



FCM Facultad de Ciencias
Médicas · UNR

GMD

Facultad Cs. Médicas
Biblioteca



TDM 2476

Tesis Doctoral

“CONTRIBUCIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL AL DESARROLLO, CRECIMIENTO, INVASIÓN Y METÁSTASIS DE UN ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO TRIPLE NEGATIVO”

Lic. Del Giúdice, Antonela

Directora: Dra. Rico, María José

Co-directora: Dra. Rozados, Viviana Rosa

Instituto de Genética Experimental

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de Rosario

Santa Fe 3100

Rosario- Argentina

2023

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
1.1. Cáncer	7
1.2. Microambiente Tumoral	11
1.3. Sistema Inmune y Cáncer	13
1.4. Angiogénesis	26
1.5. Modelos Animales.....	27
1.6. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	31
ANTECEDENTES	33
2. 1. Evaluación del complejo mayor de histocompatibilidad	33
2.2. Análisis mendeliano de la resistencia/susceptibilidad a un tumor trasplantable de mama en un modelo murino	35
2.3. Inmunosupresión de ratones CB α desafiados con un adenocarcinoma de mama ...	35
OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo general.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1. Animales	39
4.2. Tumor	39
4.3. Modelo experimental	40
4. 4. Cuantificación de linfocitos por citometría de flujo	42
4. 5. Cuantificación de citoquinas circulantes por ELISA	43

4. 6. Análisis histológicos e inmunohistoquímicos	43
4. 6. 1. Hematoxilina-eosina.....	43
4. 6. 2. Tinción Picro-Sirius Red	43
4. 6. 3. Inmunohistoquímica	44
4. 7. Evaluación y cuantificación de metástasis pulmonares.....	45
4. 8. Análisis estadístico	45
RESULTADOS	47
5.1. Caracterización del crecimiento tumoral en CBi y CBi ⁻	47
5.2. Análisis histo-morfológico del adenocarcinoma de mama M-406	48
5.2.1. Propiedades histológicas del microambiente del tumor durante su crecimiento en la línea CBi.....	48
5.2.2. Propiedades histológicas del microambiente tumoral durante el crecimiento y rechazo tumoral en la línea CBi ⁻	51
5.3. Evaluación de las citoquinas circulantes durante la fase de crecimiento y en la fase de escape o eliminación tumoral	53
5.4. Caracterización del crecimiento tumoral en la F1	55
5.5. Evaluación de las poblaciones celulares circulantes durante la fase de crecimiento y en la fase de escape o eliminación tumoral	57
5.6. Evaluación de las poblaciones celulares intratumorales durante la fase de crecimiento y en las fases de escape/eliminación tumoral.....	61
5.7. Cuantificación de metástasis pulmonares.....	65
5.8. Evaluación del proceso angiogénico	66
5.9. Evaluación de los componentes de la matriz extracelular	70
DISCUSIÓN.....	78
CONCLUSIONES	92

BIBLIOGRAFÍA	97
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	129
Trabajos completos.....	129
Trabajos completos resultantes de colaboraciones	129
PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	129

*Dedicada a mi abuelo Coco y a mi suegro Pepe,
que lamentablemente esta enfermedad se los llevó antes de tiempo.*

*Y en especial dedicada a mi suegra Ali,
una mujer que admiro con toda mi alma, que,
con un diagnóstico precoz, un tratamiento adecuado
y una actitud de hierro frente a la vida,
logró vencer un cáncer de mama y seguir disfrutando del día a día.*

AGRADECIMIENTOS

Una vez escuché decir que el Doctorado es la máxima titulación universitaria que un profesional puede lograr tener, y doy fe de ello, no sólo en lo profesional, sino por todo lo que se aprende en el camino y en todo lo que te vas convirtiendo hasta lograrlo. En mi caso, llegó el momento de cerrar esta maravillosa e increíble etapa de estudiante de Doctorado que, sin dudas, fue una de las mejores de toda mi vida y que seguramente dará comienzo a una nueva como Dra. en Cs. Biomédicas, llena de nuevos desafíos y aventuras. Cerrar esta etapa, es cerrar un ciclo de 15 años de mi vida con mi familia científica del IGE, en los cuales tuve la fortuna de conocer personas maravillosas que fueron y son fundamentales para que yo hoy esté aquí y es por eso que les quiero agradecer de todo corazón. En primer lugar, a mis directoras por estar siempre en todo momento, por su paciencia y por guiarme durante todo este tiempo. Vivi y Jose gracias por ser incondicionales y transmitirme siempre todos sus conocimientos. Gracias a Vivi por acompañar, escuchar, contener, bancar, aconsejar, motivar e incentivar tanto físicamente como en este último tiempo a la distancia. A Jose, no sólo por haber estado siempre profesionalmente guiándome en este camino, sino también por tantos consejos de vida, por tantas charlas, mates, aventuras, risas y por su hermosa amistad de hermana mayor. A Graciela, por ser un gran referente como investigadora y como ser humano, siendo clave para que pueda finalizar esta etapa. Al Dr. Ricardo, por abrirme las puertas del IGE, por ser el primero en confiar en mí y estar siempre presente, dispuesto a enseñar y ayudar. A Lean, por sus consejos de vida, sus charlas y su forma no convencional para sacar lo mejor de mí y crecer como persona y como profesional. A Luly, María Delia, Herman, Mauri, Meli, Fla y Patri, por tantos momentos increíbles compartidos. A Mariano por estar siempre dispuesto a colaborar. A mis amigos IGEinos, en especial a Vicky, mi compañera de facultad, de tesina, de tesis, mi gran amiga de vida. Gracias infinitas por tantas charlas, consejos, risas, mates, secretos, aventuras. A mis amigos doctorandos de “arriba”, Juan y Piky. Gracias por tantos momentos inolvidables. Gracias por tantos viajes, risas y aventuras compartidas. Al grupo “cito” porque sin ellos, nada de esto hubiera sido posible. Gracias Mati y Cele por ser el mejor equipo del mundo mundial y por permitirme compartir todos mis conocimientos con ustedes. Agradezco infinitamente no sólo por ser excelentes profesionales, sino también por estar siempre y por su hermosa amistad. A Juli por ser parte de mis primeros años como tesista doctoral y bancar como nadie. Gracias por tu amistad y por tantas risas y aventuras compartidas. A Caro, Cin, Manu y Ro por todo lo compartido juntas y por su amistad.

Ahora sí, una mención especial y un súper agradecimiento a Pablo, mi gran compañero de vida y de aventuras, que bancó como nadie en este último tiempo donde surgieron todos los miedos, las dudas, el estrés e incertidumbre y sobre todo agradezco porque siempre

confió en mi desde el primer momento, me motivó y acompañó a ir siempre tras mis sueños, brindándome todo su amor.

Gracias a mi incondicional, a mi mamá, al ser más hermoso que la vida me regaló. Gracias por estar siempre y bancarme en todas mis locuras. Sobre todo, gracias por creer y confiar siempre en mí. A mi papá por todos sus consejos, por enseñarme a vivir en libertad y animarme a ir siempre tras mis sueños. A mis otras mamás, a mi abuela Horten y mi tía Silvia por estar siempre en todo momento, por darme siempre tanto amor, cariño, por mimarme y sobre todo por ser hogar. A Khaled y Fer por estar en todo momento brindando todo su amor. A mi abuelo Coco, que desde el cielo siempre me guía. A mi gran maestro de vida, Héctor, por darme siempre paz en medio del caos y a su familia por estar siempre. A mi familia política, mi familia del alma, a Ali, Pepe, Caco y Ana, que desde que llegué a sus vidas me abrieron las puertas de su hogar y me brindaron todo el amor del mundo. Al Negro por todos sus consejos y por comprenderme siempre. A mis tíos y primos, por compartir conmigo cada etapa y estar siempre. A Gerardo, Sandra y toda la flia, por ser parte de mi vida y estar en todo momento. A mis amigas de toda la vida, a Lu, mi primera amiga, mi hermana del alma, la que estuvo siempre en cada momento clave. A M. Elisa, Ludmi, Magui, Caro, Marita, Nati, Fer, por ser parte de mi vida y compartir tantos momentos juntas. A mis amigos de siempre. A Dami, a mi hermano del alma, que siempre está con la palabra justa en el momento justo. A Mati, Miri y su hermosa familia, por compartir miles de experiencias juntos. A Jorge, por enseñarme que la vida también tiene su paso a paso, su equilibrio y su estabilidad. A esas personas que la vida me puso en el camino. Gracias a Estela por ser mi gran guía, a Fede, Érica y Nora por acompañarme en esta etapa tan importante de mi vida. A Mónica, por estar siempre presente. A Ágata, mi gemelita española, por la confianza y por abrirme las puertas siempre. A Su y Xavi por ser parte de una etapa crucial en mi vida, por guiarme y acompañarme a transitarla. A Giulliana, Almu, Rubén, Nuria y todas mis compañeras de mentoría, por la paciencia y la comprensión en todo momento. A Luciano, no sólo por ser un excelente profesional, sino también por confiar en mí en todo momento. A Cristina, quien me dio el empujoncito final para que hoy esté culminando este ciclo.

Gracias infinitas a cada una de las personas que fueron y son parte de esta maravillosa e increíble etapa. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. **¡LOS AMO INFINITO!**

Por decisiones que tomé en su momento y por seguir cumpliendo sueños, la vida hoy me encuentra lejos de todos mis seres queridos y de la ciencia básica, sin embargo, **ESTO NO ES UN ADIÓS, SINO UN HASTA PRONTO... PORQUE UNO SIEMPRE VUELVE A LOS VIEJOS SITIOS DONDE AMO LA VIDA** y yo realmente amé ser parte de este proyecto y de esta hermosa familia del IGE.

Anto.

ABREVIATURAS

APC: Célula presentadora de antígenos (Del inglés: *Antigen Presenting Cells*)

B16F10: Línea celular de melanoma de ratón

BOUIN: Fijador compuesto por ácido pícrico, ácido acético y formaldehído en una solución acuosa.

CAF: Fibroblastos asociados al cáncer (Del inglés: *Cancer Associated Fibroblasts*)

CD: Células Dendríticas

Ciclo A: Ciclosporina A

CO₂: Dióxido de Carbono

CSF-1: Factor estimulante de colonias macrófagos (Del inglés: *Colony Stimulating Factor 1*)

CTLA-4: Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (Del inglés: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)

DAB: Di-Amino Benzidina

Dexa: Dexametasona

EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetra Acético

EMT: Transición epitelio-mesénquima (Del inglés: *Epithelial Mesenchymal Transition*)

EPC: Células progenitoras endoteliales (Del inglés: *Endotelial Progenitor Cell*)

ER: Receptor de estrógeno (Del inglés: *Estrogen Receptor*)

F1: Filial 1

F2: Filial 2

FAP: Proteína de activación de fibroblastos (Del inglés: *Fibroblasts Activation Protein*)

Fig.: Figura

GLA: Ganglios linfáticos axilares

H₂O_d: Agua destilada

H-E: Hematoxilina- Eosina

HER2: HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Del inglés: *Human Epidermal growth factor Receptor 2*)

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 α (Del inglés: *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*)

i.p.: Intraperitoneal

IFN- γ : Interferón Gamma

IL-n: Interleuquina-n

M1: Macrófagos tipo 1

M2: Macrófagos tipo 2

M5076: Línea celular de sarcoma

MAT: Microambiente Tumoral

MC-38: Línea celular de cáncer de colon

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama

MDSC: Células mieloides supresoras (Del inglés: *Myeloid Derived Suppressor Cells*])

MEC: Matriz Extracelular

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Del inglés: *Major Histocompatibility Complex*)

MO: Microscopio Óptico

NK: Células asesinas naturales (del inglés: *Natural Killer*)

PBS: Buffer fosfato salino (Del inglés: *Phosphate Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1 (Del inglés: *Programmed Death 1*)

PD-L1: Ligando de la proteína de muerte celular programada 1 (Del inglés: *Programmed Death-Ligand 1*)

PR: Receptor de progesterona (Del inglés: *Progesterone Receptor*)

RANK: Receptor activador para el factor nuclear κ B (Del inglés: *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B*)

RANKL: Ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (Del inglés: *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*)

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Del inglés: *Restriction Fragment Length Polymorfisms*)

s.c.: Subcutáneo

S100A4: Proteína asociada a metástasis

SDF-1: Factor derivado de células estromales 1 (Del inglés: *Stromal cell Derived Factor 1*)

SLP: Supervivencia Libre de Progresión

TCR: Receptor de células T (Del inglés: *T Cell Receptor*)

TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa (Del inglés: *Transforming Growth Factor alpha*)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (Del inglés: *Transforming Growth Factor beta*)

Th: Célula T colaboradora (Del inglés: *T helper*)

Thy-1: Proteína de superficie celular (Del inglés: *Cell Surface Antigen*)

TNBC: Tumores de mama triple negativos (Del inglés: *Triple Negative Breast Cancer*)

Tregs: Células T reguladoras

T $\gamma\delta$: Células T gamma-delta

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (Del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*)

α SMA: Alfa actina de músculo liso (Del inglés: *α Smooth Muscle Actin*)

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad genética y una de las principales causas de muerte en todo el mundo. El cáncer de mama triple negativo es un subtipo que se caracteriza por la ausencia de ER, PR y HER2, este tipo de tumores suelen presentarse en mujeres jóvenes, poseen un alto riesgo de recurrencia, son extremadamente malignos y metastásicos.

Con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune antitumoral y el microambiente tumoral, se desafiaron las líneas parentales C_{Bi} (susceptible), C_{Bi}⁻ (resistente) y las F1, con el adenocarcinoma de mama M-406, triple negativo. Se evaluaron, por microscopía óptica, los tumores provenientes de los animales C_{Bi} y C_{Bi}⁻ en forma secuencial desde el día 3 hasta que los mismos estuvieran en franco escape o eliminación. Se cuantificó previo al desafío tumoral y durante las fases de crecimiento y de escape y/o eliminación, el porcentaje de células CD4⁺, CD8⁺, Tregs y Th17 circulantes e infiltrantes de tumor y se cuantificaron las citoquinas circulantes: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ .

Con el fin de evaluar diferentes componentes del MAT determinamos el colágeno, el porcentaje de área cubierta por campo de la proteína α -SMA como marcador de miofibroblastos estromales y como marcador del proceso angiogénico determinamos las células HIF1 α ⁺.

Como fue observado previamente, el tumor creció en los genotipos susceptibles, C_{Bi} y F1, y fue rechazado en C_{Bi}⁻ y nuevamente pudimos observar que el fenotipo susceptible es dominante frente al resistente. El tumor en la línea C_{Bi}⁻ tarda más tiempo en comenzar a crecer y lo hace a una velocidad mayor que C_{Bi} y F1, logrando duplicar su volumen tumoral en menor cantidad de tiempo, pero alcanzando menor volumen máximo tumoral. Al comparar el crecimiento tumoral en los genotipos C_{Bi} y F1, donde el tumor crece y escapa, observamos que el mismo se comportó de manera similar en ambos genotipos, aunque el tumor tarda más tiempo en comenzar a crecer en los animales F1 y luego crece más lento comparado con los animales C_{Bi}. El comportamiento del tumor en los híbridos F1, se puede explicar por el hecho que portan tanto alelos de susceptibilidad derivados de la línea parental C_{Bi} como alelos de resistencia derivados de la línea parental C_{Bi}⁻, lo que haría que

el tumor tarde más tiempo en comenzar a crecer y cuando crezca lo haga a una velocidad menor que en los animales CBi.

Al determinar las citoquinas Th1 y Th2 circulantes durante las diferentes fases de evolución de crecimiento tumoral, en las líneas parentales observamos que, en nuestro modelo, IL-4 e IFN- γ estarían cumpliendo un rol pro-tumoral y, por el contrario, IL-10 tendría una actividad antitumoral.

Más allá de la inmunovigilancia, muchos tumores logran escapar del control del sistema inmune y continuar con su crecimiento, tal como es el caso de los animales CBi y F1. El presente trabajo nos permitió concluir que, una respuesta inmune innata temprana poco efectiva, junto con la conformación de un microambiente tumoral inmunosupresor serían, en parte, responsables del crecimiento exponencial de M-406 en esos dos genotipos. Por el contrario, el rechazo tumoral observado en la línea parental CBi⁻, posiblemente se deba a una interacción eficiente entre la respuesta inmune innata y adquirida. Observamos una mayor irrigación del tumor en esta línea comparando con CBi, así como también un mayor infiltrado de eosinófilos que serían capaces de eliminar de manera temprana gran parte de las células tumorales a través de su actividad citolítica. También se observó un mayor porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺, así como el menor porcentaje de linfocitos Tregs en el microambiente tumoral en los animales CBi⁻ comparado con los animales CBi y F1 en la fase de crecimiento lo que explicarían, en parte, el rechazo tumoral observado en CBi⁻.

Al evaluar la presencia de metástasis espontáneas, en los genotipos donde en tumor crece y escapa, sólo se observaron en los animales de la F1. La mayor expresión de células HiF-1 α ⁺, el mayor porcentaje de colágeno en la MEC, y el menor número de células α -SMA⁺ en los tumores provenientes de los híbridos F1 en comparación con aquellos provenientes de los animales CBi, sería responsable, en parte, de un fenotipo más invasivo y del desarrollo de metástasis observada en dicha línea.

INTRODUCCIÓN

1. 1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética que ocurre cuando las células crecen y se multiplican en forma descontrolada. Es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, alcanzando casi 10 millones de fallecimientos en el año 2020, siendo el cáncer de mama el más comúnmente diagnosticado a nivel mundial (2,26 millones de casos) (Hyuna S, 2021). En Argentina, el cáncer es la segunda causa principal de muerte, situada después de las enfermedades cardiovasculares. De acuerdo a las estimaciones realizadas por la International Association of Cancer Registries, en base a datos disponibles a nivel mundial para el año 2018, Argentina presentó una tasa de incidencia de 212 casos por 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción del de piel no melanoma), cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta (<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-delcancer/estadisticas/incidencia>).

El cáncer no es una enfermedad única, sino un conjunto de más de cien enfermedades que se originan en distintos tejidos del organismo, que difieren en su tasa de crecimiento, incidencia de acuerdo a la edad y sexo, detectabilidad diagnóstica, respuesta a los tratamientos y pronóstico, entre otras características. Desde la biología celular y molecular, se trata de un grupo de enfermedades causadas por genes defectivos cuyos productos proteicos alterados, aumentados o ausentes perturban una serie de señales intracelulares responsables de la conducta celular (Hinrichsen LI & Scharovsky OG, 2002). Dichos cambios genéticos, o mutaciones, involucran la activación de un grupo de genes denominados oncogenes y/o la inactivación de otros denominados genes supresores tumorales o antioncogenes. Si bien los cambios genéticos que causan cáncer pueden heredarse en la progenie, solo un porcentaje muy bajo de neoplasias están causadas por defectos hereditarios, ya que la gran mayoría (aproximadamente el 90%) son causadas por mutaciones somáticas asociadas a diversos factores de riesgo (Aggarwal B, 2009). Algunas mutaciones pueden conferir ventajas que se traducen en un crecimiento acelerado o una mayor supervivencia, lo que puede llevar a la adquisición de nuevas mutaciones que, a su

vez, pueden repetirse una y otra vez, dando lugar a una población celular heterogénea compuesta por células con diferentes características, dependiendo de cuáles genes se encuentren mutados (Macdonald F, 2005). Hace ya una década que Hanahan y Weinberg describieron una serie de características funcionales adquiridas por las células humanas a medida que pasan de la normalidad a los estados de crecimiento neoplásico (Hanahan D & Weinberg RA, 2011). Estas características son cruciales para su capacidad de formar tumores malignos y se han ido actualizando a lo largo del tiempo (Fig. 1a). Entre ellas se encuentran: la capacidad adquirida para mantener la señalización proliferativa, la resistencia a factores inhibidores del crecimiento, la evasión de la apoptosis, el potencial de replicación ilimitado a través de la expresión de la telomerasa, la inducción de la angiogénesis, la activación del mecanismo de invasión y el desarrollo de metástasis, la desregulación y reprogramación del metabolismo celular, la evasión del sistema inmune, la inestabilidad genómica y la promoción de la inflamación tumoral. Actualmente se incorporaron nuevos marcadores emergentes que en conjunto con las características mencionadas anteriormente promueven el crecimiento y la progresión tumoral. Entre ellos se encuentran el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, los microbiomas polimórficos y las células senescentes (Fig. 1b) (Hanahan D, 2022).

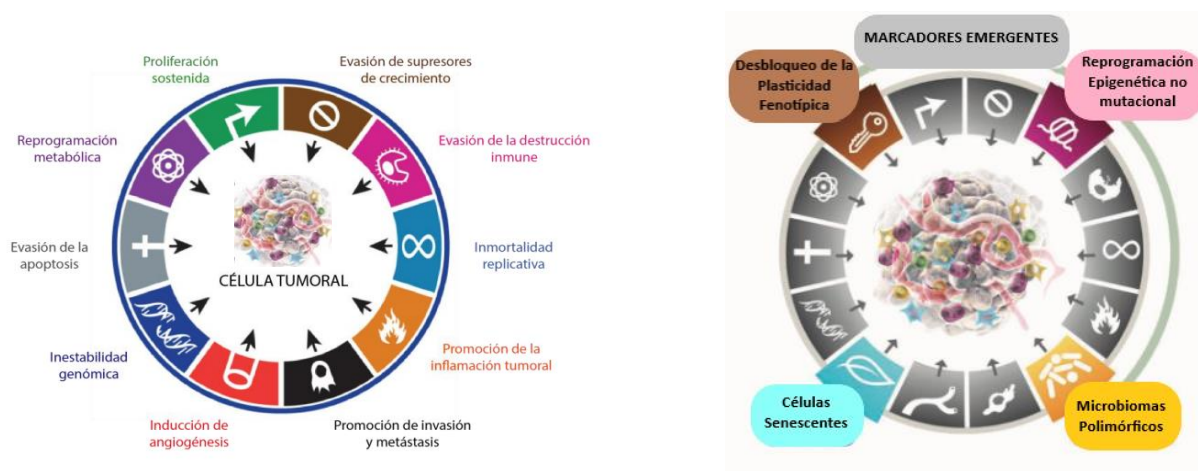


Figura N°1: Características de la célula tumoral.
Adaptado de (Hanahan D, 2022) y modificado en BioRender.com.

Cuando las células tumorales escapan del tumor primario, invaden tejidos vecinos y crecen en órganos distantes reanudando su proliferación, generan lo que se denomina: metástasis. El desarrollo de una metástasis es un proceso que consta de múltiples etapas secuenciales e interrelacionadas, conocidas como cascada metastásica, la cual comienza cuando las células malignas del tumor primario se infiltran en el parénquima circundante y entran en la circulación por intravasación de los vasos sanguíneos. Estas células tumorales circulantes viajan a áreas distantes donde se extravasan de la circulación y entran en el tejido diana (Zeeshan R & Zeeshan M, 2017).

Cada etapa de la cascada metastásica está influenciada por interacciones entre las células tumorales y el microambiente tumoral (Wai L, 2013). A pesar de que solo el 0,01% de las células tumorales que ingresan a la circulación sistémica logran completar todos estos pasos, el desarrollo de metástasis es la causa de más del 90% de las muertes asociadas al cáncer (Diepenbruck M & Christofori G, 2016) por lo que resulta fundamental desarrollar tratamientos que no solo batallen contra el tumor primario, sino que también sean capaces de combatir el desarrollo de metástasis.

El cáncer de mama es una enfermedad compleja, caracterizada por factores ambientales, genéticos y epigenéticos (Sanders J, 2014). La probabilidad de padecer cáncer de mama aumenta con la edad y el riesgo de padecerlo es heterogéneo, dependiendo, entre otros, de factores no modificables como la raza o los antecedentes personales y familiares o la de heredar mutaciones genéticas (Merino Bonilla JA, 2017). Dentro de estas mutaciones genéticas, las más comunes ocurren en genes de alta penetrancia como *p53*, *pten*, *brca1* y *brca2*. Las mutaciones en estos últimos dos confieren un riesgo de por vida de entre el 60 y 80% de desarrollo de cáncer de mama y están asociadas con otras neoplasias malignas, como cáncer de ovario (Libson S & Lippman M, 2014; Cohen-Haguenauer O, 2019).

Se considera al cáncer de mama como una enfermedad heterogénea, ya que no todos los tumores de mama tienen un comportamiento biológico similar debido a que los pacientes tienden a presentar diferentes respuestas a las terapias y resultados clínicos variables a pesar de haber sido diagnosticadas en el mismo estadio tumoral. La clasificación

del cáncer de mama involucra la evaluación de criterios histológicos, basados en la morfología y en su análisis inmunohistoquímico. Estos análisis permiten identificar cada subtipo tumoral a partir de la muestra histológica obtenida en la biopsia (Tabla I). Los marcadores analizados de rutina son: el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el índice de proliferación indicado por Ki67 (Merino Bonilla JA, 2017).

Subtipo molecular de tumor de mama				
Luminal A (50%)	Luminal B (15%)		HER2 sobreexpresado (15-30%)	Triple negativo (12-17%)
	HER2-	HER2+		
ER+	ER+	ER+	ER-	ER-
PR+	PR bajo	PR+	PR-	PR-
HER2-	HER2-	HER2+	HER2+	HER2-
Ki67 bajo	Ki67 alto	Ki67 intermedio	Ki67 alto	Ki67 alto

Tabla I: Clasificación molecular de los tumores de mama de acuerdo a los marcadores inmunohistoquímicos analizados en las biopsias. A continuación de cada nombre se indica entre paréntesis la incidencia promedio para cada subtipo tumoral. Adaptado de (Merino Bonilla JA, 2017)

Los subtipos luminales son aquellos que expresan receptores hormonales y se subclasifican, a su vez, según el estado de HER2 y su tasa de proliferación, en luminal A y luminal B. Los tumores luminales A son más frecuentes que los luminales B, pero menos agresivos y responden mejor a la terapia endócrina. Los tumores que sobreexpresan HER2 y no expresan receptores hormonales, suelen asociarse con malos resultados clínicos, pero, asimismo, la sobreexpresión de HER2 predice respuestas terapéuticas positivas a terapias dirigidas anti-HER2 (por ejemplo: trastuzumab). La modalidad de tratamiento para este tipo de tumores consiste en combinaciones de fármacos dirigidos y quimioterapia citotóxica (Rivenbark AG, 2013). El subtipo llamado “triple negativo” (del inglés: *Triple Negative Breast Cáncer*, TNBC) se caracteriza por la ausencia de ER, PR y HER2 (Bianchini G, 2016).

Este tipo de tumores representa del 12-17% de los tumores de mama solamente, pero es el responsable de un alto porcentaje de muertes debido a su agresividad. Se caracteriza por tener un alto grado histológico y altas tasas de proliferación. Suelen presentarse en mujeres jóvenes, poseen un alto riesgo de recurrencia, son extremadamente malignos y metastásicos. Debido a sus características moleculares, las únicas opciones de tratamiento disponible que poseen los pacientes con TNBC son la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia o combinaciones de éstas, ya que no responden a terapias hormonales ni terapias dirigidas a blancos celulares (Merino Bonilla JA, 2017). El estudio de nuevos tratamientos para TNBC está en constante evolución de forma de identificar nuevos blancos terapéuticos. Las investigaciones que se están llevando a cabo actualmente se encuentran con el desafío de que los TNBC presentan una amplia heterogeneidad y plasticidad intratumoral. Además, el microambiente inmunitario en muchos TNBC y la heterogeneidad inmunitaria de diferentes individuos y de diferentes sitios de órganos metastásicos son algunos de los desafíos más abrumadores. Actualmente se están desarrollando diferentes ensayos clínicos como la estratificación de pacientes basada en cambios en el transcriptoma y el epigenoma, así como también la caracterización del microambiente inmunológico, junto con quimioterapia, terapias dirigidas y/o inmunoterapia para optimizar la inmunoterapia de precisión personalizada para pacientes con TNBC (So JY, 2022). Aunque se están incluyendo pacientes en ensayos clínicos para investigar la eficacia de la inmunoterapia en este tipo de tumor, (Bergin ART & Loi S, 2019) sigue siendo una enfermedad con una alta tasa de resistencia al tratamiento y recaída.

1. 2. Microambiente Tumoral

El microambiente tumoral (MAT) se define como una compleja red formada por múltiples tipos celulares, como fibroblastos, leucocitos, células inflamatorias derivadas de la médula ósea, adipocitos y células mioepiteliales y endoteliales. También incluyen componentes como la matriz extracelular (MEC), redes vasculares sanguíneas y linfáticas que irrigan el tumor, factores solubles como citoquinas, hormonas, factores de crecimiento y enzimas, y propiedades físicas como el pH y contenido de oxígeno (Coleman RE, 2013; Spill

F, 2016; Del Prete A, 2017). En la actualidad, se reconoce cada vez más que el MAT juega un papel crítico en la progresión de los tumores en los que se pueden seleccionar variantes tumorales inmuno-resistentes que llevan al crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Alshaker H & Matalka K, 2011) e influye significativamente en la respuesta terapéutica y el resultado clínico (Wu T & Dai Y, 2017). Es muy importante conocer el MAT ya que, mientras las terapias tradicionales como la quimioterapia y la radioterapia se dirigen directamente a la célula tumoral, las células del MAT son genéticamente estables, por lo que representan una diana terapéutica con un menor riesgo de recurrencia y resistencia tumoral (Quail D & Joyce JA, 2013). Actualmente, se han incorporado nuevas opciones, como la amplia gama de inmunoterapias, que apuntan al microambiente y específicamente al sistema inmune tales como los anticuerpos que bloquean la muerte celular programada, anti PD-1 y PD-L1 (del inglés: *Programmed Death 1*, PD-1 *and its Ligands*, PD-L1) (Labani-Motlagh A, 2020).

El MAT mejora la progresión del tumor al reclutar células estromales para proporcionar señales de crecimiento que estimulen la proliferación celular y su capacidad metastásica. También es sabido que los factores solubles derivados del tumor pueden impulsar diversos mecanismos para escapar del ataque inmune en el MAT (Sengupta N, 2010). Se cree que el estroma tumoral promueve la tumorigénesis mediante diferentes estrategias, incluida la remodelación de la matriz extracelular, la supresión de la respuesta inmune y las alteraciones en las vías reguladoras del estroma que afectan la motilidad y la agresividad de las células cancerosas (Cirri P & Chiarugi P, 2012).

La matriz extracelular (MEC) es una red compleja de proteínas que rodea y estabiliza a las células. Se compone de tres tipos principales de proteínas: proteínas estructurales: colágeno y elastina, glicoproteínas: fibronectina y proteoglicanos: sulfato de condroitina. Aunque inicialmente se consideraba como una estructura estable que solo brindaba soporte estructural, los estudios más recientes indican que la MEC es sorprendentemente dinámica y versátil, y representa un papel clave en los procesos celulares como el crecimiento, la proliferación y la migración celular (Roy DM, 2014; Lu P, 2012). La MEC, en los tumores, a menudo está desorganizada y desregulada, lo que promueve el crecimiento tumoral, al evitar, entre otros mecanismos, que las células de la respuesta inmune

experimenten su diferenciación y maduración normal, saboteando así sus esfuerzos por controlar el crecimiento tumoral. El principal componente proteico de la MEC es el colágeno, su integridad juega un papel clave en el desarrollo del cáncer, la degradación del colágeno IV por las proteasas conduce a la invasión de las células cancerosas a través de la membrana basal. El colágeno tipo I es secretado por los fibroblastos infiltrantes de tumor (del inglés: *Cancer Associated Fibroblasts*, CAF) y contribuye a disminuir la absorción de fármacos quimioterapéuticos en tumores, desempeñando un papel significativo en la regulación de la sensibilidad del tumor a agentes quimioterapéuticos. Estos mecanismos demuestran que la MEC alterada no sólo promueve la transformación de células tumorales y la invasión de tejidos, sino que también ayuda a crear un microambiente tumorigénico que facilita aún más la progresión tumoral (Lu P, 2012).

1. 3. Sistema Inmune y Cáncer

A comienzos del siglo XX, Paul Ehrlich postuló que el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar tumores primarios en desarrollo, sin intervención terapéutica externa (Ehrlich P, 1909). En 1950, Burnet y Thomas, plantearon la Teoría de la Inmunovigilancia que postula que una población de linfocitos del sistema inmune reconoce continuamente y elimina células cancerosas y precancerosas. El sistema inmune puede proteger contra el surgimiento de tumores y es capaz de eliminar a aquellos previamente establecidos (Teng MW, 2008). Esta teoría tomó fuerza gracias a que ratones deficientes para diferentes componentes implicados en la respuesta inmune, tanto de la inmunidad innata como adaptativa, eran más propensos a desarrollar ciertos tipos de tumores, como sarcomas o carcinomas (Dunn GP, 2004b). Existe evidencia que sugiere que la inmunovigilancia también ocurre en los seres humanos. Personas con inmunodeficiencias adquiridas, o pacientes transplantados a los que se los mantiene inmunosuprimidos, muestran de 3 a 8 veces más incidencia de cáncer que las personas con un sistema inmune intacto. Por otro lado, los pacientes cuyos tumores presentan altos niveles de infiltrado linfocitario, poseen un mejor pronóstico (Dunn GP, 2004b; Ostrand-Rosenberg S, 2008). Asimismo, evidencia científica ha demostrado que el sistema inmune también puede favorecer la aparición de tumores primarios de inmunogenicidad reducida, los cuales son capaces de escapar al

reconocimiento inmunológico (Bui J & Schreiber RD, 2007). Por lo tanto, el sistema inmune desempeña un rol dual en la respuesta antitumoral, viéndose involucrado tanto en la progresión como en la inmunovigilancia (Jiang X & Shapiro D, 2014). Este efecto dual del sistema inmune ha modificado la Teoría de la Inmunovigilancia, llevando al desarrollo de la Teoría de la “Inmunoedición”, en la cual no sólo se tiene en cuenta el proceso por el cual las células tumorales son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune, sino también se considera el proceso por el cual, muchos tumores logran escapar del control del sistema inmune y continuar con su crecimiento. El proceso de la inmunoedición consta de tres pasos: Eliminación, Equilibrio y Escape, que son conocidos como las tres E de la Inmunoedición Tumoral (Dunn GP, 2004a; Dunn GP, 2004b; Ostrand-Rosenberg S, 2008; Teng MW, 2008). Según esta hipótesis, las variantes tumorales que no son capaces de sobrevivir a la vigilancia inmune del cáncer son eliminadas, mientras otras poblaciones escapan a la vigilancia, se seleccionan a través de la evolución genética y crecen. En la fase de Eliminación, el sistema inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para erradicar el crecimiento de tumores de forma exitosa (Chow M, 2012). Una respuesta inflamatoria aguda desencadenada por la remodelación del estroma y la angiogénesis inicia el reclutamiento de células inmunes innatas (macrófagos, células dendríticas (CD), células asesinas naturales (del inglés: *Natural Killer*, NK) y otras células en el microambiente tumoral. El reconocimiento de las células tumorales da como resultado la producción de citoquinas proinflamatorias, especialmente interleuquina-12 (IL-12) e interferón (IFN)- γ . Estas citoquinas promueven una mayor activación de las células inmunes innatas y la muerte de las células tumorales. También durante esta fase, las CD maduran, procesan antígenos asociados a tumores y migran hacia los ganglios linfáticos que drenan los tumores, donde presentan al antígeno, lo que activa células T CD4⁺ y T CD8⁺ *naive*. Estas células T activadas, específicas de tumor, se expanden y albergan en el microambiente tumoral, facilitando la muerte de las células tumorales. El destino final del tumor puede proceder en dos direcciones: la eliminación completa del tumor o la evolución de las variantes de células tumorales que escapan a la respuesta inmune y establecen tumores medibles. La presión inmune selectiva sobre las células tumorales puede provocar la

acumulación de células tumorales con defectos que las predisponen a escapar de la vigilancia inmune. Estos incluyen la pérdida de la expresión de proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I, otros defectos en las vías de procesamiento y presentación de antígenos, defectos en la señalización y coestimulación del receptor de células T (del inglés: *T Cell Receptor*, TCR), mutación o pérdida de antígenos tumorales, y deficiencias en las vías de señalización de IFN (Emens LA, 2012; Singh R & Paterson Y, 2007). Así, las células tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación entran en la fase de Equilibrio, la cual depende únicamente del sistema inmunológico adaptativo. Durante la fase de equilibrio, la inflamación cambia de aguda a crónica. En esta fase ocurre la continua eliminación de células tumorales acompañada de una persistente emergencia de variantes celulares resistentes. Finalmente, las células tumorales entran en la fase de Escape, después de haber fallado la mayoría de los mecanismos de supresión tumoral. Las células asociadas a tumores recientemente reclutadas (macrófagos, células T reguladoras (Tregs)), células mieloides supresoras (del inglés: *Myeloid Derived Suppressor Cells*, MDSC), linfocitos B activados y fibroblastos asociados a tumores propagan la inflamación crónica y progresión tumoral. Los mecanismos principales que promueven activamente el crecimiento tumoral incluyen la inhibición, a través de las células Treg intratumorales, de las células T específicas de antígeno tumoral, un cambio de una respuesta inmunitaria antitumorigénica T helper tipo 1 (Th1) a una respuesta inmunitaria protumorigénica T helper tipo 2 (Th2), y la producción de factores solubles que inhiben la función de las CD y de las células T, al tiempo que promueven la angiogénesis y la remodelación del estroma, permitiendo así, el crecimiento del tumor (Emens LA, 2012; Denardo DG & Coussens LM, 2007; Coussens LM & Pollard JW, 2011). Además, la regulación positiva de las vías inhibitorias del punto de control inmunitario, como la vía de muerte celular programada (PD-1), llevadas a cabo por las células tumorales y las células inmunes dentro del microambiente tumoral inhibe aún más la activación de las células T específicas de antígeno tumoral (Coussens LM & Pollard JW, 2011; Taube, JM 2012). Finalmente, los tumores adquieren una autonomía completa de la vigilancia inmune, crecen y desarrollan metástasis sin control (Cimino-Mathews A, 2015).

