Así, se determinó la cantidad de TGF- $\beta$  biodisponible de acuerdo a la luminiscencia generada por las muestras. Como control se estimularon las células AD-293 con medio fresco, y se calcularon las unidades relativas de luminiscencia (URL) como la luminiscencia de un punto experimental con respecto a la luminiscencia del control. Luego, para estimar la cantidad de TGF- $\beta$ 1 de las muestras se realizó una curva de dosis respuesta a TGF- $\beta$ 1, estimulando las células AD-293 con concentraciones crecientes de TGF- $\beta$ 1 recombinante, desde 0 hasta 2ng/mL (Figura 2, A). Posteriormente, cuando las células AD-293 fueron estimuladas con los medios condicionados de las líneas celulares se observó respuesta, y por tanto presencia de TGF- $\beta$  activo en los medios condicionados por las tres líneas celulares.

Para determinar el contenido de TGF- $\beta$  en los medios condicionados, se realizó una regresión polinomial de tercer orden de la curva de dosis respuesta a TGF- $\beta$ , utilizando el software GraphPadPrism 5.0. A partir de la interpolación de los datos de

los medios condicionados desde la regresión de la curva de dosis respuesta, se obtuvo que la concentración de TGF- $\beta$  en el medio condicionado de RMF-EG (0,140 ng/mL) era menor que en el de MCF-7 (0,391 ng/mL) y ésta a su vez menor que en el de MDA-MB-231 (1,226 ng/mL; Figura 2, B). De este modo, una mayor cantidad de TGF- $\beta$  biodisponible estaría relacionada con un mayor grado de malignidad.

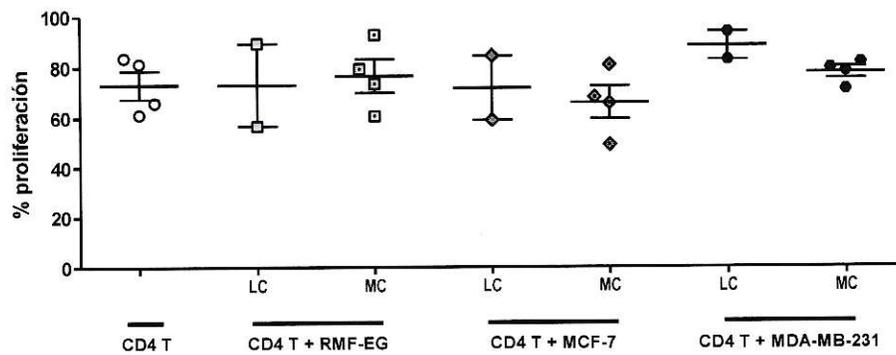


**Figura 2. Producción de TGF-β por las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231.** Células AD-293 fueron co-transfectadas con un vector reportero de TGF-β y un vector control y estimuladas con concentraciones crecientes de TGF-β1 recombinante (n=5) (A), o estimuladas con los medios condicionados por las líneas RMF-EG, MCF-7 o MDA-MB-231 (n=5) (B) por 16 horas. Posteriormente las células fueron lisadas y se calculó la razón entre la luminiscencia de la luciferasa dependiente de TGF-β y de la luciferasa control interno, obteniéndose la luminiscencia de cada punto experimental. Las unidades relativas de luminiscencia (URL) fueron determinadas de acuerdo a la luminiscencia de un punto experimental en relación a la luminiscencia de un control estimulado sólo con medio fresco.

## **5.2 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 en la proliferación de linfocitos T CD4+.**

Dado que se ha atribuido un rol inmunosupresor a las células tumorales presentes en el cáncer de mama, que podría estar mediado, entre otros factores, por TGF- $\beta$ , y considerando que las tres líneas celulares producen esta citoquina conforme a su grado de malignidad, analizamos el efecto de las líneas celulares en la activación de linfocitos TCD4+ mediada por la proliferación de éstos. Para ello, linfocitos T CD4+ marcados con CFSE y activados con  $\alpha$ CD3 (1 $\mu$ g/mL) y  $\alpha$ CD28 (2 $\mu$ g/mL), se co-cultivaron por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7 o MDA-MB-231, o con medios condicionados por estas líneas celulares. El análisis se realizó mediante citometría de flujo, seleccionando la población linfoide de acuerdo a los parámetros de tamaño y granulosidad. Además se descartaron las células muertas utilizando yoduro de propidio. Luego, se evaluó la dilución del CFSE y se determinó el porcentaje de proliferación como la suma de todos los *peaks* de proliferación. Sólo se consideraron los experimentos en los que los linfocitos T CD4+ controles fueron activados correctamente.

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos presentaron una gran variabilidad (Figura 3), tanto en los porcentajes de proliferación como en los perfiles o *peaks* de proliferación, y no permiten sacar una conclusión acerca del efecto de las líneas celulares RMF-EF, MCF-7, MDA-MB-231, o de los medios condicionados por estas líneas celulares, en la proliferación de los linfocitos T CD4+.



**Figura 3. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 en la proliferación de linfocitos T CD4+.** Se determinó el porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4+ marcados con CFSE 5 $\mu$ M y activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL / 2 $\mu$ g/mL) por sí solos (control) o co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 (n=2), o con sus medios condicionados (n=4). T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Línea Celular; MC: Medio condicionado. Mann-Whitney test: \*p<0,05.

### **5.3 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T reguladores.**

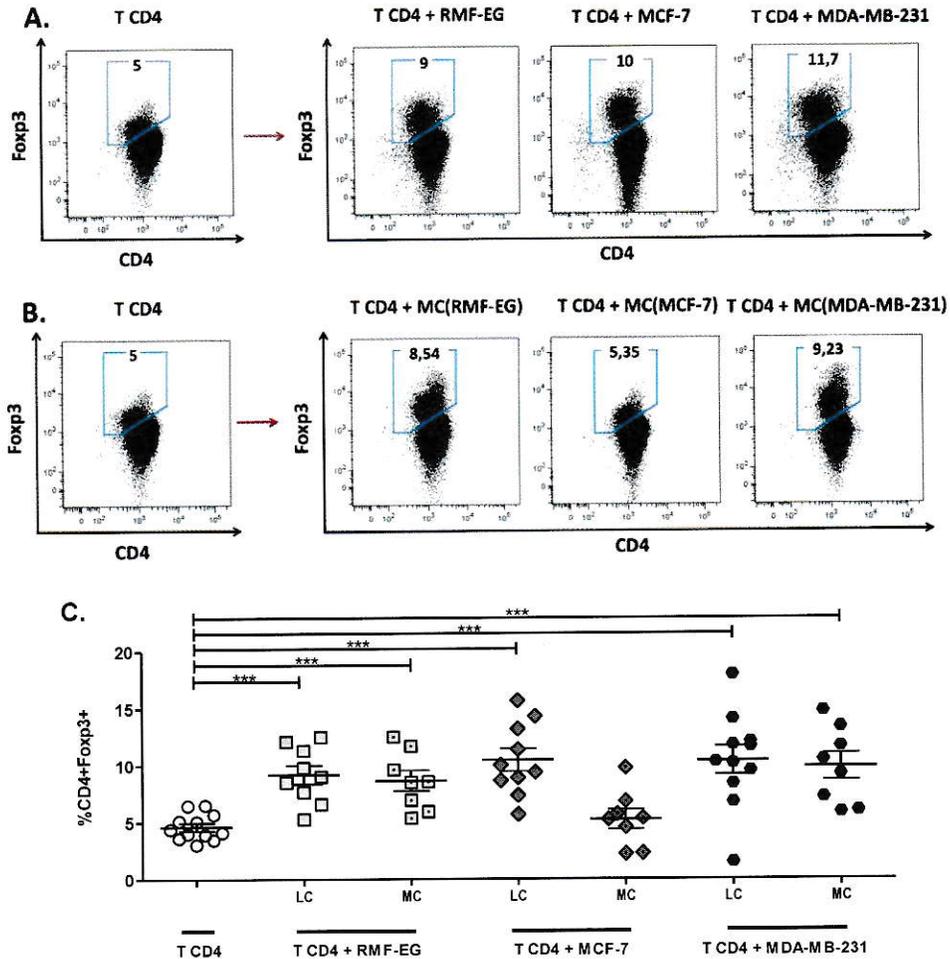
Dado que no se pudo observar un efecto a nivel de la proliferación de los linfocitos T CD4+, y considerando la importancia de los linfocitos T reguladores en los procesos inmuno moduladores del organismo y su rol en el cáncer de mama, se evaluó la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Tregs inducida por las líneas celulares. Para ello, linfocitos T CD4+ purificados se co-cultivaron con las líneas celulares en contacto directo o con sus medios condicionados por cinco días, después de los cuales se analizó el porcentaje de células CD4+Foxp3+ por citometría de flujo, seleccionando la población linfoide por tamaño y granulosidad y descartando las células muertas mediante el colorante *Viability Dye*.

Cuando los linfocitos T CD4+ fueron co-cultivados por un período de cinco días con las líneas celulares en contacto directo, se observó que las tres líneas indujeron un aumento significativo en el porcentaje de células CD4+Foxp3+, el cual fue levemente superior con la línea MDA-MB-231 (Figura 4, A, C). Sin embargo, sólo se observó un aumento en el porcentaje de células CD4+Foxp3+ cuando los linfocitos T CD4+ fueron cultivados en presencia de los medios condicionados por las líneas RMF-EG y MDA-MB-231 (Figura 4, B, C), lo que sugiere que estas líneas inducen un aumento en la diferenciación hacia linfocitos T reguladores mediante un mecanismo dependiente de los factores solubles que secretan, mientras que la línea MCF-7 lo hace mediante un mecanismo dependiente de contacto.

Ya que las líneas RMF-EG y MDA-MB-231 producen TGF- $\beta$  bioactivo, y que TGF- $\beta$  es una citoquina clave en el desarrollo de los linfocitos T reguladores, se

investigó la participación de TGF- $\beta$  en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Tregs utilizando un inhibidor químico del receptor tipo I de TGF- $\beta$ , el cual participa en la cascada de señalización inducida por esta citoquina (SB431542). Como control de vehículo se utilizó DMSO.

Observamos que tanto el control con DMSO, como el inhibidor no tuvieron un efecto basal en los linfocitos T CD4+. Sin embargo, el inhibidor provocó una disminución en el porcentaje de células CD4+Foxp3+ en los co-cultivos de los linfocitos T CD4+ con las líneas RMF-EG y MDA-MB-231, en contacto directo o con sus medios condicionados, la cual si bien no fue estadísticamente significativa mostró una tendencia. Particularmente, en la diferenciación inducida por la línea MDA-MB-231, se observa una disminución constante en cada experimento en presencia del inhibidor, es decir, en cuatro experimentos independientes se obtuvo siempre una disminución de alrededor del 2%. De este modo, si bien las diferencias entre la condición control y los co-cultivos de los linfocitos T CD4+ con la línea MDA-MB-231 en contacto directo o con su medio condicionado arrojan un *p-value* de 0,4246 y de 0,0649 respectivamente con la prueba Mann-Whitney (Figura 4, D, E), el análisis pareado de los datos con el Wilcoxon *test*, arroja un *p-value* de 0,0625 para ambas condiciones (Figura 4, F). Por otra parte, el inhibidor no tiene un efecto en el porcentaje de células CD4+Foxp3+ obtenidas desde el co-cultivo de linfocitos TCD4+ con las células MCF-7 en contacto directo o con su medio condicionado (Figura 4, D). Esto sugiere que el aumento en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia T reguladores inducido por las líneas RMF-EG y MDA-MB-231 es parcialmente dependiente de TGF- $\beta$ .



**Figura 4. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Tregs.** Análisis representativo por citometría de flujo del porcentaje de células CD4+Foxp3+ de linfocitos T CD4+ co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 (A), o con sus medios condicionados (B). Se cuantificó el porcentaje de células CD4+Foxp3+ desde diez experimentos independientes con líneas celulares o desde ocho con medios condicionados (C). Se realizaron cinco experimentos independientes con líneas celulares (D) y seis con medios condicionados (E) en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I, SB431542. Mann-Whitney *t*est: \* $p < 0,05$ , ns: no significativo. Los resultados del co-cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea MDA-MB-231 en contacto directo o con su medio condicionado se analizaron con la prueba de Wilcoxon (F). T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados.

