



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Tesinas de Grado

Adrián Gastón Salinas

Receptores TAM (TYRO3, AXL Y MERTK) y su papel en la diferenciación de macrófagos en el cáncer de mama triple negativo

2024

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – No comercial – Sin obra derivada 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Salinas, A. G. (2024) *Receptores TAM (TYRO3, AXL Y MERTK) y su papel en la diferenciación de macrófagos en el cáncer de mama triple negativo* [Tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche].

<https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/3065>



Instituto de Ciencias de la Salud
Trabajo final de la carrera de Bioquímica

**“Receptores TAM (TYRO3, AXL Y MERTK) y su papel en la
diferenciación de macrófagos en el cáncer de mama triple
negativo”**

Alumno: Adrián Gastón Salinas
Directora: Denise Mariel Risnik
Codirectora: Andrea P.M. Villagra

Fecha de entrega: 26/11/2024

Agradecimientos

El profesional que emerge en el momento que se da por concluido este trabajo final tuvo detrás a muchas personas apoyándolo y formándolo. Este texto no alcanza para agradecerles a todos, pero hay personas que fueron indispensables para llegar a este punto, dentro de ellas los más importantes fueron mis viejos. Sin su acompañamiento, enseñanzas y confianza no sería lo que soy hoy, y aunque nos los tenga a los dos presentes en este momento sé que están muy orgullosos, gracias.

También gracias a mi hermana, sobrinos y cuñado por apoyarme, preocuparse y estar al pie del cañón para lo que necesite a lo largo de todos estos años como estudiante.

No puedo estar más agradecido con la UNAJ que me brindo la carrera que siempre quise estudiar a solo 15 minutos de viaje, con unos profesores maravillosos de los que pude aprender mucho, y una cantidad inmensa de buenos compañeros de los cuales hoy a muchos los considero amigos, como Carlitos, Ludmi, Martin, y Camila. Y sobre todo gracias por los amigos que conocí acá y hoy en día los considero familia Seba, Dani y Aye.

Gracias a todos los que conforman el instituto de farmacología de fmed en UBA por brindarme el lugar donde realizar este trabajo final, por recibirme con cariño y mantener todo este tiempo un lindo ambiente. Sobre todo, gracias a Denise, la cual me guio y enseñó sobre los temas tratados en este trabajo y el mundo de la investigación.

Gracias a mis amigos colegas ya mencionados por todo el apoyo que me dieron dentro y fuera de lo relacionado a nuestra carrera, por todas las charlas y risas que hemos disfrutado mientras hacíamos trabajo de mesada o mientras cursábamos. Y también gracias al resto de amigos no relacionado con la carrera, los cuales siempre estuvieron presentes con sus ánimos, y chistes de que yo inventaba ver cosas en el microscopio.

Gracias a todos los que estos años como estudiante me acompañaron, incentivaron a mi crecimiento como profesional y brindaron su ayuda.

Índice

1. Marco teórico	4
1.1. Cáncer de mama triple negativo	4
1.2. Inmunología del cáncer	6
1.3. Macrófagos	8
1.4. Receptores tirosina quinasa y receptores TAM	10
2. Objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Reactivos generales.....	15
3.2. Obtención de células mononucleares.....	15
3.3. Aislamiento de monocitos CD14+.....	18
3.4. Cultivo de monocitos y diferenciación a macrófago	20
3.5. Línea celular	22
3.6. Citometría de flujo	23
3.7. Análisis de datos y estadística	27
4. Resultados	29
4.1. Perfil de macrófagos control.....	29
4.2. Cambios en la expresión de marcadores de macrófago inducido por el medio condicionado.....	31
4.3. Anexina V como molécula capaz de revertir la diferenciación de macrófagos inducida por medio condicionado.....	35
4.4. Bloqueo de ligandos de GAS6 y PROS1 como forma de revertir la diferenciación de macrófagos inducida por medio condicionado.....	39
5. Discusión y conclusión.....	42
6. Bibliografía.....	45

1. Marco teórico

1.1. Cáncer de mama triple negativo

El cáncer es una grave problemática a nivel mundial y un obstáculo a superar si se quiere aumentar la esperanza de vida. Dentro de los tipos de neoplasias más frecuentes se encuentra el cáncer de mama, la cual ocupó la primera y segunda posición en el ranking de incidencia de los distintos tipos de cáncer en el 2020 y 2022 respectivamente, a nivel mundial sin discriminar por sexo ni por edad. Al realizar una discriminación por sexo a estas estadísticas, se observa que el cáncer de mama en mujeres fue la neoplasia con mayor mortalidad en ambos años (Ferlay J et al., 2024; Sung et al., 2021).