Existe una estrecha relación entre la inflamación y la generación de tumores. En el siglo XIX, Rudolf Virchow fue el primero en postular la relación entre la inflamación y el cáncer al observar infiltración leucocitaria en tumores. La inflamación aguda usualmente lleva a respuestas inmunológicas adaptativas que suelen proteger contra patógenos o el cáncer. Por otro lado, actualmente se sabe que la inflamación crónica es responsable del microambiente favorable para la tumorigénesis (Swann J, 2008). La profundización del conocimiento de cómo funcionan las distintas ramas del sistema inmune innato y adaptativo, de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos inflamatorios sumado al advenimiento de técnicas como la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y la biología molecular, llevaron a una mejor caracterización funcional del infiltrado leucocitario presente en tumores sólidos, permitiendo discernir el complejo diálogo entre sistema inmune y cáncer (Nocera DN, 2013).

Tanto la inmunidad innata como la adaptativa pueden participar en la eliminación del tumor. Sin embargo, el análisis exhaustivo del infiltrado leucocitario en tumores sólidos o en sangre de pacientes, como así también en modelos experimentales de cáncer, mostró que la funcionalidad de las células presentes no siempre corresponde a la esperada para combatir un tumor (Nocera DN, 2013). Esta situación de dualidad con respecto a su función anti- o pro-tumoral en muchas poblaciones del sistema inmunológico, está comandada por las interacciones de las distintas células del sistema inmune con factores secretados por las propias células tumorales y otras células que conviven en el microambiente tumoral. Así, la respuesta inmune innata mediada por macrófagos, granulocitos, mastocitos, CD y células NK y la adaptativa mediada por linfocitos T y B, no sólo pueden desencadenar una respuesta inmune antitumoral efectiva, sino también pueden promover una inflamación crónica, condicionando el escape de la acción del sistema inmune y el desarrollo neoplásico del tejido mamario (De Nardo D & Coussens L, 2007). Además de estas células, el balance entre respuesta inmune antitumoral y la inflamación crónica, está regulado por una compleja red de citoquinas y mediadores solubles, direccionados por quimioquinas y moléculas de adhesión, que actúan a nivel de microambiente del tumor y de los ganglios linfáticos (Nicolini A, 2006).

Varias células involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa, tales como, macrófagos, mastocitos, linfocitos, neutrófilos, células NK y eosinófilos, son componentes estromales del microambiente inflamatorio que influyen en el desarrollo de tumores experimentales y humanos (Galdiero M, 2018). Aunque la mayoría de las publicaciones se han centrado en los linfocitos, en las células NK y en las CD, han surgido nuevos tipos de células que parecen expresar actividad tumoricida, incluidos los eosinófilos. Su potencial citotóxico hacia las células tumorales ha sido reportado en modelos experimentales y en humanos (Munitz A & Levi-Schaffer F, 2004). Los eosinófilos liberan un arsenal inusual de moléculas citotóxicas dependiendo del tipo de estímulo. Sus gránulos contienen proteínas preformadas que se liberan selectivamente tras la activación, y tienen propiedades altamente citotóxicas, interrumpiendo la integridad de la membrana plasmática de las células tumorales (Abu-Ghazaleh R, 1992). También son capaces de producir otros mediadores inflamatorios, incluidos las especies reactivas del oxígeno y los mediadores lipídicos. Además, tienen un papel en la regulación de la respuesta inmune, a través de la presentación de antígenos a las células T y de la producción y liberación de moléculas inmunomoduladoras. Lotfi y col. demostraron que después de la inyección subcutánea de células de melanoma en ratones, se produce una eosinofilia significativa dentro de regiones necróticas y capsulares en comparación con áreas de células tumorales viables y que la infiltración de tejidos por dichos eosinófilos está mediada por factores liberados directamente de los tejidos necróticos tumorales (Lotfi R, 2007).

En varias neoplasias como melanoma, cáncer gástrico, colorrectal, oral y de próstata, los eosinófilos juegan un papel antitumoral, mientras que en otras como el linfoma de Hodgkin y el carcinoma cervical, se han relacionado con un mal pronóstico y, finalmente, en algunos casos, aparentemente son espectadores inocentes. Estos resultados aparentemente contradictorios sugieren que el papel de los eosinófilos y sus mediadores podría depender del tipo de tumor (Varricchi G, 2017).

Uno de los componentes más comunes del estroma tumoral son los fibroblastos activados, conocidos como fibroblastos asociados al tumor (CAF) o miofibroblastos (Östman A & Augsten M, 2009; Folgueira MA, 2013). Los CAF son un subconjunto celular que

expresan alfa actina de músculo liso (del inglés: *α Smooth Muscle Actin*, α SMA), proteína de activación de fibroblastos (del inglés: *Fibroblasts Activation Protein*, FAP), desmina, proteína S100A4 y Thy-1 (Xing F, 2010). Los CAF tienen características distintas, no revierten a un fenotipo normal, no sufren apoptosis como los fibroblastos normales (Hanahan D & Weinberg R, 2011) y generan cambios en la expresión de genes que llevan a la secreción de factores solubles, tales como quimioquinas o los factores de crecimiento, que modulan el estroma tumoral, remodelan la matriz extracelular y, por lo tanto, estimulan la progresión e invasión tumoral, angiogénesis y desarrollo de metástasis (Folgueira MA, 2013; Allen M 2011; Vong S & Kalluri R, 2011; Kharaishvili G, 2014). Orimo y col. demostraron, en un modelo de xenoinjerto de tumor, que en cánceres de mama primarios humanos los CAF exhiben un aumento de la expresión de α -SMA y producen niveles elevados del factor derivado de células estromales 1 (del inglés: *Stromal cell Derived Factor 1*, SDF-1) responsable de reclutar células progenitoras endoteliales (del inglés: *Endotelial Progenitor Cell*, EPC), estimulando la angiogénesis y por lo tanto el crecimiento tumoral (Orimo A, 2005).

Dentro de la población heterogénea de leucocitos que infiltran los tumores, las células CD4⁺, CD8⁺, NK y los macrófagos infiltrantes tumorales juegan un rol vital tanto en la supervivencia como en el crecimiento tumoral. Estudios recientes han demostrado que el reclutamiento, la activación exitosa y la reprogramación de células inmunes y estromales en el espacio extracelular son el resultado de interacciones recíprocas entre las células cancerosas y el MAT (Pottier C, 2015). Además, se ha informado que el desarrollo y la progresión del tumor están influenciados por componentes del MAT y controlados por el sistema inmunitario del huésped (Watnick RS, 2012). Por lo tanto, los componentes del MAT y los biomarcadores del sistema inmune son importantes para la detección del cáncer, las evaluaciones de pronósticos y de respuesta al tratamiento (Pottier C, 2015; Watnick RS, 2012; Angell H & Galon J, 2013).

Un tipo común de linfocitos T en el MAT son las células T CD8⁺ citotóxicas, que pueden contribuir como un valor pronóstico del cáncer, debido a que son capaces de eliminar las células tumorales, a través del reconocimiento de un antígeno específico en las mismas

(Hivroz C, 2012; Klebanoff CA, 2006). Una vez que los linfocitos CD8⁺ reconocen estos antígenos tumorales, pueden eliminar dichas células directamente, o mediante la producción de grandes cantidades de IFN- γ que inducen la muerte mediante mecanismos inhibitorios en el ciclo celular, apoptosis, homeostasis del crecimiento vascular y mediante la inducción de la actividad tumoricida de los macrófagos dependiente de IFN- γ (Dunn GP, 2004b; Ostrand-Rosenberg S, 2008). Hurkmans y col., demostraron que los linfocitos infiltrantes tumorales CD8⁺ elevados eran un biomarcador potencial para predecir una mejor supervivencia libre de progresión (SLP) en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas que recibían Nivolumab (Hurkmans DP, 2020). A su vez, Emens y col. observaron una SLP y supervivencia general más prolongadas en pacientes con cáncer de mama triple negativo que tenían linfocitos CD8⁺ infiltrantes tumorales más altos antes del tratamiento con atezolizumab (Emens LA, 2019).

A su vez, las células T CD4⁺ Th1 liberan IFN- γ e IL-2, respaldando las funciones de las células T CD8⁺ (Wang T, 2004). Por otra parte, otras poblaciones de células T CD4⁺, denominadas Th2, apoyan la respuesta de las células B a través de la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 (Angell H & Galon J, 2013; Lv L, 2011).

Las células T CD4⁺ se pueden diferenciar a Th17 en respuesta al factor de crecimiento transformante beta (del inglés: *Transforming Growth Factor beta*, TGF- β) e IL-6 (Maruyama T, 2010) y producir IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (Lv L, 2011; Klebanoff CA, 2006). Las células Th17 se han visto involucradas en varias enfermedades autoinmunes y síndromes inflamatorios crónicos y exhiben papeles duales en el MAT. Se ha observado que el tratamiento de ratones con anticuerpos anti-TGF- β *in vivo* redujo la expresión de IL-17, suprimiendo la apoptosis tumoral y revirtiendo la función de las células Tregs (Yang L, 2010). También se ha visto un rol dual en el proceso angiogénico, siendo capaces de estimular la angiogénesis y el crecimiento tumoral a través de la secreción de IL-17A, mientras que otras citoquinas secretadas por las células Th17 (IL-17F, IL-21 e IL-22), exhiben propiedades antiangiogénicas. Además, las células Th17 contribuyen a la inflamación crónica promoviendo tanto la transformación como la progresión del tumor, y pueden convertirse en células Tregs, al ser influenciadas por el microambiente, apoyando la inmunosupresión

tumoral (Bailey SR, 2014). Existe evidencia convincente que demuestra que las células Th17 transferidas adoptivamente pueden mediar respuestas antitumorales duraderas en ratones con tumores de gran tamaño (Bailey SR, 2014).

Las células T reguladoras (Tregs), son una subpoblación de las células T helper CD4⁺ y poseen un fenotipo CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺. Normalmente protegen contra las enfermedades autoinmunes al suprimir las células T autorreactivas, sin embargo, en pacientes con diferentes tipos de tumores, se ha reportado un número aumentado de Tregs en el sitio del tumor, siendo capaces de suprimir una amplia gama de células inmunes, incluidas las células T CD8⁺, NK, B y las presentadoras de antígeno en el microambiente, en los nódulos linfáticos drenantes o en circulación (Zamarron B & Chen W, 2011; Allen M, 2011; Jiang X & Shapiro DJ, 2014). Por otro lado, también se ha demostrado que las células Tregs producen grandes cantidades de ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (del inglés: *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*, RANKL), que activan las células de cáncer de mama que expresan RANK y promueven las metástasis (Tan W, 2011). En consecuencia, un alto número de células Tregs está asociado con un peor pronóstico en el cáncer de mama (Bohling SD & Allison KH, 2008; Ohara M, 2009). Se cree que el tumor en sí mismo recluta células Tregs a través de la secreción de prostaglandina E2, así como la señalización de TGF- β , y suprime las funciones de las células efectoras a través de la secreción de IL-10 y TGF- β para crear un microambiente inmunosupresor (Linehan DC & Goedegebuure PS, 2005; Jiang X, 2014). Tanto las células Tregs, como las células mieloides supresoras, producen citoquinas que pueden generar CD8⁺ inmaduras, lo que impide el procesamiento y presentación antigénica, contribuyendo así a los efectos supresores en el MAT (Mantovani A, 2008). Por otro lado, en ciertas neoplasias como linfomas y cáncer colorrectal, se ha observado gran cantidad de células Tregs asociado con un buen pronóstico. Por lo que también las células Treg, presentan un rol dual en el crecimiento o rechazo del tumor (Correale P, 2010).

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular y actúan como mediadores de la comunicación de célula a célula. Son sintetizadas por células inmunes y estromales y están implicadas en la regulación del crecimiento y progresión tumoral. La fuerte asociación entre

la inflamación y el cáncer se refleja en los niveles alterados de citoquinas pro y antiinflamatorias, incluidos TGF- β , IL- 1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, etc., en el MAT donde promueven la tumorigénesis mediante la alteración de las características tumorales tales como la apoptosis, proliferación, metástasis, angiogénesis y metabolismo (Kumari N, 2016; Landskron G, 2014).

El interferón-gamma (IFN- γ) es una molécula pleiotrópica con funciones antiproliferativas, proapoptóticas, antitumorales e inmunomoduladoras. Por lo tanto, juega un papel importante en la coordinación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, así como también en la regulación de la inflamación, apoptosis y ciclo celular (Mendoza JL, 2019; Castro F, 2018). Esta citoquina es secretada predominantemente por linfocitos activados tales como las células CD4 Th1, CD8 T citotóxicos, T $\gamma\delta$, y NK γ , en menor medida, por las células T asesinas naturales (NKT), las células B y las células presentadoras de antígenos (del inglés: *Antigen Presenting Cells*, APC) (Castro F, 2018). Existe numerosa evidencia que demuestra la importancia del IFN- γ en una respuesta antitumoral efectiva. Se ha demostrado que la neutralización de IFN- γ por medio de anticuerpos monoclonales, en animales portadores de tumores, aumenta la velocidad de crecimiento de los mismos en comparación con los ratones de tipo salvaje tratados con anticuerpos de control (Dighe AS, 1994). A su vez, se demostró que los ratones que carecen de un receptor de IFN- γ intacto tienen una mayor incidencia de tumores espontáneos e inducidos por carcinógenos en comparación con los ratones de tipo salvaje de la misma edad (Teng MW, 2008). Por otro lado, varios estudios han demostrado que los inhibidores de las proteínas CTLA-4 y PD-1, así como otras terapias de bloqueo de puntos de control inmunológico, dan como resultado un aumento en la producción de IFN- γ (Chen H, 2009; Dulos J, 2012; Peng W, 2012) que, a su vez, conduce a la eliminación de células tumorales. Los efectos antitumorales de IFN- γ están dados por la regulación de la presentación de antígenos, la promoción de señales inflamatorias y quimiotácticas, activación y polarización de los leucocitos, así como efectos antiproliferativos directos y antiangiogénicos (Burke JD & Young HA , 2019). Por otro lado, en los últimos años se ha visto que el IFN- γ es también capaz de cumplir un rol protumoral. Estudios recientes demostraron que los niveles de IFN- γ en suero y la

expresión tumoral de su receptor (IFN- γ R) fueron más altos en animales en la fase de escape que en los de equilibrio (Giúdice AD, 2020). A su vez, se ha demostrado que el IFN- γ puede inducir la expresión de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: *Major Histocompatibility Complex*, MHC) no clásicas en las células tumorales, permitiéndoles evadir la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (Cho HI, 2011). Otros trabajos mostraron que el IFN- γ es capaz de inducir la apoptosis de células CD4⁺, esenciales para la respuesta antitumoral llevada a cabo por los linfocitos citotóxicos CD8⁺ (Berner V, 2007). Esta función regulatoria explicaría el hecho de que la mayoría de los ensayos clínicos en los que se administra IFN- γ con el fin de provocar una respuesta antitumoral no logre ese resultado. Incluso ciertos ensayos clínicos demuestran que el tratamiento con IFN- γ resulta desfavorable (Meyskens FL, 1995).

La interleuquina 4 (IL-4) es una citoquina pleiotrópica Th2 típica, con actividad inmunosupresora, que induce directamente la proliferación de células tumorales y media la resistencia a la apoptosis, apoyando el crecimiento tumoral (Pagura L, 2010; Li Z, 2008; Prokopchuk O, 2005). Existe evidencia que tumores de mama, ovario y pulmón, presentan un aumento de la expresión de esta interleuquina (Nash MA, 1998; Todaro M, 2007; Todaro M, 2008) y se ha propuesto que la misma promueve el desarrollo tumoral mediante efectos inmunosupresores sobre las células T (Olver S, 2007).

La interleuquina-5 (IL-5) también es una citoquina Th2 producida principalmente por linfocitos y en menor medida por los mastocitos (Wolterink RG, 2012). Actualmente hay poca información de esta interleuquina y su rol en el cáncer, sin embargo, algunos estudios sugieren que tendría un rol pro tumoral y se la asocia con un mal pronóstico ya que se sospecha que promueve la invasión del tumor y el desarrollo de metástasis (Konig A, 2016). Se ha observado que pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas en un estadio avanzado de la enfermedad, presentaban niveles elevados de IL-5 en suero (Pandit R, 2007). A su vez, estudios recientes, han propuesto que la IL-5 es un factor fundamental en la colonización metastásica de los pulmones (Zaynagetdinov R, 2015).

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica con diversas funciones que desempeña un papel central en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria y es producida y secretada por varios tipos de células, incluidas las células tumorales. Se ha observado que esta interleuquina tiene propiedades pro y antiinflamatorias (Kumari N, 2016). Las fuentes primarias de IL-6 en el microambiente tumoral son las células tumorales, así como los macrófagos asociados a tumores (TAM), células T CD4⁺, MDSC y fibroblastos (Bode JG, 1999; Nagasaki T, 2014; Nolen BM, 2008; Oh K, 2013). Se ha observado que fibroblastos del tejido mamario secretan IL-6, que participa en el crecimiento e invasividad de la línea celular MCF-7 (Baumgarten SC & Frasor J, 2012). Sullivan y col. informaron que la sobreexpresión de IL-6 en las células MCF-7 induce la transición epitelio mesénquima y aumenta su capacidad de invasión (Sullivan NJ, 2009). También se ha visto que IL-6 está involucrada en la proliferación, diferenciación y migración de células malignas (Nagasaki T, 2014) y se encuentra en altas concentraciones en suero y en diferentes tejidos tumorales, entre ellos el cáncer de mama (Waldner MJ, 2012; Dethlefsen C, 2013). Además, se ha informado que IL-6 aumenta en una variedad de tumores y contribuye al crecimiento tumoral agresivo y la resistencia al tratamiento con terapias dirigidas. Los pacientes con niveles más altos de IL-6 tienen una supervivencia más corta que aquellos con niveles normales (Ding X, 2018). A su vez, una reducción en el nivel de IL-6 fue visible en los pacientes que respondieron mejor a la terapia (Wu CT, 2013; Chen MF, 2013; Shibayama O, 2014; Guo Y, 2012; Ding X, 2018).

La interleuquina 10 (IL-10) es una de las principales citoquinas Th2 y está comúnmente asociada con la regulación de la respuesta inmune antitumoral. Se ha visto que juega un rol importante en la tolerancia inmunológica, siendo capaz de inhibir la síntesis de citoquinas liberadas por las células T activadas, células NK y macrófagos, además de bloquear la actividad presentadora de antígenos de los macrófagos. Aunque las células Th2 fueron la primera fuente celular identificada de IL-10 (Fiorentino DF, 1989) también se ha demostrado la producción de ésta interleuquina por otras células, tales como células de los linajes mieloide y linfoide (Saraiva M & O'Garra A, 2010; Ouyang W & O'Garra A, 2019), tales como macrófagos, monocitos, CD, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y células NK,

además de las células T CD4 y CD8 y las células B (Moore KW, 2001; Gabryšová L, 2014). Recientemente, el grupo de células productoras de IL-10 se expandió a macrófagos residentes, como microglía (Lobo-Silva D, 2016) y macrófagos cardíacos (Hulsmans M, 2018). Finalmente, las células tumorales también pueden producir IL-10, lo que se ha correlacionado con su capacidad para causar inmunosupresión (Chen Q, 1994; Itakura E, 2011), sugiriendo que es uno de los mecanismos empleados por las células tumorales para evadir el rechazo inmunológico. A su vez, Kaewkangsadon y col. analizaron los ganglios linfáticos axilares (GLA) de mujeres con cáncer de mama y localmente avanzado y encontraron que los GLA metastásicos exhibían niveles más altos de IL-10 que los no metastásicos (Kaewkangsadon V, 2018). Por otra parte, múltiples estudios han encontrado una correlación positiva entre los niveles elevados de IL-10, tanto en suero como en el tumor, y un mal pronóstico. Estos estudios se han realizado sobre diversos tipos de tumores (Chen Q, 1994; Sato T, 1996; Boulland ML, 1998; Boyano M, 2000; Nemunaitis J, 2001; Li C, 2014). Contrariamente a dicha función inmunosupresora, algunos autores han observado que IL-10 podría funcionar como un factor de diferenciación (Pagura L, 2010) y crecimiento hacia la subpoblación de linfocitos CD8⁺, lo que indicaría una función inmunoestimulante de esta interleuquina (Teng MW, 2011).

La interleuquina 12 (IL-12) es una citoquina pleiotrópica y proinflamatoria, cuyas acciones crean una interconexión entre la inmunidad innata y adaptativa (Lasek W, 2014). Esta interleuquina desempeña un papel esencial en la diferenciación de las células CD4⁺ Th1 en la respuesta contra el cáncer, cumpliendo un rol antitumoral y es producida por células dendríticas, macrófagos y células B en respuesta a agentes patógenos (Lu X, 2017; Ma X & Trinchieri G, 2001; O'Shea JJ & Paul W, 2002). La IL-12 estimula la producción de IFN- γ por las células NK y T (Otani T, 1999) y el crecimiento y citotoxicidad de las células NK activadas, células T CD8⁺ y CD4⁺ (Zeh HJ, 1993), cambiando la diferenciación de las células Th0 CD4⁺ hacia el fenotipo Th1 (Trinchieri G, 1992). Sin embargo, otros mecanismos también contribuyen en gran medida a actividades antitumorales, como efectos antiangiogénicos, a través de la inducción de citoquinas antiangiogénicas y producción de quimioquinas (Angiolillo AL, 1996), remodelación de la matriz extracelular peritumoral y

estroma tumoral (Kerkar SP, 2013), reprogramación de MDSC (Kerkar SP, 2011) y cambios en el procesamiento y aumento de la expresión de MHC de clase I (Suzuki S, 1998). Años atrás se han realizado varios estudios utilizando IL-12 murina recombinante y se ha demostrado que esta interleuquina funciona terapéuticamente en una serie de modelos espontáneos e inducidos de metástasis pulmonares, hepáticas y ganglionares (Brunda MJ, 1993; Gately MK, 1994; Mu J, 1995; Nastala CL, 1994; Stern LL, 1994). Brunda y col. observaron que la administración sistémica de IL-12 en animales portadores de melanoma (B16F10), de sarcoma de células reticulares (M5076) y de adenocarcinoma de colon (MC-38) inhibió las metástasis y aumentó la supervivencia (Brunda MJ, 1993; Nastala CL 1994). También se demostró que la resección quirúrgica de un carcinoma ovárico subcutáneo primario, las metástasis inducidas en los ganglios linfáticos y en los pulmones se redujeron notablemente en los ratones tratados con IL-12 en comparación con los controles, demostrando su actividad anti metastásica; estos resultados también se observaron en modelos de metástasis espontáneas (Mu J, 1995). Sin embargo, los estudios clínicos con IL-12, a pesar de las altas expectativas, no arrojaron resultados satisfactorios, ya que su eficacia en dosis toleradas fue limitada y las administraciones sistémicas de IL-12 fueron sumamente tóxicas. (Nguyen KG, 2020). Una posibilidad de la eficacia clínica limitada es el suministro insuficiente de IL-12 al microambiente tumoral en humanos. La IL-12, como la mayoría de las interleuquinas, funciona localmente a través de mecanismos paracrin y autocrinos. La diana ideal de la inmunoterapia con IL-12 no son los linfocitos en circulación, sino las células inmunes intratumorales y los ganglios linfáticos cercanos, incluidas las células T activadas pero agotadas, las células NK, los macrófagos asociados a tumores y las MDSC. Por lo tanto, maximizar la cantidad de IL-12 que llega al tumor parece fundamental para una respuesta antitumoral sólida. (Nguyen KG, 2020). La administración local de IL-12 recombinante es la estrategia más directa y cuantificable para asegurar la precisión y reproducibilidad de una dosis administrada. Sin embargo, las interleuquinas recombinantes se diseminan rápidamente desde los sitios de inyección locales hacia la circulación sistémica (Zaharoff DA, 2007). Por lo tanto, para mantener altos niveles de IL-12 recombinante en el microambiente tumoral mientras se minimiza la exposición sistémica, se están

desarrollando tecnologías de administración sostenida, capaces de liberar localmente proteínas y citoquinas durante períodos prolongados de tiempo después de la inyección directa (Wang L, 2019).

1. 4. Angiogénesis

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y se ha caracterizado como un proceso esencial para la proliferación y viabilidad de las células tumorales (Ramjiawan RR, 2017). El proceso angiogénico se produce cuando el tumor adquiere unos pocos milímetros y comienza a requerir vascularización propia para el ingreso de oxígeno y nutrientes que le permitan seguir proliferando. Las células tumorales secretan altos niveles de factores proangiogénicos que contribuyen a la creación de una red vascular anormal que se caracteriza por vasos sanguíneos desorganizados, inmaduros y permeables (Viallard C & Larrivé B, 2017). Entre los estímulos que desencadenan el proceso angiogénico, la hipoxia es el regulador predominante (Mittal K, 2014). La capacidad de adaptación a la hipoxia por las células malignas es fundamental para el crecimiento tumoral. La genética y los mecanismos biológicos subyacentes a este fenómeno son todavía poco claros, pero muchos estudios sugieren un papel muy importante del factor inducible por hipoxia (del inglés: *Hypoxia-Inducible Factor*, HIF). En condiciones de hipoxia, la subunidad alfa de este factor (HIF-1 α) no es destruida y responde a la baja concentración de oxígeno, actuando como un regulador de la homeostasis y activando la transcripción de un conjunto de genes implicados en la adaptación a la hipoxia, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis como, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), el factor de crecimiento transformante alfa (del inglés: *transforming growth factor alpha*, TGF- α), entre muchos otros implicados en el desarrollo y la agresividad tumoral (Melillo G, 2006). Su expresión está asociada a un aumento del potencial metastásico, que se verifica tanto en estudios animales, como en tumores humanos (Semenza GL, 2000). Además, el aumento de expresión de HIF-1 α está asociado a una supervivencia más corta en el cáncer de mama y útero (Bos R, 2001; Birner P, 2001). Por otro lado, con el fin de aumentar la supervivencia o la regresión de tumores, se realizaron experimentos donde se interrumpió

el suministro vascular mediante el bloqueo de los factores proangiogénicos o a través de la inhibición de la actividad de sus receptores afines con agentes farmacológicos (Ferrara N & Kerbel RS, 2005; Folkman J, 2007; Zhu AX, 2011). Sin embargo, se demostró que la disminución de vasos luego de tratamientos antiangiogénicos aumenta la hipoxia, lo que a su vez promueve la rápida progresión tumoral a través de múltiples mecanismos, entre ellos, aumento de la migración e inflamación (Jain RK, 2005; Jain RK, 2001). Además, los tumores hipóxicos son más resistentes a los tratamientos citotóxicos estándar, incluidos los agentes quimioterapéuticos o la radioterapia (Jain RK, 2009; Wilson WR & Hay MP, 2011). Actualmente se sabe que la dosis adecuada de tratamiento antiangiogénico puede conducir a una normalización de la vasculatura tumoral, al reducir la permeabilidad vascular y la presión del líquido intersticial, y mejorar el flujo sanguíneo y la perfusión tumoral. La vasculatura tumoral normalizada puede reducir la hipoxia tisular, mejorar el ingreso de oxígeno a las células y la administración de agentes citotóxicos, así como también, mejorar la inmunidad antitumoral (Huang Y, 2013; Jain RK. 2005; Jain RK. 2001; Jain RK. 2013). Los estudios preclínicos y clínicos apoyaron la hipótesis de que la terapia antiangiogénica puede normalizar la vasculatura del tumor, al menos de forma transitoria lo que se asoció con una mejor supervivencia en pacientes con tumores de cerebro, mama, colorrectal y pulmón tratados con diferentes agentes citotóxicos (Kabbnavar F, 2003; Heist RS, 2015; Batchelor TT, 2007; Tolaney SM, 2015; Cameron D, 2013).

1. 5. Modelos Animales

La utilización de modelos animales experimentales es esencial para obtener los conocimientos básicos de los mecanismos biológicos subyacentes en enfermedades humanas. Desde hace muchos años, su utilización ha contribuido a la investigación biomédica y ha llevado a descubrimientos importantes, proporcionando información clave sobre la biología de las enfermedades humanas, sus mecanismos moleculares y permitiendo de esta manera el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos (Cox RD & Brown SD, 2003). El uso de modelos experimentales en la investigación biomédica tiene dos funciones importantes: el descubrimiento de los mecanismos biológicos básicos y el desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos, los cuales se han empleado con éxito para

el desarrollo de nuevos conceptos y tratamientos terapéuticos clínicos. Los modelos experimentales son muy útiles porque "simplifican" el estudio de las enfermedades humanas, manteniendo la mayor parte de los factores ambientales constantes y haciendo factible identificar las influencias genéticas (Schughart K, 2013). Además, el desarrollo de modelos animales *in vivo* que recapitulan la historia natural de los cánceres humanos y su respuesta clínica a la terapia constituye un prerrequisito fundamental para su traslación a la clínica (Cekanova M & Rathore K, 2014).

Los ratones y las ratas son los modelos más ampliamente utilizados para el estudio de la carcinogénesis humana debido a la facilidad de su cría, su corto ciclo reproductivo, su fácil manipulación, su conocimiento genómico y, fundamentalmente, a la posibilidad de extrapolar al ser humano, si bien con ciertas limitaciones, los resultados obtenidos gracias a que tanto ratones como humanos poseen aproximadamente la misma estructura de genes y la mayoría de las vías de señalización celular están altamente conservadas entre las dos especies. Usualmente las células tumorales de ratas y ratones suelen tener mutaciones en genes similares a los que se presentan en los tumores humanos, por lo que los mecanismos de control del desarrollo tumoral demuestran equivalencia entre las especies (Irminger-Finger I, 2016; Biegging-Rolett KT, 2016; Sakai H, 2014). Además, en ambas especies puede observarse el desarrollo de tumores espontáneos, así como también pueden inducirse tumores luego de la exposición a determinados carcinógenos químicos (Herrera VL, 2013; Smits B, 2013).

Una ventaja de la utilización del ratón como modelo animal en investigación es que su genoma fue completamente secuenciado y hoy en día se cuenta con recursos informáticos que permiten integrar datos genéticos, genómicos y biológicos del ratón de laboratorio para facilitar el estudio de la salud humana y la enfermedad (Eppig JT, 2015; Schofield PN, 2012; Bult CJ, 2015).

La necesidad de contar con mejores tratamientos para el cáncer humano ha llevado a la utilización de modelos de xenoinjerto que incorporan líneas celulares primarias o genéticamente modificadas, tumores primarios y metastásicos de pacientes, lo que permite

evaluar potenciales tratamientos terapéuticos (Hidalgo M, 2014; Whittle JR, 2015). También se han diseñado modelos de ratones genéticamente modificados, ya sea alterando la expresión de oncogenes, generando mutaciones genéticas específicas, o inactivando genes supresores de tumores (Kerbel RS, 2013; Mou H, 2015) que imitan las alteraciones somáticas observadas en los tumores humanos y la progresión de la enfermedad (Singh M 2012; Hayes SA, 2014). A su vez, la evolución en el conocimiento de la genética del ratón ha facilitado el desarrollo de modelos con mayor complejidad, asemejándose aún más a los tumores humanos (Stiedl P, 2015).

La creación de líneas de ratones susceptibles al desarrollo de tumores mediante cruza selectivas, comenzó hace casi un siglo cuando William Castle y Clarence Cook Little utilizaron líneas endocriadas las cuales mostraban una susceptibilidad aumentada tanto a los tumores espontáneos como a aquellos inducidos por carcinógenos (Franks LM & Knowles MA, 2005).

Los híbridos F1 son la primera generación obtenida de la cruce de dos líneas consanguíneas. Además de ser genéticamente uniformes (isogénicas), serán heterocigotas para todos los loci en los que difieran las líneas parentales. Como consecuencia, los híbridos F1 no pueden ser apareados entre sí (esta cruce generará animales F2, la cual es la segunda generación o segunda filial obtenida de la cruce de dos híbridos F1), sino que deben ser producidos, cada vez que se requiera, por la cruce de las líneas parentales. (Benavides FJ & Guénet JL, 2003).

La cepa de ratones CBI se generó en el Centro de Biología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario mediante cruzamientos en los que participaron animales de las cepas BALB, Rockland, Swiss y NIH y se mantiene en el Instituto de Genética Experimental como una población de cría libre sujeta a un proceso de endocría por limitación del número de individuos. A partir de una población de la cepa CBI, se obtuvieron, a través de un proceso de selección artificial por conformación corporal, cuatro líneas de ratón (CBI⁺, CBI⁻, CBI/C y CBI/L) que difirieron en forma y tamaño corporal. Los animales de la línea CBI⁺ se caracterizan por tener tamaño grande con alta biomasa (alto

peso) distribuida en un esqueleto largo (cola larga) y los animales de la línea CBi⁻, se caracterizan por tener tamaño pequeño, con bajo peso y cola corta. Por otro lado, los animales de la línea CBi/C se caracterizan por tener conformación compacta (alto peso y cola corta) y los de la línea CBi/L por tener conformación longilínea, (bajo peso y cola larga). (Di Masso RJ, 1991). Actualmente dichas líneas, poseen más de 100 generaciones de cría selectiva, tienen un coeficiente teórico de endocría superior a 0,99 y han fijado distintas combinaciones alélicas por los efectos conjuntos de la cría selectiva, la respuesta correlacionada a la selección, los efectos no direccionales de la endocría, la deriva génica, y la aparición de nuevas mutaciones. A su vez presentan diferencias en el crecimiento, desarrollo y composición corporal, propiedades contráctiles del músculo, resistencia a las parasitosis, susceptibilidad a la carcinogénesis espontánea de mama así como la influencia del hospedero en el crecimiento de un adenocarcinoma de mama transplantable. (Hinrichsen L & Di Masso RJ, 2010).

El adenocarcinoma de mama M-406, surgió espontáneamente en el año 1996 en una hembra de la línea CBi y muestra diferente comportamiento en cada una de las líneas derivadas de ésta por selección. Mientras que en la línea CBi el tumor crece en forma exponencial en el 100% de los animales al ser inoculado de forma subcutánea (s.c.) con trócar, en la línea CBi⁻ el tumor muestra un breve crecimiento luego del cual comienza a remitir hasta su eliminación en el 100% de los animales (Zacarías Fluck M, 2007). A su vez, en un ensayo preliminar, se observó que cuando ratones CBi⁻ fueron desafiados por segunda vez con el tumor M-406 (luego de una primera eliminación), volvieron a rechazar el tumor, y lo hicieron más rápido, comparado con lo experimentado tras la primera exposición al antígeno tumoral.

En la línea CBi/L el comportamiento tumoral es más complejo. En el 100% de los animales el tumor comienza a crecer de forma exponencial. Luego de un período de crecimiento, en algunos ratones el tumor comienza a regresar hasta ser eliminado por completo (30%), en otros continúa con el crecimiento exponencial (51,3%) y, en un tercer grupo, el tumor entra en un estado de equilibrio en el cual no se aprecia un crecimiento neto (18,7%). Luego, algunos tumores de este último grupo retoman un crecimiento

exponencial, escapando del equilibrio y tornándose letales, mientras que en otro grupo comienzan a regresar hasta que son eliminados, comportamiento que puede ser asimilado como las tres fases de la Inmunoedición Tumoral (Pagura L, 2014). Por último, los animales CBi/C mostraron un comportamiento similar al descrito para la línea CBi⁻ (100% de toma, 100% de regresión y 0% de letalidad) por lo que puede ser caracterizada como una línea resistente a M-406, mientras que en la línea CBi⁺ el tumor crece hasta alcanzar un volumen máximo y luego regresa hasta hacerse no detectable. En este sentido, CBi⁺ representa una línea apta para el estudio del proceso que lleva al rechazo tardío de tumores transplantables (Zacarías Fluck M, 2007).

1. 6. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Cuando se intenta trasplantar un fragmento de tejido u órgano de un individuo a otro, en general, es rechazado. La aceptación definitiva del injerto por parte del organismo receptor es un fenómeno raro, que se produce sólo en situaciones particulares. Uno de los factores que determina este rechazo o aceptación es el grado de similitud genética entre el donante y el receptor. Es bien sabido que los mecanismos responsables del rechazo son de naturaleza inmunológica; en efecto, los injertos son rechazados más lentamente e incluso aceptados, en aquellos organismos inmunodeficientes, ya sea a través de la inmunidad innata o de la adquirida. Por otro lado, se sabe que un injerto entre diferentes individuos de la misma especie provoca la aparición, en el receptor, de anticuerpos específicos y de células T específicas contra los determinantes antigénicos presentes en el injerto. Los genes que controlan estos procesos han sido llamados genéricamente genes de histocompatibilidad, siendo el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), el de mayor importancia en los trasplantes. Luego de muchos años de trabajo los genetistas han podido identificar un gran número de genes implicados en este fenómeno, localizarlos en los mapas genéticos de varios mamíferos y estudiar el efecto individual de cada uno de esos genes. Finalmente, los biólogos moleculares han clonado y determinado la secuencia de varios de esos genes, con el propósito de comprender su organización, su funcionamiento y, en particular, su regulación y expresión (Benavides FJ & Guénet JL, 2003).

En el ratón, este complejo se denomina “complejo H2”, el cual comprende varios genes agrupados principalmente como genes de clase I, clase II y clase III. Estos genes son, en su mayoría, altamente polimórficos y se sitúan muy cerca unos de otros en un segmento del cromosoma 17 del ratón. Las moléculas de clase II se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos, uniéndose selectivamente a péptidos derivados del procesamiento de antígenos extraños y activando clones de linfocitos T CD4⁺ específicos para el antígeno en cuestión, iniciando la respuesta inmune adaptativa. La identificación de los alelos MHC de clase II es, por lo tanto, extremadamente importante en estudios que involucran presentación de antígeno y trasplante de células/órganos (Benavides FJ & Guénet JL, 2003).