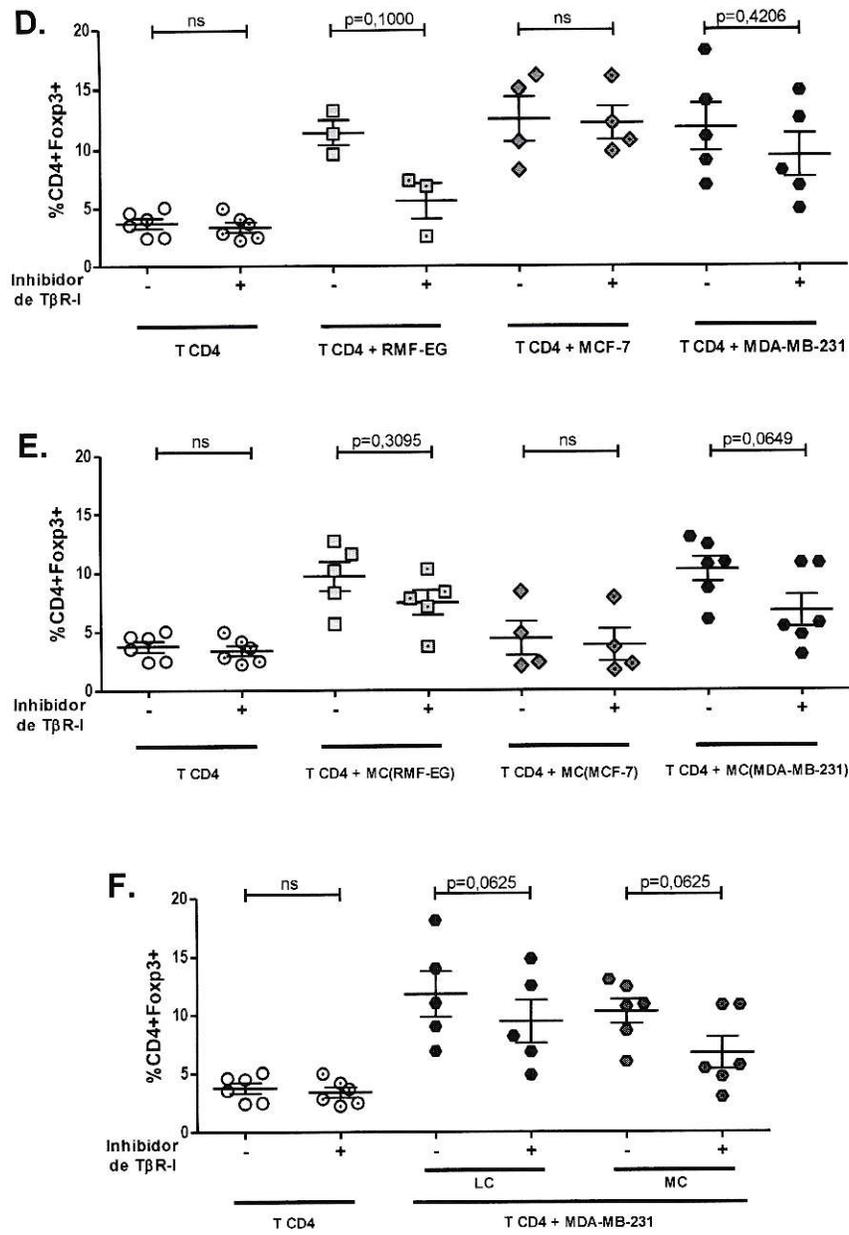


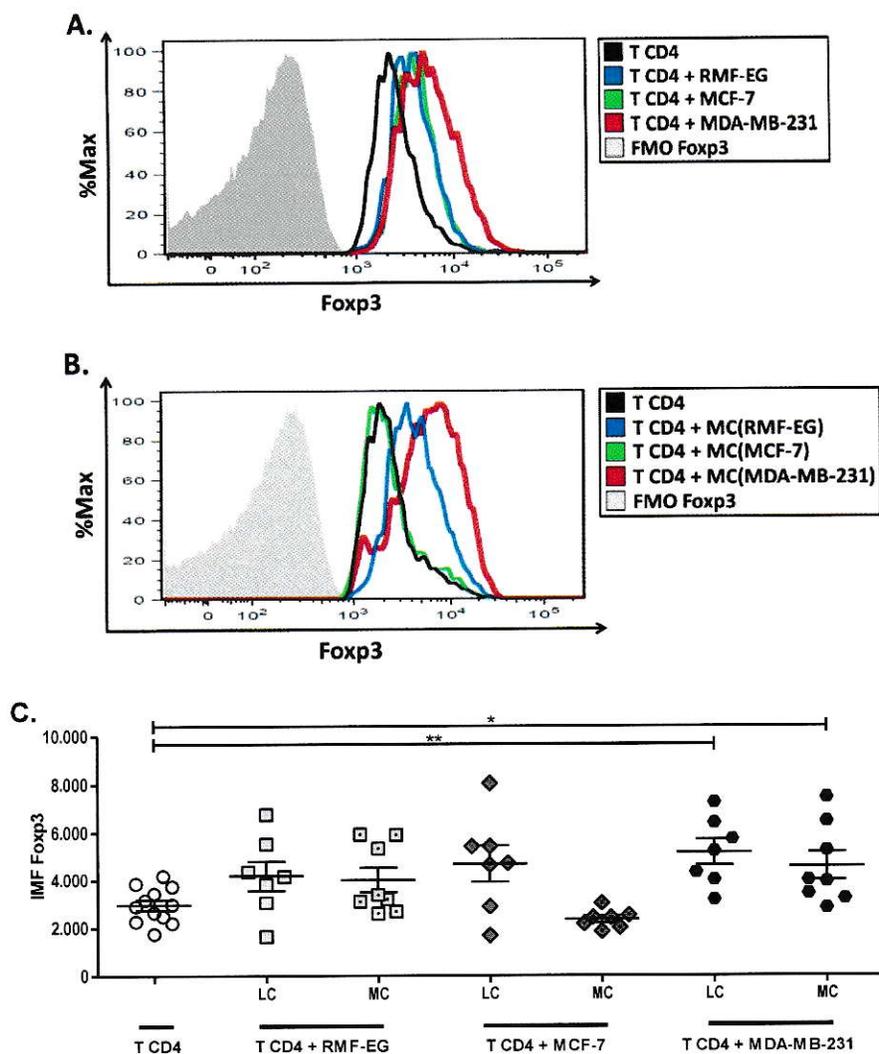
Figura 4. Continuación.

#### **5.4 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en la expresión de Foxp3 en linfocitos T CD4+.**

Mayores niveles de expresión de Foxp3 se han correlacionado con una mayor capacidad supresora en los linfocitos T reguladores (Chauhan, y col., 2009). Por esto, se analizó por citometría de flujo la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF), que da cuenta de los niveles de expresión de Foxp3, en los linfocitos T CD4+ co-cultivados con las líneas celulares o con los medios condicionados por estas líneas celulares por un período de cinco días. Para este análisis se seleccionó la población linfoide según tamaño y granulosidad y las células muertas se descartaron con el colorante *Viability Dye*. Además se seleccionó la población CD4+Foxp3+. Los resultados se compararon con un control FMO (*Fluorescence Minus One*).

Nuestros resultados demuestran que sólo la línea MDA-MB-231 induce un aumento significativo en la IMF de Foxp3, tanto en contacto directo (Figura 5 A, C), como a través de su medio condicionado (Figura 5 B, C), lo que sugiere que la inducción sería dependiente de los factores solubles secretados por esta línea celular.

Posteriormente realizamos estos experimentos en presencia o ausencia del inhibidor del receptor de TGF- $\beta$ , y observamos que éste no tuvo un efecto basal en la IMF de Foxp3 de los linfocitos T CD4, ni tampoco en las condiciones de co-cultivo. De este modo, el aumento producido por la línea MDA-MB-231 estaría mediado por un mecanismo dependiente de factores solubles no relacionado con TGF- $\beta$ .



**Figura 5. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la expresión de Fxp3 en linfocitos T CD4+.** Análisis representativo por citometría de flujo de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de Fxp3 de linfocitos T CD4+ co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 (A), o con sus medios condicionados (B). Se cuantificó la IMF de Fxp3 con líneas celulares (n=7), con medios condicionados (n=8) (C). Se realizaron experimentos en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I, SB431542, con líneas celulares (n=3) (D) o medios condicionados (n=6) (E). T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. FMO: *Fluorescence Minus One*. Mann-Whitney test: \*p<0,05, ns: no significativo.

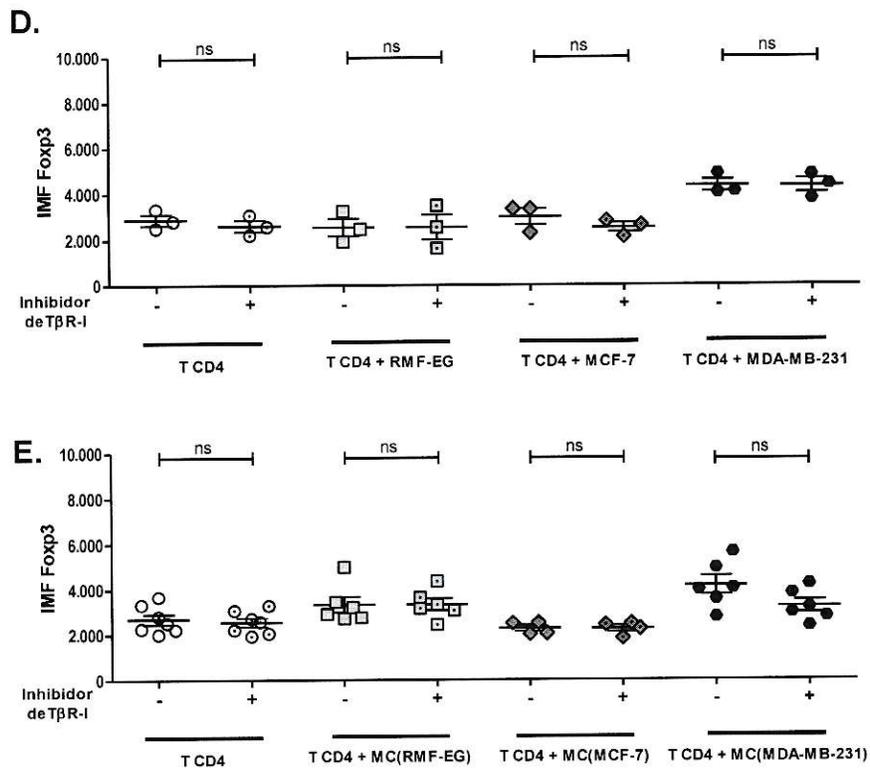


Figura 5. Continuación.

### **5.5 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T cooperadores (Th1 y Th17).**

Nuestros resultados demuestran que en presencia de las líneas celulares de origen mamario, los linfocitos T CD4+ se estarían diferenciando hacia Tregs, lo que sugiere un efecto inmunosupresor. Bajo esta premisa, el siguiente paso fue analizar si las líneas celulares afectan la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia otros linajes.

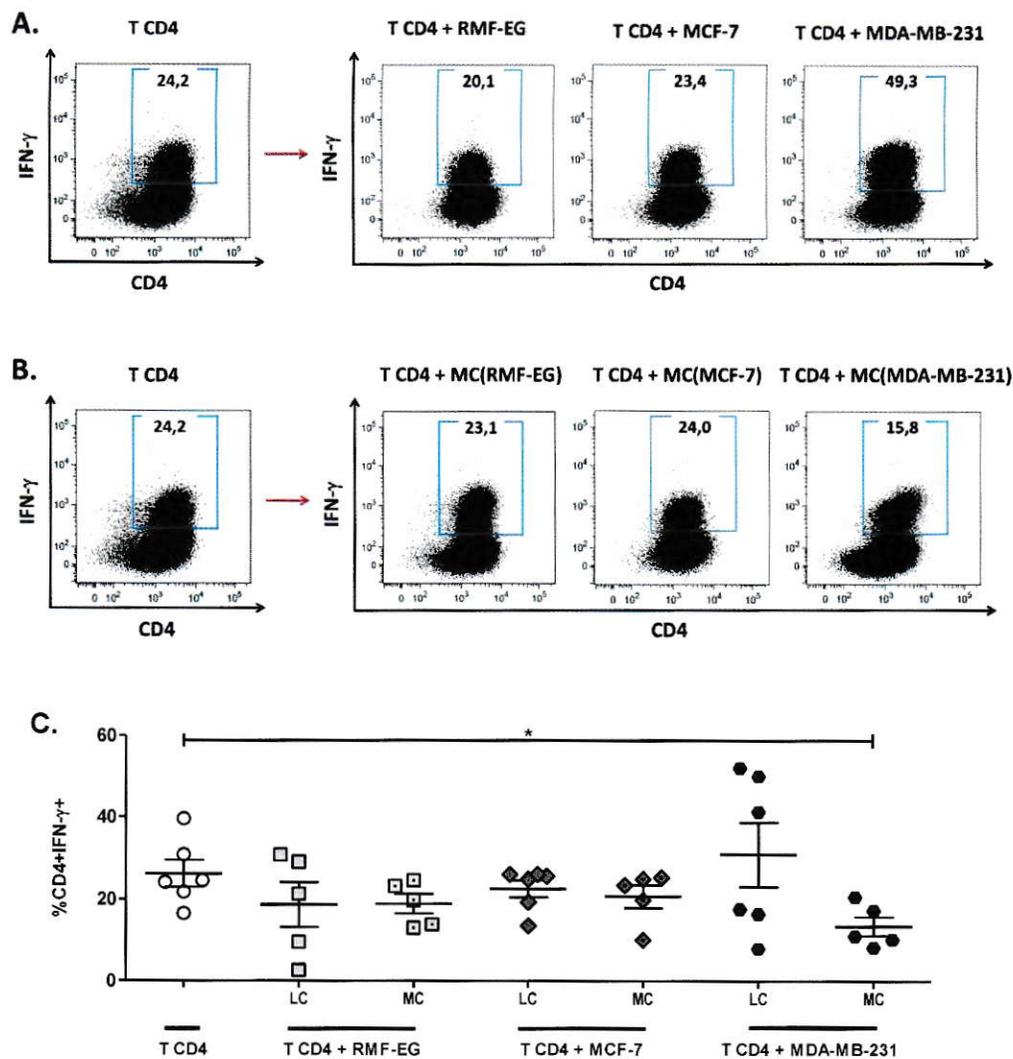
Para esto analizamos el efecto de las líneas celulares en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia los linajes T cooperadores, específicamente hacia Th1 y Th17, los cuales se han relacionado con un rol anti-tumoral y pro-tumoral respectivamente. La estrategia experimental fue co-cultivar los linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231, o sus medios condicionados, y analizar por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de IFN- $\gamma$  (Th1) o de IL-17A (Th17) respectivamente. En el análisis se seleccionó la población linfoide, se descartaron las células muertas mediante el colorante *Viability Dye*, y se determinó el porcentaje de células CD4+IFN- $\gamma$ + o CD4+IL-17A+ mediante la técnica de detección de citoquinas intracelulares.