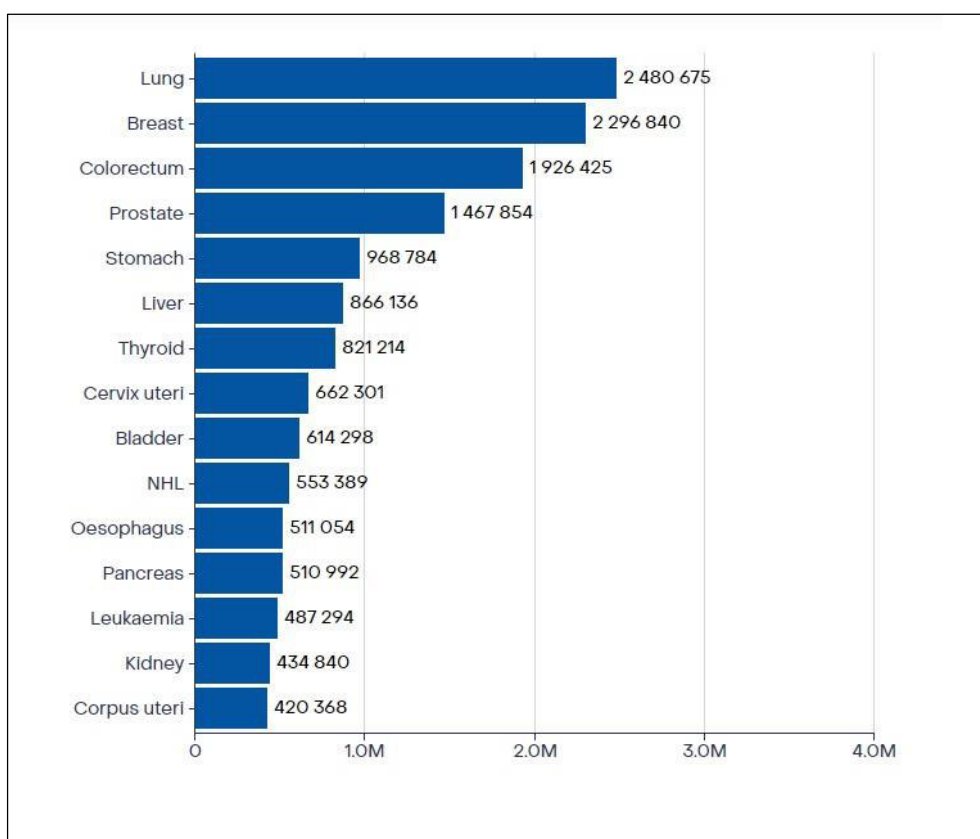


Figura 1. Ranking de incidencia de los distintos tipos de cáncer sin discriminar por sexo ni edad en 2022. Número total de casos en millones (Ferlay J et al., 2024).

Estos datos revelan la importancia de la prevención y tratamiento del cáncer de mama. Dentro de esta patología, se destaca el subtipo denominado triple negativo porque es

altamente invasivo (con un alto porcentaje de pacientes que desarrollan metástasis), presenta tratamientos limitados y tiene un mal pronóstico. Mediante la clasificación usada clínicamente para cáncer de mama según su expresión de receptores, el cáncer de mama triple negativo (CMTN) es el que se caracteriza por la ausencia de receptores de hormonas (estrógeno y progesterona) y la baja expresión de receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Por la expresión negativa de estos receptores, es insensible al tratamiento endocrino y las terapias dirigidas disponibles hasta este momento. Por ejemplo, el paciente no puede beneficiarse del uso de tamoxifeno o de trastuzumab (Dent et al., 2007; Derakhshan & Reis-Filho, 2022; Yin et al., 2020).

Los CMTN se tratan de manera tradicional con un régimen de quimioterapia y quirúrgico. De acá la importancia de buscar terapias más efectivas y menos tóxicas para este subtipo. Dentro de los estudios de cáncer de mama triple negativo se encontró una fuerte relación entre la vía de señalización Ras-MAPK, PD-L1 y los niveles de linfocitos infiltrantes de tumores (LIT), cuyos niveles bajos se asocian a una baja supervivencia. La inhibición combinada de MEK y PD-L1/PD1 mejoró la respuesta inmune antitumoral en modelos murinos. Así también en el mismo eje, otro estudio probó la combinación de inhibir PD1 junto a los receptores TAM en modelo murino de cáncer de mama triple negativo dando como resultado la disminución del crecimiento tumoral y la incidencia de metástasis. Estos resultados implican que un gran obstáculo a superar para la mejoría de tratamientos de cáncer de mama es probablemente la conversión de neoplasias no inmunogénicas a altamente inmunogénicas (Bates et al., 2018; Kasikara et al., 2019; Loi et al., 2016).

Los datos epidemiológicos muestran que el CMTN ocurre principalmente en mujeres jóvenes premenopáusicas y representa entre el 15 y 20% de todos los pacientes con cáncer de mama. En comparación con otros subtipos de cáncer de mama, el tiempo de supervivencia de los pacientes es más corto, y la mortalidad es del 40% los primeros 5 años luego del diagnóstico. El CMTN es altamente invasivo y aproximadamente el 46% de los pacientes presentara metástasis (Yin et al., 2020).