ANTECEDENTES

2. 1. Evaluación del complejo mayor de histocompatibilidad

Debido a las diferencias observadas en el crecimiento del tumor en los diferentes genotipos, fue necesario analizar si las mismas se generaban como consecuencia del rechazo al tejido tumoral inoculado por falta de histocompatibilidad entre las diferentes líneas o como resultado de una respuesta antitumoral eficiente desarrollada en los animales que rechazan el tumor. Para ello se enviaron muestras de ADN genómico provenientes de las diferentes líneas de ratón al laboratorio del Dr. Fernando Benavidez (Centro de Cáncer MD Anderson de la Universidad de Texas, Smithville, Tx, USA), donde se realizó la tipificación del haplotipo H2 por un procedimiento basado en la amplificación genómica del ADN por reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction, PCR*) seguida de RFLP (del inglés: *Restriction Fragment Length Polymorfisms*).

Los resultados (Tabla II) demuestran que las líneas CBI⁻, CBI/L y CBI presentan el mismo haplotipo heterocigota H2^p/H2^j, mientras que las líneas CBI⁺ y CBI/C presentan el haplotipo heterocigota H2^b/H2^j. Teniendo en cuenta la respuesta antagónica de CBI y CBI⁻ frente al desafío tumoral, estos resultados apoyan la hipótesis de que la resistencia a M-406 mostrada por la línea CBI⁻ es el resultado de una fuerte respuesta inmune antitumoral que deriva en el rechazo del mismo (Capitani MC, 2020).

Marcador	Posición (Mb)	CBi	CBi ⁻	CBi/L	CBi/C	CBi+
D17Mit143	8.4 UNK1	BALB-L	UNK1	BALB-L	BALB-L	BALB-L
D17Mit113	11.9	UNK1	UNK1	UNK2	UNK2	UNK1
D17Mit261	15.8	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit197	20.1	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit133	24.8	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit26	25.3	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit46	25.3	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit100	26.1	BALB-L	BALB-L	BALB-L	BALB-L	BALB-L
D17Mit62	17.98 cM	B6-L	B6-L	BALB-L	B6-L	B6-L
H2 PCR	Haplotipo	p/j	p/j	p/j	B	b/j
D17Mit83	34.9	UNK1	UNK1	UNK1	B6-L	B6-L
D17Mit24	37.4	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit234	39.0	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L	B6-L
D17Mit65	47.5	BALB-L	BALB-L	UNK1	B6-L	UNK2

Tabla II: Posición de los loci H2 en el cromosoma 17

2.2. Análisis mendeliano de la resistencia/susceptibilidad a un tumor trasplantable de mama en un modelo murino

Debido a los resultados anteriormente descritos, y con el fin de caracterizar el patrón de herencia de la resistencia/susceptibilidad al adenocarcinoma de mama M-406, y mediante un enfoque mendeliano clásico, se realizaron cruzamientos recíprocos entre las líneas endocriadas de ratón, CBi y CBi⁻, generándose la filial 1 (F1) y a partir de ella la filial 2 (F2). Para ello, se usaron machos y hembras de ambos híbridos recíprocos (F1A y F1B), lo que permitió disponer de las cuatro combinaciones posibles entre ambas F1: F2A, F2B, F2C y F2D.

El tumor presentó 100% de toma en todas las combinaciones F1 y F2. En la F1 creció exponencialmente en todos los animales hasta alcanzar el tamaño máximo permitido por las normas éticas, momento en que se los sacrificó. Es decir, los híbridos recíprocos F1 se comportaron ambos como CBi (toma 100%, letalidad 100%), poniendo de manifiesto ausencia de efectos maternos. Con respecto a la F2, el tumor creció exponencialmente en el 75% de los animales y regresó espontáneamente en el 25% restante hasta su eliminación total. La segregación mostrada en la F2 fue compatible con el carácter autosómico dominante de la susceptibilidad al tumor observado en la F1. El análisis del tiempo de duplicación tumoral en las distintas combinaciones F2, se tradujo en una mayor velocidad de crecimiento del tumor, en aquella con doble dosis genética CBi (susceptible) de origen materno, F2D, y una menor velocidad de crecimiento tumoral en aquella con doble dosis materna CBi⁻ (resistente), F2A, respuesta no evidenciada en las dos combinaciones F2 restantes (F2B y F2C). Esta respuesta diferencial sólo fue observada en hembras, lo que permite suponer la existencia de fenómenos epigenéticos vinculados con el sexo del portador del tumor (Cáceres JM, 2015).

2.3. Inmunosupresión de ratones CBi⁻ desafiados con un adenocarcinoma de mama

Considerando que el sistema inmune juega un rol fundamental en la defensa del organismo frente a los tumores, y la inmunosupresión reduce la activación o la eficacia del sistema inmunológico, se evaluó el crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en animales CBi⁻ inmunosuprimidos con ciclosporina A (CicloA) y dexametasona (Dexa). La

CicloA y la Dexa son fármacos que poseen efectos inmunosupresores que actúan sobre la respuesta inmune humoral y mediada por células.

Para ello, animales C_{Bi}-N (normales) se inmunosuprimieron con CicloA (C_{Bi}-CicloA), o con Dexa (C_{Bi}-Dexa) durante 7 días. Pasado este tiempo, animales C_{Bi}-N, C_{Bi}-CicloA, y C_{Bi}-Dexa fueron inoculados con M-406 por vía s.c. (Día 0). Se evaluó la evolución del volumen tumoral durante el experimento y se observó que en el día 14 post inoculación tumoral, los animales C_{Bi}-N, C_{Bi}-CicloA y C_{Bi}-Dexa se diferenciaron significativamente en el volumen tumoral. El porcentaje de regresión tumoral en el día 21 en C_{Bi}-Dexa, fue de 0%, de 40% en el grupo C_{Bi}-CicloA y del 100% en C_{Bi}-N.

Estos resultados permitieron concluir que la inmunosupresión con dexametasona permite el crecimiento de M-406 en los animales C_{Bi}, sugiriendo que el sistema inmune del huésped participa de manera activa, desarrollando una respuesta inmune efectiva que logra la regresión espontánea y, finalmente, la completa eliminación del tumor en los animales de dicho genotipo (Crocco ML, 2013).

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta inmune antitumoral y el microambiente tumoral en las líneas parentales endocriadas de ratones CBI susceptible y CBI^r resistente, y de la F1 derivada de los cruzamientos recíprocos de dichas líneas parentales, inoculadas con el adenocarcinoma de mama triple negativo M-406.

3.2. Objetivos específicos

En las líneas parentales CBI y CBI^r

1. Corroborar el crecimiento y escape y/o eliminación del adenocarcinoma de mama M-406
2. Durante la evolución del crecimiento y escape y/o eliminación tumoral
 - a) Cuantificar en muestras de sangre las citoquinas IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12 y los linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Treg y Th17 circulantes
 - b) Cuantificar en muestras de tumores los linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Treg y Th17
 - c) Caracterizar histológicamente el microambiente tumoral
 - d) Determinar la presencia de células HIF1 α ⁺.
 - e) Cuantificar la presencia y actividad de fibroblastos asociados al tumor mediante la expresión de la proteína α -SMA.
 - f) Determinar el colágeno de la matriz extracelular.
3. Determinar la presencia o ausencia de metástasis pulmonares

En la Filial 1

4. Corroborar el comportamiento del adenocarcinoma de mama M-406
5. Cuantificar los linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Treg y Th17, tanto circulantes como en muestras de tumores, durante la evolución del crecimiento tumoral.
6. En la fase de escape
 - a) Determinar la presencia de células HIF1 α ⁺.

- b) Cuantificar la presencia y actividad de fibroblastos asociados al tumor mediante la expresión de la proteína α -SMA.
 - c) Determinar el colágeno de la matriz extracelular.
7. Determinar la presencia o ausencia de metástasis pulmonares

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se utilizaron ratones adultos hembras de las líneas endocriadas CBi y CBi⁻ pertenecientes al Bioterio del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR, y los híbridos hembras F1A y F1B derivadas de los cruzamientos recíprocos entre ambas líneas parentales.

Los animales fueron provistos de alimento balanceado comercial y agua *ad libitum* y se los mantuvo en ciclos de luz/oscuridad de 12h y a temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Los experimentos se llevaron a cabo durante la primera mitad del ciclo de luz.

Todos los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos éticos institucionales que acuerdan con los del Comité de Bioética y del Sub-comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

Generación de los híbridos F1: Se realizaron los siguientes cruzamientos recíprocos:

- F1A: ♀ CBi (n=10) x ♂ CBi⁻ (n=10)
- F1B: ♀ CBi⁻ (n=10) x ♂ CBi (n=10)

4.2. Tumor

Adenocarcinoma M-406: es un adenocarcinoma de mama semi-diferenciado del tipo B (Squartini & Pingitore, 1994) y triple negativo (negativo para los receptores de estrógenos (ER), progesterona (EP) y receptor 2 del factor de crecimiento de tipo epidérmico humano (Her2/neu) (Rico MJ, 2012).

Este tumor surgió espontáneamente en 1996, en una hembra de la línea CBi y se mantiene desde entonces, *in vivo*, por injertos intraperitoneales (i.p.) en su huésped singeneico, cada 14 días. Cuando el tumor se inocular por vía subcutánea (s.c.) en la línea de origen, la incidencia tumoral y letalidad es del 100% (100% de toma y 0% de regresión).

4.3. Modelo experimental

Ratones adultos hembras CBi, CBi⁻, F1A y F1B fueron desafiados por vía s.c. en el flanco derecho, utilizando trócar, con un inóculo de aproximadamente 1 mm³ del adenocarcinoma M-406. Durante el experimento se evaluó el crecimiento del tumor (midiendo tres veces por semana con calibre Vernier el diámetro tumoral mayor y menor) y se calculó el volumen tumoral mediante la siguiente fórmula: $VT = (D \text{ menor}^2 \times D \text{ mayor} \times 0,4)$ y los animales pertenecientes a los distintos genotipos se distribuyeron en 5 grupos de acuerdo a los materiales a extraer y a las determinaciones a realizar:

- Grupo 1: (n=6/genotipo). En las hembras CBi, F1A y F1B se evaluó el crecimiento tumoral hasta que el tumor llegó al máximo tamaño tumoral éticamente permitido. Los animales fueron sacrificados por sobreexposición a CO₂. Se extrajeron muestras de tumor, las cuales fueron fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en parafina. Seguidamente se realizaron cortes con micrótomo de 5-7µm de espesor para realizar los análisis inmunohistoquímicos correspondientes. También, se extirparon los pulmones para el análisis y cuantificación de metástasis.
- Grupo 2: En hembras CBi, CBi⁻, F1A y F1B (n=6) se evaluó el crecimiento tumoral hasta que el tumor alcanzó la fase de Escape o cuando el tumor estaba en la fase de Eliminación. Durante el experimento se extrajeron muestras de sangre de la vena mandibular: en el estado Basal (previo al desafío del tumor), en la fase de Crecimiento y en la fase de Escape o Eliminación (post- desafío tumoral) para determinar los linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Tregs y Th17 circulantes por citometría de flujo.
- Grupo 3: Se tomaron muestras de tumor de CBi, CBi⁻, F1A y F1B (n=5-6) en la fase de Crecimiento y de Escape o Eliminación y se realizó una suspensión celular por disgregación mecánica, para determinar los linfocitos CD4⁺, CD8⁺, Tregs y Th17 intratumorales por citometría de flujo.
- Grupo 4: (n=6-8) Cuando los animales estaban en la fase de Crecimiento o cuando alcanzaron la fase de Escape, en la línea CBi, o Eliminación en CBi⁻, los mismos fueron anestesiados y se extrajeron muestras de sangre, se separó el suero y se congeló a -20°C hasta su utilización. Posteriormente, los animales se sacrificaron por

sobreexposición a CO₂ y se extrajeron muestras de tumor, las que fueron fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en parafina, para determinar HIF1- α , CAF y fibras de colágeno (Fig. 2).

- Grupo 5: (n=5-6/ genotipo). Se tomaron muestras de tumor, en los días 3, 5, 7, 10 y 14 en la línea CBi, y en los días 3, 5, 7, 10 y 12 en CBi⁻ y fueron fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en parafina, para realizar los análisis histológicos.

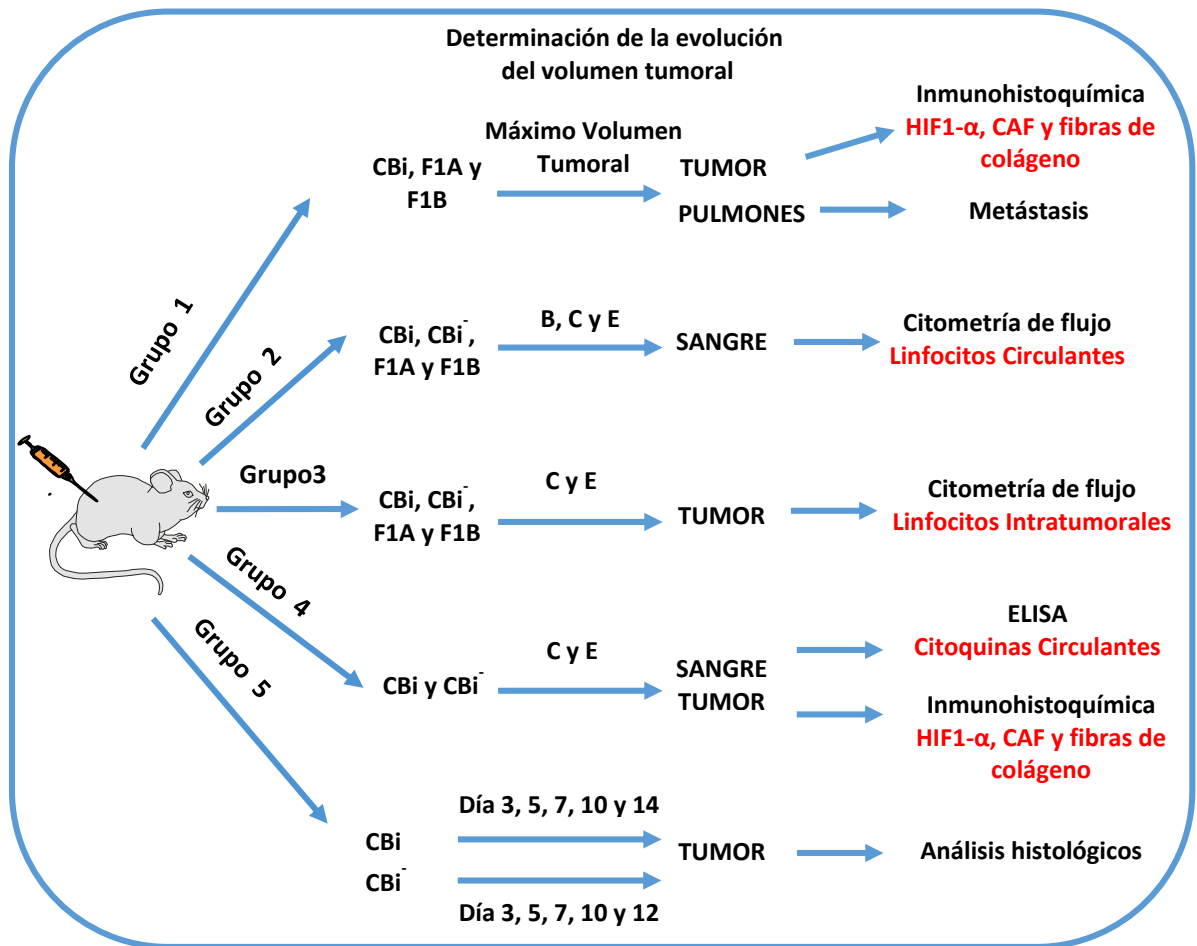


Figura N°2: Modelo experimental

B: Condición Basal, **C:** Fase de crecimiento en los animales CBI, F1 y CBI⁻ y **E:** Fase de Escape en los animales CBI y F1 y de Eliminación en los animales CBI⁻

4. 4. Cuantificación de linfocitos por citometría de flujo

La evaluación del porcentaje de células CD4⁺, CD8⁺, Treg y Th17 circulantes e infiltrantes de tumor se realizó de la siguiente manera:

- a) Linfocitos circulantes (Grupo 2): Se obtuvieron muestras de sangre (100µL x animal, anticoaguladas con EDTA) en condiciones Basales, en fase de Crecimiento y en fase de Escape (C_{Bi} y F1) o Eliminación (C_{Bi}⁻). Luego se lisaron los glóbulos rojos, utilizando cloruro de amonio como buffer de lisis, durante 30 min en estufa a 37°C.
- b) Linfocitos intratumorales (Grupo 3): Las muestras de tumores obtenidos en fase de Crecimiento y en fase de Escape o Eliminación fueron disgregadas mecánicamente, filtradas, posteriormente centrifugadas y lavadas con PBS.

Luego, ambas muestras fueron tratadas de la siguiente forma:

- Se lavaron con PBS y se agregó el anticuerpo anti-CD8-[FITC] (BD Pharmingen), en una dilución 1:400, utilizando PBS como buffer de dilución, para detectar los linfocitos CD8⁺. Las muestras se incubaron 30 min en la oscuridad.
- Posteriormente, se fijaron las células y se permeabilizaron, incubando en el buffer correspondiente (BD Pharmingen) durante 30 min a 4°C y 37°C, respectivamente. Entre la fijación y la permeabilización las muestras fueron centrifugadas y lavadas con PBS.
- Luego, se realizó otro lavado con PBS y se agregó a cada muestra una mezcla conteniendo los anticuerpos correspondientes conjugados a diferentes fluorocromos para la detección de los linfocitos CD4⁺ (anti-CD4-[PerCP-Cy5.5], dilución 1:400); Th17 (Th17: anti-IL-17-[PE], dilución 1:400) y Treg (anti-Foxp3-[Alexa Flúor 647], dilución 1:300) (BD Pharmingen). Se utilizó PBS como buffer de dilución y las muestras se incubaron 30 min en la oscuridad.
- Paralelamente se llevó a cabo un control negativo (sin anticuerpo) y un control positivo (muestras de ganglio).
- Las muestras fueron lavadas para eliminar el exceso de anticuerpo y se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta el momento de la determinación.

Finalmente, se procedió a cuantificar en el citómetro BD FACS Aria II. Los datos se analizaron con el software Flowing (Turku Centre for Biotechnology).

4. 5. Cuantificación de citoquinas circulantes por ELISA

Animales del Grupo 4 fueron anestesiados con ketamina y xilacina (Dosis: Ketamina/Xilacina 150/15 mg/Kg de peso) y se extrajeron muestras de sangre, por punción cardíaca. Luego de la retracción del coágulo por incubación a 37°C, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 10 minutos, se separó el suero en tubos Eppendorf y se congeló a -20°C. En las muestras de suero obtenidas, se evaluaron los niveles de diferentes citoquinas: IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12 mediante la técnica de ELISA. Para ello se utilizó un kit comercial (BD OptEIA™, BD Biosciences) y se llevó a cabo según el protocolo establecido por el fabricante.

4. 6. Análisis histológicos e inmunohistoquímicos

4. 6. 1. Hematoxilina-eosina

Los cortes histológicos obtenidos de las muestras de tumor de animales del Grupo 5 se trataron según el siguiente protocolo:

- Se desparafinaron, utilizando xileno y concentraciones decrecientes de alcohol.
- Se lavaron dos veces con H₂O_d.
- Fueron teñidos con hematoxilina de 3-5 min.
- Se realizaron lavados con H₂O_d.
- Se tiñeron con eosina durante 2 min.
- Se lavaron con agua corriente.
- Se deshidrataron y fijaron en alcoholes de concentraciones crecientes.

4. 6. 2. Tinción Picro-Sirius Red

- Las muestras de tumor obtenidas de los Grupos 1 y 4, se desparafinaron, utilizando xileno y concentraciones decrecientes de alcohol.

- Se tiñeron con Rojo Sirius F3B (Sigma-Aldrich, USA) en solución acuosa saturada de ácido pícrico (Cicarelli, Argentina) por 60 min.
- Se lavaron con H₂O_d.
- Se expusieron a una solución saturada de ácido pícrico por 30 min.
- Se lavaron con H₂O_d.
- Se deshidrataron y montaron.

Con el uso de una cámara digital acoplada al microscopio óptico, se tomaron fotos en un total de 30 campos (cada foto corresponde a un campo) representativas de todo el tejido, para cada una de las muestras, en una magnificación 40X. Se calculó sobre cada foto la cantidad de píxeles de color rojo utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ y Adobe Photoshop 2019. Con estos datos, se calculó, para cada muestra, el porcentaje del área total cubierta por colágeno por campo.

4. 6. 3. Inmunohistoquímica

Con las muestras del tumor obtenidas de los Grupos 1 y 4 se realizó el siguiente protocolo:

- Se desparafinaron pasándolas por xileno y luego por etanol en concentraciones decrecientes.
- Se llevó a cabo la recuperación antigénica con citrato de sodio (10 mM, pH 6) a 95°C durante 30 min.
- Una vez atemperadas, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrogeno al 3% en H₂O_d durante 15 min.
- Se lavaron las muestras y se bloquearon las reacciones no específicas con suero normal de caballo (Vectastain, USA).
- En los sucesivos lavados realizados durante el protocolo se utilizó H₂O_d o buffer Tris (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7,6) según correspondiera.

Para la determinación de la presencia de CAF, los cortes fueron incubados durante toda la noche (ON) a 4°C con anticuerpo primario monoclonal anti- α -SMA (Abcam, USA) en una dilución 1:300 en buffer Tris. Luego de dos lavados en Tris durante 5 minutos, se

adicionó el anticuerpo secundario biotinilado (Vectastain, USA) dilución 1:50, utilizando Tris y suero normal de caballo. Después de 1 h de incubación se procedió al lavado correspondiente y se incubó con el kit Elite ABC (Vectastain, Vector Laboratories, USA) por 30 min. El revelado se realizó con el reactivo DAB Substrate Kit (BD Pharmigen, España) hasta aparición de color beige. Luego del lavado con H_2O_d , se realizó una contratinción con hematoxilina. Finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron con bálsamo para su observación al microscopio. Para cada muestra se tomaron fotografías en 20 campos microscópicos con una magnificación 40X y se evaluó el porcentaje de área cubierta por células α -SMA⁺. Las imágenes fueron cuantificadas con el programa ImageJ.

Para la determinación de células HIF1 α ⁺, al tratarse de un factor de transcripción nuclear, previo a la recuperación antigénica, se realizó la permeabilización del tejido con una solución de 0,2% Tritón-X100 en PBS durante 10 min. Luego se lavó con H_2O_d durante 5 min y se procedió de la forma descripta anteriormente. El anticuerpo primario utilizado fue: anti-HIF1 α (Invitrogen, USA) 1:5000. Finalmente, se determinó el número de células HIF1 α ⁺ en 30 campos microscópicos con una magnificación 100X, y se calculó el número de células positivas por campo.

4. 7. Evaluación y cuantificación de metástasis pulmonares

Una vez extraídos los pulmones de los animales CBi y F1 (Grupo 1), los mismos se fijaron en una solución de BOUIN para evaluar la presencia de metástasis espontáneas. La cuantificación se realizó de forma macroscópica.

4. 8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 7. Las comparaciones que involucraron dos grupos se llevaron a cabo con la prueba t de Student para datos independientes o con la prueba U de Mann-Whitney, según si las variables involucradas cumplían o no con el supuesto de normalidad, respectivamente. Las comparaciones que involucraron más de dos grupos se llevaron a cabo con un análisis de la variancia paramétrico (ANOVA) o no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) según

corresponda, seguidos de las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey o de Dunns, respectivamente. Se consideraron significativas las diferencias cuando $P < 0,05$.

Los datos longitudinales de volumen tumoral (mm^3) y tiempo (días transcurridos a partir del desafío tumoral) se ajustaron con un modelo exponencial creciente $V_t = Y_0 \cdot e^{\lambda(kt)}$ y se analizaron diferentes parámetros de dicha ecuación:

- Y_0 , es el valor de Y cuando X (tiempo) es cero, y se expresa en las mismas unidades que Y,

- **Tiempo de latencia**, corresponde al tiempo que tarda el tumor en empezar a crecer y se calcula como $1 / Y_0$,

- **K**, representa la constante de velocidad, expresada en recíproco de las unidades de tiempo del eje X, y

- **Tiempo medio de duplicación tumoral**, expresado en las unidades de tiempo del eje X; se calcula como $\ln(2) / K$.

RESULTADOS

5.1. Caracterización del crecimiento tumoral en CBi y CBi⁻

El tumor se comportó de manera similar a lo observado en estudios previos, creció en forma exponencial en hembras de la línea CBi hasta alcanzar la fase de Escape (Fig. 3a) y comenzó a crecer en la línea CBi⁻ hasta alcanzar un pico máximo de crecimiento tumoral (aproximadamente al día 7-8 post-desafío tumoral), momento en el cual comienza a ser rechazado hasta llegar a su fase de Eliminación (Fig. 3b).

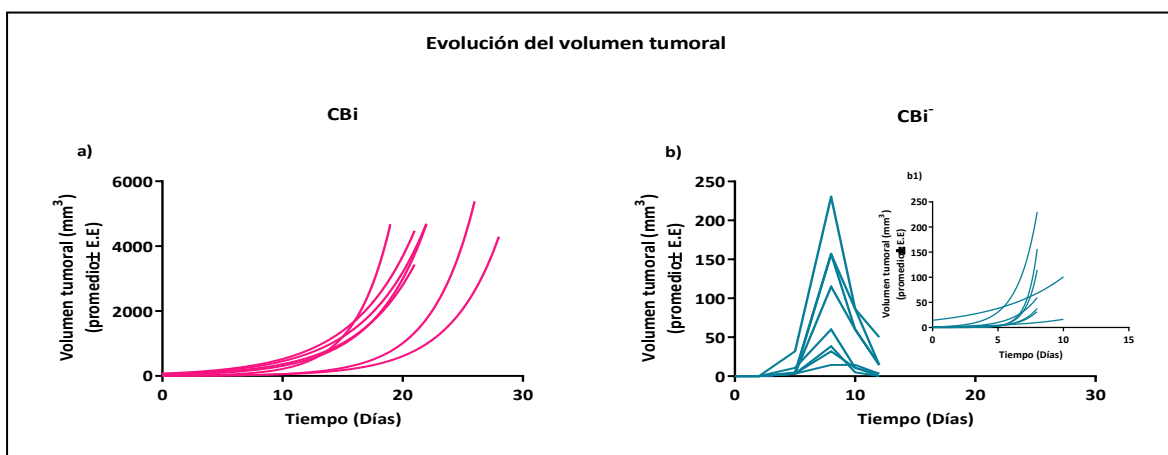


Figura N°3. Evolución del volumen tumoral en las líneas antagónicas CBi y CBi⁻

Evolución del volumen tumoral: a) CBi hembras, gráfica ajustada a una ecuación de crecimiento exponencial, b) CBi⁻ hembras, b1) CBi⁻ hembras, gráfica ajustada a una ecuación de crecimiento exponencial

Con el fin de evaluar posibles diferencias en los períodos en los que el tumor crece en ambos genotipos, se realizó la curva de crecimiento exponencial en el genotipo CBi⁻ en su fase de crecimiento (Fig. 4b1) y se compararon los diferentes parámetros de la ecuación de crecimiento exponencial: $1/Y_0$ o tiempo de latencia, K que representa la constante de velocidad, y el tiempo medio de duplicación tumoral, con los de la línea CBi. Se pudo observar (Fig. 4), que en la línea CBi⁻, en el periodo en el que el tumor crece, presenta mayor tiempo de latencia ($P < 0,01$) [$6,56 \pm 3,64$] (media \pm EE) (Fig. 4a), mayor valor de la constante de velocidad ($P < 0,05$) [$0,73 \pm 0,14$] (Fig. 4b) y menor tiempo medio de duplicación tumoral ($P < 0,0001$) [$0,86 \pm 0,10$] comparado con CBi: tiempo de latencia: [$0,10 \pm 0,04$]; constante de velocidad: [$0,24 \pm 0,02$]; tiempo medio de duplicación [$2,99 \pm 0,22$] (Fig. 4c).

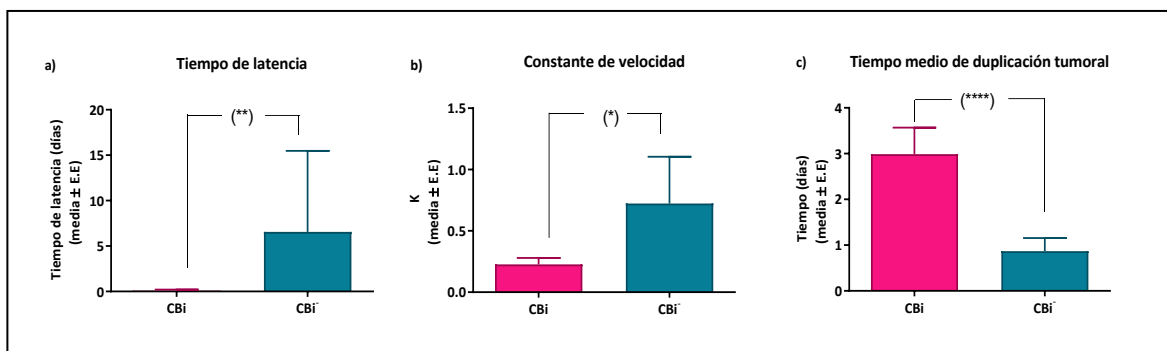


Figura N°4. Comparación de los parámetros de la curva de crecimiento en las líneas antagónicas CBi y CBi⁻

a) Tiempo de latencia $1/Y_0$, **b)** Constante de velocidad k , **c)** Tiempo medio de duplicación tumoral. (Test t de Student). En todas las determinaciones se utilizaron los valores de CBi cuando alcanzaron el pico máximo de crecimiento tumoral, antes que comience a rechazar el tumor. Los datos se expresan como media y error estándar

5.2. Análisis histo-morfológico del adenocarcinoma de mama M-406

Con el fin de evaluar y comparar las características del microambiente tumoral, así como también identificar, parte de las diferentes poblaciones celulares infiltrantes del tumor, se llevó a cabo una observación microscópica del tejido tumoral proveniente de los animales de ambas líneas, CBi y CBi⁻, teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E).

5.2.1. Propiedades histológicas del microambiente del tumor durante su crecimiento en la línea CBi

Entre los días 3 y 5 (Fig. 5a, b y c), se observó una masa tumoral en expansión con numerosas figuras mitóticas, rodeada de un gran repertorio de poblaciones celulares de tipo inflamatorio constituidas, principalmente, por granulocitos polimorfonucleares neutrófilos que infiltran el estroma circundante, con escasos eosinófilos, algunos mastocitos y aislados macrófagos. Además, se reconoció abundantes fibroblastos y capilares sanguíneos hiperémicos, de localización extratumoral. Hacia el día 5, se observó un crecimiento de la masa tumoral persistente, destacándose la presencia de un infiltrado inflamatorio constituido fundamentalmente por macrófagos, linfocitos, entremezclados con fibroblastos, miofibroblastos y mayor densidad de matriz extracelular (MEC) con fibras de colágeno.

En el día 7 (Fig. 5d), continuó el crecimiento tumoral en coincidencia con un marcado aumento de las figuras mitóticas. Las masas carcinomatosas se hallaron rodeadas casi exclusivamente por linfocitos, con disminución de las células descritas en los días 3 a 5. Por otro lado, se registró un predominio fibroblastos y fibras de colágeno.

Ya en el día 10 (Fig. 5e), fue difícil apreciar el infiltrado inflamatorio de granulocitos polimorfonucleares, reconociéndose aislados mastocitos extratumorales. Existieron mayor cantidad de capilares congestivos, acompañados por mayor depósito de fibras de colágeno.

En el día 14 (Fig. 5f), se observó necrosis y hemorragia en la zona central del tumor, con nidos carcinomatosos viables periféricos, circundados por linfocitos distribuidos a manera de banda peritumoral.

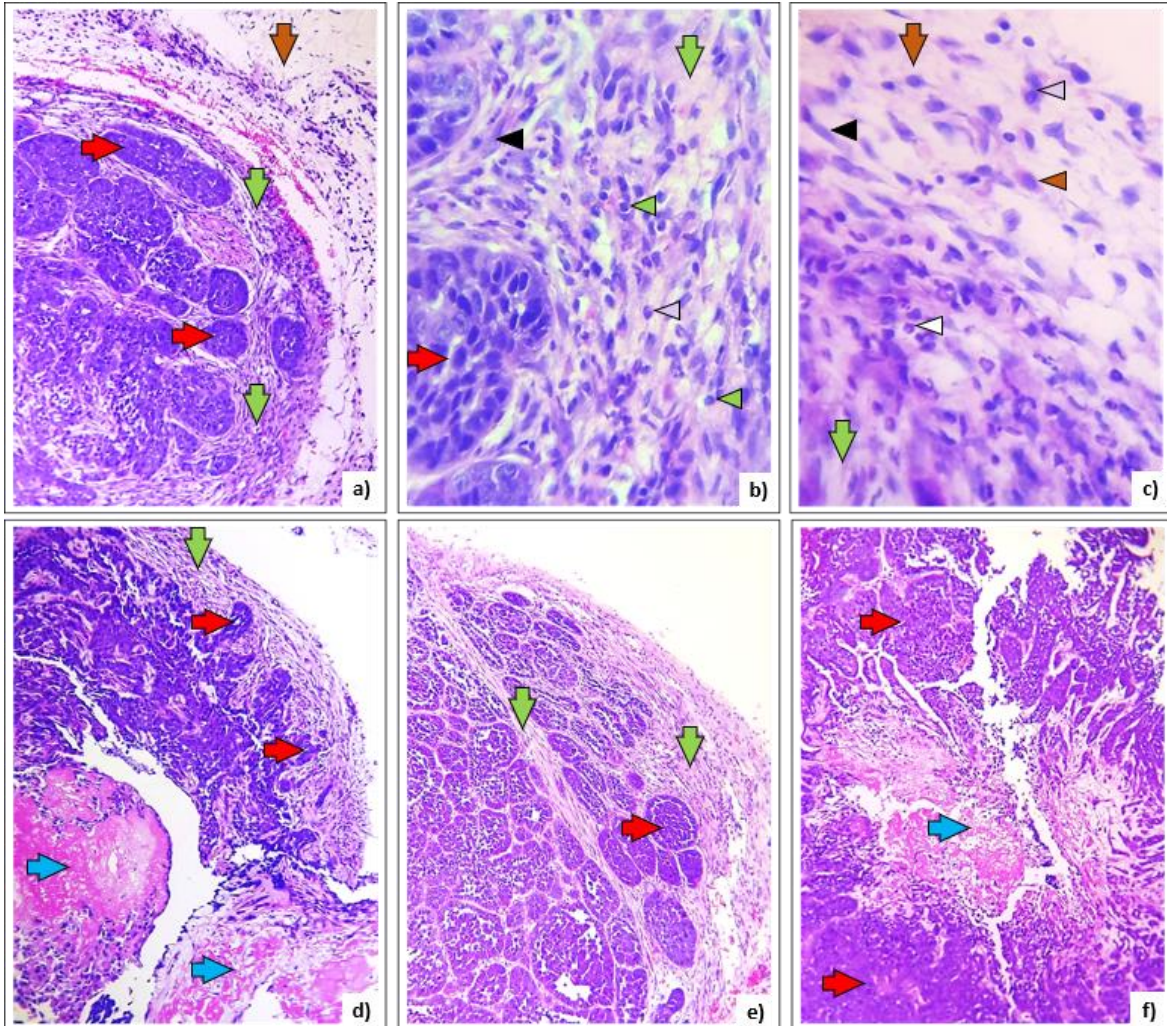


Figura N°5. Microfotografías del crecimiento tumoral y fase de escape inmunológico en la línea CBi

Fechas rojas: nidos tumorales periféricos. Flechas verdes: reacción desmoplásica estromal e inflamatoria intra y peritumoral. Flechas marrones: infiltrado inflamatorio circundante. Flechas turquesas: necrosis. Día 3 a 5: a) Nidos periféricos de células tumorales, circundados por reacción estromal con incremento de las fibras de colágeno tanto a nivel peritumoral cercano, como en los tejidos vecinos. 10x. b) Aquí se observa magnificación de nido tumoral de células con atipia, rodeado por un estroma desmoplásico peri-tumoral e infiltrado de macrófagos (Punta Flecha Violeta), y gran repertorio de linfocitos (Punta Flecha Verde) y fibroblastos (Punta Flecha Negra). 40x. c) En la región extratumoral se evidencia la presencia de macrófagos, fibroblastos y mastocitos (Punta Flecha Marrón). A nivel peri-tumoral se registra numerosa cantidad de polimorfonucleares (Punta Flecha Blanca). 40x. Día 7: d) Aquí se puede ver un marcado desarrollo del tejido tumoral con bordes infiltrantes, desmoplasia y regiones centrales necróticas (Flecha Turquesa). 10x. Día 10: e) En esta figura se puede observar una región periférica de la masa tumoral con notoria evolución, caracterizada por numerosos nidos tumorales en sostenido avance e infiltración de márgenes sanos. Además, se evidencia importante desmoplasia que tabica y rodea el tejido viable tumoral, con infiltrado de linfocitos. 10x. Día 14: f) Se evidencia el tumor en expansión cuyos bordes periféricos de forma radial, infiltran tejido adyacente. Se observa un centro con necrosis de tipo isquémica que progresa conforme se desarrolla la masa periférica tumoral. 10x.

5.2.2. Propiedades histológicas del microambiente tumoral durante el crecimiento y rechazo tumoral en la línea CBi

Entre los días 3 y 5 (Fig. 6b y c), cuando el tumor está en la etapa de crecimiento, se observó que el MAT presentaba una variada distribución y número de componentes celulares de tipo inflamatorio, identificándose bajo la formación de pequeños cúmulos celulares. Entre estas poblaciones se destacan: polimorfonucleares eosinófilos peri e intratumorales y mastocitos, que al igual de lo que sucede con los eosinófilos, se organizan en pequeños cúmulos dispersos en el estroma circundante. Además, se observaron células compatibles con macrófagos. Estas se encontraron en cercanías a las formaciones nodulares y en pequeñas regiones necróticas con presencia de restos celulares o fragmentación nuclear, similar a cuerpos apoptóticos. Además, se evidenció un tejido estromal peritumoral con un apreciable número de fibroblastos en estado activo y que aparentan formar, de manera temprana, un encapsulado que limita y contiene la lesión. Por último, pudo apreciarse un infiltrado linfocitario estromal.