En nuestras condiciones experimentales no observamos células productoras de IL-17A, o linfocitos Th17, por lo tanto no mostramos estos resultados.

En el análisis del porcentaje de células CD4+IFN- $\gamma$ + provenientes del co-cultivo de los linfocitos T CD4+ con las líneas celulares en contacto directo, no se observó un cambio significativo en su diferenciación hacia células Th1 (Figura 6, A, C). En contraste, en el análisis de las células productoras de IFN- $\gamma$ , provenientes del cultivo de

linfocitos T CD4+ con el medio condicionado de las líneas celulares, se observa que el medio condicionado de la línea MDA-MB-231 produce una disminución significativa en el porcentaje de células CD4+IFN- $\gamma$ + con respecto al control (Figura 6 B, C).

Cuando evaluamos la influencia de TGF- $\beta$  en estos resultados, realizando el mismo experimento en presencia o ausencia del inhibidor de T $\beta$ R-I, encontramos que el inhibidor no tuvo un efecto basal en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia células Th1, ni tampoco en las condiciones de co-cultivo (Figura 6, D), lo que sugiere que la disminución en el porcentaje de CD4+IFN- $\gamma$ + inducido por la línea celular MDA-MB-231 no es dependiente de TGF- $\beta$ .



**Figura 6.** Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Th1. Análisis representativo por citometría de flujo del porcentaje de células CD4+IFN- $\gamma$ + de linfocitos T CD4+ activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL / 2 $\mu$ g/mL) co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 (A), o con sus medios condicionados (B). Se cuantificó el porcentaje de células CD4+IFN- $\gamma$ + desde seis experimentos independientes con líneas celulares o desde cinco con medios condicionados (C). Se realizaron seis experimentos independientes con medios condicionados en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I SB431542 (D). T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \*p<0,05, ns: no significativo.

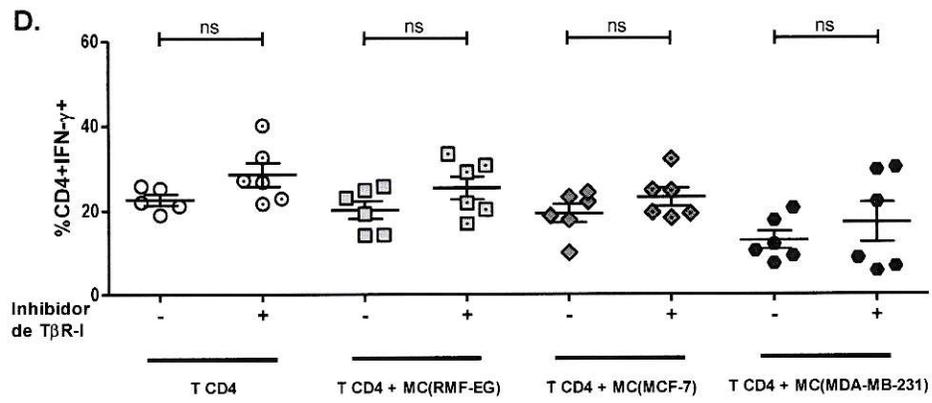


Figura 6. Continuación.

## **5.6 Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$ , en el patrón de secreción de citoquinas de linfocitos T CD4+.**

El efecto inmunosupresor de las líneas celulares en la diferenciación de los linfocitos T CD4+, puede evidenciarse también por los cambios en el patrón de secreción de citoquinas de los linfocitos debido a las modificaciones del microambiente tumoral.

De este modo, investigamos el patrón de secreción de citoquinas de los linfocitos T CD4+ activados policlonalmente con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 y co-cultivados con las células RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231. También evaluamos el patrón de secreción de citoquinas cuando los linfocitos T CD4+ fueron cultivados con los medios condicionados por las líneas celulares antes mencionadas. Para ello, tras cinco días, se colectaron los sobrenadantes de los distintos cultivos y se utilizó el kit CBA Th1/Th2/Th17 para determinar por citometría de flujo la concentración de las siguientes citoquinas: IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2.

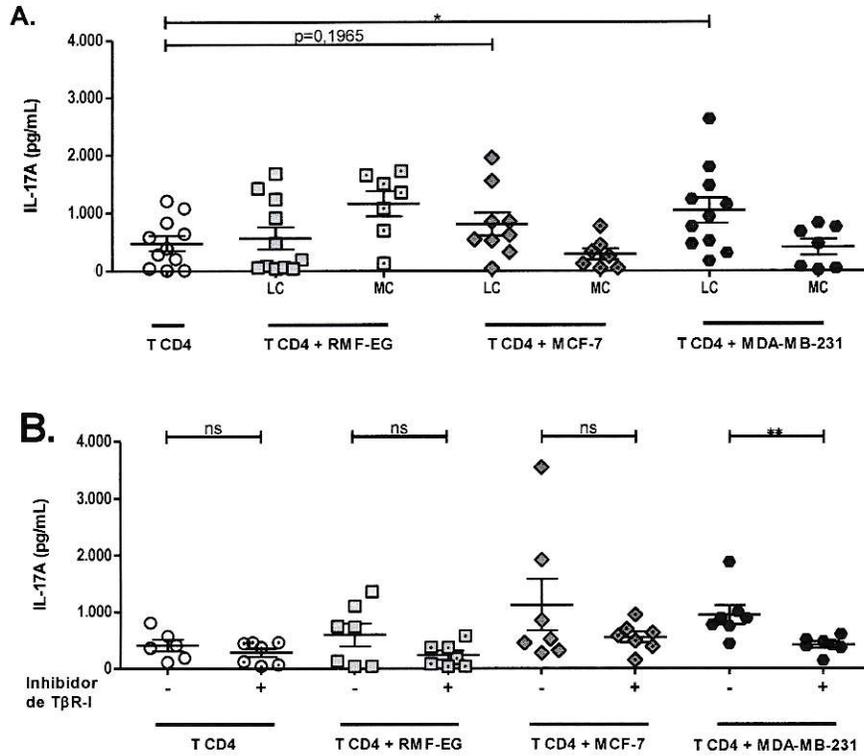
Posteriormente se evaluó la influencia de TGF- $\beta$  en estos resultados utilizando el inhibidor químico de T $\beta$ R-I previamente mencionado (SB431542).

### 5.6.1 Producción de IL-17A.

Dado que IL-17A es una citoquina que se ha relacionado con un rol pro-tumoral, ya que es pro-inflamatoria y estimula la producción de mediadores de la angiogénesis, como VEGF (Takahashi, y col., 2005), analizamos la concentración de IL-17A en los cultivos.

En relación a nuestros resultados, si bien no observamos linfocitos Th17 por marcaje intracelular de IL-17A, pudimos detectar la citoquina en el sobrenadante de los cultivos. Cuando los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron co-cultivados con la línea MDA-MB-231, se observó un aumento significativo en la concentración de IL-17A, que no ocurre en presencia del medio condicionado de esta línea. Por otra parte, la línea MCF-7 también induce una tendencia a aumento en la producción de IL-17A, la cual ocurre sólo en contacto directo. La línea RMF-EG, sin embargo, no induce un cambio en la producción de IL-17A (Figura 7, A).

Posteriormente realizamos estos experimentos en presencia o ausencia del inhibidor del receptor tipo I de TGF- $\beta$ . Observamos que el inhibidor no tuvo un efecto basal en la producción de esta citoquina, sin embargo provocó una disminución significativa en la producción de IL-17A en los co-cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con la línea MDA-MB-231 (Figura 7, B). Los resultados sugieren que el aumento en la producción de IL-17A inducido por la línea MDA-MB-231 sería dependiente de contacto, ya que el medio condicionado no logra inducir este aumento; además estaría mediado por un mecanismo dependiente de TGF- $\beta$ .



**Figura 7. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la producción de IL-17A de linfocitos T CD4+.** Se analizó por citometría de flujo la producción de IL-17A en sobrenadantes de linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL / 2 $\mu$ g/mL), co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231o con sus medios condicionados. Se cuantificó la concentración de IL-17A desde once experimentos independientes con líneas celulares o desde siete con medios condicionados (A). Se realizaron siete experimentos independientes con líneas celulares en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I, SB431542 (B). T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \*p<0,05, ns: no significativo.

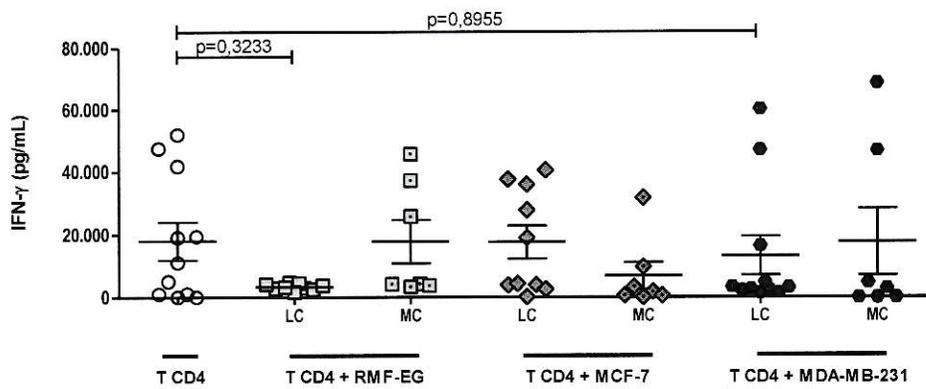
### 5.6.2 Producción de IFN- $\gamma$ .

Dado que IFN- $\gamma$  se ha relacionado con un rol anti-tumoral, ya que activa las respuestas inmunes mediadas por macrófagos, tiene efectos pro-apoptóticos en las células tumorales y estimula la producción de citoquinas inhibitorias de la angiogénesis (Brandacher, y col., 2006), analizamos la concentración de IFN- $\gamma$  en los cultivos.

Los resultados indican que, en nuestras condiciones experimentales, las líneas celulares no inducen un cambio significativo en la producción de IFN- $\gamma$  en ninguna de las condiciones de cultivo. No obstante, la dispersión de los datos no permite obtener conclusiones definitivas al respecto (Figura 8).

Sin embargo, cabe señalar que si bien la producción de IFN- $\gamma$  en el cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea MDA-MB-231 o con el medio condicionado por esta línea celular no disminuyó de manera significativa, existe una tendencia a la disminución que dos puntos experimentales desvían. De este modo, sería necesario hacer más experimentos para confirmar que la línea es capaz de inducir una disminución en la producción de IFN- $\gamma$ . Asimismo, aumentando el número de experimentos se podría confirmar o descartar si la línea RMF-EG induce una disminución en la producción de IFN- $\gamma$ .

Puesto que no encontramos un efecto significativo de las líneas celulares o de los medios condicionados en la producción de IFN- $\gamma$  de los linfocitos T CD4+, no analizamos el efecto de TGF- $\beta$  en estos cultivos.



**Figura 8. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 en la producción de IFN- $\gamma$  de linfocitos T CD4+.** Se analizó por citometría de flujo la producción de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL / 2 $\mu$ g/mL), co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 o con sus medios condicionados. Se cuantificó la concentración de IFN- $\gamma$  desde once experimentos independientes con líneas celulares o desde siete con medios condicionados. T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \* $p < 0,05$ .