Cabe destacar que se detectaron vasos capilares congestivos tanto a nivel intratumoral como en cercanías de los pequeños nódulos carcinomatosos.

Ya en el día 7 (Fig. 6d), fue posible registrar una constante en las poblaciones celulares de tipo inflamatorio agudo mencionadas, y también comenzó a registrarse un aumento de células linfocitarias infiltrantes, cuya distribución se localiza en el estroma peri e intratumoral.

Además, se observaron células fagocíticas (macrófagos que podrían identificarse como histiocitos) que infiltran regiones ocupadas por restos de células tumorales o fragmentos nucleares que recuerdan a cuerpos apoptóticos. De manera temprana, se observan focos difusos de necrosis y fibrosis.

En este día, se destacan dos aspectos importantes observados en los tumores provenientes de CBi. Por un lado, las células tumorales apenas han podido formar reducidos nidos neoplásicos periféricos, sin tabicamiento exacerbado del conectivo y con limitadas o nulas figuras mitóticas. Por otro lado, y de manera inversa, se visualiza un

aumento del tejido conectivo estromal que rodea al foco de inóculo, con mayor predominio de componentes celulares de tipo fibroblastos, miofibroblastos y una menor, pero apreciable, densidad de fibras colágenas que limitan la lesión y la circunscriben de manera focal, generando una contención con mayor eficacia y menor invasión de tejidos circundantes por parte del tumor.

En el día 10 (Fig. 6e), cuando el tumor está siendo rechazado, se observó un marcado aumento de linfocitos, con una sostenida presencia de células inflamatorias, predominantemente mastocitos. En cuanto al tumor, se evidencia una mayor destrucción del tejido neoplásico periférico infiltrado por eosinófilos, mastocitos, histiocitos y linfocitos, reducidos focos viables que se distribuyen de manera difusa, y nula presencia de figuras mitóticas; en contraste a lo que sucede en los tumores provenientes de los animales CBi, cuya distribución de viabilidad es periférica e infiere un foco de sostenido avance e invasión.

En el día 12 (Fig. 6f, g y h), se observó una clara destrucción del tejido tumoral, en el cual puede evidenciarse una región central necrótica, con restos celulares y/o nucleares, rodeados de numerosos histiocitos en estado activo (fagocíticos). En su contigüidad se registró un estroma delimitado por una capa de conectivo laxo vascularizado por pequeños capilares, seguido de un grueso conectivo, con predominio de fibroblastos y miofibroblastos distribuidos circunferencialmente al sitio de inóculo previo. Entre las capas de conectivo se distribuye un marcado infiltrado linfocitario, acompañado de plasmocitos. Finalmente, los polimorfonucleares eosinófilos y mastocitos son apenas observables en la región extratumoral.

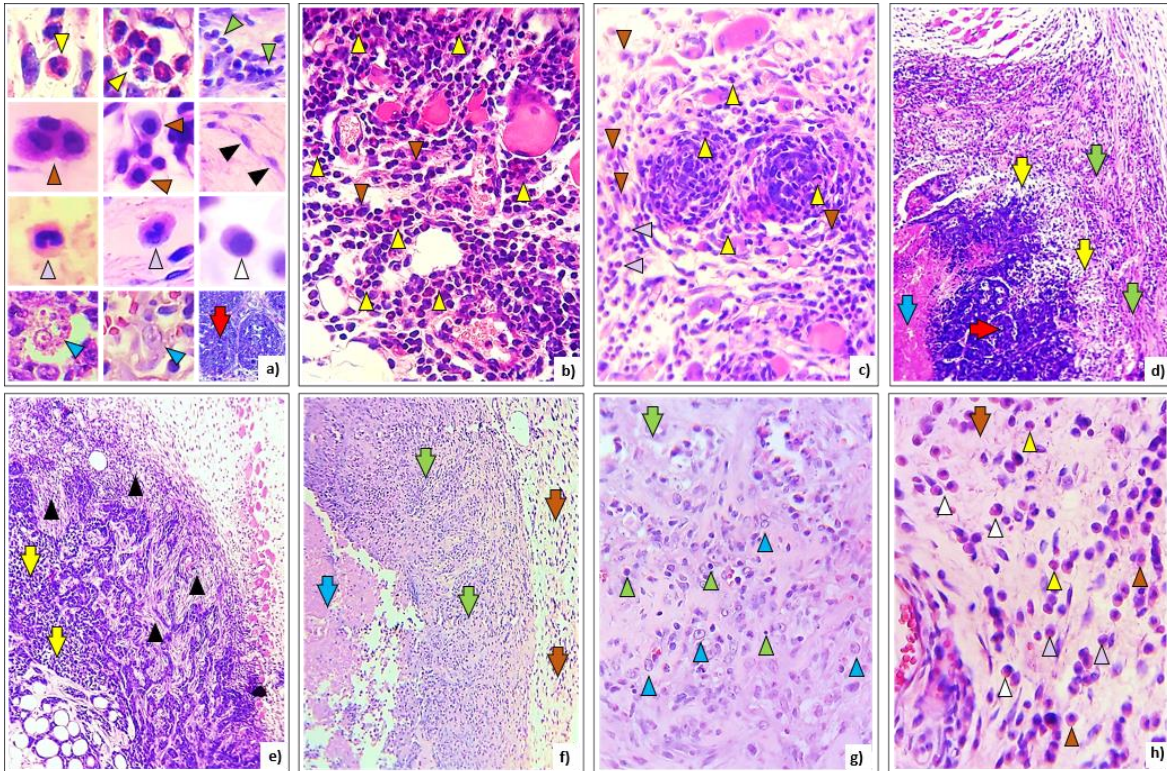


Figura N°6. Microfotografías del crecimiento tumoral y fase de eliminación en la línea CBI

a) Aquí se observan las diferentes poblaciones celulares en estudio: 1) y 2) Eosinófilos y conglomerados de eosinófilos (Punta Flecha Amarilla) 3) Linfocitos (Punta Flecha Verde) 4) y 5) Plasmocitos (Punta Flecha Marrón) 6) Fibroblastos (Punta Flecha Negra) 7) y 8) Macrófagos (Punta Flecha Violeta) 9) Plasmocitos (Punta Flecha Blanco) 10) y 11) Macrófagos e Histiocitos (Punta Flecha Turquesa) 12) Nido de células tumorales (Flecha Roja) 100x-oil. **b) y c) Día 3 a 5:** Se observa en la región peri-tumoral un marcado infiltrado inflamatorio agudo con eosinófilos y mastocitos, cuya distribución es dispersa y organizados en pequeños nódulos. 10x. **d) Día 7:** Aquí se evidencia una pequeña masa tumoral (Flecha Roja) con un centro necrótico (Flecha Turquesa) y un estroma peri-tumoral (Flecha Verde) que rodea los difusos focos de necrosis temprana (Flecha Amarilla). 10x. **e) Día 10:** Se aprecia un desorganizado y reducido tejido tumoral remanente, con necrosis temprana e infiltrado por fibroblastos. 10x. **f) Día 12:** Ausencia de células tumorales y centro de necrosis, rodeado de fibrosis e infiltrado inflamatorio con linfocitos e histiocitos. 10x. **g)** Magnificación de imagen f, región peritumoral. 40x. **h)** Magnificación imagen f, en la región extratumoral se observan células inflamatorias como eosinófilos y plasmocitos. 40x.

5.3. Evaluación de las citoquinas circulantes durante la fase de crecimiento y en la fase de escape o eliminación tumoral

Como hemos mencionado anteriormente, las citoquinas son mediadoras clave en el proceso de inflamación y tienen un papel muy importante en la progresión tumoral, la

angiogénesis y las metástasis en el cáncer de mama. Con el objetivo de estudiar su rol en nuestro modelo, se evaluaron citoquinas Th1 y Th2 mediante la técnica de ELISA, determinándose la concentración de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ en los animales CBI y CBI⁻, tanto en la fase de crecimiento tumoral, como en la fase de escape en CBI y de eliminación en CBI⁻.

Al cuantificar las diferentes citoquinas durante la fase de crecimiento en ambos genotipos, se observó una mayor concentración de IL-4 ($P < 0,001$) e IFN- γ ($P < 0,01$) (Fig. 7a y f, respectivamente) y una menor concentración de IL-10 ($P < 0,01$) (Fig. 7d) en los animales CBI: IL-4: ($80,25 \pm 3,49$); IFN- γ : ($43,77 \pm 3,64$); IL-10: ($48,95 \pm 3,28$) comparados con CBI⁻: IL-4: ($22,69 \pm 6,92$); IFN- γ : ($28,71 \pm 2,56$); IL-10: ($66,47 \pm 1,31$). Por otro lado, no se observaron diferencias en la concentración de IL-5, IL-6 e IL-12 entre ambos genotipos. (Fig. 7b, c y e, respectivamente).

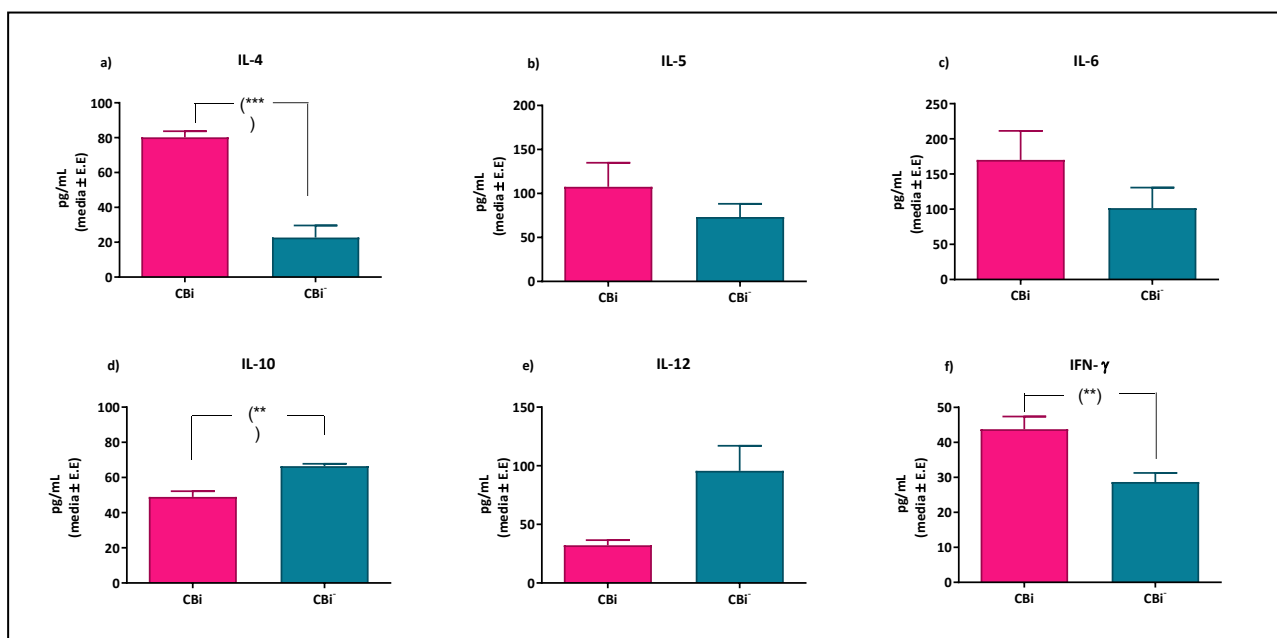


Figura N°7. Concentración de citoquinas en la fase de crecimiento en las líneas antagónicas CBI y CBI⁻

Cuantificación de citoquinas circulantes mediante la técnica de ELISA. Los datos se expresan como media y error estándar de la concentración de las citoquinas. a) IL-4, b) IL-5, c) IL-6, d) IL-10 e) IL-12 y f) IFN gamma (Test t de Student).

Al cuantificar las diferentes citoquinas en la fase de escape CBI y de eliminación CBI⁻, no se observaron diferencias en la concentración de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ al comparar ambos genotipos (Fig. 8a, b, c, d, e y f, respectivamente).

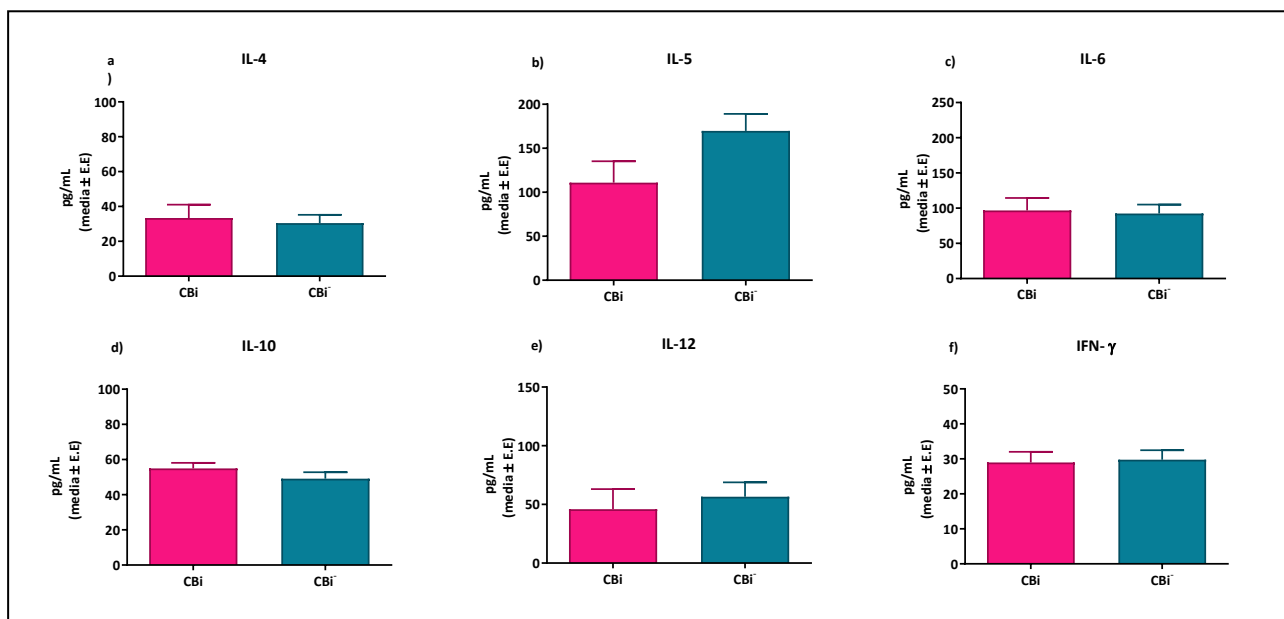


Figura N° 8. Concentración de citoquinas en la fase de escape/eliminación tumoral en las líneas antagonistas CBI y CBI⁻

Cuantificación de citoquinas circulantes mediante la técnica de ELISA. Los datos se expresan como media y error estándar de la concentración de las citoquinas. **a)** IL-4, **b)** IL-5, **c)** IL-6, **d)** IL-10 **e)** IL-12 y **f)** IFN gamma (Test t de Student).

5.4. Caracterización del crecimiento tumoral en la F1

El comportamiento observado en los animales CBI y CBI⁻ al ser desafiados por el adenocarcinoma de mama M-406 nos llevó a evaluar el comportamiento del tumor en los animales de la primera filial del cruzamiento recíproco entre ambas líneas parentales, F1A y F1B. Al inocular M-406 por vía s.c. en dichos híbridos, el tumor se comportó de manera similar a lo observado en estudios previos. Como puede observarse (Fig. 9a y b), el tumor creció en forma exponencial en el 100% de los animales de las dos F1 (A y B), sin observarse diferencias en el tiempo de latencia, en la constante de velocidad de crecimiento ni en el tiempo medio de duplicación tumoral entre ambos híbridos (Fig. 9c, d y e).

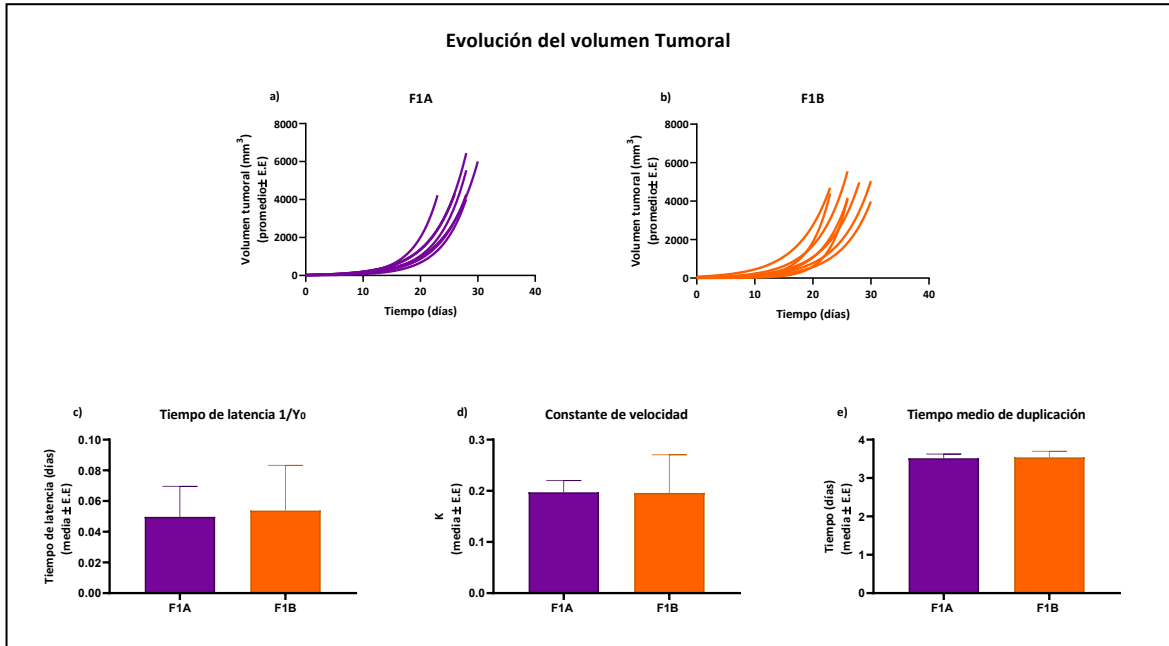


Figura N° 9. Evolución del volumen tumoral en los híbridos de la F1 (A y B)

Evolución del volumen tumoral: a) F1A hembras, b) F1B hembras, ajustadas a una ecuación de crecimiento exponencial. c) Tiempo de latencia 1/Y₀, d) Constante de velocidad k, e) Tiempo medio de duplicación tumoral. (Test t de Student).

La falta de diferencias en los parámetros analizados entre los híbridos F1A y F1B nos permitió estudiar el crecimiento tumoral en forma conjunta en todos los animales de la F1.

Al comparar los 3 genotipos en su fase de crecimiento y los diferentes parámetros de la ecuación de crecimiento exponencial observamos que los animales CBi⁻ presentan mayor tiempo de latencia ($P < 0,0001$) [$0,92 \pm 0,38$] (Fig. 10b), mayor constante de velocidad ($P < 0,0001$) [$0,73 \pm 0,14$] (Fig. 10c) y menor tiempo medio de duplicación tumoral ($P < 0,0001$) [$0,87 \pm 0,10$] (Fig. 10d) comparado con los animales CBi y F1. CBi: Tiempo de latencia: [$0,03 \pm 0,01$], constante de velocidad: [$0,24 \pm 0,02$], tiempo medio de duplicación: [$2,99 \pm 0,22$]; F1: Tiempo de latencia: [$0,06 \pm 0,01$], constante de velocidad: [$0,20 \pm 0,01$], tiempo medio de duplicación: [$3,33 \pm 0,12$].

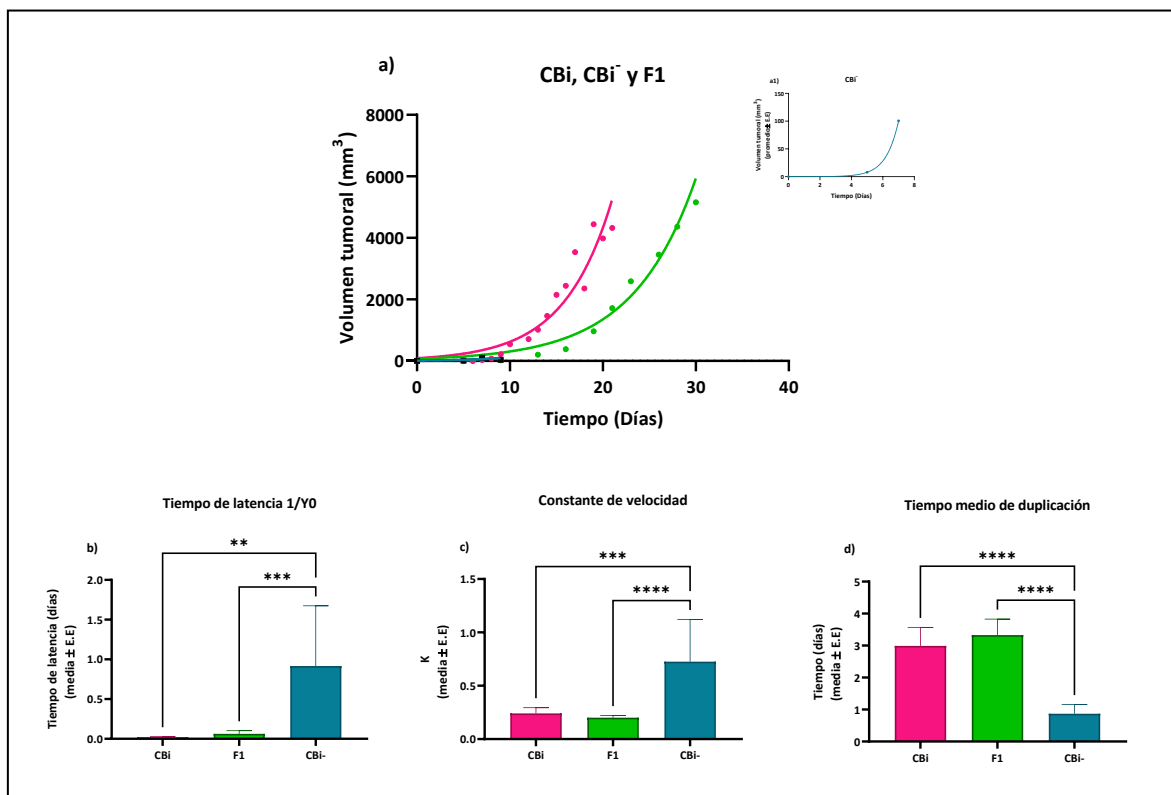


Figura N° 10. Comparación del crecimiento tumoral entre los genotipos CBI, CBI⁻ y F1

a) Evolución del volumen tumoral en CBI, CBI⁻ y F1: curvas ajustadas a una ecuación de crecimiento exponencial. **a1)** Evolución del volumen tumoral en CBI⁻ en su fase de crecimiento: curva ajustada a una ecuación de crecimiento exponencial. **b)** 1/Y₀, **c)** Constante de velocidad K, **d)** Tiempo medio de duplicación tumoral, (Test ANOVA y post test de Tukey).

5.5. Evaluación de las poblaciones celulares circulantes durante la fase de crecimiento y en la fase de escape o eliminación tumoral

Con el fin de estudiar la herencia de la respuesta inmune en la susceptibilidad al crecimiento y escape o rechazo tumoral observada en las líneas parentales CBI y CBI⁻, evaluamos el porcentaje de linfocitos circulantes en ambas líneas y en los híbridos F1.

Al analizar el porcentaje de células circulantes en condiciones basales, previo al desafío tumoral, entre los animales de las líneas parentales y de los híbridos F1, observamos un mayor porcentaje de linfocitos CD4⁺ (P<0,0001) en los animales de la línea CBI⁻ [56,88 (37,79- 76,66)] en relación a los animales de la F1 [24,74 (17,03- 34,34)], sin observarse

diferencias significativas en comparación con CBi [39,96 (0,08-53,94)] (Fig.11a), mientras que el porcentaje de linfocitos Tregs fue menor ($P < 0,001$) en los animales CBi^{-} [0,47 (0,06-1,24)] comparado con los animales F1 [1,10 (0,65-1,40)] y CBi [1,55 (0,88- 1,79)] (Fig. 11c). Al analizar los linfocitos Th17, se observa un porcentaje mayor de los mismos ($P < 0,001$) en los animales F1 [1,31 (0,71 – 2,52)] respecto a CBi [0,35 (0,13 – 0,95)], sin observarse diferencias con los animales CBi^{-} [0,86 (0,51 – 1,44)] (Fig. 11d), mientras que al analizar los linfocitos $CD8^{+}$, no se encontraron diferencias significativas entre ambas líneas parentales y F1 (Fig. 11b).

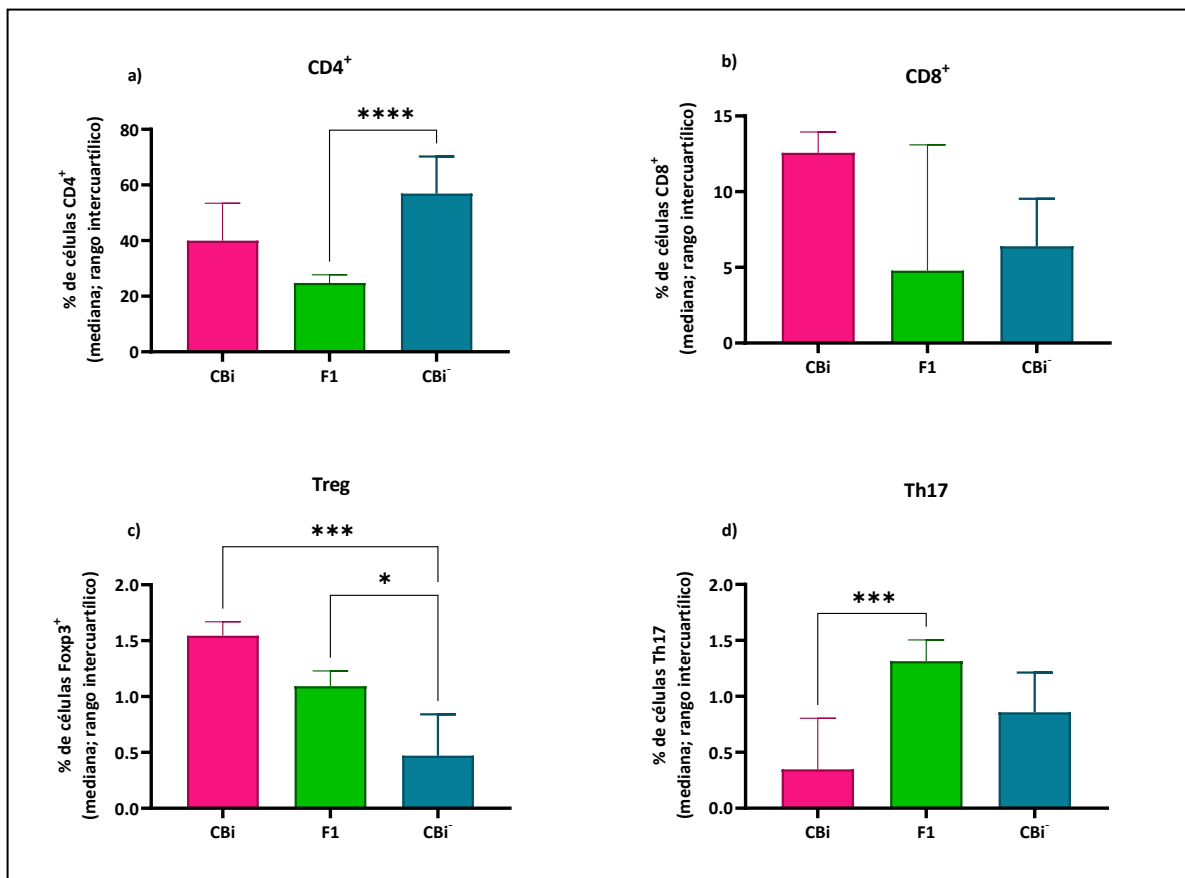


Figura N°11. Porcentaje de células circulantes en condiciones basales en cada uno de los genotipos

Quantificación de linfocitos circulantes por citometría de flujo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del porcentaje de células positivas. **a)** $CD4^{+}$, **b)** $CD8^{+}$, **c)** Tregs, **d)** Th17 (Test Kruskal-Wallis y post test de Dunn).

Por otro lado, en la fase de crecimiento, cuando se analizó el porcentaje de células circulantes en las líneas parentales y en F1, se observó un menor porcentaje de linfocitos Tregs ($P < 0,001$) en los animales CBi [0,04 (0,01 – 0,42)] comparado con F1 [0,33 (0,15 – 0,78)] y CBi⁻ [0,58 (0,18 – 3,01)] (Fig. 12c). Por otro lado, se observó un mayor porcentaje de células CD8⁺ ($P < 0,05$) en los animales CBi [15,11 (2,05 – 17,60)], comparado con F1 [6,45 (0,26 – 14,72)], sin observarse diferencias con los animales CBi⁻ [8,35 (5,31 – 10,11)] (Fig. 12b). No se observaron diferencias en el porcentaje de células CD4⁺ y Th17 entre CBi, F1 y CBi⁻ (Fig. 12 a y d respectivamente).

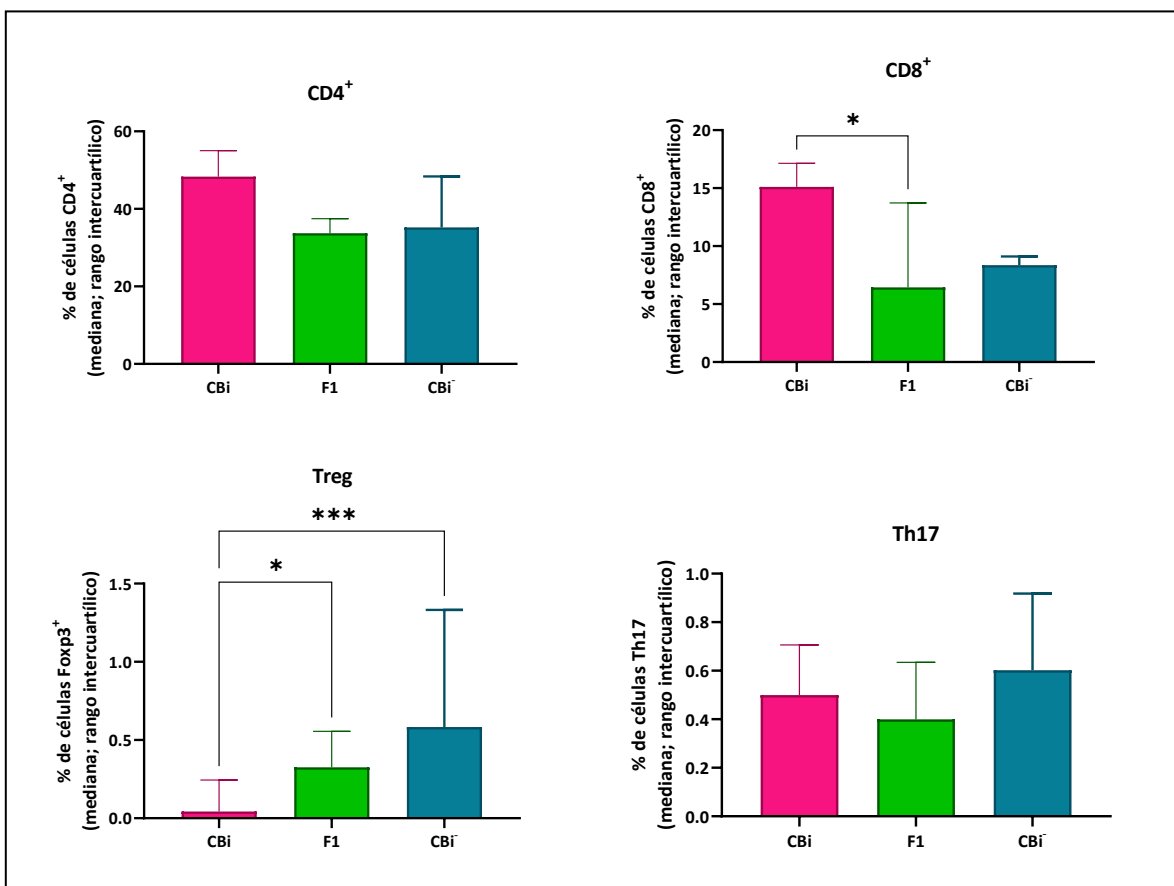


Figura N° 12. Porcentaje de células circulantes en la fase de crecimiento en cada uno de los genotipos

Cuantificación de linfocitos circulantes por citometría de flujo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del porcentaje de células positivas. **a)** CD4⁺, **b)** CD8⁺, **c)** Tregs, **d)** Th17 (Test Kruskal-Wallis y post test de Dunn).

Al evaluar el porcentaje de células circulantes en la fase de escape en los animales CBI y F1 y en la fase de eliminación en los animales CBI⁻, se observó un mayor porcentaje de células CD8⁺ (P<0,0001), Tregs (P<0,0001) y Th17 (P<0,0001) en los animales F1 comparado con los animales CBI y CBI⁻. **CD8⁺**- F1: [14,74 (11,75 – 17,89)]; CBI: [8,37 (0,07 – 12,94)]; CBI⁻ [6,20 (3,21 – 11,10)] (Fig. 13b); **Tregs**- F1: [2,27 (1,76 – 3,43)]; CBI: [0,11 (0,04 – 0,37)]; CBI⁻ [0,63 (0,15 – 1,56)] (Fig. 13c) y **Th17**- F1: [1,37 (0,92 – 2,06)]; CBI: [0,13 (0,08 – 0,51)]; CBI⁻ [0,36 (0,09 – 1,13)] (Fig. 13d). Al evaluar los linfocitos CD4⁺ se observó un menor porcentaje de los mismos (P<0,01) en los animales F1 [35,41 (27,56 – 44,00)] comparado con CBI⁻ [52,16 (38,47 – 70,94)], sin observarse diferencias con los animales CBI [42,31 (37,13 – 55,15)] (Fig. 13a).

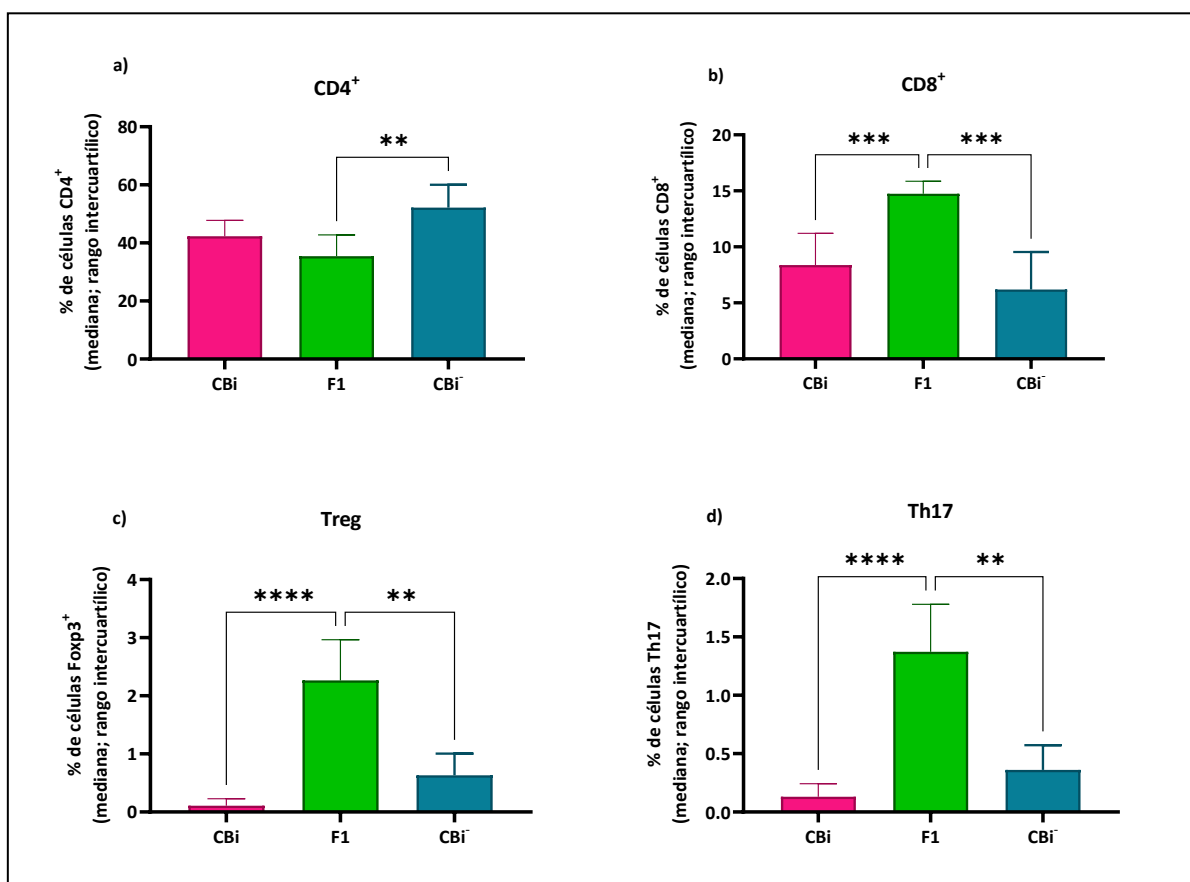


Figura N° 13. Porcentaje de células circulantes en las fases de escape/eliminación tumoral en cada uno de los genotipos

Cuantificación de linfocitos circulantes por citometría de flujo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del porcentaje de células positivas. **a)** CD4⁺, **b)** CD8⁺, **c)** Tregs, **d)** Th17 (Test Kruskal-Wallis y post test de Dunn).

5.6. Evaluación de las poblaciones celulares intratumorales durante la fase de crecimiento y en las fases de escape/eliminación tumoral

Teniendo en cuenta que las células de la respuesta inmune ejercen su efecto en el microambiente tumoral, se evaluaron las células infiltrantes tumorales. Para ello se extrajeron muestras de tumor en la fase de crecimiento en los 3 genotipos y en la fase de escape (CBi y F1) o eliminación (CBi⁻) y se analizaron por citometría de flujo.