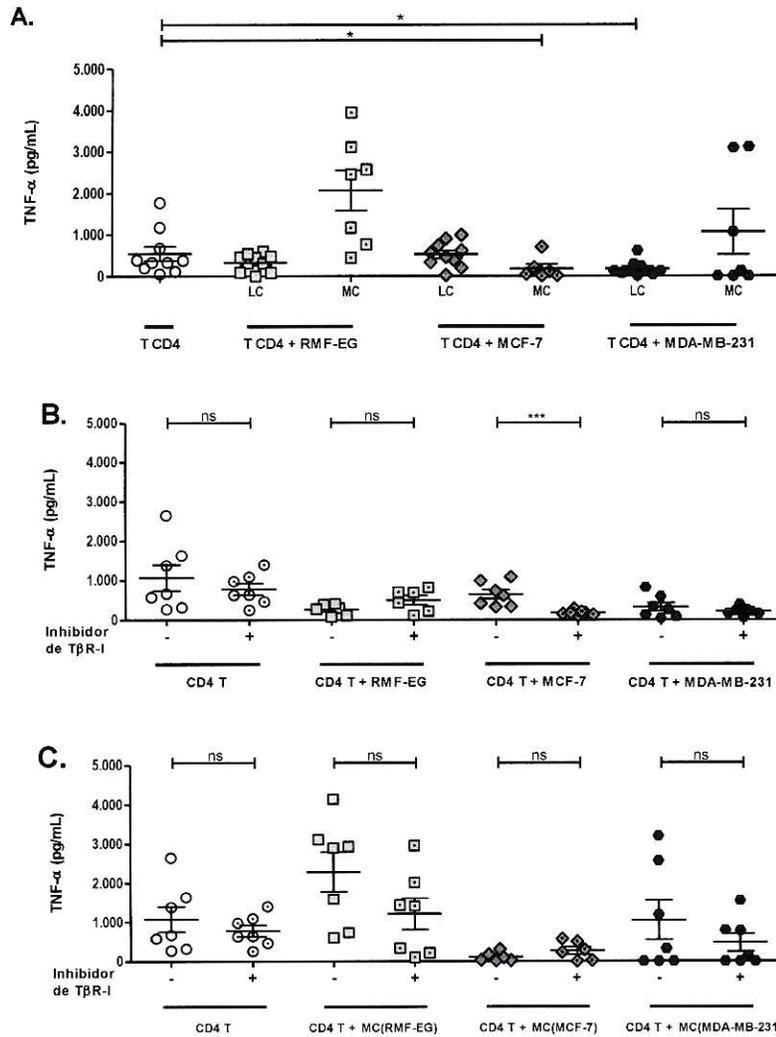
### 5.6.3 Producción de TNF- $\alpha$ .

TNF- $\alpha$  es una de las citoquinas secretadas por los linfocitos Th1 que contribuye a su función anti-tumoral (DeNardo & Coussens, 2007). Además, se ha observado que junto con IFN- $\gamma$  es capaz de inducir una detención del crecimiento tumoral (Braumüller, y col., 2013). Considerando estos antecedentes, analizamos la concentración de TNF- $\alpha$  en nuestros cultivos.

En nuestros experimentos observamos una disminución significativa en la producción de TNF- $\alpha$  en los co-cultivos de linfocitos T CD4+ con la línea MDA-MB-231, que no ocurre en el cultivo de los linfocitos TCD4+ con el medio condicionado por esta línea celular. También observamos una disminución significativa en la concentración de TNF- $\alpha$  en el cultivo de los linfocitos T CD4+ con el medio condicionado de la línea MCF-7, con respecto al control (Figura 9, A).

Considerando que la disminución en la producción de TNF- $\alpha$  inducida por la línea MDA-MB-231, sólo se observó cuando el cultivo fue realizado en contacto directo con la línea celular, esto sugiere que el mecanismo que media la disminución sería dependiente de contacto. Por su parte, la disminución inducida por el medio condicionado de la línea MCF-7 no ocurre en contacto directo, por lo que la presencia de las células podría estar inhibiendo el efecto.

Posteriormente analizamos la influencia de TGF- $\beta$  en estos resultados y encontramos que el inhibidor de TGF- $\beta$  no tuvo efecto en la producción de TNF- $\alpha$  por los linfocitos T CD4+ en ninguna de las condiciones experimentales (Figura 9, B, C).



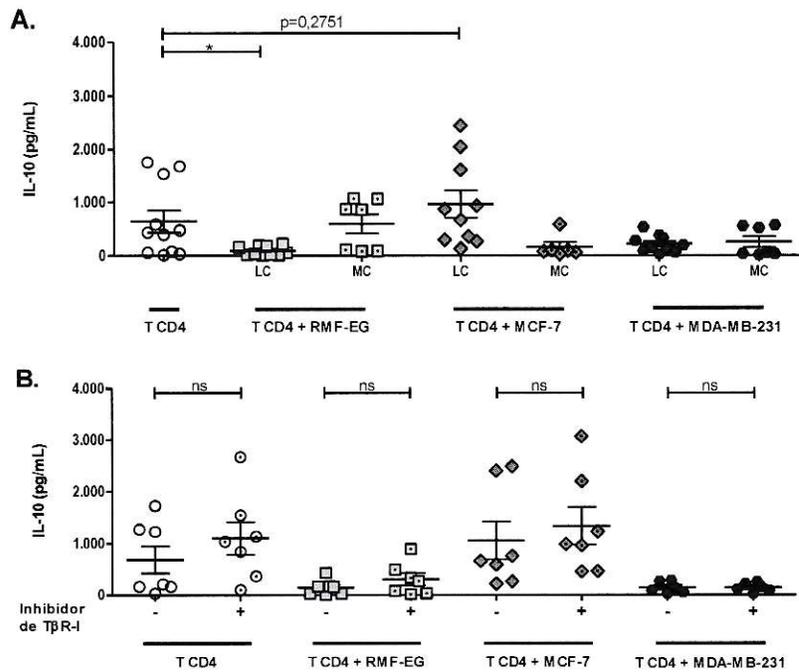
**Figura 9. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la producción de TNF- $\alpha$  de linfocitos T CD4+.** Se analizó por citometría de flujo la producción de TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL / 2 $\mu$ g/mL), co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231, o con sus medios condicionados. Se cuantificó la concentración de TNF- $\alpha$  desde once experimentos independientes con líneas celulares o desde siete con medios condicionados (A). Se realizaron siete experimentos independientes con líneas celulares (B) o con medios condicionados (C) en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I SB431542. T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \*p<0,05, ns: no significativo.

#### 5.6.4 Producción de IL-10.

IL-10 es una citoquina inmuno-supresora que afecta la maduración y función presentadora de las células presentadoras de antígenos (De Smedt, y col., 1997). Además, IL-10 favorece la producción de linfocitos T reguladores, y se ha correlacionado con la función supresora de los mismos (Bergmann, y col., 2007). Dados estos antecedentes, analizamos la concentración de IL-10 en los distintos cultivos.

El análisis demuestra que sólo MCF-7 induce una tendencia a aumento en la producción de IL-10, que no ocurre cuando los linfocitos T CD4+ fueron cultivados con el medio condicionado de esta línea celular. Esto sugiere que el efecto de esta línea celular es dependiente de un mecanismo de contacto. Por otra parte, la línea celular RMF-EG produce una disminución significativa en la producción de IL-10 (Figura 10, A).

Posteriormente analizamos la influencia de TGF- $\beta$  en la producción de IL-10 y no observamos diferencias significativas en la producción de esta citoquina (Figura 10, B). De este modo, tanto el aumento en la producción de IL-10 inducido por la línea MCF-7, como la disminución en la producción de IL-10 inducida por la línea RMF-EG, serían dependientes de un mecanismo de contacto, no relacionado con TGF- $\beta$ .

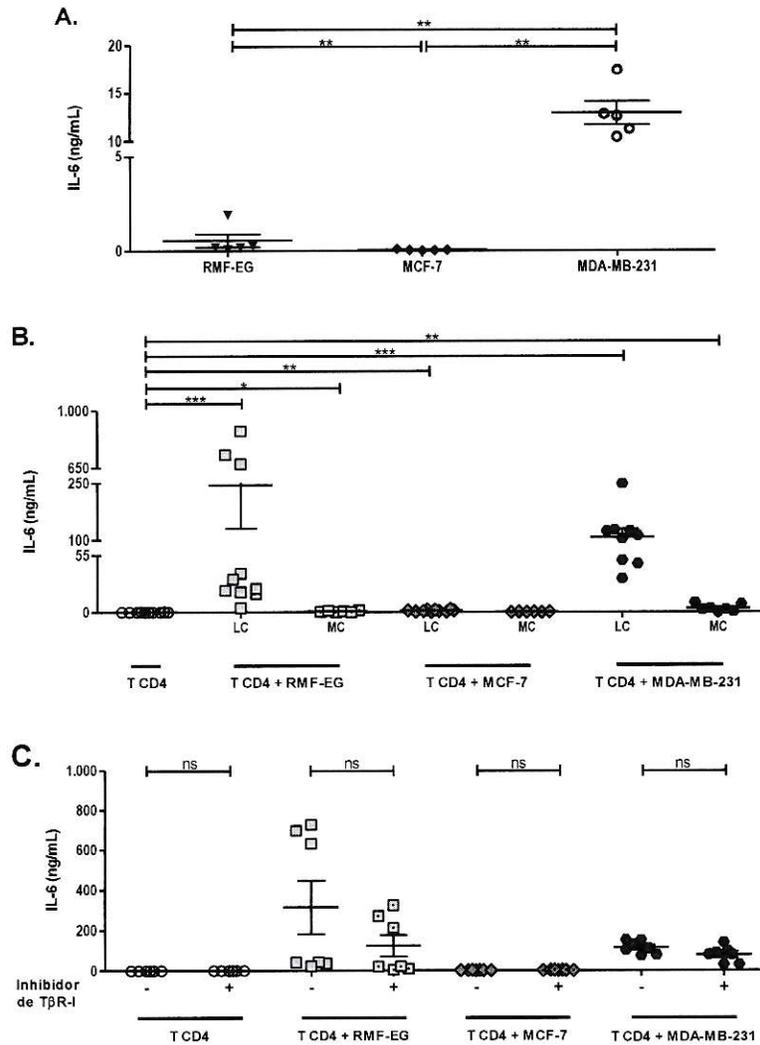


**Figura 10. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la producción de IL-10 de linfocitos T CD4+.** Se analizó por citometría de flujo la producción de IL-10 en sobrenadantes de linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL / 2 $\mu$ g/mL), co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231, o con sus medios condicionados. Se cuantificó la concentración de IL-10 desde once experimentos independientes con líneas celulares o desde siete con medios condicionados (A). Se realizaron siete experimentos independientes con líneas celulares en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I SB431542 (B). T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \*p<0,05, ns: no significativo.

### 5.6.5 Producción de IL-6.

IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria cuyo incremento se ha correlacionado con una pobre prognosis en pacientes con cáncer mamario. Además, se ha observado que estimula la proliferación de las células de cáncer mamario y promueve su transición epitelial-mesenquimal (Sullivan, y col., 2009). Por esto, analizamos la concentración de IL-6 en los distintos cultivos. Si bien evaluamos la producción de las siete citoquinas en cultivos de las líneas celulares RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 sin agregar los linfocitos T CD4+, sólo observamos que éstas eran capaces de producir IL-6. En la figura 11A se muestra la producción de IL-6 por las líneas celulares. Observamos que MDA-MB-231 produce cantidades considerables de esta citoquina (Figura 11, A).

Cuando analizamos esta citoquina en los co-cultivos con los linfocitos T CD4+, observamos un aumento significativo en la producción de esta citoquina inducido por las tres líneas celulares con respecto al control. Las mayores concentraciones de IL-6 se produjeron en presencia de las líneas RMF-EG y MDA-MB-231, sin embargo en el caso de RMF-EG se observó una variación importante en los resultados. Por otra parte, en el análisis de los co-cultivos de los linfocitos T CD4+ con los medios condicionados por las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231, se encontró que éstos no tenían un efecto en la producción de IL-6 por los linfocitos T CD4+ (Figura 11, B). De este modo, el aumento en la producción de IL-6 observado con las tres líneas celulares sería dependiente de un mecanismo de contacto, ya que los medios condicionados no cambian la producción de esta citoquina. Posteriormente, se analizó si TGF- $\beta$  tenía alguna participación en el efecto previamente expuesto utilizando el inhibidor de T $\beta$ R-I. Se observó que tanto el DMSO, como el inhibidor, no tuvieron un efecto basal, ni tampoco un efecto en los grupos experimentales (Figura 11, C).