En la fase de crecimiento, se observó un menor porcentaje de células CD4⁺ ($P < 0,0001$) y CD8⁺ ($P < 0,0001$) en los tumores provenientes de los animales F1: CD4⁺ [15,80 (12,72 – 24,34)]; CD8⁺ [6,53 (5,06 – 8,39)] comparado con los provenientes de CBI⁻: CD4⁺ [88,58 (81,83 – 94,59)]; CD8⁺: [18,78 (14,68 – 29,09)], sin observarse diferencias con los tumores provenientes de CBI: CD4⁺ [40,20 (31,58– 42,86)]; CD8⁺ [13,00 (10,38– 20,49)] (Fig. 14a y b, respectivamente). A su vez, el porcentaje de linfocitos Tregs fue mayor ($P < 0,0001$) en los tumores provenientes de F1 [3,04 (2,53 – 5,52)] comparado con los provenientes de CBI⁻ [0,59 (0,39 – 0,80)], sin observarse diferencias con las muestras de tumores provenientes de CBI [1,56 (0,81 – 1,95)] (Fig. 14c). Al evaluar las células Th17 se observó un mayor porcentaje de las mismas ($P < 0,05$) en las muestras de tumores provenientes de los animales F1 [3,69 (2,07 – 5,68)] comparadas con las muestras obtenidas a partir de los animales CBI [1,86 (0,85 – 2,52)], sin observarse diferencias en relación a las muestras de tumores provenientes de animales CBI⁻ [1,70 (0,70 – 2,89)], (Fig 14d).

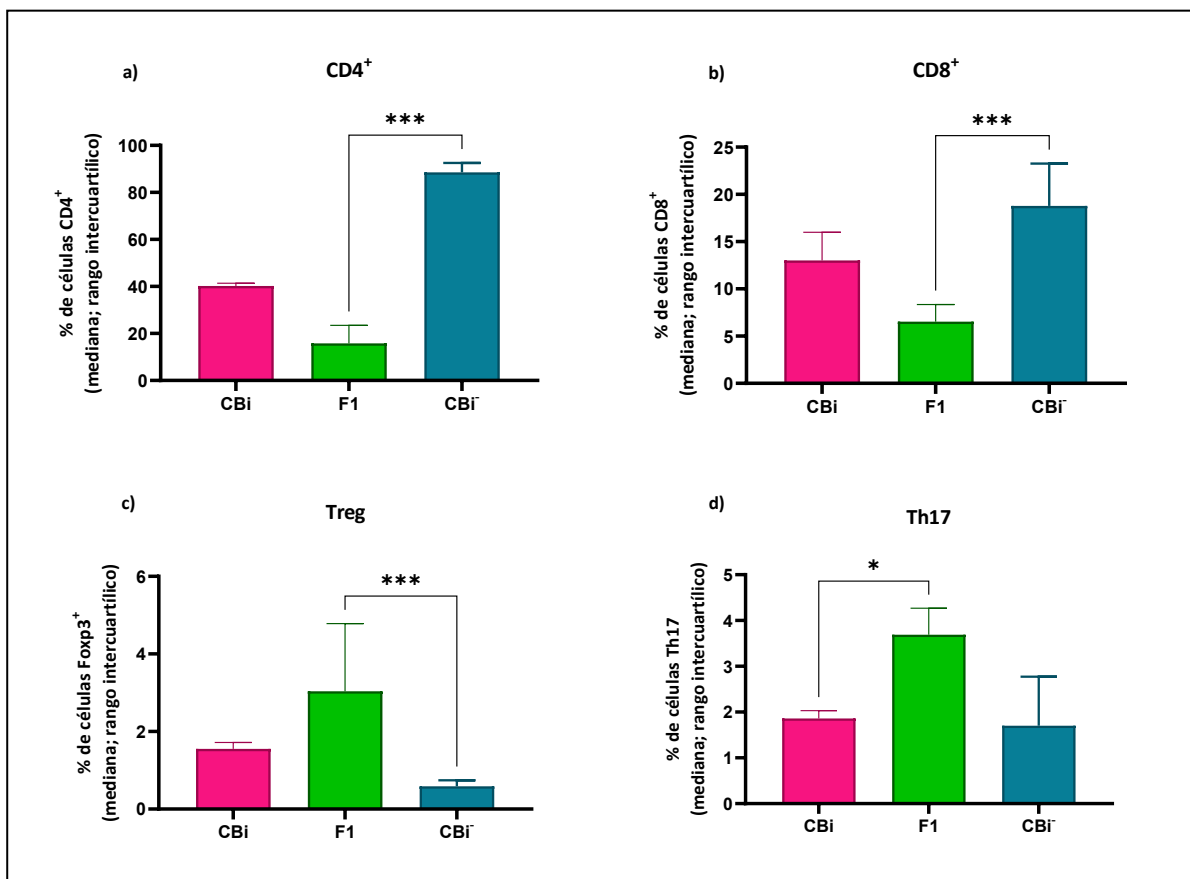


Figura N° 14. Porcentaje de linfocitos infiltrantes de tumor en la fase de crecimiento en cada uno de los genotipos

Cuantificación de linfocitos circulantes por citometría de flujo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del porcentaje de células positivas. **a)** CD4⁺, **b)** CD8⁺, **c)** Treg, **d)** Th17 (Test Kruskal-Wallis y post test de Dunn).

Por otro lado, cuando el tumor se encuentra en fase de escape en los animales CBI y F1 y de eliminación en los animales CBI⁻, se observó un menor porcentaje de células CD4⁺ (P<0,0001) y CD8⁺ (P<0,0001) en los tumores provenientes de los animales F1: CD4⁺ [2,75 (1,58 – 5,40)]; CD8⁺ [4,14 (2,13 – 6,21)] comparado con los provenientes de CBI⁻: CD4⁺ [23,68 (13,85 – 38,29)]; CD8⁺ [12,19 (8,44 – 18,37)], sin observarse diferencias con los tumores provenientes de CBI: CD4⁺ [11,59 (10,59 – 15,86)]; CD8⁺ [6,58;(4,94 – 7,75)] (Fig. 15a y b, respectivamente). Por el contrario, se observó un mayor porcentaje de células Tregs infiltrantes de tumor (P<0,0001) en los tumores provenientes de los animales F1 [6,35 (5,17 – 8,33)] comparado con los provenientes de CBI⁻ [0,28 (0,21 – 0,65)], sin observarse

diferencias con las muestras de tumores provenientes de CBI [0,90 (0,87 – 0,98)] (Fig. 15c). El porcentaje de linfocitos Th17 fue mayor ($P < 0,0001$) en las muestras de tumores provenientes de los animales F1 [5,91 (3,45 – 7,69)] comparadas con las muestras obtenidas a partir de los animales CBI [0,79 (0,49 – 0,93)], sin observarse diferencias en relación a las muestras de tumores provenientes de animales CBI⁻ [1,17 (0,79 – 1,71)] (Fig 15d).

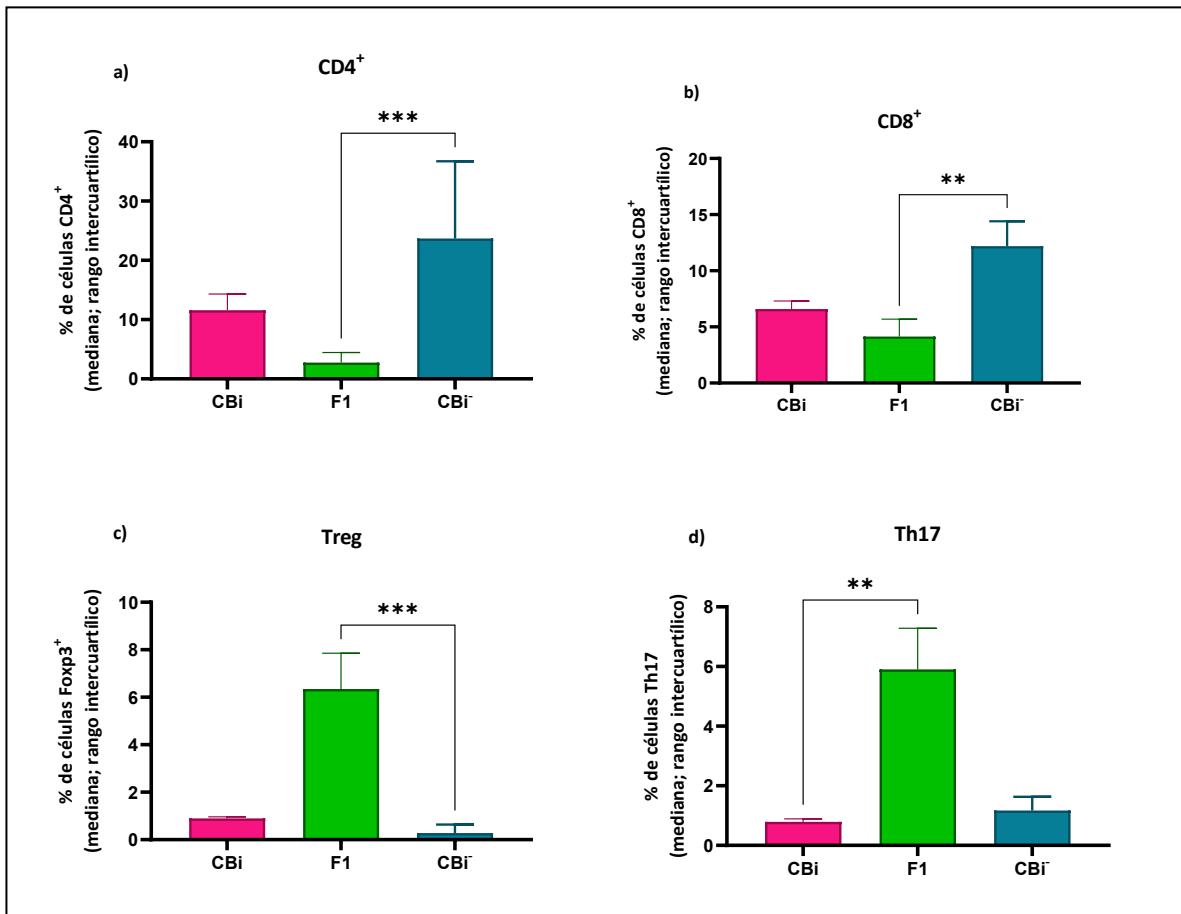


Figura N° 15. Porcentaje de linfocitos infiltrantes de tumor en las fases de escape/eliminación tumoral en cada uno de los genotipos

Cuantificación de linfocitos circulantes por citometría de flujo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartilico del porcentaje de células positivas. a) CD4⁺, b) CD8⁺, c) Tregs, d) Th17 (Test Kruskal-Wallis y post test de Dunn)

5.7. Cuantificación de metástasis pulmonares

Teniendo en cuenta que una de las causas de los fracasos en los diferentes tratamientos antitumorales es el desarrollo de metástasis y, como hemos visto anteriormente, el tumor crece en el 100% de los animales CBi y F1, evaluamos posibles diferencias en el crecimiento, invasión y metástasis pulmonares. Para ello, evaluamos la presencia de metástasis pulmonares en los animales del Grupo 1, donde el tumor creció hasta el máximo tamaño tumoral permitido. Se observó que las hembras de la línea CBi no presentaron metástasis y sí lo hicieron las hembras de la F1 (Fig 16 y tabla III).



	CBi	F1
		
	CBi	F1
Animales con metástasis	0/9	17/18
% de animales con metástasis	0%	94, 4%

Figura N°16. Fotografía de pulmones en la línea parental CBi y en los híbridos F1
Tabla II- Metástasis pulmonares

CBi: ausencia de metástasis pulmonares. F1: Se observa la presencia de nódulos metastásicos de diferentes tamaños.

5.8. Evaluación del proceso angiogénico

Debido a que uno de los eventos íntimamente relacionados tanto con el crecimiento tumoral como con el desarrollo de las metástasis, es la angiogénesis, se evaluó por inmunohistoquímica, el número de células HIF-1 α ⁺ en la matriz extracelular de los tumores provenientes de los animales CBi y CBi⁻, tanto en fase de crecimiento de ambas líneas, como en la fase de escape en CBi y de eliminación en CBi⁻.

Al analizar las muestras de tumores obtenidas en la fase de crecimiento en ambas líneas (Fig 17a) y en fase de escape en los animales CBi y fase de eliminación en los animales CBi⁻ (Fig. 17b), se observó que en ambos momentos los tumores provenientes de los animales CBi presentaron mayor número de células HIF-1 α ⁺ que los tumores provenientes de los animales CBi⁻ (P<0,01; P<0,05; respectivamente). Fase de crecimiento: CBi [3,52 (2,79 – 4,88)]; CBi⁻ [0,37 (0,33 – 0,47)]; Fase de escape o eliminación: CBi [1,67 (1,43 – 2,77)]; CBi⁻ [0,09 (0,06 – 0,10)]. Las Figuras 18 y 19 muestran las microfotografías correspondientes a la fase de crecimiento y escape/eliminación, respectivamente.

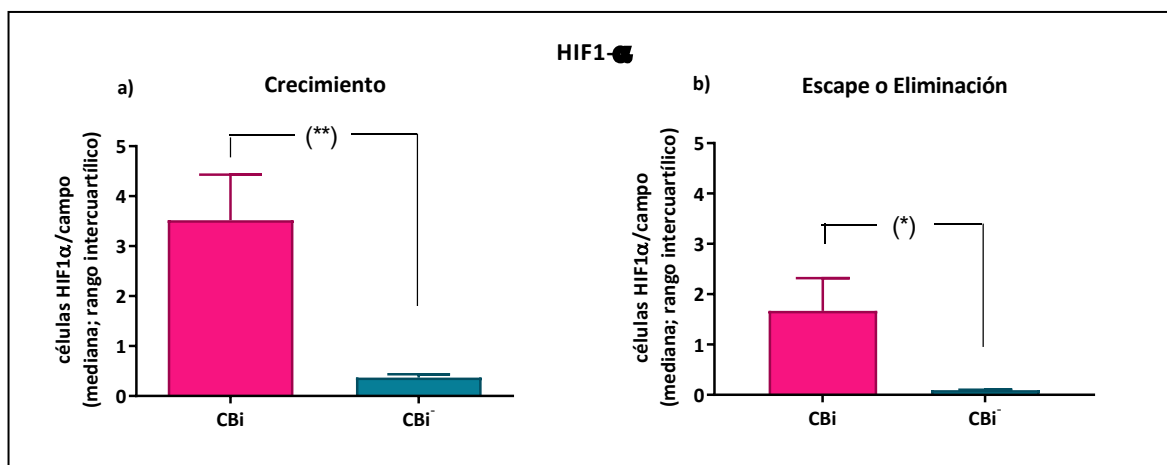


Figura N° 17. Número de células HIF-1 α positivas por campo en las líneas antagónicas CBi y CBi⁻

Cuantificación de células Hif-1 α ⁺ por inmunohistoquímica. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del número de células positivas (Test U de Mann-Whitney).

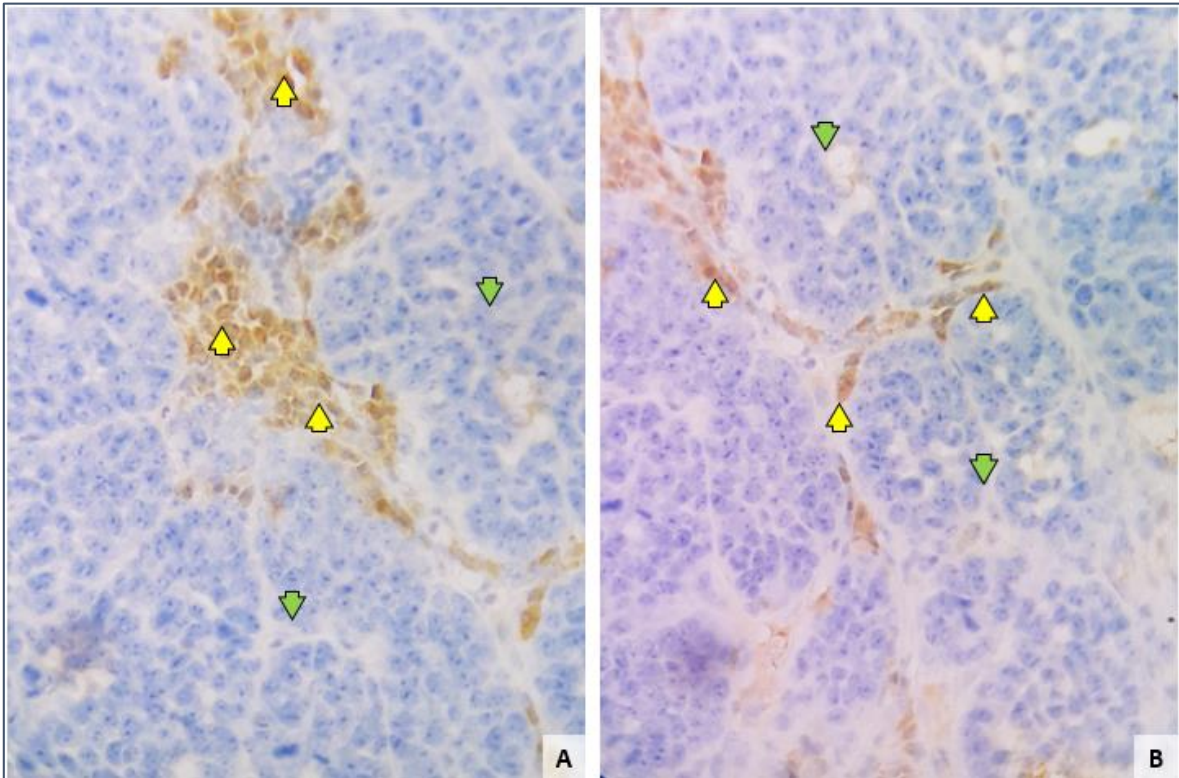


Figura N°18. Inmunohistoquímica HIF-1 α en fase de crecimiento.

Microfotografías de M-406 en las líneas parentales CBi y CBi⁻

A. CBi: región intratumoral, donde se registra células HIF-1 α ⁺ (Flechas amarillas) que se distribuyen en la matriz extracelular. Cúmulos tumorales (Flechas Verdes). **B.** CBi⁻: Tumor con inmunomarcación positiva en los delgados tabiques del conectivo - 400x. MO - Ocular 10x/20mm. Objetivos PL ∞

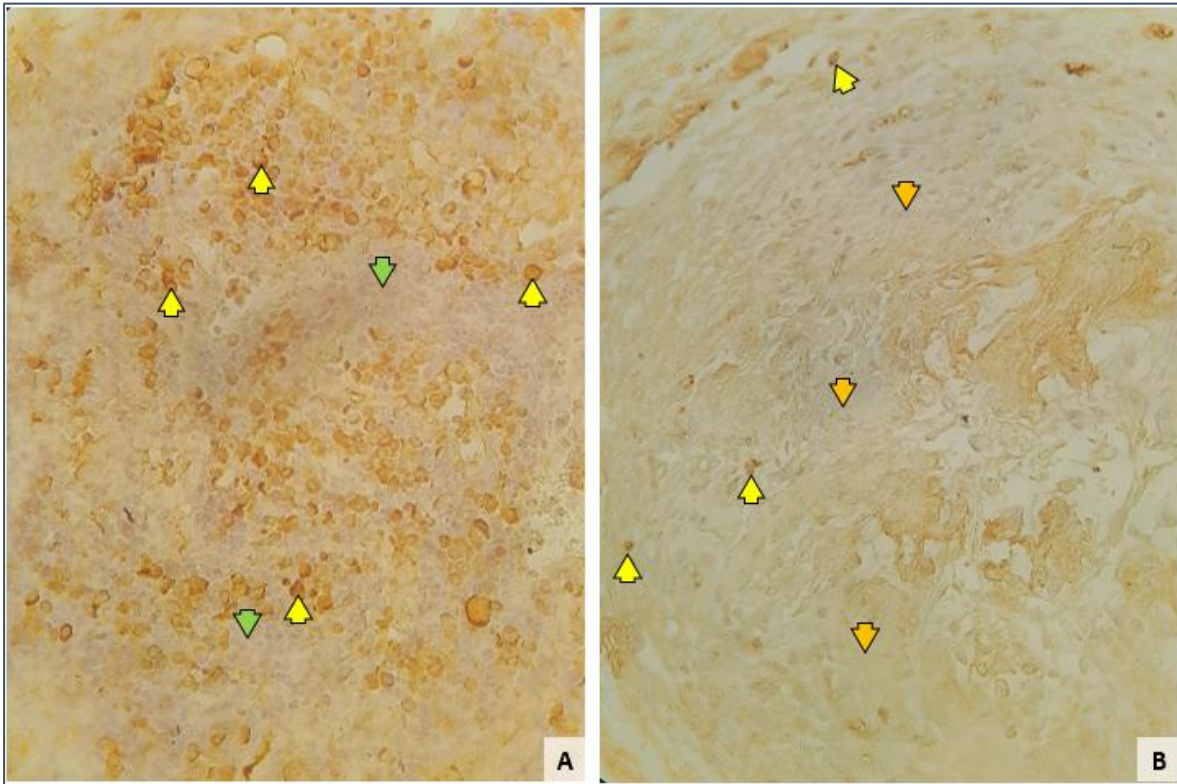


Figura N°19. Inmunohistoquímica de HIF-1 α en fase de escape o eliminación.

Microfotografías de M-406 en las líneas parentales CBi y CBi-

A. CBi: región intratumoral, con notoria señal de marcación por HIF-1 α ⁺ (Flechas amarillas) que se distribuye a nivel del conectivo e incluso, células tumorales (Flechas Verdes). **B.** CBi: Región necrótica (Flechas Naranja) con escasa inmunomarcación - 400x. MO - Ocular 10x/20mm. Objetivos PL ∞ .

Por otro lado, también se analizó el número de células de HIF-1 α ⁺, en los tumores de los animales CBi y F1 cuando alcanzaron el máximo tamaño tumoral permitido

Como puede observarse en la figura 20, los tumores provenientes de los animales CBi [0,37 (0,20 – 0,47)] presentaron un menor número de células Hif-1 α ⁺ (P<0,0001) comparado con los tumores provenientes de los animales F1 [1,00 (0,87 – 1,30)]. En la Figura 21 se observan las microfotografías correspondientes.

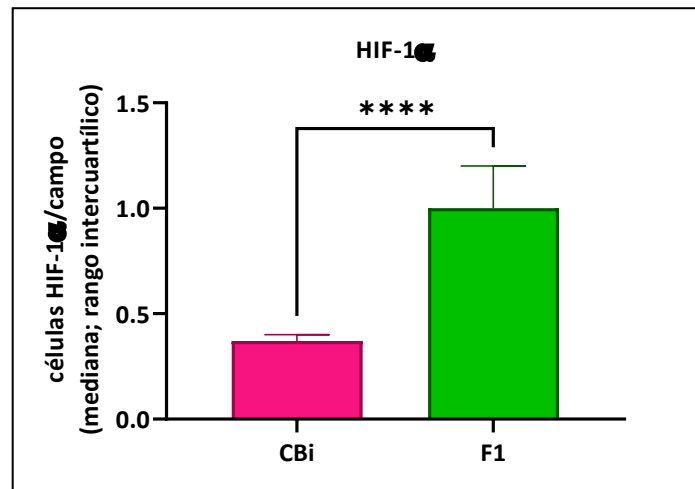


Figura N°20. Número de células HIF-1α positivas por campo en la línea parental CBI y en los híbridos F1

Quantificación de células Hif-1α⁺ por inmunohistoquímica. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico del número de células positivas (Test U de Mann-Whitney).

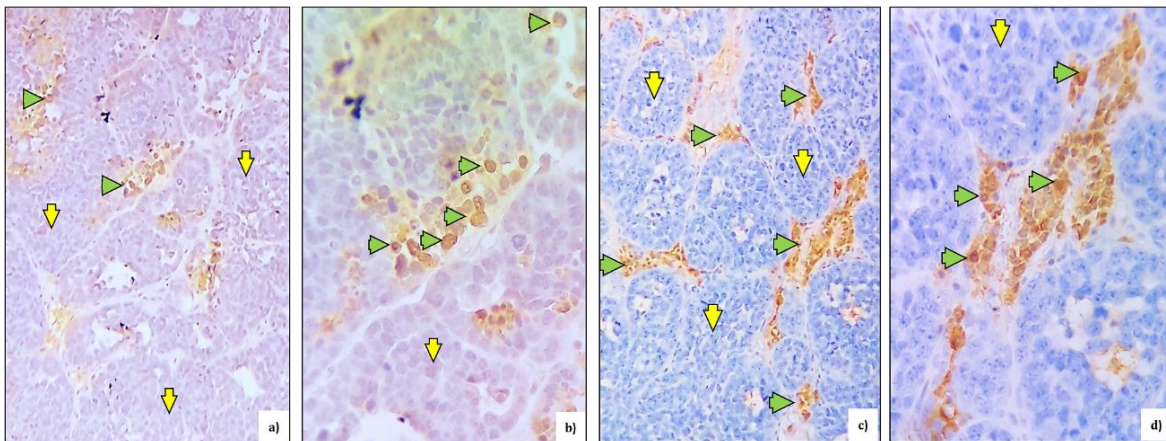


Figura N°21. Inmunohistoquímica de HIF-1α.

Microfotografías de M-406 en la línea parental CBI y en híbridos F1

a, c) CBI, F1, respectivamente: Zona central del tejido tumoral con presencia de numerosos cúmulos organizados de células tumorales (Flechas Amarillas), con regiones de conglomerados celulares marcadas con anticuerpos anti-HIF1- α (Flecha Verdes). 10x. **b, d)** CBI, F1, respectivamente: Magnificación de región tumoral, donde se aprecian numerosas células con notoria atipia celular e inmunomarcación de células tumorales con distribución nuclear y/o citoplasmática. 40x.

5.9. Evaluación de los componentes de la matriz extracelular

Por otro lado, y con el fin de evaluar distintas características de la matriz extracelular, se cuantificó el número de CAF, utilizando la proteína α -SMA como marcador molecular y, el colágeno intratumoral, por medio de la tinción Picro-Sirius Red en muestras de tumores de ratones CBi y CBi⁻ en la fase de crecimiento en ambos genotipos y en la fase de escape en los animales CBi y de eliminación en los animales CBi⁻.

En la fase de crecimiento en ambos genotipos, al analizar los resultados de α -SMA obtenidos, se observó un mayor porcentaje de área cubierta por campo ($P < 0,01$) en los tumores provenientes de los animales CBi⁻ [11,33 (5,46 – 11,46)] comparado con los provenientes de los animales CBi [3,61 (3,45 – 4,36)] (Fig. 22a). Sin embargo, el porcentaje de área cubierta por α -SMA cuantificado en las fases de escape/eliminación fue menor ($P < 0,001$) en los tumores provenientes de los animales de la línea CBi⁻ [0,71 (0,26 – 1,26)] con respecto a los provenientes de la línea CBi [4,38 (3,21 – 4,99)] (Fig. 22b). Las Figuras 23 y 24 muestran las microfotografías correspondientes a la fase de crecimiento en ambos genotipos y a la fase de escape en los animales CBi y de eliminación en los animales CBi⁻.

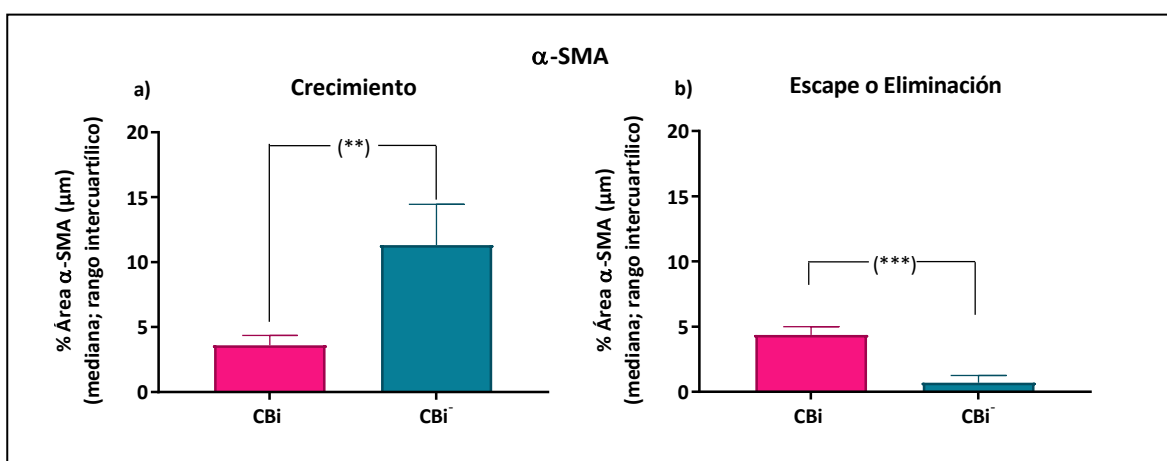


Figura N° 22. Porcentaje de área cubierta por α -SMA por campo en las líneas antagónicas CBi y CBi⁻

a) Área porcentual cubierta por α -SMA por campo al día 7; **b)** Área porcentual cubierta por α -SMA por campo al día 14. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (Test U de Mann-Whitney).

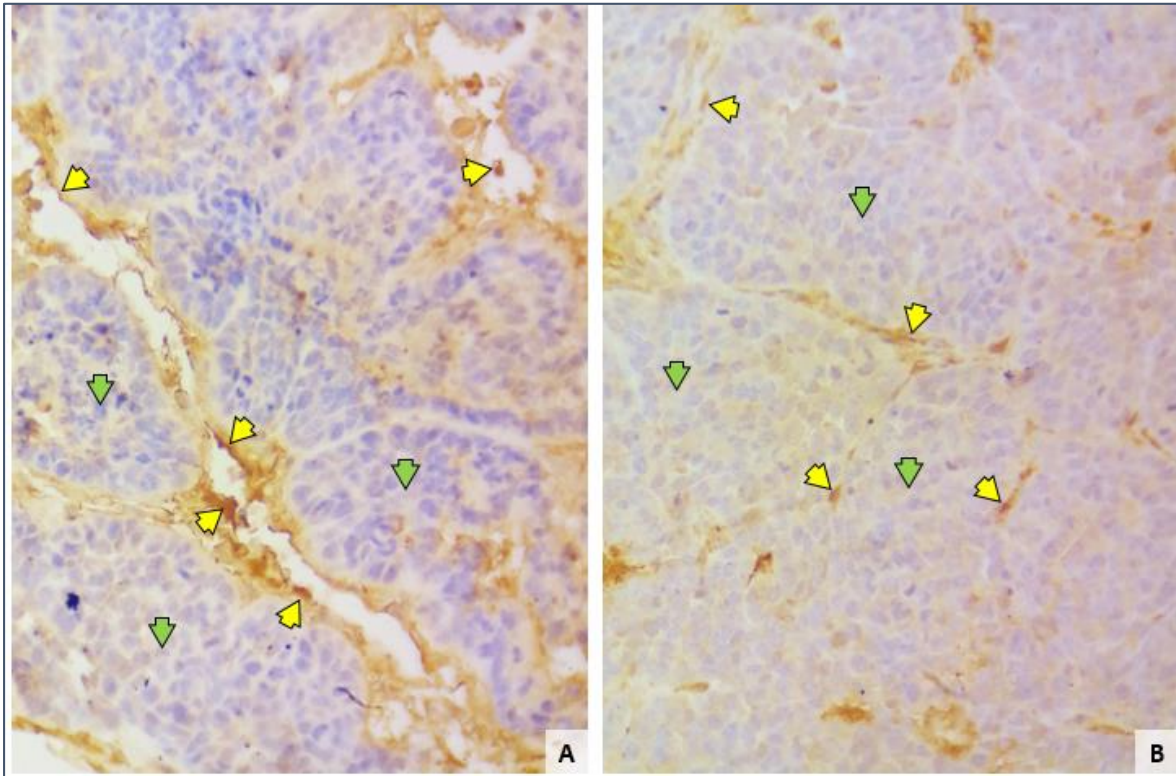


Figura N°23. Inmunohistoquímica de α -SMA en fase de crecimiento.

Microfotografías de M-406 en las líneas parentales CBi y CBi⁻

A. CBi: región intratumoral, donde se aprecia intensa señal de marcación por fibroblastos fibróticos (α -SMA⁺ - Flechas amarillas) en el conectivo que tabica los nidos tumorales (Flechas Verdes). **B.** CBi⁻: Obsérvese la marcación positiva entre los cúmulos intratumorales - 400x. MO - Ocular 10x/20mm. Objetivos PL ∞ .

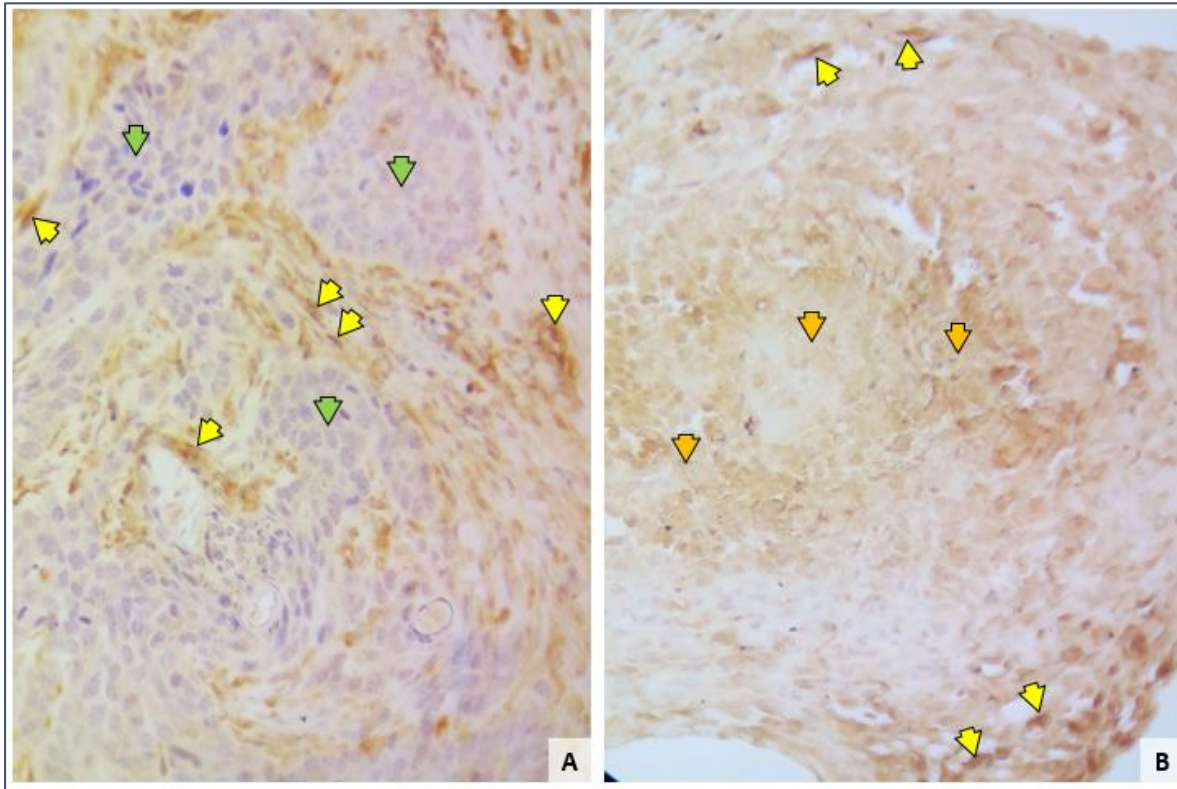


Figura N°24. Inmunohistoquímica de α -SMA en fase de escape o eliminación.

Microfotografías de M-406 en las líneas parentales CBi y CBi⁻

A. CBi: región intratumoral proliferativa, donde se observa marcación α -SMA⁺ (Flechas amarillas) entre los nidos tumorales (Flechas Verdes). B. CBi⁻: Región necrótica de tumor involucionado (Flechas Naranja) con inmunoreactividad o señal reducida - 400x. MO - Ocular 10x/20mm. Objetivos PL ∞ .

Por otro lado, al determinar el porcentaje de área cubierta por colágeno en las muestras de tumores provenientes de los animales CBi comparado con los provenientes de CBi⁻ no se observaron diferencias significativas, en ninguno de los momentos estudiados (Fig. 25a y b). Las Figuras 26 Y 27 muestran las microfotografías correspondientes.

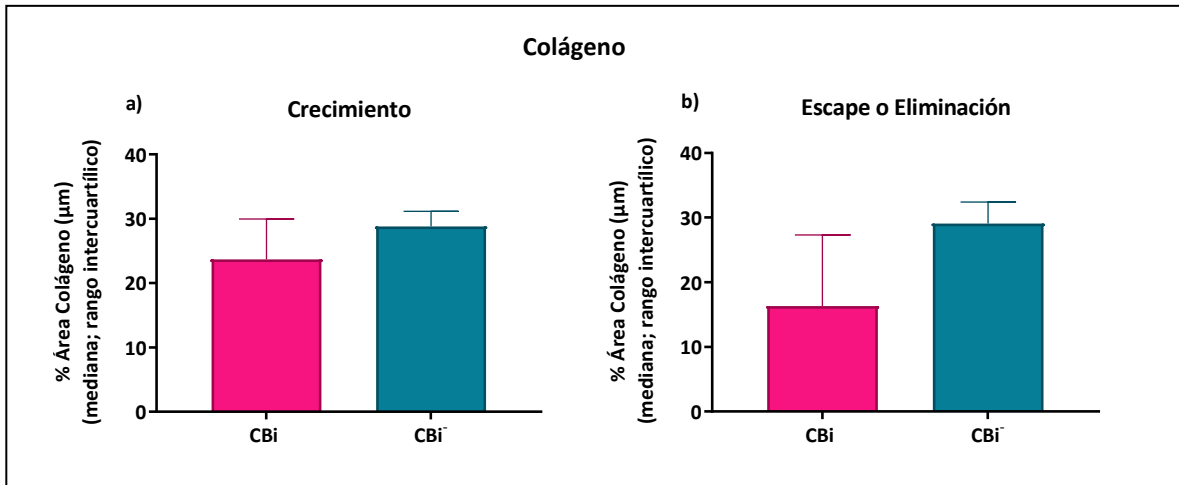


Figura N°25. Porcentaje de área cubierta por colágeno por campo en las líneas antagónicas CBI y CBI⁻

a) Área porcentual cubierta por colágeno por campo al día 7; b) Área porcentual cubierta por colágeno por campo al día 14. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (Test U de Mann-Whitney).