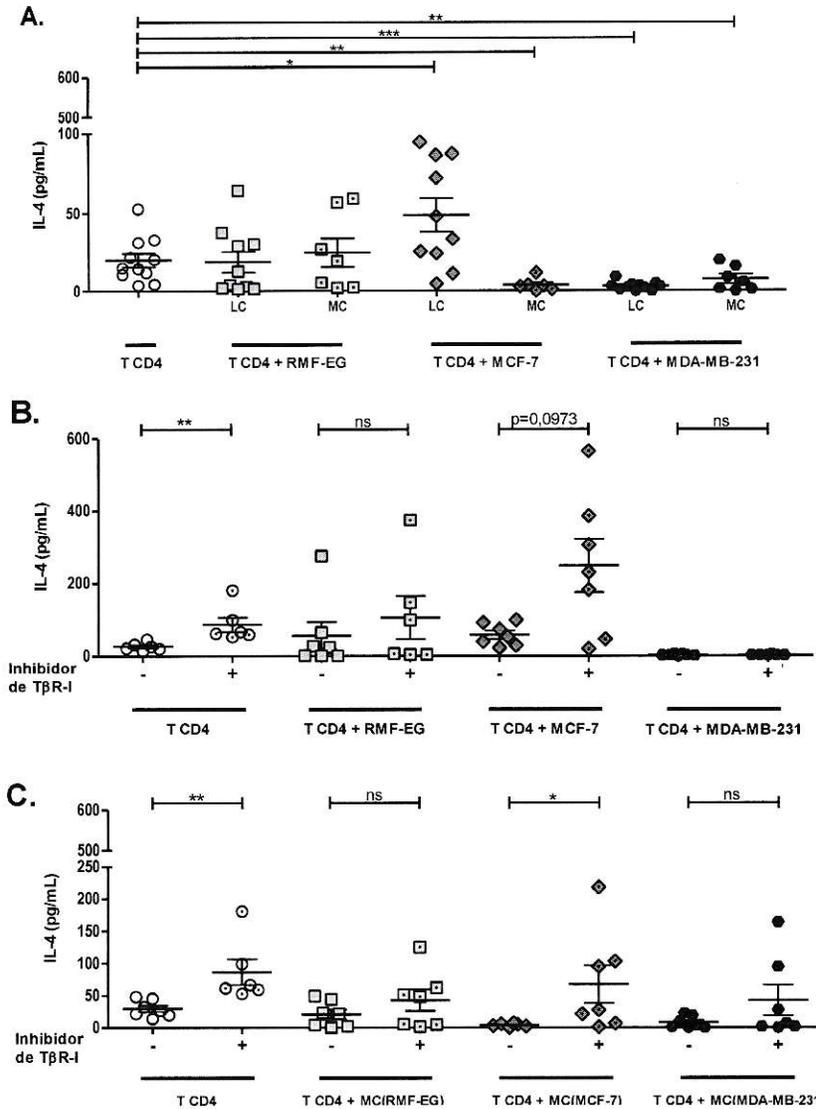
**Figura 11. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la producción de IL-6 de linfocitos T CD4+.** Se analizó por citometría de flujo la producción de IL-6 en los controles que contenían sólo las líneas celulares (A) y en linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL/2 $\mu$ g/mL), co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231, o con sus medios condicionados (B). Se cuantificó la concentración de IL-6 desde cuatro experimentos control (A), desde once experimentos independientes con líneas celulares o desde siete con medios condicionados (B). Se realizaron siete experimentos independientes con líneas celulares en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I SB431542 (C). T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \* $p < 0,05$ , ns: no significativo.

#### 5.6.6 Producción de IL-4.

Dado que a IL-4 se le ha asociado un rol pro-tumoral, ya que regula el fenotipo y la función efectora de los macrófagos asociados al tumor produciendo un aumento de la metástasis de células epiteliales mamarias malignas (DeNardo, y col., 2009), en el presente estudio analizamos la concentración de IL-4 en los cultivos.

En general los valores para IL-4 fueron muy bajos en todas las condiciones. A partir de un promedio de once experimentos, se observó un aumento significativo en la producción de IL-4 en el co-cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea MCF-7, que no ocurre con su medio condicionado, lo que sugiere que el efecto estaría mediado por un mecanismo dependiente de contacto. Además observamos una disminución significativa en la producción de IL-4 en el co-cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea MDA-MB-231, tanto en contacto directo como con el medio condicionado por esta línea celular, lo que sugiere un mecanismo mediado por factores solubles (Figura 12, A).

Posteriormente, en el análisis del efecto de TGF- $\beta$  en estos resultados se observó que el inhibidor de TGF- $\beta$  indujo un aumento basal significativo en la producción de IL-4 con respecto al vehículo DMSO en los linfocitos T CD4+ controles, por lo tanto no es posible atribuir un rol a TGF- $\beta$  en las otras condiciones experimentales (Figura 12, B, C).



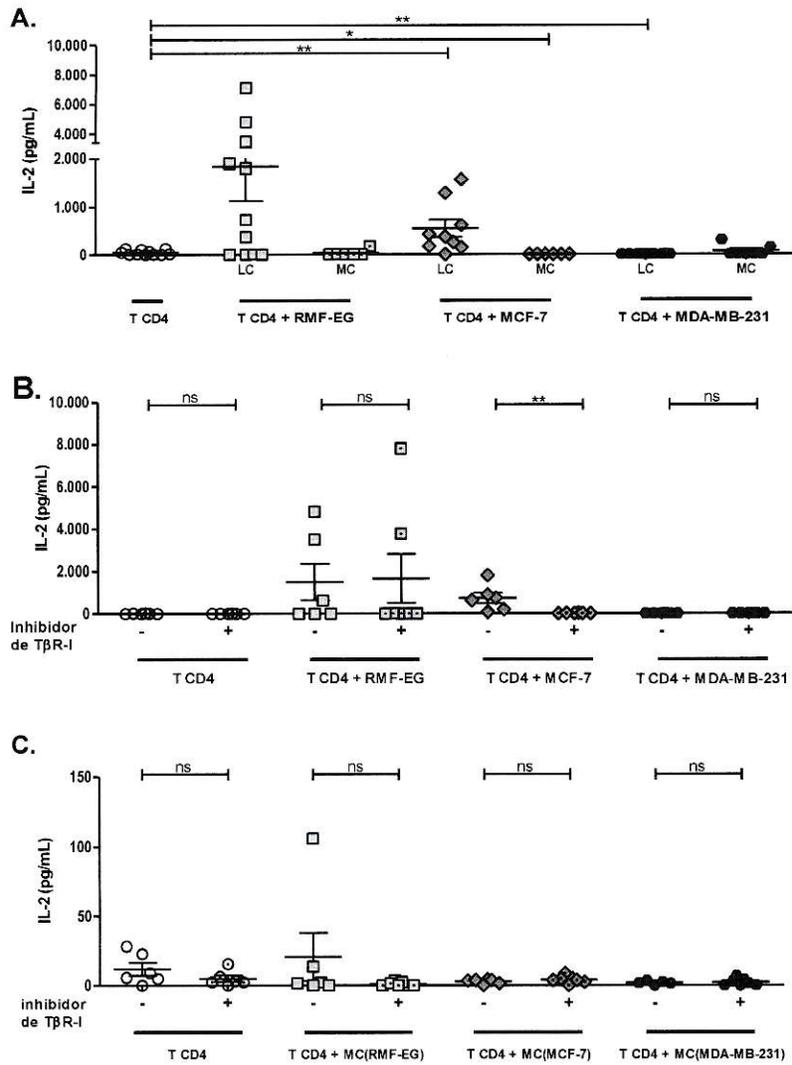
**Figura 12. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la producción de IL-4 de linfocitos T CD4+.** Se analizó por citometría de flujo la producción de IL-4 en sobrenadantes de linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1  $\mu$ g/mL / 2  $\mu$ g/mL), co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231, o con sus medios condicionados. Se cuantificó la concentración de IL-4 desde once experimentos independientes con líneas celulares o desde siete con medios condicionados (A). Se realizaron siete experimentos independientes con líneas celulares (B) o con medios condicionados (C) en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I SB431542. T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \*p < 0,05, ns: no significativo.

### 5.6.7 Producción de IL-2.

Considerando que IL-2 es esencial para la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos T CD4+ y de los linfocitos T citotóxicos (Loose & Van de Wiele, 2009), y que estos últimos están involucrados en las respuestas anti-tumorales, analizamos la concentración de IL-2 en las diferentes condiciones de cultivo.

A partir de nuestros resultados observamos que ocurre un aumento significativo en la producción de IL-2 en el co-cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea MCF-7, y una disminución en el co-cultivo con la línea MDA-MB-231 (Figura 13, A). Estos efectos no se observaron en presencia de los medios condicionados por estas líneas celulares, lo que sugiere que el cambio en la producción de IL-2 en ambos casos sería dependiente de un mecanismo de contacto. RMF-EG no tuvo un efecto significativo en la producción de IL-2 y los datos presentaron una gran dispersión.

Cuando analizamos la influencia de TGF- $\beta$  en estos resultados encontramos que el inhibidor no tenía un efecto basal en la producción de IL-2 (Figura 13, B, C), sin embargo, observamos que el aumento en la producción de IL-2 inducido por la línea MCF-7 se perdía al utilizar el inhibidor (Figura 13, C), lo que sugiere que estaría mediado por un mecanismo dependiente de contacto, en el cual podría contribuir además TGF- $\beta$ .



**Figura 13. Efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en la producción de IL-2 de linfocitos T CD4+.** Se analizó por citometría de flujo la producción de IL-2 en sobrenadantes de linfocitos T CD4+, activados con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (1 $\mu$ g/mL / 2 $\mu$ g/mL), co-cultivados por cinco días con las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231, o con sus medios condicionados. Se cuantificó la concentración de IL-2 desde once experimentos independientes con líneas celulares o desde siete con medios condicionados (A). Se realizaron siete experimentos independientes con líneas celulares (B) o con medios condicionados (C) en presencia del inhibidor de T $\beta$ R-I SB431542. T CD4: Linfocitos T CD4+; LC: Líneas celulares; MC: Medios condicionados. Mann-Whitney test: \* $p$ <0,05, ns: no significativo.

### 5.6.8 Resumen de resultados del patrón de secreción de citoquinas.

La tabla 1 resume los resultados obtenidos en la sección 5.6, es decir, los resultados del efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7, MDA-MB-231 y de TGF- $\beta$  en el patrón de secreción de citoquinas de los linfocitos T CD4+. Los signos "+" indican que hubo un aumento, los signos "-" que hubo una disminución y los "0" que no hubo un efecto inducido por el co-cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea celular o con el medio condicionado por la línea celular en la producción de la citoquina. En el caso de la columna T $\beta$ R-I se indica la línea celular, cuyo efecto fue dependiente de TGF- $\beta$ , o "0" si no hubo o no fue posible atribuir la participación de TGF- $\beta$  a los efectos inducidos por las líneas celulares.

Tabla 1. Resumen de resultados del patrón de secreción de citoquinas.

	RMF-EG		MCF-7		MDA-MB-231		T $\beta$ R-I
	LC	MC	LC	MC	LC	MC	
IL-17A	0	0	+	0	+	0	MDA-MB-231
IFN- $\gamma$	0	0	0	0	0	0	0
TNF- $\alpha$	0	0	0	+	+	0	0
IL-10	-	0	+	0	-	0	0
IL-6	+++	+	++	0	+++	++	0
IL-4	0	0	+	--	---	--	0
IL-2	0	0	++	-	--	0	MCF-7

## VI. DISCUSIÓN

Una de las características distintivas del cáncer es su capacidad de desarrollar mecanismos de evasión de la respuesta inmune que involucran a los linfocitos T CD4+. En este trabajo estudiamos la producción de TGF- $\beta$  de la línea celular humana de estroma normal mamario RMF-EG y de las líneas humanas de epitelio tumoral mamario MCF-7 y MDA-MB-231 y el efecto, presuntamente mediado por TGF- $\beta$ , que producen estas líneas celulares en la diferenciación de los linfocitos T CD4+.

### 6.1 Células tumorales y producción de TGF- $\beta$ .

Una de las citoquinas importantes para la regulación del sistema inmune es TGF- $\beta$ , a la que además, se le ha atribuido un papel crucial en la progresión tumoral (Blobe, y col., 2000). Durante años, numerosas investigaciones han atribuido a esta citoquina un rol predictivo en relación al grado de malignidad y a la progresión tumoral. Un estudio realizado con pacientes con cáncer de mama avanzado (estados III y IV), midió los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 mediante ELISA y demostró que existía una correlación entre una mayor concentración de esta citoquina y un grado mayor de malignidad del cáncer (Ivanovic, y col., 2003). Por otra parte, en un estudio previo de nuestro laboratorio realizado con las líneas celulares de epitelio tumoral mamario MCF-7 y MDA-MB-231, se evaluó mediante ELISA la concentración de TGF- $\beta$ 1 en medios condicionados por estas líneas celulares, y se encontró que la línea MDA-MB-231, que es altamente invasiva, produce cinco veces más TGF- $\beta$ 1 que la línea MCF-7, que es débilmente invasiva (Guerrero, y col., 2010). Sin embargo, TGF- $\beta$  no siempre se encuentra biodisponible, sino que usualmente se encuentra depositado en la matriz extracelular y secuestrado por la proteína LTBP (Munger, y col, 1997). De este modo,

si bien el TGF- $\beta$  total medido por ELISA da cuenta de una mayor producción, es necesario determinar la cantidad biodisponible de esta citoquina.

En el presente estudio evaluamos la abundancia de TGF- $\beta$  activo presente en los medios condicionados de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 y demostramos que existe una correlación entre la abundancia de TGF- $\beta$  bioactivo y el nivel de malignidad de las líneas celulares, siendo la línea MDA-MB-231 la más maligna. La abundancia de TGF- $\beta$  bioactivo medida en nuestro ensayo estuvo entre un rango de 0,140 ng/ml para la línea RMF-EG y de 1,226 ng/ml para la línea MDA-MB-231. En la literatura se ha reportado que la concentración total de TGF- $\beta$  en el plasma de donantes sanos es de alrededor de 0,8-2 ng/ml, mientras que los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$  pueden aumentar hasta 14ng/ml en pacientes con cáncer de colon y hasta 20 ng/ml en los pacientes con cáncer de mama (Todorović-Raković, y col., 2003; Tsushima, y col., 1996). Sin embargo, esas investigaciones midieron la concentración de TGF- $\beta$  total, y un estudio realizado en ratones que comparó mediante la utilización de un bioensayo basado en luminiscencia la concentración de TGF- $\beta$  total en relación a la de TGF- $\beta$  activo, determinó que la concentración del total en plasma podía ser 65 veces mayor a la del activo (Khan, y col., 2012). Además, se ha reportado que un rango entre 0,2-2 ng/ml de TGF- $\beta$ , es capaz de afectar la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos, y con ello su función presentadora (Fogel-Petrovic, y col., 2007). De este modo, el rango de concentraciones que observamos en el presente estudio, concuerda con un posible favorecimiento del desarrollo tumoral, apoyando la correlación entre el grado de malignidad de la línea celular y la abundancia de TGF- $\beta$  activo.

## **6.2 Efecto de las células tumorales sobre la proliferación de los linfocitos T CD4+.**

A partir de estudios realizados en humanos, se ha descrito que TGF- $\beta$  tiene un efecto inhibitorio en la proliferación de los linfocitos T CD4+ (Tiemessen y col., 2003), sin embargo otros autores han demostrado que TGF- $\beta$  inhibe la proliferación de los linfocitos T de memoria, aunque aumenta la proliferación de los linfocitos T vírgenes (de Jong, y col., 1994).

A nivel fisiológico, los linfocitos T CD4+ circulan entre la sangre, la linfa y los órganos linfoides. En estos últimos las células presentadoras de antígenos (APC), presentan un péptido unido a moléculas MHC de clase II a los linfocitos T CD4+ vírgenes, que reconocen el complejo mediante su TCR y se activan. Si bien, los linfocitos T se activan a través de la señalización inducida por el co-receptor del TCR, la molécula CD3, requieren además de señales de coestimulación proporcionadas por moléculas accesorias expresadas en la superficie de las APC. Una de las señales mejor caracterizada es el receptor de membrana CD28 presente en los linfocitos T, el cual se une a moléculas coestimuladoras de la familia B7 expresadas en las APC profesionales (Abbas, y col., 2008b). Para simular las condiciones fisiológicas, en nuestros experimentos los linfocitos T CD4+ fueron activados policlonalmente con los anticuerpos  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28 en presencia de las líneas celulares o medios condicionados por estas mismas células. La proliferación se evaluó por citometría de flujo por dilución del colorante CFSE.

Los resultados de proliferación de linfocitos T CD4+ presentaron una gran variabilidad, tanto en los porcentajes de proliferación, como en los perfiles de

proliferación, lo que puede ser producto de las diferencias entre los donantes, cuyos linfocitos alcanzaban incluso basalmente distintos niveles de activación. Dado que no había consistencia en los resultados, ya que todos los experimentos mostraban perfiles de proliferación diferentes, sería necesario realizar más experimentos para evaluar si existe algún efecto en la proliferación de los linfocitos T CD4+ inducido por las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231, ya sea un cambio en el porcentaje total o un retardo en la proliferación.

### **6.3 Efecto de las células tumorales en la diferenciación de linfocitos T reguladores.**

Las células tumorales poseen ciertas características que favorecen la progresión tumoral, entre las cuales se encuentra la capacidad de evadir la respuesta inmune mediada por linfocitos T y B, macrófagos y células *natural killer* (Hanahan & Weinberg, 2010). Los linfocitos T reguladores (Tregs), un subgrupo de linfocitos T CD4+, tienen un rol crucial en tal evasión, ya que son células inmunosupresoras del sistema inmune que infiltran los tumores y promueven la progresión del cáncer limitando la respuesta anti-tumoral (Facciabene, y col., 2012).

Se ha relacionado un aumento en la población de linfocitos Tregs con la progresión tumoral. En un estudio realizado en pacientes con cáncer mamario o pancreático avanzado, se determinó que la frecuencia de linfocitos Tregs fue significativamente mayor en la sangre de los pacientes con cáncer en relación a donantes sanos, y que el tumor y los linfonodos drenantes contenían elevados porcentajes de linfocitos Tregs (alrededor de un 20%; Liyanage, y col., 2002). Otro estudio realizado en pacientes con carcinoma ductal invasivo (IDC) de mama demostró un mayor porcentaje de linfocitos Tregs en las PBMCs de pacientes con cáncer y una

mayor infiltración de linfocitos T CD4+Foxp3+ en los tumores en relación a donantes y tejidos mamarios sanos. Estos linfocitos Tregs tenían elevados niveles de expresión de Foxp3, que se correlacionaron con una mayor agresividad tumoral (linfonodo axilar con metástasis). Dado que los linfocitos Tregs presentaron una mayor expresión del receptor CCR4, y las células de tumor mamario mostraron una expresión incrementada de la quimioquina CCL22 en relación a los controles sanos, los autores atribuyeron el aumento de los linfocitos Tregs a un efecto migratorio mediado por la interacción CCR4/CCL22 (Benevides, y col., 2013).

En el presente estudio evaluamos el efecto de la línea de estroma normal mamario RMF-EG, y de las líneas de epitelio tumoral MCF-7 y MDA-MB-231 en la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Tregs, y observamos que las tres líneas celulares inducen un aumento en el porcentaje de células CD4+Foxp3+. El aumento en el porcentaje de linfocitos Tregs inducido por las líneas celulares de nuestra investigación, concuerda con el aumento de los linfocitos Tregs en el sitio del tumor observado por Benevides y col., el cual podría estar mediado no sólo por el reclutamiento de estas células, sino también por un proceso activo de diferenciación de linfocitos T CD4+.

Con el fin de profundizar en el estudio de los mecanismos que producen el aumento del porcentaje de linfocitos Tregs, estudiamos el efecto de los factores solubles (medios condicionados) producidos por las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a Tregs. Nuestros resultados indican que sólo la línea MDA-MB-231 produce factores solubles capaces de inducir esta diferenciación lo que sugiere que esta línea celular agresiva tiene una mejor disposición para establecer un microambiente inmunosupresor.

TGF- $\beta$  puede inducir la diferenciación de células T CD4+ vírgenes a linfocitos T reguladores inducibles (iTreg), lo que las lleva a adquirir una actividad supresora, principalmente mediada por la inducción de la expresión de Foxp3 (Chen, y col., 2003). En un estudio realizado en cáncer gástrico, se cultivaron PBMCs de donantes sanos con medios condicionados por líneas celulares de cáncer gástrico humano y encontraron un aumento en el porcentaje de células T CD4+Foxp3+, que coincidió con una mayor concentración de TGF- $\beta$  en tales medios condicionados. Los autores evaluaron el efecto de TGF- $\beta$  en la diferenciación hacia linfocitos Tregs, y encontraron que había una dependencia parcial, ya que si bien el bloqueo de TGF- $\beta$  con un anticuerpo monoclonal produjo una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4+Foxp3+, éste aún fue mayor al del control (Yuan, y col., 2011).

En nuestros resultados, cuando evaluamos la influencia de TGF- $\beta$  sobre el porcentaje de linfocitos CD4+Foxp3+ utilizando un inhibidor químico del receptor tipo I de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-I), también observamos una dependencia parcial de parte de la línea MDA-MB-231, pero no observamos que TGF- $\beta$  tuviera un efecto en la diferenciación mediada por las células MCF-7. Esto sugiere que la polarización de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Tregs inducida por la línea MCF-7 podría estar mediada por un mecanismo de contacto aún no descrito que sería interesante explorar. Por otra parte, los resultados con la línea celular de estroma mamario normal RMF-EG, indican que ésta también produce un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+Foxp3+. Fisiológicamente, este resultado podría sugerir un rol de los fibroblastos en la mantención de un ambiente supresor que impida el desarrollo de una respuesta inmune inapropiada.

El factor de transcripción Foxp3 es el regulador clave de la generación y función de los linfocitos Tregs. Un estudio demostró que la expresión sostenida de Foxp3 en células activadas puede conferir capacidades regulatorias. Además, la expresión alta y estable de Foxp3 es requerida para la función supresora de los linfocitos Tregs (Sakaguchi, y col., 2010). Cuando analizamos la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de Foxp3 que da cuenta del nivel de expresión de esta proteína, identificamos que la línea MDA-MB-231 induce un aumento en la expresión de Foxp3 en los linfocitos T CD4+. Un estudio realizado con linfocitos T CD4+ humanos demostró que la expresión ectópica de Foxp3 en estas células llevó al desarrollo de células supresoras, sin importar si eran inicialmente linfocitos vírgenes o de memoria (Allan y col., 2008). De este modo, el aumento en la expresión de Foxp3 podría estar relacionado con una mayor supresión, lo que concuerda con la invasividad de esta línea celular.

#### **6.4 Efecto de las células tumorales en la diferenciación de linfocitos T cooperadores.**

La reacción de defensa anti tumoral del organismo, involucra múltiples tipos y mecanismos celulares. A las células Th1 se les ha atribuido un rol clave en el cáncer, ya que producen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, citoquinas involucradas en la respuesta anti-tumoral mediada por células del sistema inmune innato y linfocitos T citotóxicos (DeNardo, y col., 2007). Múltiples estudios clínicos han reportado una disminución en la proporción de células Th1 que favorece un aumento en la población de linfocitos Th2 en pacientes con distintos tipos de cáncer: glioblastoma, cáncer pulmonar, linfoma no-

Hodgkin, cáncer de mama, cáncer renal, prostático, entre otros (Shurin, y col., 1999). Un estudio realizado en pacientes con cáncer gastrointestinal demostró que los linfocitos de sangre periférica (PBL) y los del linfonodo drenante (LNL) de pacientes con cáncer contenían una menor proporción de linfocitos Th1 en relación a los PBL de donantes sanos (Nakayama, y col., 2000). Por otra parte, un estudio realizado en pacientes con distintos tipos de cáncer (pulmón, mama, estómago, colon, recto, ovario), demostró que las PBMCs de los pacientes produjeron menores niveles de IL-2, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12, lo que sugiere una respuesta mediada por linfocitos Th1 reducida en los pacientes con cáncer en relación a controles sanos (Goto, y col, 1999).

Cuando evaluamos el efecto de las líneas RMF-EG, MCF-7 y MDA-MB-231 en la diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo Th1, no observamos un cambio significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de IFN- $\gamma$  con ninguna de las líneas celulares en contacto directo. Sin embargo, cabe señalar la gran variabilidad en los datos en el cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea MDA-MB-231 en contacto directo, ya que de seis experimentos, en tres se produjo un aumento y en tres una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4+IFN- $\gamma$ +. Esto sugiere que podría haber dos poblaciones entre los donantes, una que es susceptible al efecto inhibitorio de la línea celular en contacto directo y otra que no lo es. Para comprobarlo, es necesario aumentar el número de experimentos.

Pese a la variabilidad observada en los resultados del cultivo de los linfocitos T CD4+ en contacto directo con la línea MDA-MB-231, el cultivo de éstos con el medio condicionado de la línea celular sugiere un efecto inmunosupresor de la línea MDA-MB-231, ya que se observa una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4+IFN- $\gamma$ +. Otra evidencia que apoya un efecto inmunosupresor de la línea MDA-MB-231 sobre

la población de linfocitos Th1, es la disminución que observamos en la producción de las citoquinas IL-2 y TNF- $\alpha$  inducida por esta línea celular, la cual es consistente con una inhibición del fenotipo Th1 y con el estudio de Goto, y col. Si bien no se observó una disminución en el promedio de la producción de IFN- $\gamma$ , citoquina clave de los linfocitos Th1, esto puede ser producto de la dispersión de los datos, ya que sólo un par de puntos experimentales elevaban el promedio, pero el resto de los datos apuntaba a una disminución. De este modo, es necesario aumentar el número de experimentos para confirmar que la línea MDA-MB-231 induce una disminución en la producción de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, la línea RMF-EG mostró una tendencia a disminuir la producción de IFN- $\gamma$ , pero no produjo una disminución en las otras citoquinas secretadas por los linfocitos Th1, por lo que no es posible atribuir un rol modulador de la respuesta anti-tumoral a esta línea celular.