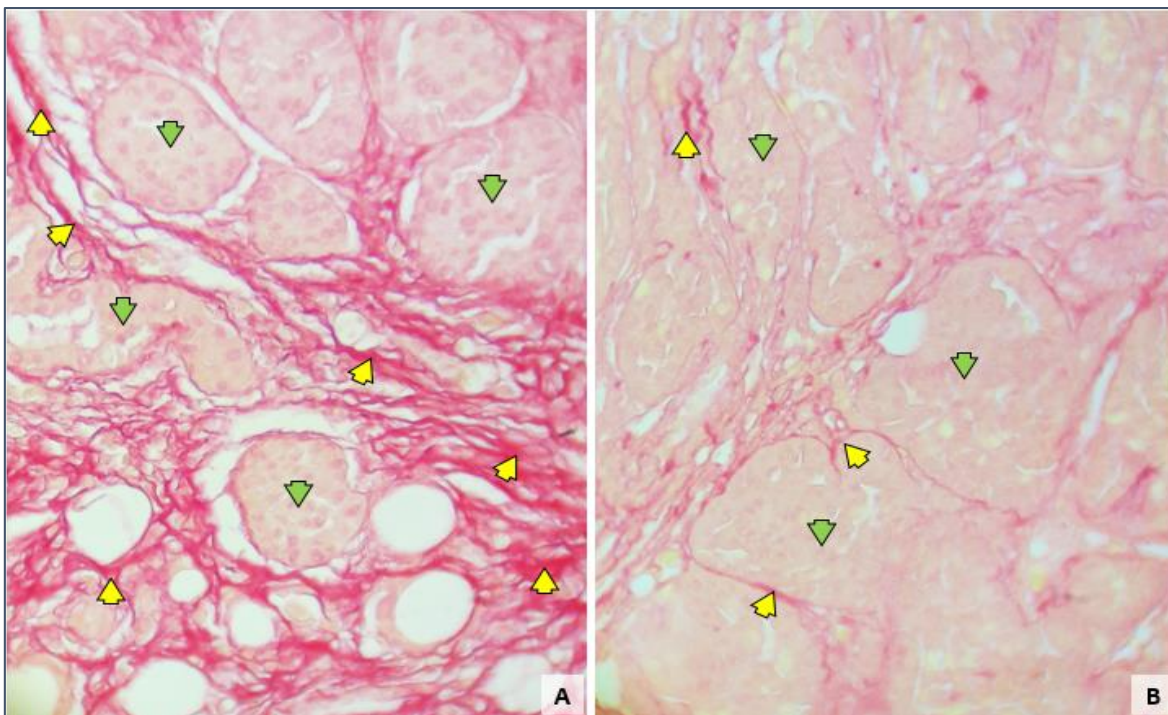


Figura N° 26. Tinción de fibras de colágeno por técnica Picro-Sirius Red en fase de crecimiento. Microfotografías de M-406 en las líneas parentales CBI y CBI⁻

A. CBI: región peritumoral, en la cual se aprecia desmoplasia caracterizada por el marcado depósito de colágeno (Flechas amarillas) a nivel de la matriz extracelular. Nichos tumorales (Flechas Verdes). B. CBI⁻: Tumor delimitados por delgados tabiques de colágeno - 400x. MO - Ocular 10x/20mm. Objetivos PL ∞.

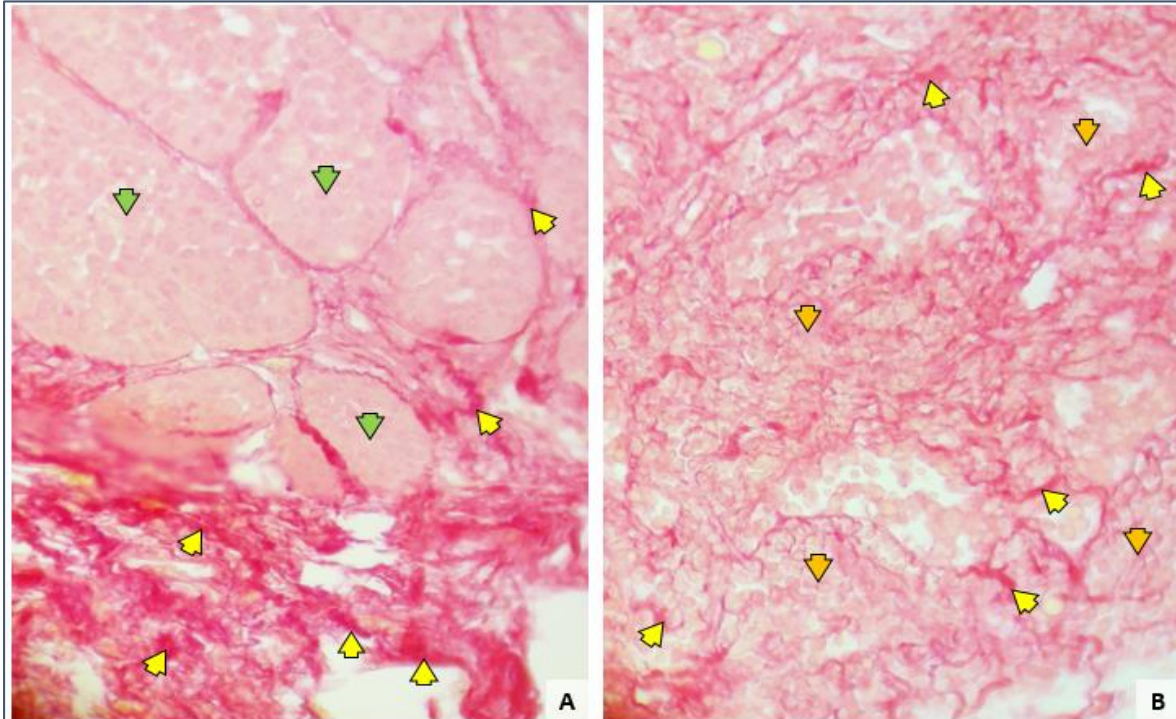


Figura N° 27. Tinción de fibras de colágeno por técnica Picro-Sirius Red en fase de escape o eliminación. Microfotografías de M-406 en las líneas parentales CBi y CBi

A. CBi: región peritumoral, con marcado depósito de evidentes haces de fibras de colágeno (Flechas amarillas) que tabica los cúmulos tumorales (Flechas Verdes). B. CBi: Región necrótica (Flechas Naranja) sin viabilidad tumoral apreciable y colágeno de fibras pequeñas - 400x. MO - Ocular 10x/20mm. Objetivos PL ∞.

También se evaluó el colágeno intratumoral y la expresión de α -SMA en los tumores de los animales CBi y F1 cuando alcanzaron el máximo tamaño tumoral permitido. Allí se observó un menor porcentaje de área cubierta por colágeno ($P < 0,0001$) y un mayor porcentaje de área cubierta por α -SMA ($P < 0,01$) en los tumores provenientes de los animales CBi, comparado con los provenientes de los animales F1 (Fig. 28a y b, respectivamente). Porcentaje de área cubierta por colágeno: CBi [11,65 (8,15 – 19,51)], F1 [22,62 (19,98 – 28,84)]; porcentaje de área cubierta por α -SMA: CBi [1,52 (0,27 – 3,81)], F1 [0,46 (0,07 – 0,93)]. Estas diferencias se evidencian claramente en las microfotografías correspondientes (Fig. 29 y 30).

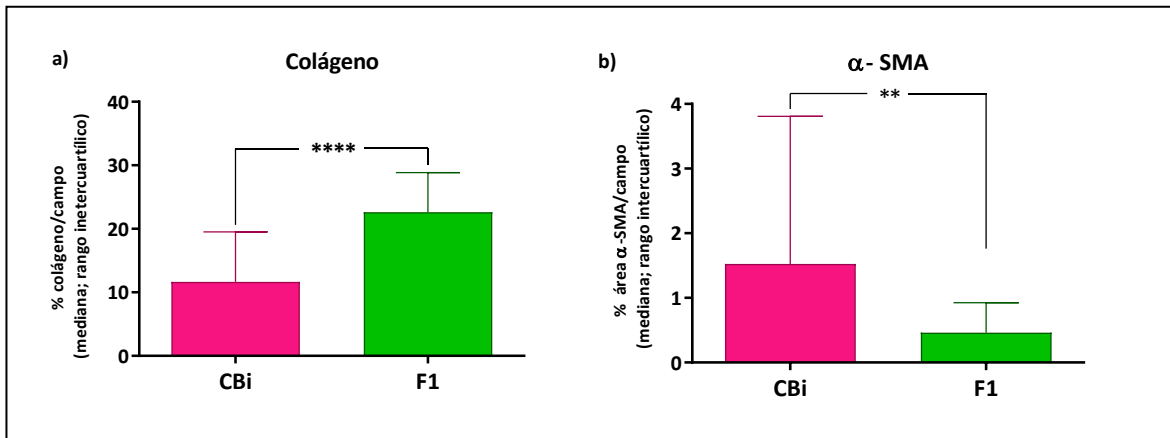


Figura N°28. Porcentaje de área cubierta por colágeno y α-SMA por campo en la línea parental CBi y en los híbridos F1

a) Área porcentual cubierta por colágeno por campo. b) Área porcentual cubierta por α-SMA por campo. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (Test U de Mann-Whitney).

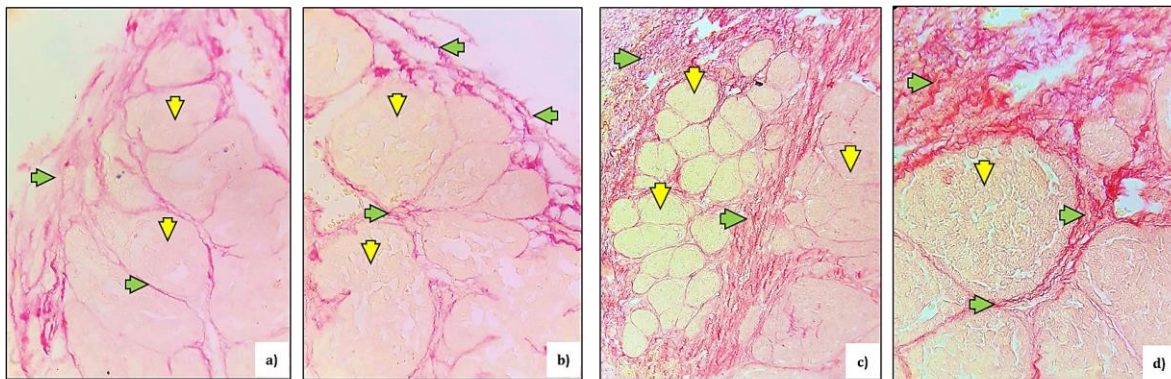


Figura N° 29. Tinción de fibras de colágeno por técnica Picro-Sirius Red. Microfotografías de M-406 en la línea parental CBi y en híbridos F1

a, b) CBI: Región Periférica del tejido con prominentes nidos tumorales (Flechas Amarillas), rodeado y tabicado por un delgado tejido conectivo, evidenciado por la técnica tincional que denota la presencia de fibras colágenas (Flecha Verdes). 40x. c) F1: Región periférica del tumor con presencia de células tumorales organizadas en numerosos nidos o cúmulos aglomerados (Flechas Amarillas), rodeado por una marcada reacción estromal de tipo desmoplasia (Flechas Verdes). 10x. d) F1: Magnificación de nido tumoral rodeado y tabicado por tejido conectivo, evidenciado por la técnica tincional que denota la presencia de fibras colágenas. 40x.

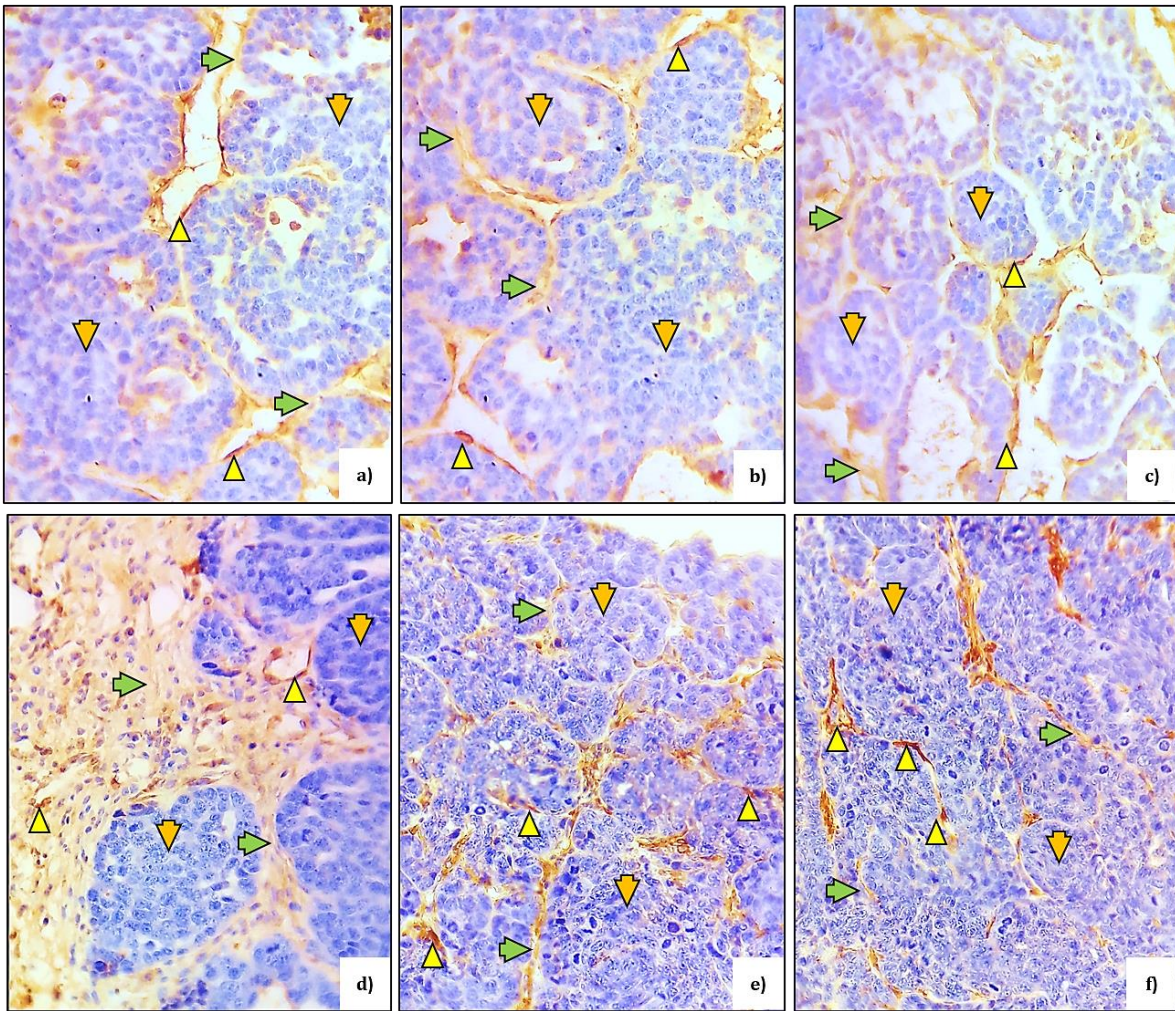


Figura N°30. Inmunohistoquímica α -SMA. Microfotografías de M-406 en la línea parental CBi y en híbridos F1

a, b, c) CBi: Numerosos cúmulos tumorales viables (Flechas Naranjas), tabicados por tejido conectivo (Flecha Verdes) donde es posible apreciar formaciones vasculares de variados calibres. Inmunomarcación anti- α -SMA (Punta Flechas Amarillas). 40x. **d) F1:** Región periférica del tejido tumoral. Se observan prominentes cúmulos tumorales viables, de avance sostenido (Flechas Naranjas), rodeado por un estroma reactivo y tabicado por tejido conectivo (Flecha Verdes). 40x. **e, f) F1:** Región central del tejido tumoral donde se aprecian numerosos nidos tumorales tabicados por un delgado tejido conectivo. Inmunomarcación anti- α -SMA (Punta Flechas Amarillas). 40x.

DISCUSIÓN

Los modelos animales para el estudio del cáncer han tenido un gran impacto en la comprensión de los procesos que gobiernan el inicio, la progresión tumoral y el desarrollo de las metástasis. En el cáncer de mama, dichos modelos han desempeñado un papel vital en la historia y el desarrollo de la investigación básica y traslacional, ya que se han utilizado para la comprensión biológica del mismo, así como también para el desarrollo de nuevas terapias. (Zeng L, 2020).

Los roedores, especialmente ratones y ratas, son los animales que se utilizan comúnmente para la investigación del cáncer debido a su pequeño tamaño, bajo costo, fácil manipulación y corto tiempo de generación. A su vez, los ratones también tienen varias similitudes a nivel anatómico, fisiológico, inmunológico y genético con el humano, compartiendo un alto grado de homología genómica y una superposición en la función de sus genes, lo que los convierte en ideales como modelo animal de laboratorio para la investigación biomédica del cáncer. (Mendes N, 2020).

Los principales roedores utilizados en el laboratorio se pueden clasificar en cepas consanguíneas y colonias no consanguíneas. Las cepas consanguíneas se caracterizan por homogeneidad genética, isogenicidad, uniformidad fenotípica, larga estabilidad genética, identidad e individualidad de cepa, mientras que las no consanguíneas maximizan la variación genética y minimizan la endogamia con una mayor variación fenotípica interindividual, lo que permite obtener animales con mejor fertilidad, salud y longevidad, útiles en análisis genéticos de rasgos complejos, como el cáncer (Romero-Fernández W, 2016). La isogenicidad, o igualdad genética es, sin dudas, la característica más importante y de gran valor en el uso de modelos de animales en investigación biomédica, ya que permiten hacer experimentos eliminando la variabilidad de origen genético, por lo que, la variabilidad de los resultados de las investigaciones se puede asignar mayormente a factores ambientales o metodológicos. Esta uniformidad nos permite lograr precisión estadística con mucha menor cantidad de animales que los necesarios al trabajar con grupos no consanguíneos. (Benavides FJ & Guénet JL, 2003).

Teniendo en cuenta los resultados observados previamente, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta inmune antitumoral y el microambiente tumoral en las líneas parentales endocriadas de ratones CBI (susceptible) y CBI⁻ (resistente), y de la F1 derivada de los cruzamientos recíprocos de dichas líneas parentales, inoculadas con el adenocarcinoma de mama triple negativo M-406.

Al analizar el crecimiento tumoral en las líneas endocriadas de ratón CBI y CBI⁻ luego de ser desafiadas de forma s.c. con el adenocarcinoma de mama M-406, las mismas se comportaron de forma similar a lo observado en experiencias previas (Zacarías Fluck M, 2007). En la línea CBI, el tumor creció en forma exponencial en el 100% de los animales desafiados (Fig. 3a), fenotipo susceptible y en la línea CBI⁻ el mismo comenzó a crecer y, luego de un periodo de tiempo, fue rechazado en el 100 % de los animales (Fig. 3b), fenotipo resistente. A su vez, observamos mayor tiempo de latencia (Fig. 4a), mayor valor de la constante de velocidad (Fig. 4b) y menor tiempo medio de duplicación tumoral (Fig. 4c) en la línea CBI⁻ comparada con CBI, demostrando que el tumor en la línea CBI⁻ tarda más tiempo en comenzar a crecer, pero crece a una velocidad mayor que CBI, logrando duplicar su volumen tumoral en menor cantidad de tiempo, pero alcanzando menor volumen máximo tumoral.

Con el fin de evaluar diferencias histológicas en el crecimiento tumoral estudiamos al microscopio óptico (MO) de forma secuencial los tumores provenientes de animales CBI y CBI⁻ inoculados con el adenocarcinoma de mama M-406, desde el día 3 hasta los días 12 ó 14 cuando el tumor está en franco escape o franca eliminación, según el comportamiento del mismo en los dos genotipos estudiados. La comparación histológica de los tumores provenientes de animales CBI y CBI⁻ (Fig. 5 y 6 respectivamente), en coincidencia con lo observado en relación a la susceptibilidad y/o resistencia, permitió evidenciar también un destacable comportamiento antagónico en lo que respecta a las poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria e inmunitaria frente al tumor M-406. En los tumores de los animales CBI⁻, entre los días 3 y 5 de evolución tumoral (Fig. 6b y c, respectivamente) se registró, de manera temprana, una marcada presencia de vasos

hiperémicos intratumorales (aumento de irrigación), lo cual coincidiría con el inicio del proceso inflamatorio, en contraste con la notoria ausencia de reacción vascular en el modelo CBi (Fig. 5a, b y c). Amersfoort J y col. demostraron que el reclutamiento y la activación de las células inmunitarias innatas en el MAT depende estrictamente de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, que participan en una comunicación cruzada bidireccional con las células inmunitarias innatas (Amersfoort J, 2022). Por un lado, las células inmunes innatas pueden modular la activación y las funciones de las células endoteliales tumorales y, a su vez, la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales puede afectar la extravasación de células inmunes. (Ebeling S, 2023). Es por esto que, desde el punto de vista histológico, creemos que esta diferencia observada entre las dos líneas de ratones, tal vez sea uno de los primeros eventos que condicione el curso de una respuesta antitumoral eficiente en la línea CBi⁻, permitiendo una extravasación adecuada y, consecuentemente, un elevado reclutamiento de los distintos componentes de la respuesta inmune innata en el sitio del tumor.

Además, en las muestras de tumores derivados de CBi⁻ se observó una marcada respuesta inflamatoria de fase aguda, que parecería estar involucrada en el rechazo del tumor observado en esta línea. El infiltrado de eosinófilos, mastocitos y monocitos es mucho más notorio que el observado en CBi y, estas células, aparentan ser protagonistas cruciales para el control inicial del crecimiento tumoral, teniéndose en cuenta su concentración, forma de distribución y organización, con el objeto de impedir el avance e invasión tumoral. La importancia asignada a los eosinófilos en la investigación del cáncer ha crecido recientemente, ya que varios estudios mostraron una asociación entre un mayor recuento de eosinófilos y un buen pronóstico, así como también una mejor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama con receptores hormonales negativos/HER2-positivo y en el cáncer de mama triple negativo (Poncin A, 2021).

También, entre los días 3 y 5, es apreciable en la línea CBi⁻ que las poblaciones celulares innatas forman pequeños nódulos de manera temprana, posiblemente conteniendo el foco neoplásico y evitando su organización en forma de nidos o cúmulos, pudiendo limitar así el desarrollo y crecimiento ulterior (Fig. 6b y c). Por el contrario, en los tumores provenientes

de la línea CBi se observa una masa tumoral en expansión, con numerosas figuras mitóticas, aumento de un infiltrado linfocitario y, principalmente, una mayor densidad de la MEC (Fig. 5a, b y c). Varios estudios demuestran que el contenido de las células inmunes del tejido mamario normal aumenta progresivamente a medida que aumenta la proliferación tumoral en el cáncer de mama (Goff SL, 2021). En un estudio de muestras de mastectomía utilizando inmunohistoquímica y citometría de flujo, Ruffell y col. observaron que los tejidos de cáncer de mama contenían infiltrados dominados por linfocitos CD8⁺ y CD4⁺, con poblaciones menores de células NK y linfocitos B, mientras que en el tejido mamario normal fueron más evidentes células de linaje mieloide, incluidos macrófagos, mastocitos y neutrófilos (Ruffell B, 2012).

Lo expuesto, sugiere la posibilidad de que el rechazo del tumor en la línea CBi se deba, en parte, al incremento de vasos sanguíneos que atraen células tales como eosinófilos, y a la actividad citotóxica directa de dichas células mediante la degranulación de sus componentes enzimáticos (Hollande C, 2019), o a la actuación indirecta de los mismos por medio del reclutamiento de poblaciones celulares con actividad citotóxica, como los linfocitos CD8⁺ (Carretero R, 2015). Estudios recientes demostraron que la ablación de los eosinófilos en modelos de cáncer colorrectal afectaba negativamente a la inmunidad antitumoral a través de respuestas defectuosas de dichos linfocitos (Arnold IC, 2020).

Asimismo, se observó una clara diferencia en el infiltrado de monocitos. En el caso del modelo CBi su presencia permite inferir una quimiotaxis temprana y posterior diferenciación hacia un fenotipo pro-inflamatorio activo, es decir, histiocitos con gran actividad fagocítica (Fig. 6g), mientras que en la línea CBi la presencia de monocitos es escasa. Una vez puesto en marcha el proceso inflamatorio, conforme evoluciona el mismo, se inician de manera paralela procesos tendientes a una acción anti-inflamatoria para evitar la perpetuidad de la inflamación y el excesivo daño en el foco de acción. Tkach y col. demostraron que las células tumorales de pacientes con TNBC liberan vesículas extracelulares y moléculas solubles que promueven la diferenciación de monocitos hacia macrófagos proinflamatorios. A su vez, demostraron que estos resultados se asociaron con una infiltración de células T y una mayor supervivencia de los pacientes (Tkach M, 2022).

Por otro lado, otras investigaciones han evidenciado que ciertos factores y citoquinas solubles como CSF-1, IL-3, IL-4, IL-10 y TGF- β impulsan el reclutamiento de los macrófagos al sitio del tumor y su polarización a un fenotipo M2 con un rol pro-tumoral y promoviendo la supervivencia, proliferación, angiogénesis y diseminación de las células tumorales (Mehta AK, 2021). En nuestro modelo, las diferencias observadas entre las dos líneas de ratones sugerirían que IL-4 e INF- γ estarían cumpliendo un rol pro-tumoral y, por el contrario, IL-10 tendría una actividad antitumoral (Fig.7).

A todo lo descrito en la línea CBI⁻ se suma la participación de un entorno constituido predominantemente por fibroblastos, miofibroblastos y una MEC con fibras colágenas que aísla y restringe la invasión tumoral. Su organización y distribución parece ser un mecanismo estructural que permite a los componentes celulares de fase aguda llevar a cabo su cometido antitumoral y concentrar células fagocíticas para eliminar y reparar el sitio de la lesión. Los avances recientes en estudios de la biología de los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) sugieren que las funciones de los CAF son heterogéneas y que están compuestas por poblaciones funcionalmente distintas, incluidos los CAF que promueven el cáncer (pCAF) y los que lo restringen (rCAF) (Mizutani Y, 2019). En nuestro caso, los fibroblastos observados al MO en la línea CBI⁻ (Fig. 6e) estarían restringiendo el crecimiento del tumor y serían, en parte, responsables del rechazo tumoral observado en dicha línea.

También, deben considerarse las diferencias observadas en la proliferación de las células tumorales en ambas líneas, lo cual está directamente relacionado con el crecimiento tumoral. Por ejemplo, al día 10, en los animales CBI⁻ se evidencian reducidos focos viables que se distribuyen de manera difusa y nula presencia de figuras mitóticas (Fig. 6e), mientras que en CBI, la distribución de células viables es periférica y está organizada en cúmulos o nidos en sostenido avance e invasión (Fig. 5e). En base a esto, un buen punto para destacar es que, si bien en ambos casos se trata del mismo tumor (M-406), es evidente que el genotipo de ambas líneas favorece la generación de un microambiente propicio que impide o favorece la división celular, permitiendo a su vez la eliminación o el escape tumoral, respectivamente.

La presencia de plasmocitos, células especializadas en la síntesis y liberación de anticuerpos, es evidenciable al final de la fase de eliminación (Fig. 6h). Si bien el mecanismo antitumoral, por lo general, implica procesos de características celulares y no humorales, no se puede descartar la participación de un mecanismo con estas características. La hipótesis de la participación en la respuesta antitumoral de un mecanismo de inmunidad humoral estaría apoyada por la notoria presencia de los plasmocitos al final de la fase de eliminación tumoral, sugiriendo una posible respuesta linfocitaria de tipo retardada.

Las diferencias observadas en el crecimiento tumoral, en los dos genotipos parentales CBi (susceptible) y CBi⁻ (resistente), nos llevaron a evaluar posibles diferencias en la concentración de citoquinas circulantes que pudieran explicar la respuesta frente a la inoculación s.c. del adenocarcinoma de mama M-406. Si bien no se observaron diferencias en escape o eliminación (Fig. 8), si encontramos que en la fase de crecimiento la concentración de IL-4 e IFN- γ (Fig. 7a y f, respectivamente) fue mayor e IL-10 menor (Fig. 7d) en los animales CBi comparados con los animales CBi⁻, sugiriendo que, en nuestro modelo, IL-4 e IFN- γ tendrían un rol pro-tumoral, estimulando el crecimiento y posterior escape tumoral en los animales CBi y mientras que IL-10 estaría cumpliendo un rol antitumoral, promoviendo la posterior eliminación del tumor en los animales CBi⁻. Esto coincide con lo observado previamente en los animales de la línea CBi/L, derivada del mismo experimento de selección que la línea CBi⁻, inoculados con M-406 s.c. los que, en fase de eliminación, presentan niveles altos de IL-10 y niveles bajos de IL-4 e IFN- γ . A su vez, la viabilidad de las células de M-406 fue baja, cuando se incubaron con medios condicionados que contenían altas concentraciones de IL-10. (Giúdice AD, 2020). A su vez, otros autores observaron que IL-10 podría estimular la diferenciación y el crecimiento de los linfocitos CD8⁺, lo que indica un papel inmunoestimulador (MacNeil IA, 1990; Chen WF, 1991). Por el contrario, Zou y col. encontraron, en pacientes con cáncer gástrico, niveles plasmáticos elevados de IL-10 asociados con un mayor tamaño del tumor (Zou Z, 2018).

Es sabido que la generación de los híbridos F1, derivados de la primera generación obtenida del cruzamiento entre dos cepas consanguíneas distintas, si bien son genéticamente uniformes (isogénicas), serán heterocigotas para todos los loci en los que

difieran las cepas parentales. La uniformidad genética a través del tiempo es una de las ventajas más claras de estas cepas de ratones y debido a su carácter híbrido presentan mayor resistencia a enfermedades y a cambios ambientales que las cepas que les dieron origen (Carbone C, 2021).

Como lo hicimos previamente, evaluamos el comportamiento del tumor en los animales de la primera filial del cruzamiento recíproco entre ambas líneas parentales, F1A y F1B, las cuales evolucionaron de forma similar a lo observado anteriormente (Cáceres JM, 2015), mostrando un crecimiento exponencial en el 100 % de los animales (Fig. 9a y b). Estos resultados, sumados al hecho de que no se encontraron diferencias en el tiempo de latencia, en la constante de velocidad de crecimiento ni en el tiempo medio de duplicación tumoral, entre ambos híbridos recíprocos (Fig. 9c, d y e), nos permitieron estudiar el crecimiento tumoral en forma conjunta en todos los animales de la F1.

Con el fin de identificar el patrón hereditario del carácter susceptible y/o resistente, evaluamos en la fase de crecimiento tumoral, los diferentes parámetros derivados de la ecuación de crecimiento exponencial de los tres genotipos estudiados. Observamos que los animales CBi⁻ presentan mayor tiempo de latencia (Fig. 10a), mayor constante de velocidad (Fig. 10b) y menor tiempo medio de duplicación tumoral (Fig. 10c) comparado con los animales CBi y F1, confirmando nuevamente que el tumor en la línea CBi⁻ tarda más tiempo en comenzar a crecer, pero crece a una velocidad mayor que CBi y F1, logrando duplicar su volumen tumoral en menor cantidad de tiempo, pero alcanzando menor volumen máximo tumoral. Por otro lado, al comparar el crecimiento tumoral en los genotipos CBi y F1, en los que el tumor crece y escapa, observamos que el mismo se comportó de manera similar en ambos genotipos. Sin embargo, se observó un mayor tiempo de latencia ($P < 0,01$) y menor constante de velocidad ($P < 0,05$) en los animales F1 comparado con los animales CBi, sugiriendo que el tumor tarda más tiempo en comenzar a crecer en los animales F1 y luego crece más lento comparado con los animales CBi. Estas diferencias podrían deberse, en parte, a la presencia de genes CBi y CBi⁻ en los híbridos F1, haciendo que, si bien el tumor en los animales F1 se comporta de forma similar a los animales CBi (el tumor crece y escapa),

la presencia de genes CBi^- en los híbridos F1, harían que el tumor tarde más tiempo en comenzar a crecer y cuando crece, lo hace a una velocidad menor que en CBi . La respuesta de los híbridos recíprocos, similar a la observada en la línea parental CBi , permite concluir que, aun admitiendo una base poligénica para los fenómenos de susceptibilidad y resistencia involucrados en este modelo, la línea CBi sería portadora de alelos de susceptibilidad, en tanto posibilitan el crecimiento de M-406, mientras que la línea CBi^- portaría alelos de resistencia cuya expresión llevan al rechazo tumoral. Al igual que lo observado por Cáceres y col. al aplicar la metodología mendeliana clásica, nuevamente pudimos observar que el fenotipo susceptible es dominante frente al resistente (Cáceres JM, 2015).

Considerando la importancia de las células del sistema inmune tanto en la inmunovigilancia como en la promoción de la progresión tumoral a través de la inmunosupresión y teniendo en cuenta las diferencias observadas en los animales pertenecientes a los tres genotipos al ser inoculados con el adenocarcinoma de mama M-406, estudiamos algunas de las poblaciones circulantes en las condiciones basales, y durante las fases de crecimiento y escape (CBi y F1) o crecimiento y eliminación tumoral (CBi^-), como forma de evaluar, en parte, la respuesta inmune desarrollada, previo y post desafío tumoral y su posible influencia en la herencia de la susceptibilidad al escape o eliminación tumoral.

Al evaluar las células circulantes $CD4^+$, $CD8^+$, Tregs y Th17 en condiciones basales, previo al desafío tumoral (Fig. 11), se observó un menor porcentaje de linfocitos Tregs en los animales CBi^- (fenotipo resistente) respecto a los animales CBi y F1 (fenotipos susceptibles) (Fig. 11c), lo que sugirió que en los genotipos susceptibles se presentaba un estado inmunosupresor que podría inicialmente permitir el crecimiento tumoral. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, dicha condición se revierte en la fase de crecimiento (Fig. 12c), donde se observa una disminución de células Tregs tanto en CBi (basal vs crecimiento, $P < 0,001$) como en F1 (basal vs crecimiento; $P < 0,0001$), sin observarse cambios en la línea CBi^- . Esta disminución de linfocitos Tregs circulantes en los animales

donde el tumor escapa (CBI y F1) podría deberse a que los mismos se han acumulado en el infiltrado tumoral. De la misma manera, en los animales CBI⁻ en fase de crecimiento, observamos un menor porcentaje de células Tregs intratumorales comparados con los animales F1, lo que explicaría el rechazo tumoral de esta línea. (Fig. 14c). Por otro lado, al comparar los linfocitos Tregs intratumorales en la fase de crecimiento en los animales CBI y CBI⁻, pudimos observar que los tumores provenientes de los animales CBI⁻ presentan un menor porcentaje de dichas células comparados con los tumores provenientes de CBI (P<0,01). Nuestros resultados coinciden con los de Huang y col. que observaron un aumento del infiltrado de linfocitos Tregs dentro del tejido de TNBC en comparación con el tejido mamario normal (Huang P, 2023), así como también su presencia empeora la progresión, conduce a un peor pronóstico y contribuye a la resistencia a la inmunoterapia (Bohling SD, 2008; Jiang D, 2015; Ali HR, 2014; Bates GJ, 2006; Droeser R, 2012; Liu F, 2011; Maeda N, 2014; Papaioannou E, 2019; Sun S, 2014).

Por otro lado, se observó un mayor porcentaje de linfocitos circulantes basales CD4⁺ en los animales de la línea CBI⁻ comparados con los animales F1 (Fig. 11a). Esta diferencia se vuelve a observar cuando el tumor está en franco escape en F1 y en eliminación en CBI⁻ (Fig. 13a). A su vez, este mismo resultado se observó en los linfocitos CD4⁺ infiltrantes de tumor, tanto en fase de crecimiento (Fig. 14a) como en franco escape en F1 y en eliminación en CBI⁻ (Fig. 15a). Esto nos sugiere, que en este modelo quizás los linfocitos CD4⁺ sean capaces de estimular la producción de eosinófilos de manera temprana (Fig. 6b y c), y esto permitiría el pronto rechazo tumoral observado en CBI⁻ (Blomberg OS, 2023). Como es sabido, los linfocitos CD4⁺, si bien son actores importantes dentro del microambiente tumoral, pueden polarizarse en subconjuntos Th1, Th2, Th17 y Tregs. Las citoquinas determinadas no permitieron definir alguno de los perfiles señalados, ya que CBI⁻ en fase de crecimiento presentó menor concentración de IL-4, (citoquina Th2), mayor de IL-10 (perfil Th2) y menor de IFN- γ (citoquina Th1). Probablemente, el balance de estas y otras citoquinas es el que determina el perfil inmuno-estimulante que se observó en CBI⁻ o inmuno-supresor que se presentó en CBI y F1. Igualmente, en fase de crecimiento, observamos en el microambiente tumoral que en los tumores provenientes de CBI⁻

presentaron un mayor número de células CD4⁺ y menor número de células Tregs, comparados con los otros dos genotipos, lo que sugiere que en CBI⁻ dichas células presentarían un perfil inmunoestimulante que determinan el rechazo tumoral (Fig. 14).