La citoquina TGF- $\beta$  es capaz de inhibir la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia células Th1. Un estudio realizado con linfocitos vírgenes humanos de sangre de cordón umbilical (UBL), activados policlonalmente con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, demostró que TGF- $\beta$  inhibe la diferenciación hacia linfocitos Th1, disminuyendo tanto el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$ , como la expresión (cDNA) de su factor de transcripción maestro, T-bet (Santarlaschi, y col., 2009). En este trabajo demostramos que la presencia del inhibidor de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R-I) no alteró de manera significativa el porcentaje de linfocitos Th1, indicando que existirían otros factores solubles responsables de la inhibición inducida por el medio condicionado de la línea MDA-MB-231. Un factor que podría estar involucrado con esta inhibición podría ser IL-6, una citoquina producida en altos niveles por esta línea celular, que se ha descrito que puede regular negativamente la diferenciación de los linfocitos Th1 (Diehl, y col., 2000)

Como se mencionó, se ha observado un desbalance en las respuestas inmunes causadas por los linfocitos Th1 y Th2 que favorece a las células Th2 en distintos tipos de cáncer (Shurin, y col., 1999). Se ha reportado que los linfocitos Th2 pueden producir IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 (Mosmann & Sad, 1996). Un estudio realizado en pacientes con cáncer mamario, demostró que éstas tenían mayores niveles plasmáticos de citoquinas inmuno reguladoras, que incluían a IL-4 e IL-10, en comparación a pacientes con lesiones mamarias benignas (Lyon, y col., 2008). IL-4 se ha relacionado con un rol pro-tumoral en el cáncer, ya que los linfocitos Th2 mediante la producción de IL-4 regulan el fenotipo y la función efectora de los macrófagos asociados al tumor, los cuales a su vez producen un aumento de la metástasis de células epiteliales mamarias malignas (DeNardo, y col., 2009). Por otra parte, IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria que suprime la proliferación de los linfocitos Th1 y la función presentadora de las células dendríticas (Zhu & Paul, 2008). Además, IL-10 es uno de los mecanismos inmuno supresores utilizado por los linfocitos T reguladores, habiéndose correlacionado positivamente la producción de IL-10 con la capacidad supresora de estas células (Bergmann, y col., 2007).

De este modo, el aumento en la producción de IL-4 inducido por la línea MCF-7 podría estar relacionado con un incremento en la población de linfocitos T CD4+ productores de IL-4 que favorecerían la progresión tumoral. Asimismo la tendencia a aumento en la producción de IL-10 inducida también por la línea MCF-7 estaría reforzando un efecto pro-tumoral de parte de esta línea celular, que coincide con los mayores niveles de citoquinas inmuno reguladoras observados por el grupo de Lyon, y col. Por otra parte, la disminución en la producción de IL-10 inducida por la línea RMF-EG podría estar contrarrestando los efectos inmunosupresores que permitieran la

evasión inmune de los tumores. Finalmente, la disminución en la producción de IL-4 inducida por la línea MDA-MB-231 podría ser producto del favorecimiento de una respuesta generada por otro linaje de los linfocitos T cooperadores, como las células Th17. El aumento en la producción de IL-4 observado en presencia del inhibidor de TGF- $\beta$  en la condición control, impide atribuir un rol a esta citoquina en las condiciones experimentales, y se puede explicar en que se ha observado que TGF- $\beta$  suprime la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Th2, inhibiendo la función de su factor de transcripción maestro GATA-3 (Kawahara, y col., 2012).

Las células Th17, son otra subpoblación de linfocitos T de ayuda que se ha relacionado con el cáncer. Estos linfocitos producen una variedad de citoquinas tales como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 y GM-CSF e inicialmente fueron sólo relacionados con los procesos inflamatorios de las alergias y enfermedades autoinmunes. Sin embargo, investigaciones posteriores los han relacionado con el cáncer. IL-17A es una citoquina pro-inflamatoria capaz de inducir un aumento en la producción de factores pro-angiogénicos, como VEGF, y un aumento en citoquinas y quimioquinas relacionadas con el reclutamiento de células del sistema inmune innato, como neutrófilos, que refuerzan la respuesta pro-inflamatoria y el desarrollo tumoral. Un estudio realizado en pacientes con carcinoma ductal invasivo (IDC) mostró que éstos pacientes tenían una mayor proporción de linfocitos T CD4+ y T CD8+ productores de IL-17 en la sangre y en el sitio del tumor. También mostraban mayores niveles de expresión (cDNA) de IL-17, del factor de transcripción maestro de los linfocitos Th17, RORc, y de diversos mediadores de la angiogénesis (CXCL8, MMP-2, MMP-9 y VEGF-A) en el tejido tumoral mamario comparado a controles sanos (Benevides, y col., 2013).

En el presente estudio analizamos por citometría de flujo el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17A mediante el marcaje intracelular de citoquinas, sin embargo, no fue posible visualizar una población CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>. En contraste, mediante el análisis por CBA demostramos que la línea MCF-7 indujo una tendencia a aumento en la producción de IL-17A y que la línea MDA-MB-231 indujo un aumento significativo en la producción de esta citoquina en relación a la condición control. En ambos casos se observó que el aumento era dependiente de contacto, sin embargo el cambio en la producción de IL-17A inducido por la línea MDA-MB-231 también se relacionó con TGF- $\beta$ , ya que el inhibidor de esta citoquina, T $\beta$ R-I, restablecía la producción de TGF- $\beta$  al nivel del control. De este modo, TGF- $\beta$  pareciera ejercer algún control en el efecto observado, sin embargo en este caso necesita del contacto celular para inducir un aumento en la producción de IL-17A.

La discrepancia que encontramos en la producción de IL-17A medida por CBA y a través de marcaje intracelular, podría explicarse en un fenómeno de plasticidad celular. Se ha descrito que los linfocitos Th17 se pueden convertir a un linaje Th1, ganando la habilidad de secretar IFN- $\gamma$  y manteniendo o perdiendo su capacidad de producir IL-17 (Bailey, y col., 2014). De este modo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> podrían estar diferenciándose a células Th17, las cuales producirían IL-17 que se acumularía en el sobrenadante del cultivo, y por tanto sería detectable por CBA. Sin embargo a lo largo de los cinco días de cultivo se podrían transformar a células Th1, motivo por el cual no sería detectable IL-17 a los cinco días mediante marcaje intracelular.

Por otra parte, IL-17 puede inducir un incremento en la producción de IL-6 en el microambiente tumoral (Murugaiyan & Saha, 2009). IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria cuyo incremento se ha correlacionado con una pobre prognosis en

pacientes con cáncer mamario. Además, se ha observado que estimula la proliferación de las células de cáncer mamario, promueve su transición epitelial-mesenquimal (Sullivan, y col., 2009), e incrementa la producción de factores pro-angiogénicos como VEGF, favoreciendo la angiogénesis del tumor (Huang, y col., 2004). Un estudio en pacientes con carcinoma ductal mamario determinó por qPCR que las PBMCs de pacientes con cáncer expresaban mayores niveles de IL-6 e IL-17 en comparación a donantes sanos (Jaberipour, y col., 2011).

Cuando evaluamos la producción de IL-6, lo primero que notamos fue que tanto la línea RMF-EG, como la línea MDA-MB-231 producen IL-6 por sí solas, mientras que la producción de la línea MCF-7 es prácticamente despreciable. La línea MDA-MB-231 produjo grandes cantidades de IL-6, lo que concuerda con el fenotipo más agresivo e invasivo de la línea celular y con el efecto biológico de IL-6. Luego, cuando evaluamos la producción de IL-6 en los co-cultivos de las líneas RMF-EG, MCF-7 o MDA-MB-231 con los linfocitos T CD4+, notamos que las tres líneas inducen un aumento en la producción de IL-6, el cual supera con creces la producción de la línea celular o de los linfocitos T CD4+ por sí solos, lo que sugiere que los dos tipos celulares podrían actuar en sinergia en la producción de IL-6.

Dado que la línea celular RMF-EG produce basalmente IL-6 y no induce la producción de otras citoquinas pro-tumorales, la producción de IL-6 podría estar relacionada con un efecto inmuno modulador, lo que concuerda con nuestros resultados previos ya que esta línea celular induce una tendencia a la disminución en la producción de IFN- $\gamma$ , una disminución en la producción de IL-10 y produce un aumento en el porcentaje de linfocitos Tregs.

Los niveles de IL-6 fueron mucho mayores en el co-cultivo de los linfocitos T CD4+ con la línea MDA-MB-231 comparado con los del co-cultivo con la línea MCF-7. Esta situación es consistente con el aumento en la producción de IL-17A, ya que la línea MDA-MB-231, que es altamente invasiva, indujo un mayor aumento en la producción de IL-17A en comparación a la línea MCF-7, que es débilmente invasiva. De este modo, el aumento en la producción de IL-17A y de IL-6 podría estar relacionado con el nivel de invasividad de las líneas celulares.

En relación a la influencia de TGF- $\beta$  en el patrón de secreción de citoquinas, nuestros resultados indican que, en nuestras condiciones experimentales, el factor sólo estuvo involucrado en el aumento en la producción de IL-17A inducido por la línea MDA-MB-231, lo que podría estar relacionado con el rol de TGF- $\beta$  en la diferenciación de los linfocitos Th17 (Bailey, y col., 2014)

Finalmente, si bien la vía de señalización de TGF- $\beta$  más caracterizada es la mediada por las proteínas SMADs, las cuales han sido relacionadas tanto con el cáncer de mama (Xue, y col., 2014), como con los efectos en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ (Flavell & Li, 2008), TGF- $\beta$  puede activar otras vías de señalización no dependientes de SMAD entre las que se encuentran las vías MAPK y JNK/p38 (Zhang, 2009). Aunque existe menos información al respecto y la mayoría de los efectos de TGF- $\beta$  en el sistema inmune han sido atribuidos a la vía mediada por las proteínas SMAD, existen reportes que indican que las vías de señalización independientes de SMAD estarían involucradas en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos Th17 o T reguladores (Lu, y col., 2010). En base a esto, cabe señalar que el inhibidor químico que utilizamos en el presente estudio (SB431542),

inhibe el receptor tipo I de TGF- $\beta$ , afectando específicamente a la vía de señalización mediada por las proteínas SMAD, sin afectar las vías independientes de SMAD (Inman, y col., 2002). De este modo, si bien los efectos en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ no fueron mayormente dependientes de TGF- $\beta$  en nuestras condiciones experimentales, sería interesante investigar si son mediados por las vías de señalización de TGF- $\beta$  no dependientes de las proteínas SMAD, para lo cual se podría utilizar inhibidores específicos de las vías MAPK, JNK, etc.

En resumen, nuestros resultados sugieren que existe una correlación entre el nivel de malignidad de la línea celular y la abundancia de TGF- $\beta$  bioactivo. De este modo, sería interesante estudiar si la interacción entre las células del estroma y las células tumorales, o entre las células del estroma, células tumorales y linfocitos T CD4+, induce un aumento aún mayor en la abundancia de TGF- $\beta$  bioactivo que pueda favorecer la progresión tumoral. Además sería interesante investigar si la interacción entre células de estroma y células neoplásicas tiene algún efecto en la diferenciación de los linfocitos T CD4+.

Por otra parte, independiente de si TGF- $\beta$  tiene o no un rol en nuestros resultados, observamos que ambas líneas celulares favorecen un microambiente pro-tumoral, modulando la respuesta de los linfocitos T CD4+. Por una parte, la línea MCF-7, que es débilmente invasiva, induce un aumento en el porcentaje de linfocitos Tregs y promueve un cambio en el patrón de secreción de citoquinas inclinado hacia un perfil pro-tumoral (aumento en la producción de IL-17A, IL-6, IL-4) e inmuno-supresor (aumento en la producción de IL-10). Por otra parte, la línea MDA-MB-231, que es altamente invasiva, induce un aumento en el porcentaje de los linfocitos Tregs, pero

también una disminución en el porcentaje de células Th1. Además genera un aumento aún mayor que el inducido por MCF-7 en las citoquinas pro-angiogénicas (IL-17A e IL-6) y una disminución en las citoquinas anti-tumorales (TNF- $\alpha$  e IL-2). De este modo la magnitud de la respuesta pro-tumoral se correlaciona con el nivel de invasividad de la línea celular, ya que la línea MCF-7 favorece la generación de un microambiente inmuno-supresor, mientras que la línea MDA-MB-231 además de favorecer la inmunosupresión disminuye la respuesta anti-tumoral, lo que concuerda con un fenotipo más agresivo. Además, nuestros resultados sugieren que las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 median su efecto sobre los linfocitos T CD4+ a través de mecanismos distintos. Los efectos sobre la diferenciación de los linfocitos T CD4+ inducidos por la línea MCF-7 son mayormente dependientes de contacto, mientras que los inducidos por la línea MDA-MB-231 son principalmente dependientes de factores solubles, lo que podría favorecer su invasividad. En la literatura se ha reportado que células de mieloma son capaces de inducir la generación de linfocitos T reguladores, mediante un mecanismo no relacionado con factores solubles como TGF- $\beta$  o IL-10, sino que dependiente del contacto mediado por la interacción ICOS/ICOS-L (Feyler, y col., 2012). De este modo, sería interesante investigar cuál el mecanismo responsable de los efectos inducidos por la línea MCF-7 en los linfocitos T CD4+, estudiando por ejemplo la interacción ICOS/ICOS-L. Por otro lado, en el caso de la línea MDA-MB-231 se observó que ciertos efectos eran parcialmente dependientes de TGF- $\beta$  como la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T reguladores y la producción de IL-17, por lo cual sería interesante explorar qué otros factores solubles están involucrados en estos y en los otros efectos mediados por esta línea celular.

## VII. CONCLUSIÓN

Las líneas celulares de epitelio tumoral mamario favorecen la generación de un microambiente inmunosupresor, aumentando la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T reguladores y promoviendo un cambio en el patrón de secreción de citoquinas hacia un perfil pro-tumoral.

## VIII. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, S. Pillai. 2008a. Propiedades generales de las respuestas inmunitarias. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ta edición. pp 3-19. Elsevier, Madrid.
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, S. Pillai. 2008b. Activación de los Linfocitos T. *Inmunología Celular y Molecular*. 6ta edición. pp 189-215. Elsevier, Madrid.
- Abe, M., Harpel, J.G., Metz, C.N., Nunes, I., Loskutoff, D.J., Rifkin, D.B. 1994. An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct. *Analytical biochemistry*. **216(2)**: 276-284.
- Allan, S.E., Alstad, A.N., Merindol, N., Crellin, N.K., Amendola, M., Bacchetta, R., Naldini, L., Roncarolo, M.G., Soudeyns, H., Levings, M.K. 2008. Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of Foxp3. *Molecular Therapy*. **16(1)**: 194-202.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., Hafler, D.A. 2004. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Seminars in immunology*. **16(2)**: 89-98.
- Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S., Paulos, C.M. 2014. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Frontiers in immunology*. **5**: 276.
- Benevides, L., Cardoso, C.R., Tiezzi, D.G., Marana, H.R., Andrade, J.M., Silva, J.S. 2013. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. *European journal of immunology*. **43(6)**: 1518-1528.
- Bergmann, C., Strauss, L., Zeidler, R., Lang, S., Whiteside, T.L. 2007. Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-culture simulating tumor microenvironment. *Cancer immunology and immunotherapy*. **56(9)**: 1429-1442.
- Bissell, M.J., Radisky, D. 2011. Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer*. **1(1)**: 46-54.
- Bilate, A.M., Lafaille, J.J. 2012. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual review of immunology*. **30**: 733-758.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine*. **342(18)**: 1350-1358.
- Brandacher, G., Winkler, C., Schroecksnadel, K., Margreiter, R., Fuchs, D. 2006. Antitumor activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Current drug metabolism*. **7(6)**: 599-612.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H.U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martínez, L., Fend,

F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., Röcken, M. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*. **494(7437)**: 361-365.

Burnet, F. M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*. **13**: 1-27.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M. 2003. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*. **198(12)**: 1875-1886.

de Jong, R., van Lier, R.A., Ruscetti, F.W., Schmitt, C., Debré, P., Mossalavi, M.D. 1994. Differential effect of transforming growth factor-beta 1 on the activation of human naïve and memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *International immunology*. **6(4)**: 631-638.

DeNardo, D.G., Andreu, P., Coussens, L.M. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer metastasis reviews*. **29(2)**: 309-316.

DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., Coussens, L.M. 2009. CD4<sup>(+)</sup> T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer cell*. **16(2)**: 91-102.

DeNardo, D.G., Coussens, L.M. 2007. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptative and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*. **9(4)**: 212.

De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., Moser, M. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European journal of immunology*. **27(5)**: 1229-1235.

Diehl, S., Anguita, J., Hoffmeyer, A., Zapton, T., Ihle, J.N., Fikrig, E., Rincón, M. 2000. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity*. **13(6)**: 805-815.

Egeblad, M., Nakasone, E.S., Werb, Z. 2010. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell*, **18(6)**: 884-901.

Facciabene, A., Mott, G.T., Coukos, G. 2012. T-Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Research*. **72(9)**: 2162-2171.

Feyler, S., Scott, G.B., Parrish, C., Jarmin, S., Evans, P., Short, M., McKinley, K., Selby, P.J., Cook, G. 2012. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contact-dependent and antigen-presenting cell-independent. *PLoS One*. **7(5)**: e35981.

Flavell, R.A., Li, M.I. 2008. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. **134(3)**: 392-404.

Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., Licona-Limón, P. 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nature Reviews Immunology*. **10(8)**: 554-567.

Fogel-Petrovic, M., Long, J.A., Misso, N.L., Foster, P.S., Bhoola, K.D., Thompson, P.J. 2007. Pshysiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function. *International Immunopharmacology*. **7(14)**: 1924-1933.

Goto, S., Sato, M., Kaneko, R., Itoh, M., Sato, S., Takeuchi, S. 1999. Analysis of Th1 and Th2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells as a parameter of immunological dysfunction in advanved cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **48(8)**:435-442.

Guerrero J., Tobar N., Cáceres M., Espinoza L., Escobar P., Dotor J., Smith PC and Martinez J. 2010. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$ . *Breast Cancer Research and Treatment*. **119**: 497-508.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**: 57–70.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144(5)**: 646-674.

Huang, S.P., Wu, M.S., Shun, C.T., Wang, H.P., Lin, M.T., Kuo, M.L., Lin, J.T. 2004. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *Journal of Biomedical Science*. **11(4)**: 517-527.

Inman, G.J. Nicolás, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., Hill, C.S. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5 and ALK7. *Molecular Pharmacology*. **62**: 65-74.

Ivanović, V., Todorović-Raković, N., Demajo, M., Nesković-Konstantinović, Z., Subota, V., Ivanisević-Milovanović, O., Nikolić-Vukosavljević, D. 2003. Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. *European journal of cancer*. **39(4)**: 454-461.

Jaberipour, M., Baharlou, R., Hosseini, A., Talei, A., Razmkhah, M., Ghaderi, A. 2011. Increased IL-17 and IL-6 transcripts in peripheral blood mononuclear cells: implication for a robust proinflammatory response in early stages of breast cancer. *Middle East Journal of Cancer*. **2(1)**: 19-26.

Khan, S.A., Joyce, J., Tsuda, T. 2012. Quantification of active and total transforming growth factor- $\beta$  levels in serum and solid organ tissues by bioassay. *BMC research notes*. **5**: 636.

Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Altuwajjri, S., Szeliga, W., Kolls, J., Chang, A., Zou, W. 2007. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *The Journal of Immunology*. **178(11)**: 6730-6733.

Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Sarkar, F.H. 2011. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?. *Cancers*. **3(1)**: 716-729.

Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Grav, J.W., Carey, L., Richardson, A., Weinberg, R.A. 2004. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101(14)**: 4966-4971.

Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., Nakayama, T. 2012. The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- $\beta$  and suppresses T(H)2 differentiation. *Nature Immunology*. **13(8)**: 778-786.

Laurence, A., O'Shea, J.J. 2007. Th-17 differentiation: of mice and men. *Nature Immunology*. **8**: 903-905.

Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., Flavell, R.A. 2006. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of immune response. *Annual review of immunology*. **24**: 99-146.

Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., Linehan, D.C. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *The Journal of Immunology*. **169(5)**: 2756-2761.

Loose, D., Van de Wiele, C. 2009. The Immune System and Cancer. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals*. **24(3)**: 369-376.

Lu, L., Wang, J., Zhang, F., Chai, Y., Brand, D., Wang, X., Horwitz, D.A., Shi, W., Zheng, S.G. 2010. Role of SMAD and Non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *The Journal of Immunology*. **184(8)**: 4295-4306.

Luo, C.T., Li, M.O. 2013. Transcriptional control of regulatory T cell development and function. *Trends in immunology*. **34(11)**: 531-539.

Lyon, D.E., McCain, N.L., Walter, J., Schubert, C. 2008. Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. *Nursing research*. **57(1)**: 51-58.

Nakayama, H., Kitayama, J., Muto, T., Nagawa, H. 2000. Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Japanese journal of clinical oncology*. **30(7)**: 301-305.

Neurath, M.F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P.R., Bhan, A., Autschbach, F., Sullivan, B.M., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S. 2002. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *The Journal of experimental medicine*. **195(9)**: 1129-1143.

- Mosmann, T.R., Sad, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*. **17(3)**: 138-146.
- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.E., Mazziere, R., Nunes, L., Rifkin, D.B. 1997. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney international*. **51(5)**: 1376-1382.
- Murphy, K.M., Reiner, S.L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*. **2(12)**: 933-944.
- Murugaiyan, G., Saha, B. 2009. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *Journal of Immunology*. **183(7)**: 4169-4175.
- Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., Lotze, M.T. 2003. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. **101(7)**: 2620-2627.
- Sakaguchi, S., Mivara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A. 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*. **10(7)**: 490-500.
- Santarasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Querci, V., De Palma, R., Liotta, F., Cosmi, L., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *European journal of immunology*. **39(1)**: 207-215.
- Schmierer, B., Hill, C.S. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews. Molecular cell biology*. **8(12)**: 970-982.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., Doetschman, T. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. **359(6397)**: 693-699.
- Shurin, M.R., Lu, L., Kalinski, P., Stewart-Akers, A.M., Lotze, M.T. 1999. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer seminars in immunopathology*. **21(3)**: 339-359.
- Su, X., Ye, J., Hsueh, E.C., Zhang, Y., Hoft, D.F., Peng, G. 2010. Tumor microenvironment direct recruitment and expansion of human Th17 cells. *The Journal of Immunology*. **184(3)**: 1630-1641.
- Subik, K., Lee, J.F., Baxter, L., Strzpetek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.C., Bonfiglio, T., Hicks, D.G., Tang, P. 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast cancer: basic and clinical research*. **4**: 35-41.
- Takahashi, H., Numasaki, M., Lotze, M.T., Sasaki, H. 2005. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunology letters*. **98(2)**: 189-193.
- Tiemessen, M.M., Kunzmann, S., Schmidt-Weber, C.B., Garssen, J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knol, E.F., van Hoffen, E. 2003. Transforming growth factor-beta inhibits

human antigen-specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *International immunology*. **15(12)**: 1495-1504.

Todorović-Raković, N., Ivanović, V., Demajo, M., Nesković-Konstantinović, Z., Nikolić-Vukosavljević, D. 2003. Elevated plasma levels of TGF-beta1 in patients with locally advanced breast cancer related to other clinical stages. *Archive of Oncology*. **11(3)**: 131-133.

Tsushima, H., Kawata, S., Tamura, S., Ito, N., Shirai, Y., Kiso, S., Imai, Y., Shimomukai, H., Nomura, Y., Matsuda, Y., Matsuzawa, Y. 1996. High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: Association with disease progression. *Gastroenterology*. **110(2)**: 375-382.

Vignali, D.A., Collison, L.W., Workman, C.J. 2008. How regulatory T cells works. *Nature Reviews Immunology*. **8(7)**: 523-532.

Whiteside, T.L. 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. **27(45)**: 5904-5912.

Xue, J., Lin, X., Chiu, W.T., Chen, Y.H., Yu, G., Liu, M., Feng, X.H., Sawaya, R., Medema, R.H., Hung, M.C., Huang, S. 2014. Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF- $\beta$ -dependent cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation*. **124(2)**: 564-579.

Yuan, X.L., Chen, L., Zhang, T.T., Ma, Y.H., Zhou, Y.L., Zhao, Y., Wang, W.W., Dong, P., Yu, L., Zhang, Y.Y, Shen, L.S. 2011. Gastric cancer cells induce human CD4+Foxp3+ regulatory T cells through the production of TGF-b1. *World journal of gastroenterology*. **17(15)**: 2019-2027.

Zhang, Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cancer research*. **19(1)**: 128-139.

Zhu, J., Paul, W.E. 2008. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood*. **112(5)**: 1557-1569.

#### Recursos Electrónicos:

Chile. Ministerio de Salud. Departamento de Estadísticas e Información de Salud, (2011). *Defunciones y mortalidad por causas*. Recuperado Junio 17, 2014, de <http://www.deis.cl/estadisticas-mortalidad/?p=51>

OMS. (2014). *Cáncer*. Recuperado Junio 17, 2014, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>