Al determinar el porcentaje de linfocitos CD8⁺ circulantes en los tres genotipos, las diferencias que se observan no explican por sí mismas el comportamiento del tumor. Sin embargo, cuando estudiamos dichas células en el microambiente tumoral observamos, en la fase de crecimiento, un mayor porcentaje de los mismos en la línea CBI⁻ en relación a F1 (Fig. 14b), diferencia que también se observa en la fase de escape y/o eliminación (Fig. 15b). Al comparar nuevamente ambas líneas parentales, CBI⁻ presentó un mayor porcentaje de linfocitos CD8⁺ intratumorales en comparación con CBI en ambas fases ($P < 0,05$) ($P < 0,01$). Esto sugiere que el mayor porcentaje de linfocitos CD8⁺ intratumorales serían responsables, en parte, de la eliminación tumoral observada en la línea resistente. Al igual que lo observado por Cheng y col. no descartamos que los eosinófilos observados en la línea CBI⁻ (Fig. 6b y c) podrían estar reclutando esta población de linfocitos citotóxicos (Cheng JN, 2021).

Al determinar el porcentaje de linfocitos Th17 circulantes en condiciones basales se observó un mayor porcentaje de los mismos en los animales F1 respecto a los animales CBI (Fig. 11d), sin embargo, dicha diferencia desaparece en la fase de crecimiento (Fig. 12d), debido a una disminución de los linfocitos Th17 en los animales F1 (basal vs crecimiento, $P < 0,0001$), sin observarse cambios en la línea CBI. Esta disminución de linfocitos Th17 circulantes en los animales F1 podría deberse a que los mismos se encuentran presentes en el infiltrado tumoral, ya que tanto en la fase de crecimiento, como en la fase de escape y/o eliminación observamos un mayor porcentaje de células Th17 intratumorales en los animales F1 comparados con los animales CBI (Fig. 14d y 15d, respectivamente). Como nos ha ocurrido con cada uno de los parámetros estudiados, la determinación de esta única variable ya sea circulante como intratumoral, por sí misma no explica los resultados obtenidos en relación al crecimiento tumoral. Por otro lado, sabemos que la función de

estas células en los tumores depende en gran medida del contexto, presentando una actividad tanto promotora como supresora de tumores (Karpishev V, 2022).

Al determinar el porcentaje de linfocitos circulantes en fase de escape y/o eliminación (Fig. 13) observamos un mayor porcentaje de células CD8⁺, Treg y Th17 en los animales F1 comparado con líneas parentales (Fig. 13b, c y d respectivamente). Estos resultados podrían explicar, en parte, las diferencias observadas en los parámetros de la ecuación de la curva de crecimiento exponencial, cuando los tumores están creciendo en los tres genotipos (Fig. 10). Como vimos anteriormente, el tumor comienza a crecer más rápido en los animales CBi⁻ comparado con CBi y F1 (Fig. 4b); y al comparar el comportamiento tumoral entre los genotipos donde el tumor crece y escapa, se observó que en la línea CBi el mismo crece más rápido que en F1 (P<0,05). Las diferencias observadas al determinar el porcentaje de linfocitos en los 3 genotipos podrían deberse, en parte, a que, en esta fase el tumor en los animales CBi ya está en franco escape y en los animales CBi⁻ en franca eliminación. Sin embargo, en los animales F1 aún está actuando la respuesta inmune antitumoral poniendo en juego diferentes mecanismos que serían responsables, en parte, de que el tumor crezca más lento y tarde más tiempo en escapar.

Con el fin de profundizar en los distintos eventos involucrados en las diferencias observadas en la respuesta al desafío con el adenocarcinoma de mama M-406 en los tres genotipos evaluados, determinamos los cambios producidos en el MAT.

Uno de los eventos más importantes en el crecimiento y el desarrollo tumoral y metastásico, es el proceso angiogénico ya que permite el suministro de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento tanto para promover el crecimiento tumoral, como para la diseminación de células tumorales a órganos distantes. (Weidner N, 1991; Li T, 2018).

El factor HIF-1 α está íntimamente relacionado con el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que irrigan el tumor. Numerosos estudios han demostrado que la vía HIF-1 α /VEGF está implicada en la inmunidad tumoral, la inflamación, la lesión por isquemia-reperfusión, el estrés oxidativo y diferentes procesos fisiopatológicos de angiogénesis y

remodelación vascular. (Chen W, 2022). Con el fin de determinar las posibles diferencias que se pudieran generar en este evento, y que pudieran ser responsables del crecimiento o rechazo tumoral, determinamos el número de células HIF-1 α ⁺ en los tumores provenientes de los animales CBi y CBi⁻. Observamos que tanto en la fase de crecimiento como en la fase de escape y/o eliminación (Fig. 17a y b, respectivamente), los tumores provenientes de los animales CBi presentaron mayor número de células HIF-1 α ⁺ respecto a los tumores provenientes de los animales CBi⁻, lo que indicaría un mayor estímulo angiogénico en la línea susceptible. Sin embargo, cuando comparamos histológicamente los tumores provenientes de los animales CBi y CBi⁻ en los primeros días de crecimiento tumoral (Fig. 5a, b y c), observamos una mayor irrigación tumoral en los tumores provenientes de los animales CBi⁻ comparados con CBi, así como también un mayor número de eosinófilos. Esto concuerda con Carretero y col. que observaron que la transferencia de eosinófilos y células T al sitio del tumor inducen la normalización de la vasculatura y la polarización de los macrófagos hacia el tipo M1, con una menor expresión de genes VEGF y HIF-1 α (Carretero R, 2015).

El desarrollo del tumor también depende de diferentes componentes del MAT, como el estroma tumoral, que permite o impide la llegada de las células involucradas en la respuesta inmune, así como los diferentes fármacos utilizados en la terapia antitumoral. Con el fin de profundizar sobre las diferencias observadas en los tumores provenientes de los animales CBi y CBi⁻ y poder determinar aquellos marcadores que pudieran ser responsables, del crecimiento o rechazo tumoral, evaluamos diferentes componentes de la matriz extracelular. Para ello determinamos el porcentaje de área cubierta por campo de la proteína α -SMA como marcador de miofibroblastos estromales, la cual nos señala las poblaciones de CAFs, siendo los mismos capaces de expresar variedad de factores de crecimiento y quimiocinas inflamatorias que participan en la remodelación del estroma del tumor, la regulación de la motilidad de las células tumorales y la inducción de las células tumorales hacia fenotipos que son más resistentes a la quimioterapia (Liu L, 2016). En nuestro trabajo, observamos, contrariamente a lo esperado, en la fase de crecimiento (Fig. 22a), un mayor porcentaje de α -SMA en los tumores provenientes de los animales CBi⁻ en

comparación con tumores provenientes de CBI, diferencia que se revierte en la fase de escape y/o eliminación tumoral (Fig. 22b). Estos resultados coinciden con lo observado al MO (Fig. 6e), donde los fibroblastos en la línea CBI⁻ estarían ejerciendo un rol antitumoral y serían en parte, responsables del rechazo tumoral observado en dicha línea. Varios estudios han demostrado la presencia de ciertas poblaciones de CAF que suprimen el crecimiento tumoral (Zhang J, 2013; Özdemir BC, 2014; Rhim AD, 2014; Shin K, 2014; Maris P, 2015; Pallangyo CK, 2015; Gerling M, 2016).

Asimismo, determinamos el colágeno, ya que el mismo juega un papel fundamental en la regulación de la progresión del cáncer de mama y la resistencia terapéutica. Más allá de que no se observan diferencias cuantitativas al evaluar el porcentaje de área cubierta de colágeno por campo en las fases estudiadas (Fig. 25a y b, respectivamente), sí se encontraron al evaluar el colágeno peritumoral. En la fase de crecimiento en la línea CBI, en la región peritumoral, observamos desmoplasia caracterizada por el marcado depósito de colágeno a nivel de la matriz extracelular (Fig. 26a), mientras que en la línea CBI⁻ el tumor se encuentra delimitado por delgados tabiques de colágeno (Fig. 26b). Por otro lado, en la fase de escape o eliminación observamos en CBI, en la región peritumoral, un marcado depósito de haces de fibras de colágeno que tabica los cúmulos tumorales (Fig. 27a), mientras que en CBI⁻ se observa colágeno de fibras pequeñas, sin viabilidad tumoral apreciable (Fig. 27b). Samar y col. observaron en carcinomas adenoides quísticos y epitelial-mioepitelial malignos predominio de fibras de colágeno tipo I, mientras que en el adenoma pleomórfico benigno encontraron mayor predominio de colágeno tipo III. (Samar ME, 2012). La tinción realizada no permite diferenciar las fibras de colágeno tipo I del tipo III, o fibras reticulares, pero podemos inferir que las fibras que se observan en los tumores provenientes de los animales CBI y CBI⁻ son diferentes y cumplirían diferente función en el crecimiento o el rechazo tumoral.

Como mencionamos anteriormente, el desarrollo de metástasis es un proceso complejo que implica múltiples pasos secuenciales (Massagué J, 2016). Como uno de los principales sitios metastásicos del cáncer de mama es el pulmón, evaluamos la presencia

de metástasis espontáneas pulmonares en los animales CBi y F1, en los que el tumor crece y escapa. Observamos que los animales CBi no presentaron metástasis pulmonares mientras que los animales F1 si lo hicieron (Fig. 16 y tabla III). Esto podría deberse a que el tumor crece más lento en los animales F1 comparados con los tumores de los animales CBi ($P < 0,05$), permitiendo a las células tumorales llegar al sitio metastásico antes de alcanzar el máximo permitido, momento en que se sacrifica al animal.

Como lo hemos mencionado previamente, el desarrollo de las metástasis depende, entre otros factores, del proceso angiogénico, así como también de la estructura del MAT, razón por la cual evaluamos el número de células HIF-1 α^+ , el número de CAF y el colágeno intratumoral en muestras de tumores de ratones CBi y F1 cuando alcanzaron el máximo tamaño tumoral permitido.

Desde el punto de vista cuantitativo se observó, en F1, una menor proporción de células α -SMA $^+$ pero un mayor porcentaje de colágeno (Fig. 28) al comparar con CBi, lo que podría ser contradictorio, ya que se presume que, en un tumor en crecimiento los CAF son los productores de proteínas de la MEC (Alexander J, 2016). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que ciertas características adquiridas por las células cancerosas, como la pérdida de la señalización de TGF β , resulta específicamente en una mayor producción de MEC (Laklai H, 2016).

Por otro lado, se observó una mayor expresión de HIF-1 α (Fig. 23) en los tumores provenientes de los híbridos F1 en comparación con aquellos provenientes de los animales CBi, lo que indicaría un fenotipo más invasivo que podría estar promoviendo la transición epitelio mesénquima (del inglés: *Epithelial Mesenchymal Transition*, EMT) la cual se caracteriza por la pérdida de adhesión célula-célula y la adquisición de motilidad, confiriendo a las células una mayor capacidad migratoria, invasividad y una elevada resistencia a la apoptosis, lo que se traduce como un fenotipo metastásico más agresivo (Wang HY, 2022). Estudios recientes han demostrado que HIF-1 α desempeña funciones importantes en la EMT inducida por hipoxia al promover una amplia gama de factores de transcripción de la misma a través de múltiples vías de señalización en varios tipos de

tumores, promoviendo las metástasis y asociándose con una tasa de supervivencia general más baja (Tam SY, 2020).

CONCLUSIONES

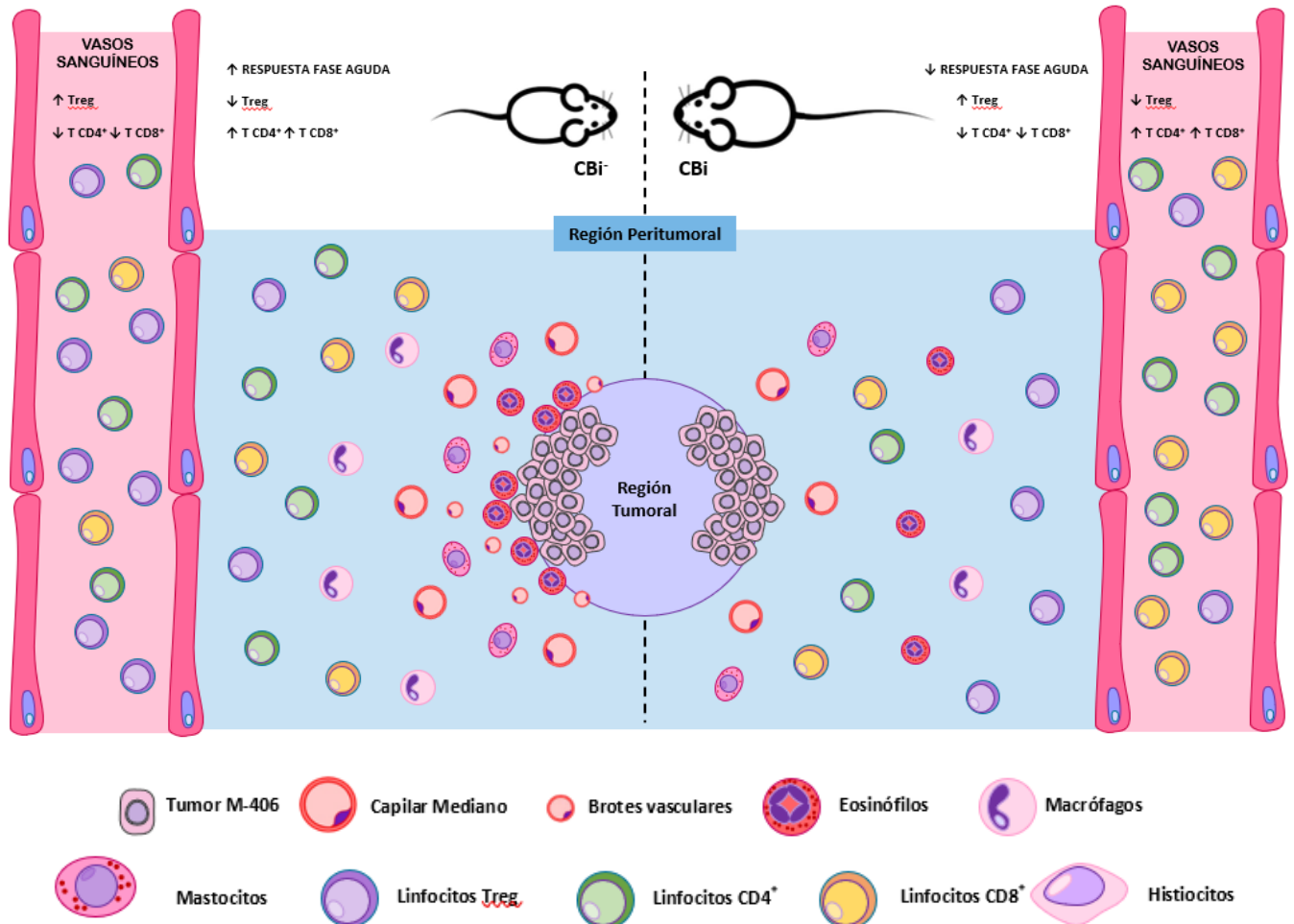
- Las líneas antagónicas CBi (susceptible) y CBi^r (resistente), los híbridos F1 y el adenocarcinoma de mama M-406 constituyen un modelo interesante para caracterizar las poblaciones celulares y el microambiente tumoral involucrados en el crecimiento y/o rechazo tumoral.
- Al igual que lo observado previamente, al desafiar de forma s.c. con el adenocarcinoma de mama M-406, el tumor creció en forma exponencial en el 100% de los animales de la línea CBi, y en los híbridos recíprocos F1, fenotipos susceptibles, y en la línea CBi^r el mismo comenzó a crecer y luego de un periodo de tiempo fue rechazado en el 100 % de los animales, fenotipo resistente.
- El análisis de las curvas de crecimiento exponencial nos permitió observar que el tumor en la línea CBi^r tarda más tiempo en comenzar a crecer y lo hace a una velocidad mayor que CBi y F1, logrando duplicar su volumen tumoral en menor cantidad de tiempo, pero alcanzando menor volumen máximo tumoral. Al comparar el crecimiento tumoral en los genotipos CBi y F1, en los que el tumor crece y escapa, observamos que el mismo se comportó de manera similar en ambos genotipos, aunque el tumor tarda más tiempo en comenzar a crecer en los animales F1 y luego crece más lento comparado con los animales CBi.
- Aun admitiendo una base poligénica para los fenómenos de susceptibilidad y resistencia involucrados en este modelo, podemos concluir que el comportamiento del tumor en los híbridos F1, se debería a que portan tanto alelos de susceptibilidad derivados de la línea parental CBi como alelos de resistencia derivados de la línea parental CBi^r, los que harían que el tumor tarde más tiempo en comenzar a crecer y cuando crezca lo haga a una velocidad menor que en los animales CBi.

- Al igual que lo observado previamente, al aplicar la metodología mendeliana clásica, nuevamente pudimos observar que el fenotipo susceptible es dominante frente al resistente.
- La mayor irrigación observada en los animales CBi⁻ en los primeros días de crecimiento tumoral comparada con los animales CBi, permitirían el reclutamiento de los distintos componentes de la respuesta inmune innata en el sitio del tumor, que serían responsables, en parte, del rechazo tumoral en dicha línea.
- El mayor número de eosinófilos observados en los tumores de la línea CBi⁻ comparados con los de la línea CBi serían responsables, en parte, de la eliminación tumoral observada en dichos animales.
- En nuestro modelo, IL-4 e IFN- γ estarían ejerciendo un rol inmunosupresor y, por el contrario, IL-10 tendría una actividad antitumoral.
- Los fibroblastos en la línea CBi⁻ estarían ejerciendo un rol antitumoral y serían, en parte, responsables del rechazo tumoral observado en dicha línea.
- El mayor porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺, así como el menor porcentaje de linfocitos Tregs en el microambiente tumoral observado en los animales CBi⁻ comparados con los animales CBi y F1 en la fase de crecimiento explicarían, en parte, el rechazo tumoral de esta línea.
- Los animales F1 presentaron metástasis pulmonares mientras que los animales CBi no lo hicieron.
- La mayor expresión de células HiF-1 α ⁺, el mayor porcentaje de colágeno en la MEC, y el menor número de células α -SMA⁺ en los tumores provenientes de los híbridos F1 en comparación con aquellos provenientes de los animales CBi, serían responsables, en parte, de un fenotipo más invasivo y del desarrollo de metástasis observada en dicha línea.

A modo de resumen hemos diseñado un modelo teórico para explicar de forma conjunta los eventos más importantes que están teniendo lugar tanto en el rechazo como en el crecimiento tumoral.

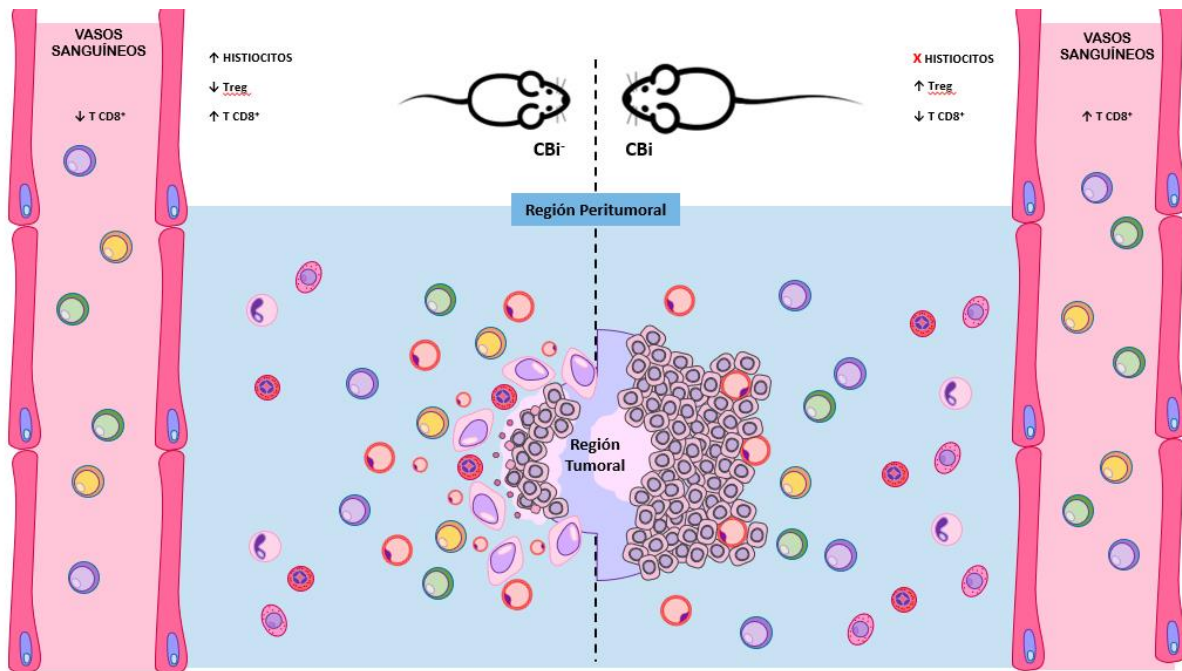
En la fase de crecimiento en la línea CBi⁻ observamos mayor número de eosinófilos, macrófagos y mastocitos intratumorales, y mayor irrigación tumoral comparado con CBi, poniendo en evidencia un aumento y eficiencia de la respuesta inmune de fase aguda. Por otro lado, en la línea donde el tumor es rechazado, observamos un mayor porcentaje de linfocitos Treg y menor porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ circulantes pero un menor porcentaje de linfocitos Treg y mayor porcentaje de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en el infiltrado tumoral, contrariamente a lo que se observó en la línea donde el tumor escapa.

MODELO TEÓRICO: Fase de Crecimiento



Por otro lado, cuando el tumor está en la fase de eliminación en la línea CBi⁻, observamos mayor número de histiocitos en el infiltrado tumoral, así como también un mayor porcentaje de linfocitos CD8⁺ y menor porcentaje de células Treg. A su vez, cuando el tumor en la fase de escape en la línea CBi, podemos ver en nuestro modelo, como las células tumorales han escapado del reconocimiento del sistema inmune innato y adaptativo y se observa una masa tumoral en expansión.

MODELO TEÓRICO: Fase de Escape/Eliminación tumoral



Los ensayos realizados en este trabajo nos permitieron profundizar en los mecanismos de susceptibilidad y/o resistencia tumoral e indagar en la forma de herencia que se presenta en el modelo animal utilizado. A pesar de la existencia de la inmunovigilancia, las células tumorales comúnmente presentan múltiples mecanismos de evasión a la respuesta inmune, que permiten su crecimiento eficiente. Aún nos falta mucho por estudiar para comprender con mayor certeza, cuál o cuáles son los mecanismos involucrados en el escape tumoral responsables del crecimiento del tumor en los genotipos CBi y F1, y el rechazo del mismo en los animales de la línea CBi⁻. Sin embargo, nuestros resultados nos alientan para seguir caracterizando el modelo, como forma de comprender de manera más profunda los eventos que acompañan al escape y/o eliminación tumoral,

así como también el crecimiento, invasión y el desarrollo de metástasis de los TNBC. Esto permitirá en un futuro diseñar nuevas estrategias terapéuticas que sean eficientes en el tratamiento del cáncer de mama en general, y de los tumores de mama triple negativos en particular, dada su especial agresividad y pobre pronóstico asociado.

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Ghazaleh, R. I., Gleich, G. J. & Prendergast, F. G. (1992). Interaction of eosinophil granule major basic protein with synthetic lipid bilayers: a mechanism for toxicity. *The Journal of membrane biology*, 128(2), 153–164. <https://doi.org/10.1007/BF00231888>

Aggarwal, B. B., Vijayalekshmi, R. V. & Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(2), 425–430. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0149>

Alexander, J. & Cukierman, E. (2016). Stromal dynamic reciprocity in cancer: intricacies of fibroblastic-ECM interactions. *Current opinion in cell biology*, 42, 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.05.002>

Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S. J., et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(8), 1536–1543. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu191>

Allen, M. & Louise Jones, J. (2011). Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of pathology*, 223(2), 162–176. <https://doi.org/10.1002/path.2803>

Alshaker, H. A. & Matalka, K. Z. (2011). IFN- γ , IL-17 and TGF- β involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. *Cancer cell international*, 11, 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-11-33>

Amersfoort, J., Eelen, G. & Carmeliet, P. (2022). Immunomodulation by endothelial cells partnering up with the immune system? *Nature reviews. Immunology*, 22(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00694-4>

Angell, H. & Galon, J. (2013). From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current opinion in immunology*, 25(2), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.03.004>

Angiolillo, A. L., Sgadari, C. & Tosato, G. (1996). A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 795, 158–167. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb52664.x>

Arnold, I. C., Artola-Boran, M., Gurtner, A., et al. (2020). The GM-CSF-IRF5 signaling axis in eosinophils promotes antitumor immunity through activation of type 1 T cell responses. *The Journal of experimental medicine*, 217(12), e20190706. <https://doi.org/10.1084/jem.20190706>

Bailey, S. R., Nelson, M. H., Himes, R. A., et al. (2014). Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Frontiers in immunology*, 5, 276. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00276>

Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., Di Tomaso, E., et al. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer cell*, 11(1), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.021>

Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., et al. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(34), 5373–5380. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9584>

Baumgarten, S. C. & Frasor, J. (2012). Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(3), 360–371. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1302>

Benavides, F.J. & Guénet, J.L. (2003). Genética de Histocompatibilidad. En *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones*, F.J., Benavides &

J.L., Guénet, 137-151. Editorial: Universidad de Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones. CEGAL. ISBN-10: 8481385840 ISBN-13: 978-8481385847

Benavides, F.J. & Guénet, J.L. (2003). Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética. En *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones*, F.J., Benavides & J.L., Guénet, 101-124. Editorial: Universidad de Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones. CEGAL. ISBN-10: 8481385840 ISBN-13: 978-8481385847

Bergin, A. R. T. & Loi, S. (2019). Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-1342. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18888.1>

Berner, V., Liu, H., Zhou, Q., et al. (2007). IFN-gamma mediates CD4+ T-cell loss and impairs secondary antitumor responses after successful initial immunotherapy. *Nature medicine*, 13(3), 354–360. <https://doi.org/10.1038/nm1554>

Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., et al. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature reviews. Clinical oncology*, 13(11), 674–690. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66>

Bieging-Rolett, K. T., Johnson, T. M., Brady, C. A., et al. (2016). p19(Arf) is required for the cellular response to chronic DNA damage. *Oncogene*, 35(33), 4414–4421. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.490>

Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., et al. (2001). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(6), 1661–1668.

Blomberg, O. S., Spagnuolo, L., Garner, H., et al. (2023). IL-5-producing CD4+ T cells and eosinophils cooperate to enhance response to immune checkpoint blockade in breast cancer. *Cancer cell*, 41(1), 106–123.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.11.014>

Bode, J. G., Nimmegern, A., Schmitz, J., et al. (1999). LPS and TNF α induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS letters*, 463(3), 365–370. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01662-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01662-2)

Bohling, S. D. & Allison, K. H. (2008). Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(12), 1527–1532. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.160>

Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C. F., et al. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 309–314. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.4.309>

Boulland, M. L., Meignin, V., Leroy-Viard, K., et al. (1998). Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas. *The American journal of pathology*, 153(4), 1229–1237. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65667-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65667-2)

Boyano, M. D., Garcia-Vázquez, M. D., López-Michelena, T., et al. (2000). Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. *British journal of cancer*, 83(7), 847–852. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1402>

Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., et al. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *The Journal of experimental medicine*, 178(4), 1223–1230. <https://doi.org/10.1084/jem.178.4.1223>

Bui, J. D. & Schreiber, R. D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Current opinion in immunology*, 19(2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.001>

Bult, C. J., Krupke, D. M., Begley, D. A., et al. (2015). Mouse Tumor Biology (MTB): a database of mouse models for human cancer. *Nucleic acids research*, 43 (Database issue), D818–D824. <https://doi.org/10.1093/nar/gku987>

Burke, J. D. & Young, H. A. (2019). IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Seminars in immunology*, 43, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.05.002>

Cáceres J.M., Pagura L., Di Masso R.J. et al. (2015). Análisis mendeliano de la resistencia/susceptibilidad a un tumor trasplantable de mama en un modelo murino. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 26(2), 83-95.

Cameron, D., Brown, J., Dent, R., et al. (2013). Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 14(10), 933–942. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70335-8)

Capitani M.C., Del Giúdice A., Mainetti L.E., et al. (2020). Tipificación del complejo mayor de histocompatibilidad en dos líneas endocriadas de ratones con comportamiento antagónico frente a un tumor. Resúmenes del XLVIII Congreso Argentino de Genética.

Carbone, C., Ayala, M. A. & Cagliada, M.P. (2021). Calidad Genética. En *Ciencia y Bienestar de los Animales de Laboratorio*, S.N., Milocco, 86. Editorial de la Universidad de La Plata. ISBN 978-950-34-2076-8

Carretero, R., Sektioglu, I. M., Garbi, N., et al. (2015). Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells. *Nature immunology*, 16(6), 609–617. <https://doi.org/10.1038/ni.3159>

Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., et al. (2018). Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in immunology*, 9, 847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>

Cekanova, M. & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy*, 8, 1911–1921. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>

Chen, H., Liakou, C. I., Kamat, A., et al. (2009). Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOS^{hi} T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2729–2734. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813175106>

Chen, M. F., Chen, P. T., Lu, M. S., et al. (2013). IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Molecular cancer*, 12, 26. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-26>

Chen, Q., Daniel, V., Maher, D. W. & Hersey, P. (1994). Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *International journal of cancer*, 56(5), 755–760. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910560524>

Chen, W. F. & Zlotnik, A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 147(2), 528–534.

Chen, W., Wu, P., Yu, F., et al. (2022). HIF-1 α Regulates Bone Homeostasis and Angiogenesis, Participating in the Occurrence of Bone Metabolic Diseases. *Cells*, 11(22), 3552. <https://doi.org/10.3390/cells11223552>

Cheng, J. N., Luo, W., Sun, C., et al. (2021). Radiation-induced eosinophils improve cytotoxic T lymphocyte recruitment and response to immunotherapy. *Science advances*, 7(5), eabc7609. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc7609>

Cho, H. I., Lee, Y. R. & Celis, E. (2011). Interferon γ limits the effectiveness of melanoma peptide vaccines. *Blood*, 117(1), 135–144. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-298117>

Chow, M. T., Möller, A. & Smyth, M. J. (2012). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in cancer biology*, 22(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.004>

Cimino-Mathews, A., Foote, J. B. & Emens, L.A. (2015). Immune targeting in breast cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 29(5), 375–385.

Cirri, P. & Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer metastasis reviews*, 31(1-2), 195–208. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9340-x>

Cohen-Haugenauer O. (2019). Hereditary predisposition to breast cancer: genetics. Prédiposipion héréditaire au cancer du sein - Génétique. *Medecine sciences: M/S*, 35(2), 138–151. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019003>

Coleman, R.E., Gregory, W., Marshall, H., et al. (2013). The metastatic microenvironment of breast cancer: clinical implications. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 22 Suppl 2, S50–S56. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.010>

Correale, P., Rotundo, M.S., Del Vecchio, M. T., et al. (2010). Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 33(4), 435–441. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181d32f01>

Coussens, L.M. & Pollard, J.W. (2011). Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3), a003285. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003285>

Cox, R.D. & Brown, S. D. (2003). Rodent models of genetic disease. *Current opinion in genetics & development*, 13(3), 278–283. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(03\)00051-0](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(03)00051-0)

Crocco M.L., Del Giúdice A., Scotta L., et al. (2013). Inmunosupresión con diferentes drogas de ratones CBI desafiados con un adenocarcinoma de mama. Resúmenes de la Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario: 113.

Del Prete, A., Schioppa, T., Tiberio, L., et al. (2017). Leukocyte trafficking in tumor microenvironment. *Current opinion in pharmacology*, 35, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.05.004>

DeNardo, D.G. & Coussens, L.M. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast cancer research: BCR*, 9(4), 212. <https://doi.org/10.1186/bcr1746>

Dethlefsen, C., Højfeldt, G. & Hojman, P. (2013). The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 138(3), 657–664. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2488-z>

Di Masso, R.J., Abdala, S.B., Sánchez, S.M. & Font, M.T. (1991). Respuesta a la selección divergente por conformación corporal en el ratón. *Mendeliana*, 9(2): 79-92.

Diepenbruck, M. & Christofori, G. (2016). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Current opinion in cell biology*, 43, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>

Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1(6), 447–456. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90087-6)

Ding, X., Zhang, J., Liu, D., et al. (2018). Serum expression level of IL-6 at the diagnosis time contributes to the long-term prognosis of SCLC patients. *Journal of Cancer*, 9(5), 792–796. <https://doi.org/10.7150/jca.22656>

Droeser, R., Zlobec, I., Kilic, E., et al. (2012). Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC cancer*, 12, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-134>

Dulos, J., Carven, G. J., Van Boxtel, S. J., et al. (2012). PD-1 blockade augments Th1 and Th17 and suppresses Th2 responses in peripheral blood from patients with prostate and advanced melanoma cancer. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 35(2), 169–178. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318247a4e7>

Dunn, G.P., Old, L. J., & Schreiber, R.D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>

Dunn, G.P., Old, L.J., & Schreiber, R.D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology*, 22, 329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>

Ebeling, S., Kowalczyk, A., Perez-Vazquez, D. & Mattiola, I. (2023). Regulation of tumor angiogenesis by the crosstalk between innate immunity and endothelial cells. *Frontiers in oncology*, 13, 1171794. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1171794>

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneeskd*, 5: 273-290.

Emens L. A. (2012). Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert review of anticancer therapy*, 12(12), 1597–1611. <https://doi.org/10.1586/era.12.147>

Emens, L. A., Cruz, C., Eder, J. P., et al. (2019). Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA oncology*, 5(1), 74–82. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4224>

Eppig, J. T., Richardson, J. E., Kadin, J. A., et al. (2015). Mouse Genome Informatics (MGI): reflecting on 25 years. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 26(7-8), 272–284. <https://doi.org/10.1007/s00335-015-9589-4>

Ferrara, N. & Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7070), 967–974. <https://doi.org/10.1038/nature04483>

Fiorentino, D.F., Bond, M.W. & Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine*, 170(6), 2081–2095. <https://doi.org/10.1084/jem.170.6.2081>

Folgueira, M. A., Maistro, S., Katayama, M. L., et al. (2013). Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series. *Bioscience reports*, 33(6), e00085. <https://doi.org/10.1042/BSR20130060>

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews. Drug discovery*, 6(4), 273–286. <https://doi.org/10.1038/nrd2115>

Franks, L. M. & Knowles, M. A. (2005). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. En *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, M. A. Knowles, & P. J. Selby (Eds.), Fourth ed.: 1-24. Oxford University Press

Gabryšová, L., Howes, A., Saraiva, M. & O'Garra, A. (2014). The regulation of IL-10 expression. *Current topics in microbiology and immunology*, 380, 157–190. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_8

Galdiero, M. R., Marone, G. & Mantovani, A. (2018). Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(8), a028662. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028662>

Gately, M.K., Gubler, U., Brunda, M. J., et al. (1994). Interleukin-12: a cytokine with therapeutic potential in oncology and infectious diseases. *Therapeutic immunology*, 1(3), 187–196.

Gerling, M., Büller, N.V., Kirn, L.M., et al. (2016). Stromal Hedgehog signalling is downregulated in colon cancer and its restoration restrains tumour growth. *Nature communications*, 7, 12321. <https://doi.org/10.1038/ncomms12321>

Giúdice, A.D., Pagura, L., Capitani, M. C., et al. (2020). Nonclassical roles for IFN- γ and IL-10 in a murine model of immunoediting. *Future science OA*, 6(10), FSO589. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0108>

Goff, S. L. & Danforth, D.N. (2021). The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Clinical breast cancer*, 21(1), e63–e73. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2020.06.011>

Guo, Y., Xu, F., Lu, T., et al. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer treatment reviews*, 38(7), 904–910. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.04.007>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hayes, S. A., Hudson, A. L., Clarke, S. J., et al. (2014). From mice to men: GEMMs as trial patients for new NSCLC therapies. *Seminars in cell & developmental biology*, 27, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.04.002>

Heist, R.S., Duda, D.G., Sahani, D.V., et al. (2015). Improved tumor vascularization after anti-VEGF therapy with carboplatin and nab-paclitaxel associates with survival in lung

cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), 1547–1552. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424024112>

Herrera, V.L., Ponce, L.R. & Ruiz-Opazo, N. (2013). Multiple susceptibility loci for radiation-induced mammary tumorigenesis in F2[Dahl S x R]-intercross rats. *PLoS one*, 8(8), e72143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072143>

Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., et al. (2014). Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer discovery*, 4(9), 998–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>

Hinrichsen, L.I. & Scharovsky, O.G. (2002). Biología de la Célula Tumoral. En *Oncología Molecular y Celular*, Bonfil, RD & Scharovsky, OG., (Eds.), 1 ed.: 39-55. Buenos Aires. Dunken

Hinrichsen, L. & Di Masso, R.J. (2010). Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 21(2).

Hivroz, C., Chemin, K., Turret, M. & Bohineust, A. (2012). Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Critical reviews in immunology*, 32(2), 139–155. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i2.30>

Hollande, C., Boussier, J., Ziai, J., et al. (2019). Inhibition of the dipeptidyl peptidase DPP4 (CD26) reveals IL-33-dependent eosinophil-mediated control of tumor growth. *Nature immunology*, 20(3), 257–264. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0321-5>

<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

Huang, P., Zhou, X., Zheng, M., et al. (2023). Regulatory T cells are associated with the tumor immune microenvironment and immunotherapy response in triple-negative

breast cancer. *Frontiers in immunology*, 14, 1263537.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1263537>

Huang, Y., Goel, S., Duda, D.G., et al. (2013). Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer research*, 73(10), 2943–2948.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4354>

Hulsmans, M., Sager, H. B., Roh, J. D., et al. (2018). Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *The Journal of experimental medicine*, 215(2), 423–440.
<https://doi.org/10.1084/jem.20171274>

Hurkmans, D. P., Kuipers, M. E., Smit, J., et al. (2020). Tumor mutational load, CD8⁺ T cells, expression of PD-L1 and HLA class I to guide immunotherapy decisions in NSCLC patients. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 69(5), 771–777.
<https://doi.org/10.1007/s00262-020-02506-x>

Irminger-Finger, I., Ratajska, M. & Pilyugin, M. (2016). New concepts on BARD1: Regulator of BRCA pathways and beyond. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 72, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.008>

Itakura, E., Huang, R.R., Wen, D.R., et al. (2011). IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(6), 801–809.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.5>

Jain R.K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine*, 7(9), 987–989.
<https://doi.org/10.1038/nm0901-987>

Jain R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5706), 58–62.
<https://doi.org/10.1126/science.1104819>

Jain R.K. (2013). Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(17), 2205–2218. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3653>

Jain, R. K., Duda, D. G., Willett, C. G., et al. (2009). Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 6(6), 327–338. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.63>

Jiang, X. (2014). Harnessing the immune system for the treatment of breast cancer. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1300264>

Jiang, D., Gao, Z., Cai, Z., et al. (2015). Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC cancer*, 15, 727. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1742-7>

Jiang, X. & Shapiro, D. J. (2014). The immune system and inflammation in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.06.003>

Kabbinavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., et al. (2003). Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(1), 60–65. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.10.066>

Kaewkangsan, V., Verma, C., Eremin, J. M., et al. (2018). Tumour-draining axillary lymph nodes in patients with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC): the crucial contribution of immune cells (effector, regulatory) and cytokines (Th1, Th2) to immune-mediated tumour cell death induced by NAC. *BMC cancer*, 18(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4044-z>

Karpishev, V., Ahmadi, M., Abbaszadeh-Goudarzi, K., et al. (2022). The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Cancer cell international*, 22(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02528-8>

Kerbel, R.S., Guerin, E., Francia, G., et al. (2013). Preclinical recapitulation of antiangiogenic drug clinical efficacies using models of early or late stage breast cancer metastasis. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 22 Suppl 2, S57–S65. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.011>

Kerkar, S.P., Goldszmid, R. S., Muranski, P., et al. (2011). IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *The Journal of clinical investigation*, 121(12), 4746–4757. <https://doi.org/10.1172/JCI58814>

Kerkar, S.P., Leonardi, A. J., Van Panhuys, N., et al. (2013). Collapse of the tumor stroma is triggered by IL-12 induction of Fas. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(7), 1369–1377. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.58>

Kharaishvili, G., Simkova, D., Bouchalova, K., et al. (2014). The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer cell international*, 14, 41. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-41>

Klebanoff, C.A., Gattinoni, L. & Restifo, N. P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological reviews*, 211, 214–224. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00391.x>

Klein Wolterink, R. G., Kleinjan, A., Van Nimwegen, M., et al. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *European journal of immunology*, 42(5), 1106–1116. <https://doi.org/10.1002/eji.201142018>

König, A., Vilsmaier, T., Rack, B., et al. (2016). Determination of Interleukin-4, -5, -6, -8 and -13 in Serum of Patients with Breast Cancer Before Treatment and its Correlation to Circulating Tumor Cells. *Anticancer research*, 36(6), 3123–3130.

Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. & Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour biology: the journal of the International Society for Onco developmental Biology and Medicine*, 37(9), 11553–11572. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5098-7>

Labani-Motlagh, A., Ashja-Mahdavi, M. & Loskog, A. (2020). The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Frontiers in immunology*, 11, 940. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00940>

Laklai, H., Miroshnikova, Y. A., Pickup, M.W., et al. (2016). Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nature medicine*, 22(5), 497–505. <https://doi.org/10.1038/nm.4082>

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., et al. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*, 2014, 149185. <https://doi.org/10.1155/2014/149185>

Lasek, W., Zagożdżon, R. & Jakobisiak, M. (2014). Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 63(5), 419–435. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1523-1>

Li, C., Li, H., Jiang, K., et al. (2014). TLR4 signaling pathway in mouse Lewis lung cancer cells promotes the expression of TGF- β 1 and IL-10 and tumor cells migration. *Bio-medical materials and engineering*, 24(1), 869–875. <https://doi.org/10.3233/BME-130879>

Li, T., Kang, G., Wang, T. & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology letters*, 16(1), 687–702. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>

Li, Z., Jiang, J., Wang, Z., et al. (2008). Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer research*, 68(21), 8687–8694. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0449>

Libson, S. & Lippman, M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. *International review of psychiatry (Abingdon, England)*, 26(1), 4–15. <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.852971>

Linehan, D.C., & Goedegebuure, P.S. (2005). CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunologic research*, 32(1-3), 155–168. <https://doi.org/10.1385/IR:32:1-3:155>

Liu, F., Lang, R., Zhao, J., et al. (2011). CD8⁺ cytotoxic T cell and FOXP3⁺ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast cancer research and treatment*, 130(2), 645–655. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1647-3>

Liu, L., Liu, L., Yao, H. H., et al. (2016). Stromal Myofibroblasts Are Associated with Poor Prognosis in Solid Cancers: A Meta-Analysis of Published Studies. *PLoS one*, 11(7), e0159947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159947>

Lobo-Silva, D., Carriche, G.M., Castro, A.G., et al. (2016). Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 297. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0763-8>

Lotfi, R., Lee, J.J. & Lotze, M.T. (2007). Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 30(1), 16–28. <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000211324.53396.f6>

Lu, X. (2017). Impact of IL-12 in Cancer. *Current cancer drug targets*, 17(8), 682–697. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170427102729>

Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology*, 196(4), 395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>

Lv, L., Pan, K., Li, X. D., et al. (2011). The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS one*, 6(3), e18219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018219>

Ma, X. & Trinchieri, G. (2001). Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Advances in immunology*, 79, 55–92. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(01\)79002-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(01)79002-5)

Macdonald, F., Ford, C.H.J. & Casson, A.G. (2005). General Principles. In *Molecular Biology of Cancer*, Bushell G. & Mills H., (Eds.), Second ed.: 1-12. New York: Bios Scientific Publishers

MacNeil, I. A., Suda, T., Moore, K. W., et al. (1990). IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 145(12), 4167–4173.

Maeda, N., Yoshimura, K., Yamamoto, S., et al. (2014). Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients. *Annals of surgical oncology*, 21 Suppl 4(Suppl 4), S546–S554. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3564-2>

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>

Maris, P., Blomme, A., Palacios, A. P., et al. (2015). Asporin Is a Fibroblast-Derived TGF- β 1 Inhibitor and a Tumor Suppressor Associated with Good Prognosis in Breast Cancer. *PLoS medicine*, 12(9), e1001871. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001871>

Maruyama, T., Kono, K., Mizukami, Y., et al. (2010). Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer science*, 101(9), 1947–1954. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01624.x>

Massagué, J. & Obenauf, A.C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature17038>

Mehta, A.K., Kadel, S., Townsend, M.G., et al. (2021). Macrophage Biology and Mechanisms of Immune Suppression in Breast Cancer. *Frontiers in immunology*, 12, 643771. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643771>

Melillo, G. (2006). Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Molecular cancer research: MCR*, 4(9), 601–605. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0235>

Mendes, N., Dias Carvalho, P., Martins, F., et al. (2020). Animal Models to Study Cancer and Its Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, 1219, 389–401. https://doi.org/10.1007/978-3-030-34025-4_20

Mendoza, J. L., Escalante, N. K., Jude, K. M., et al. (2019). Structure of the IFN γ receptor complex guides design of biased agonists. *Nature*, 567(7746), 56–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0988-7>

Merino Bonilla, J. A., Torres Tabanera, M. & Ros Mendoza, L. H. (2017). Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. El cáncer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. *Radiología*, 59(5), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2017.06.003>

Meyskens, F.L., Jr, Kopecky, K.J., Taylor, C. W., et al. (1995). Randomized trial of adjuvant human interferon gamma versus observation in high-risk cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(22), 1710–1713. <https://doi.org/10.1093/jnci/87.22.1710>

Mittal, K., Ebos, J. & Rini, B. (2014). Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. *Seminars in oncology*, 41(2), 235–251. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.02.007>

Mizutani, Y., Kobayashi, H., Iida, T., et al. (2019). Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer research*, 79(20), 5367–5381. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0454>

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>

Mou, H., Kennedy, Z., Anderson, D.G., et al. (2015). Precision cancer mouse models through genome editing with CRISPR-Cas9. *Genome medicine*, 7(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0178-7>

Mu, J., Zou, J. P., Yamamoto, N., et al. (1995). Administration of recombinant interleukin 12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes. *Cancer research*, 55(19), 4404–4408.

Munitz, A. & Levi-Schaffer, F. (2004). Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy*, 59(3), 268–275. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2003.00442.x>

Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., et al. (2014). Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *British journal of cancer*, 110(2), 469–478. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.748>

Nagasaki, T., Hara, M., Shiga, K. & Takeyama, H. (2014). Relationship between inflammation and cancer progression: Recent advances in interleukin-6 signaling and its blockage in cancer therapy. *Recept. Clin. Investig.*, 1(3): 1-7

Nash, M. A., Lenzi, R., Edwards, C. L., et al. (1998). Differential expression of cytokine transcripts in human epithelial ovarian carcinoma by solid tumour specimens, peritoneal exudate cells containing tumour, tumour-infiltrating lymphocyte (TIL)-derived T cell lines and established tumour cell lines. *Clinical and experimental immunology*, 112(2), 172–180. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00576.x>

Nastala, C. L., Edington, H. D., McKinney, T. G., et al. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *153*(4), 1697–1706.

Nemunaitis, J., Fong, T., Shabe, P., et al. (2001). Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer investigation*, *19*(3), 239–247. <https://doi.org/10.1081/cnv-100102550>

Nguyen, K.G., Vrabel, M.R., Mantooth, S. M., et al. (2020). Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, *11*, 575597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575597>

Nicolini, A., Carpi, A. & Rossi, G. (2006). Cytokines in breast cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, *17*(5), 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.07.002>

Nocera, D.N., Gonzalo Nuñez, N., Roselli, E., et al. (2013). Dangerous liasons: inflammation, immunity and cancer. Departamento de Bioquímica Clínica. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Vol. 1 Núm. 3 (1): Bitácora Digital: Tercer Número

Nolen, B.M., Marks, J. R., Ta'san, S., et al. (2008). Serum biomarker profiles and response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Breast cancer research: BCR*, *10*(3), R45. <https://doi.org/10.1186/bcr2096>

Oh, K., Lee, O. Y., Shon, S. Y., et al. (2013). A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast cancer research: BCR*, *15*(5), R79. <https://doi.org/10.1186/bcr3473>

Ohara, M., Yamaguchi, Y., Matsuura, K., et al. (2009). Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, *58*(3), 441–447. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0570-x>

Olver, S., Apte, S., Baz, A. & Kienzle, N. (2007). The duplicitous effects of interleukin 4 on tumour immunity: how can the same cytokine improve or impair control of tumour growth? *Tissue antigens*, 69(4), 293–298. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00831.x>

Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., et al. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>

O'Shea, J. J. & Paul, W. E. (2002). Regulation of T(H)1 differentiation--controlling the controllers. *Nature immunology*, 3(6), 506–508. <https://doi.org/10.1038/ni0602-506>

Ostman, A. & Augsten, M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Current opinion in genetics & development*, 19(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.01.003>

Ostrand-Rosenberg, S. (2008). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current opinion in genetics & development*, 18(1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.12.007>

Otani, T., Nakamura, S., Toki, M., et al. (1999). Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. *Cellular immunology*, 198(2), 111–119. <https://doi.org/10.1006/cimm.1999.1589>

Ouyang, W. & O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50(4), 871–891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>

Özdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer cell*, 25(6), 719–734. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>

Pagura, L., Cáceres, J. M., Cardinale, A., et al. (2014). A mammary adenocarcinoma murine model suitable for the study of cancer immunoediting. *Journal of biomedical science*, 21(1), 52. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-52>

Pagura, L., Cáceres, J.M., Rico, M.J., et al. (2010). Perfil inmunológico en las diferentes etapas de la inmunoección tumoral en un modelo de adenocarcinoma de mama murino. *Medicina (Buenos Aires)*, 70 SUPL.II:424

Pallangyo, C. K., Ziegler, P. K. & Greten, F. R. (2015). IKK β acts as a tumor suppressor in cancer-associated fibroblasts during intestinal tumorigenesis. *The Journal of experimental medicine*, 212(13), 2253–2266. <https://doi.org/10.1084/jem.20150576>

Pandit, R., Scholnik, A., Wulfekuhler, L., & Dimitrov, N. (2007). Non-small-cell lung cancer associated with excessive eosinophilia and secretion of interleukin-5 as a paraneoplastic syndrome. *American journal of hematology*, 82(3), 234–237. <https://doi.org/10.1002/ajh.20789>

Papaioannou, E., Sakellakis, M., Melachrinou, M., et al. (2019). A Standardized Evaluation Method for FOXP3+ Tregs and CD8+ T-cells in Breast Carcinoma: Association with Breast Carcinoma Subtypes, Stage and Prognosis. *Anticancer research*, 39(3), 1217–1232. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13232>

Peng, W., Liu, C., Xu, C., et al. (2012). PD-1 blockade enhances T-cell migration to tumors by elevating IFN- γ inducible chemokines. *Cancer research*, 72(20), 5209–5218. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1187>

Poncin, A., Onesti, C. E., Josse, C., et al. (2021). Immunity and Breast Cancer: Focus on Eosinophils. *Biomedicines*, 9(9), 1087. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091087>

Pottier, C., Wheatherspoon, A., Roncarati, P., et al. (2015). The importance of the tumor microenvironment in the therapeutic management of cancer. *Expert review of anticancer therapy*, 15(8), 943–954. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1059279>

Prokopchuk, O., Liu, Y., Henne-Bruns, D., & Kornmann, M. (2005). Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *British journal of cancer*, 92(5), 921–928. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602416>

Quail, D. F. & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11), 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>

Ramjiawan, R.R., Griffioen, A. W. & Duda, D. G. (2017). Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis*, 20(2), 185–204. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9552-y>

Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D. H., et al. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 25(6), 735–747. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.021>

Rico, M.J., Rozados, V.R., Mainetti, L.E., et al. (2012). *Exp Oncol.*, 34(1):38- 42.

Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M. & Coleman, W. B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *The American journal of pathology*, 183(4), 1113–1124. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>

Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., De Lucca, M., et al. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio [The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation]. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 33(2), 288–299.

Roy, D.M., & Walsh, L.A. (2014). Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 6, 81–91. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S46020>

Ruffell, B., Au, A., Rugo, H. S., et al. (2012). Leukocyte composition of human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 2796–2801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104303108>

Sakai, H., Fujigaki, H., Mazur, S. J. & Appella, E. (2014). Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) forestalls cellular premature senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA damage response signaling during DNA replication. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(6), 1015–1029. <https://doi.org/10.4161/cc.27920>

Samar, M.E., Ávila, R.E., Asis, O.G., et al. (2012). Identificación de Colágeno I y III con Picosirius Red/ Polarización en el Estroma de Tumores Salivales. *International journal of odontostomatology*, 6(1), 59-64. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2012000100008>

Sanders, J. & Samuelson, D. J. (2014). Significant overlap between human genome-wide association-study nominated breast cancer risk alleles and rat mammary cancer susceptibility loci. *Breast cancer research: BCR*, 16(1), R14. <https://doi.org/10.1186/bcr3607>

Saraiva, M. & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>

Sato, T., McCue, P., Masuoka, K., et al. (1996). Interleukin 10 production by human melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2(8), 1383–1390.

Schofield, P.N., Hoehndorf, R. & Gkoutos, G.V. (2012). Mouse genetic and phenotypic resources for human genetics. *Human mutation*, 33(5), 826–836. <https://doi.org/10.1002/humu.22077>

Schughart, K., Libert, C. & Kas, M. J. (2013). Controlling complexity: the clinical relevance of mouse complex genetics. *European journal of human genetics: EJHG*, 21(11), 1191–1196. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.79>

Semenza, G.L. (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & development*, 14(16), 1983–1991.

Sengupta, N., MacFie, T. S., MacDonald, T. T., et al. (2010). Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression. *Pathology, research and practice*, 206(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2009.10.001>

Shibayama, O., Yoshiuchi, K., Inagaki, M., et al. (2014). Association between adjuvant regional radiotherapy and cognitive function in breast cancer patients treated with conservation therapy. *Cancer medicine*, 3(3), 702–709. <https://doi.org/10.1002/cam4.174>

Shin, K., Lim, A., Zhao, C., et al. (2014). Hedgehog signaling restrains bladder cancer progression by eliciting stromal production of urothelial differentiation factors. *Cancer cell*, 26(4), 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.001>

Singh, M., Murriel, C.L. & Johnson, L. (2012). Genetically engineered mouse models: closing the gap between preclinical data and trial outcomes. *Cancer research*, 72(11), 2695–2700. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2786>

Singh, R. & Paterson, Y. (2007). Immunoediting sculpts tumor epitopes during immunotherapy. *Cancer research*, 67(5), 1887–1892. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3960>

Smits, B.M., Haag, J.D., Rissman, A.I., et al. (2013). The gene desert mammary carcinoma susceptibility locus Mcs1a regulates Nr2f1 modifying mammary epithelial cell differentiation and proliferation. *PLoS genetics*, 9(6), e1003549. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003549>

So, J.Y., Ohm, J., Lipkowitz, S. & Yang, L. (2022). Triple negative breast cancer (TNBC): Non-genetic tumor heterogeneity and immune microenvironment: Emerging treatment options. *Pharmacology & therapeutics*, 237, 108253. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108253>

Spill, F., Reynolds, D.S., Kamm, R.D. & Zaman, M. H. (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current opinion in biotechnology*, 40, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.007>

Squartini, F. (1994). Oxford University Press, New York, Pp 47- 100

Stern, L.L., Tarby, C.M., & Tamborini B., et al. (1994). Preclinical development of IL-12 as an anticancer drug: comparison to IL-2. *Proc Am Soc Cancer Res*. 35:520a

Stiedl, P., Grabner, B., Zboray, K., et al. (2015). Modeling cancer using genetically engineered mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1267, 3–18. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2297-0_1

Sullivan, N. J., Sasser, A. K., Axel, A. E., et al. (2009). Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*, 28(33), 2940–2947. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.180>

Sun, S., Fei, X., Mao, Y., et al. (2014). PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 63(4), 395–406. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1519-x>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Suzuki, S., Umezu, Y., Saijo, Y., et al. (1998). Exogenous recombinant human IL-12 augments MHC class I antigen expression on human cancer cells in vitro. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 185(3), 223–226. <https://doi.org/10.1620/tjem.185.223>

Swann, J.B., Vesely, M.D., Silva, A., et al. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(2), 652–656. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708594105>

Tam, S. Y., Wu, V. W. C. & Law, H. K. W. (2020). Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. *Frontiers in oncology*, 10, 486. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00486>

Tan, W., Zhang, W., Strasner, A., et al. (2011). Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*, 470(7335), 548–553. <https://doi.org/10.1038/nature09707>

Taube, J. M., Anders, R. A., Young, G. D., et al. (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science translational medicine*, 4(127), 127ra37. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689>

Teng, M. W., Darcy, P.K. & Smyth, M.J. (2011). Stable IL-10: a new therapeutic that promotes tumor immunity. *Cancer cell*, 20(6), 691–693. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.020>

Teng, M.W., Swann, J.B., Koebel, C.M., et al. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of leukocyte biology*, 84(4), 988–993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>

Tkach, M., Thalmensi, J., Timperi, E., et al. (2022). Extracellular vesicles from triple negative breast cancer promote pro-inflammatory macrophages associated with better clinical outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(17), e2107394119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107394119>

Todaro, M., Alea, M.P., et al. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell stem cell*, 1(4), 389–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001>

Todaro, M., Lombardo, Y., Francipane, M.G., et al. (2008). Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell death and differentiation*, 15(4), 762–772. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402305>

Tolaney, S.M., Boucher, Y., Duda, D.G., et al. (2015). Role of vascular density and normalization in response to neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy in breast cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), 14325–14330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518808112>

Trinchieri, G., Wysocka, M., D'Andrea, A., et al. (1992). Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Progress in growth factor research*, 4(4), 355–368. [https://doi.org/10.1016/0955-2235\(92\)90016-b](https://doi.org/10.1016/0955-2235(92)90016-b)

Varricchi, G., Galdiero, M.R., Loffredo, S., et al. (2017). Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncoimmunology*, 7(2), e1393134. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1393134>

Viallard, C. & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>

Vong, S. & Kalluri, R. (2011). The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes & cancer*, 2(12), 1139–1145. <https://doi.org/10.1177/1947601911423940>

Wai, L.E., Narang, V., Gouillard, A., et al. (2013). In silico modeling of cancer cell dissemination and metastasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1284, 71–74. <https://doi.org/10.1111/nyas.12077>

Waldner, M.J., Foersch, S. & Neurath, M.F. (2012). Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1248–1253. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4614>

Wang, H.Y., Zhang, X.P. & Wang, W. (2022). Regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in hypoxia by the HIF-1 α network. *FEBS letters*, 596(3), 338–349. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14258>

Wang, L. & Liu, X. (2019). Sustained Release Technology and Its Application in Environmental Remediation: A Review. *International journal of environmental research and public health*, 16(12), 2153. <https://doi.org/10.3390/ijerph16122153>

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., et al. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature medicine*, 10(1), 48–54. <https://doi.org/10.1038/nm976>

Watnick R.S. (2012). The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), a006676. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006676>

Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. & Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine*, 324(1), 1–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM199101033240101>

Whittle, J.R., Lewis, M.T., Lindeman, G.J. & Visvader, J. E. (2015). Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast cancer research: BCR*, 17(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0523-1>

Wilson, W. R. & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 11(6), 393–410. <https://doi.org/10.1038/nrc3064>

Wu, C.T., Chen, M.F., Chen, W.C. & Hsieh, C. C. (2013). The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiation oncology (London, England)*, 8, 159. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-159>

Wu, T. & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer letters*, 387, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>

Xing, F., Saidou, J. & Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 15(1), 166–179. <https://doi.org/10.2741/3613>

Yang, L., Pang, Y. & Moses, H. L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in immunology*, 31(6), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.04.002>

Zacarías Fluck, M., Rico, M.J., Scharovsky, O.G., et al. (2007). Uso de modelos animales y modelos matemáticos en el estudio del crecimiento tumoral. El adenocarcinoma de mama M-406 en ratones de la línea CBI. Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2007, FCV-UNR: 192-193

Zaharoff, D.A., Rogers, C.J., Hance, K.W., et al. (2007). Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine*, 25(52), 8673–8686. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.037>

Zamarron, B. F. & Chen, W. (2011). Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *International journal of biological sciences*, 7(5), 651–658. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.651>

Zaynagetdinov, R., Sherrill, T.P., Gleaves, L.A., et al. (2015). Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. *Cancer research*, 75(8), 1624–1634. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2379>

Zeeshan, R. & Mutahir, Z. (2017). Cancer metastasis - tricks of the trade. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 17(3), 172–182. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.1908>

Zeh, H.J., Hurd, S., Storkus, W J. & Lotze, M. T. (1993). Interleukin-12 promotes the proliferation and cytolytic maturation of immune effectors: implications for the immunotherapy of cancer. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology: official journal of the Society for Biological Therapy*, 14(2), 155–161. <https://doi.org/10.1097/00002371-199308000-00012>

Zeng, L., Li, W. & Chen, C. S. (2020). Breast cancer animal models and applications. *Zoological research*, 41(5), 477–494. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.095>

Zhang, J., Chen, L., Liu, X., et al. (2013). Fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells prevent carcinoma through collagen production and encapsulation of carcinogens. *Cancer research*, 73(9), 2770–2781. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3022>

Zhu, A. X., Duda, D.G., Sahani, D. V. & Jain, R. K. (2011). HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(5), 292–301. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.30>

Zou, Z., Zhao, L., Su, S., et al. (2018). The plasma levels of 12 cytokines and growth factors in patients with gastric cancer. *Medicine*, 97(19), e0413. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010413>

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados presentados en esta tesis doctoral dieron origen a las siguientes publicaciones originales:

Trabajos completos

- **Antonela Del Giúdice**, Lucas Pagura, M. Celeste Capitani, Leandro Ernesto Mainetti, O. Graciela Scharovsky, Ricardo José Di Masso, María José Rico, Viviana Rosa Rozados. “NON-CLASSICAL ROLES FOR IFN- γ AND IL-10 IN A MURINE MODEL OF IMMUNOEDITION”. (2020). *Future Sci OA*: 6(10): 589. doi: 10.2144/fsoa-2019-0108.

Trabajos completos resultantes de colaboraciones

- María V Giolito, Cristian M Camacho, Maitena Martínez-Amezaga, Carla I Traficante, Rocío A Giordano, Patricia G Cornier, Ernesto G Mata, Carina MI Delpiccolo, Dora B Boggian, **Antonela Del Giúdice**, Leandro E Mainetti, Olga G Scharovsky, Viviana R Rozados, María J Rico. Antitumor activity of new chemical compounds in triple negative mammary adenocarcinoma models. (2020). *Future Sci OA*: 6(3): 442. doi: 10.2144/fsoa-2019-0057.
- Leandro E Mainetti, María José Rico, Cintia Daniela Kaufman, Monica Carolina Grillo, Julian Guercetti, María Virginia Baglioni, **Antonela Del Giúdice**, Maria Celeste Capitani, Matias Fusini, Viviana Rosa Rozados, O Graciela Scharovsky. Losartan improves the therapeutic effect of metronomic cyclophosphamide in triple negative mammary cancer models. (2020). *Oncotarget*: 11(32):3048-3060. doi: 10.18632/oncotarget.27694.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- Fusini ME, Mainetti LE, Rico MJ, Kaufman CD, Grillo MC, Guercetti J; Baglioni MV, **Del Giúdice A**, Capitani MC, Rozados VR, Scharovsky G. VASCULAR NORMALIZATION OF TRIPLE NEGATIVE MAMMARY ADENOCARCINOMAS TREATED

METRONOMICALLY WITH CYCLOPHOSPHAMIDE (CY) AND LOSARTAN (LOS).
 Medicina (B Aires) 80 - (Supl. V): 115, 2020. ISSN: 1669-9106.

- **Antonela Del Giúdice**, María Celeste Capitani, Matías Ezequiel Fusini, Leandro E Mainetti, Olga Graciela Scharovsky, María Jose Rico, Viviana Rosa Rozados. EVALUATION OF CIRCULATING LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS DURING THE GROWTH OF M-406 TRIPLE NEGATIVE MURINE MAMMARY TUMOR. Medicina (B Aires) 79 - (Supl. IV): 305, 2019. ISSN: 1669-9106.
- Mónica Carolina Grillo, Cintia Kaufman, M. Virginia Baglioni, **Antonela Del Giúdice**, Viviana Rosa Rozados, Olga Graciela Scharovsky, María Jose Rico, Leandro E. Mainetti. TUMOR MICROENVIRONMENT: EFFECT OF METRONOMIC CHEMOTHERAPY WITH CYCLOPHOSPHAMIDE (CY) AND LOSARTAN (LOS) ON M-406 MURINE MAMMARY ADENOCARCINOMA. Medicina (B Aires) 79 - (Supl. IV): 195, 2019. ISSN: 1669-9106.
- Cintia Kaufman, Mónica Carolina Grillo, M. Virginia Baglioni, **Antonela Del Giúdice**, Viviana Rosa Rozados, Olga Graciela Scharovsky, María Jose Rico, Leandro E. EFFECT ON THE TUMOR MICROENVIRONMENT OF METRONOMIC CHEMOTHERAPY WITH CYCLOPHOSPHAMIDE (CY) AND LOSARTAN (LOS) IN A MURINE MODEL OF MAMMARY ADENOCARCINOMA. Medicina (B Aires) 79 - (Supl. IV): 195, 2019. ISSN: 1669-9106.
- María Manuela Barranco, | María Sylvestre Begnis, Martín José Habib, Magdalena Lanzillotta, **Antonela Del Giúdice**, María Jose Rico, Olga Graciela Scharovsky, Fabiana García, Leandro Ernesto Mainetti, Viviana Rosa Rozados. DEVELOPMENT OF A NEW MURINE MODEL OF METABOLIC SYNDROME AFTER FEEDING WITH HIGH-FAT DIET IN FEMALE CBI MICE. Medicina (B Aires) 79 - (Supl. IV): 203, 2019. ISSN: 1669-9106.
- María Celeste Capitani, Antonela **Del Giúdice**, Matías Ezequiel Fusini, Leandro E. Mainetti, Olga Graciela Scharovsky, María Jose Rico, Viviana Rosa Rozados. CD4, CD8 AND TREG LYMPHOCYTES IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT OF M-406 MURINE

TRIPLE NEGATIVE MAMMARY TUMOR GROWING IN HOSTS WITH DIFFERENT SUSCEPTIBILITIES. *Medicina (B Aires)* 79 - (Supl. IV): 240, 2019. ISSN: 1669-9106.

- María Manuela Barranco, Martín José Habib, Bianca Di Carlo, Nicolás Sigal, María Sylvestre Begnis, Felipe Zecchinati, **Antonela Del Giúdice**, María Jose Rico, Viviana Rosa Rozados, Olga Graciela Scharovsky, Silvina Stella Maris Villanueva, Fabiana García, Leandro Ernesto Mainetti. ACTIVITY OF INTESTINAL EFFLUX PUMPS IN M-406 MAMMARY ADENOCARCINOMA BEARING MICE WITH METABOLIC SYNDROME (MS) TREATED WITH CYCLOPHOSPHAMIDE (CY) METRONOMIC CHEMOTHERAPY (MC). *Medicina (B Aires)* 79 - (Supl. IV): 240, 2019. ISSN: 1669-9106.
- **Antonela Del Giúdice**, María Celeste Capitani, Matías Fusini, Leandro Mainetti, O. Graciela Scharovsky, Ricardo Di Masso, María José Rico, Viviana R. Rozados. MULTIVARIATE ANALYSIS OF IMMUNE CELLS POPULATIONS INVOLVED IN TUMOR GROWTH. *Medicina (B Aires)* 78 - (Supl. III): 206, 2018. ISSN: 1669-9106.
- Fusini, Matías; Capitani, María C.; **Del Giúdice, Antonela**; Scharovsky, O. Graciela; Mainetti, Leandro E.; Rico, María J.; Rozados, Viviana R. CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO EN MACHOS DE LA LÍNEA CBi. *Revista de la Reunión Anual (Sociedad de Biología de Rosario. En línea)* –Pág. 43. ISSN 2314-1484, 2018.
- Habib, Martín J.; Barranco, María M.; Di Carlo, Bianca; Sigal, Nicolás; Sylvestre Begnis, María; Zechinatti, Felipe; **Del Giúdice, Antonela**; Rico, María J.; Rozados Viviana R.; Scharovsky, O. Graciela; Villanueva, Silvina SM.; García, Fabian; Mainetti, Leandro E. EFECTO DE LA QUIMIOTERAPIA METRÓNOMICA EN RATONES CON SÍNDROME METABÓLICO PORTADORES DE UN ADENOCARCINOMA MAMARIO. *Revista de la Reunión Anual (Sociedad de Biología de Rosario. En línea)* –Pág. 63. ISSN 2314-1484, 2018.
- Esquivel, Lara; **Del Giúdice, Antonela**; Perroud, Herman A.; Mainetti, Leandro E.; Rico María J.; Scharovsky, O. Graciela; Rozados Viviana R. EVALUACIÓN DE MARCADORES DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON CÁNCER DE

MAMA. Revista de la Reunión Anual (Sociedad de Biología de Rosario. En línea) – Pág. 74. ISSN 2314-1484, 2018.

- María Manuela Barranco, Martín José Habib, Bianca Di Carlo, Nicolás Sigal, María Sylvestre Begnis, Felipe Zecchinati, **Antonela Del Giúdice**, María José Rico, Viviana R. Rozados, O. Graciela Scharovsky, Silvina Villanueva, Leandro Mainetti, Fabiana García. METABOLIC SYNDROME: DEVELOPMENT OF A NEW MURINE MODEL. *Medicina (B Aires) 78 - (Supl. III): 191*, 2018. ISSN: 1669-9106.
- Mónica Carolina Grillo, Cintia Kaufman, **Antonela Del Giúdice**, María Virginia Baglioni, Viviana R. Rozados, O. Graciela Scharovsky, María José Rico, Leandro Mainetti. “METRONOMICS” WITH CYCLOPHOSPHAMIDE (CY) AND LOSARTAN (LOS) FOR THE TREATMENT OF M-406 TRIPLE NEGATIVE MURINE MAMMARY ADENOCARCINOMA. *Medicina (B Aires) 78 - (Supl. III): 80*, 2018. ISSN: 1669-9106.
- Bonet, Micaela Nerina, **Antonela Del Giúdice**, Di Masso Ricardo J, Scharovsky O. Graciela, Rico María José, Rozados Viviana R. Caracterización de dos adenocarcinomas de mama murinos espontáneos. Revista de la Reunión Anual (Sociedad de Biología de Rosario. En línea) –Pag 172. ISSN 2314-1484, 2017.
- **Del Giúdice Antonela**, Perroud Herman, Zchetti Wanda, Pizzo Estefanía, Scalbi Silvia, Brunas Oscar, Rico María J., Scharovsky O Graciela, Rozados Viviana R. La expresión de HIF1 α y VEGF en tumores de pacientes con cáncer de mama no predice la respuesta clínica a la terapia antitumoral. Revista de la Reunión Anual (Sociedad de Biología de Rosario. En línea) –Pag 173. ISSN 2314-1484, 2017.
- Julián Guercetti, Leandro Mainetti, Mónica Carolina Grillo, **Antonela Del Giúdice**, María Victoria Baglioni, Juan Manuel Cáceres, VR Rozados, María José *Rico, O. Graciela Scharovsky. Drug repositioning for cancer treatment: metronomic chemotherapy with Cyclophosphamide (Cy) and Losartan (LOS) for the M-234p murine mammary adenocarcinoma. *Medicina (B Aires) 77 - (Supl. I): 201*, 2017. ISSN: 1669-9106.
- **Del Giúdice Antonela**, Rico María José, Scharovsky O. Graciela, Rozados Viviana R. IDENTIFICACION DE POBLACIONES CELULARES INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA

INMUNE ANTITUMORAL ANTE EL DESAFIO CON UN ADENOCARCINOMA DE MAMA TRIPLE NEGATIVO. Participación como representante en la Delegación Universidad Nacional de Rosario. XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo- AUGM. Universidad Nacional de Itapúa (UNI) de la ciudad de Encarnación, República del Paraguay. 18-20 de octubre de 2017. Resolución N° 2600/2017.

- **Del Giúdice, Antonela**, Oviedo Angela Paula, Mainetti LE, Scharovsky O. Graciela, Rico María J, Rozados Viviana R. Tumor and circulating CD4+ and CD8+ lymphocytes in CBI- mice challenged with triple negative mammary adenocarcinoma. Medicina (B Aires) 76- (Supl.I): 167, 2016. ISSN: 0025.7680.
- Oviedo, Angela P.*; **Del Giúdice, Antonela***; Pagura, Lucas; Cáceres, Juan M.; Rico, María J; Scharovsky, O. Graciela; Di Masso, Ricardo J.; Rozados Viviana R. **Contribuyeron igualmente***. INTERFERÓN Y ESCAPE TUMORAL EN UN MODELO MURINO DE INMUNOEDICIÓN ¿CAUSA O CONSECUENCIA? Libro de resúmenes de la Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario: 176, 2016. ISSN: 2314-1484.
- **Del Giúdice Antonela**, Roggero Eduardo A, Menacho-Márquez Mauricio, Scharovsky O. Graciela, Rico María J, Rozados Viviana R. Estudio de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en un modelo de inmunoección tumoral. Medicina (B Aires) 75- (Supl.II): 463, 2015. ISSN: 1669-9106
- Oviedo Angela*, **Del Giúdice Antonela***, Pagura Lucas, Menacho-Márquez Mauricio, Scharovsky O. Graciela, Rozados Viviana R, Rico María J. Estudio del rol de IL-10 e IFN- γ en un modelo murino de inmunoección tumoral. ***Contribuyeron igualmente**. Medicina (B Aires) 75- (Supl.II): 344, 2015. ISSN: 1669-9106.
- **Del Giúdice Antonela**, Pagura L, Rico MJ, Scharovsky OG, Di Masso RJ, Rozados VR. Respuesta Th1/Th2 en animales portadores de un adenocarcinoma de mama murino. XVI Jornadas de Divulgación Técnico- Científicas 2015. III Jornadas Latinoamericana.
- **Del Giúdice Antonela**, Loterstein Cecilia, Baglioni María Virginia, Menacho Mauricio A, Scharovsky O. Graciela, Rico María J, Rozados Viviana R. Caracterización de las

poblaciones celulares en la respuesta inmune al adenocarcinoma de mama M-406 durante la inmunomodulación tumoral. *Medicina*, 74, Supl.III, 239, 2014.

- Loterstein, Cecilia; **Del Giúdice, Antonela**, Di Masso, Ricardo J.; Scharovsky O. Graciela; Menacho-Márquez, Mauricio; Rico, María J., Rozados, Viviana R. Evaluación de las poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ en animales CBI⁻ desafiados con el adenocarcinoma de mama M-406. Revista de la Reunión Anual (Sociedad de Biología de Rosario. En línea) –Pag 25. ISSN 2314-1484, 2014.
- L Scotta, C Loterstein, **A Del Giudice**, RJ Di Masso, OG Scharovsky, MA Menacho-Márquez, MJ Rico, VR Rozados. Efecto del microambiente tumoral sobre el crecimiento de células de un adenocarcinoma de mama murino. Libro de resúmenes de la Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario: 29, 2014. ISSN 2314-1484.
- **Del Giúdice A.***; Crocco L.*; Scotta L.; Ilieff E.; Pagura L.; Cardinale A.; Di Masso R.; Scharovsky O.; Rico M.; Rozados V. Poblaciones de linfocitos CD4⁺ Y CD8⁺ circulantes en animales CBI⁻ inmunosuprimidos portadores del adenocarcinoma de mama M-406. *Medicina*, 73, Supl.III, 264, 2013. *Contribuyeron igualmente.
- ML Crocco, **A Del Giudice**, L Scotta, RJ Di Masso, OG Scharovsky, MJ Rico, VR Rozados. Inmunosupresión con diferentes drogas de ratones CBI desafiados con un adenocarcinoma de mama. Libro de resúmenes de la Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario: 113. 2013. ISSN 2314-1484