La nueva clasificación de cáncer de mama basado en un patrón de expresión génica divide los tumores en 4 subtipos, de los cuales dos son reconocidos como triple negativo (subtipo basal, y el subtipo normal). Con el avance de los estudios de perfiles genéticos se demostró que los tumores de mama de tipo basal representan la mayoría de los CMTN, pero no todos los tumores de tipo basal albergan un fenotipo triple negativo. Estos CMTN basales se correlacionan con una peor supervivencia en comparación a los no basales (subtipo normal). Se descubrieron 6 subtipos de cáncer de mama triple negativo siguiendo

el análisis de la expresión genética. Más recientemente, se restringió el CMTN a solo 4 subtipos: tipo basal 1 (BL1), tipo basal 2 (BL2), tipo mesenquimatosos (M) y tipo luminal receptor de andrógenos (LAR) (Borri & Granaglia, 2021).

No todos los CMTN comparten las mismas características histopatológicas y las mismas características pronósticas, lo que lleva a considerar todos los CMTN como neoplasias agresivas podría ser inexacto porque abarcan diferentes grados de lesiones (altos o bajos). El CMTN genera metástasis preferentemente en las vísceras, además otros sitios comunes son la pleura, el hígado y el hueso. El mecanismo involucrado en la generación de metástasis está relacionado con la inestable genética de las células del tumor primario, su capacidad de escapar del sistema inmune y las características del microambiente donde se establecen (Borri & Granaglia, 2021).

1.2. Inmunología del cáncer

En el cáncer de mama, el sistema inmunológico cumple una función importante en el pronóstico y evolución clínica de la enfermedad. El papel del sistema inmune se extiende más allá de su interacción directa con las células del tumor y su control sobre la progresión del tumor, también tiene interacción con los fármacos citotóxicos utilizados en quimioterapia (Criscitiello & Curigliano, 2013). Con las terapias convencionales, algunos fármacos tienen interacciones que estimulan el sistema inmunitario, mediante supresión de mecanismos inmunosupresores o efectos estimulantes sobre los efectores inmunológicos. Pero en otros casos, muchos fármacos tienen efectos secundarios inmunosupresores (Zitvogel, Apetoh, Ghiringhelli, & Kroemer, 2008).

El sistema inmune innato y adaptativo desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento tumoral, los diversos tipos celulares del sistema inmune se encuentran infiltrados en tumores malignos (por ejemplo, macrófagos, neutrófilos y linfocitos). Tanto las células inmune innatas como las adaptativas conforman un ambiente que puede funcionar para estimular o inhibir el crecimiento del tumor. Se sugiere que la respuesta inflamatoria en un cáncer es la de una inflamación crónica, lo que presenta un ambiente rico en células inmune innatas, en lugar de dar una respuesta antitumoral, con sus secreciones promueven la angiogénesis y la proliferación celular. Inflamación comparable a la de cicatrización de una herida pero que no tiene un final. A su vez, la respuesta adaptativa, que tiene el potencial de atacar en forma dirigida contra proteínas

antigénicas expresadas en tumores y generar una inflamación que resulte en la destrucción de tejido tumoral, se encuentra en estado exhausto. Con base a las primicias anteriores, las terapias contra el cáncer basándose en la inmunología requieren provocar un cambio en este microambiente tumoral que favorezca el rechazo al tumor. De todas las células del sistema inmunológico innato implicadas en la progresión del cáncer los macrófagos son la fuente primaria de citoquinas secretadas en el microambiente tumoral además de ser la población de células inmune más abundante. Estas clásicamente pueden clasificarse como tipo 1 (M1) o como tipo 2 (M2), aunque hoy en día se considera una visión muy simplificada del espectro de perfiles existentes. Los M1 secretan citoquinas como la interleucina 12 (IL-12), que pueden ayudar a generar inmunidad adaptativa Th1 e impartir un efecto citotóxico en las células tumorales. En cambio, los M2 se encargan de la resolución de los procesos inflamatorios, secretan citoquinas inmunosupresoras y factores de crecimiento y en consecuencia promueven el crecimiento de las células tumorales. Por eso, no sorprende que los macrófagos asociados a tumores (MAT) presenten un fenotipo similar a M2. Los cuales son capaces de producir potentes factores de crecimiento angiogénicos y linfangiogénicos, proteasas y citoquinas, todos los cuales son mediadores que potencian la progresión neoplásica. Junto a las células tumorales los MAT son capaces de liberar interleucina 10 que mitiga la respuesta antitumoral del sistema inmunológico adaptativo (Coussens & Werb, 2002; Disis, 2010; Zitvogel, Apetoh, Ghiringhelli, André, et al., 2008).

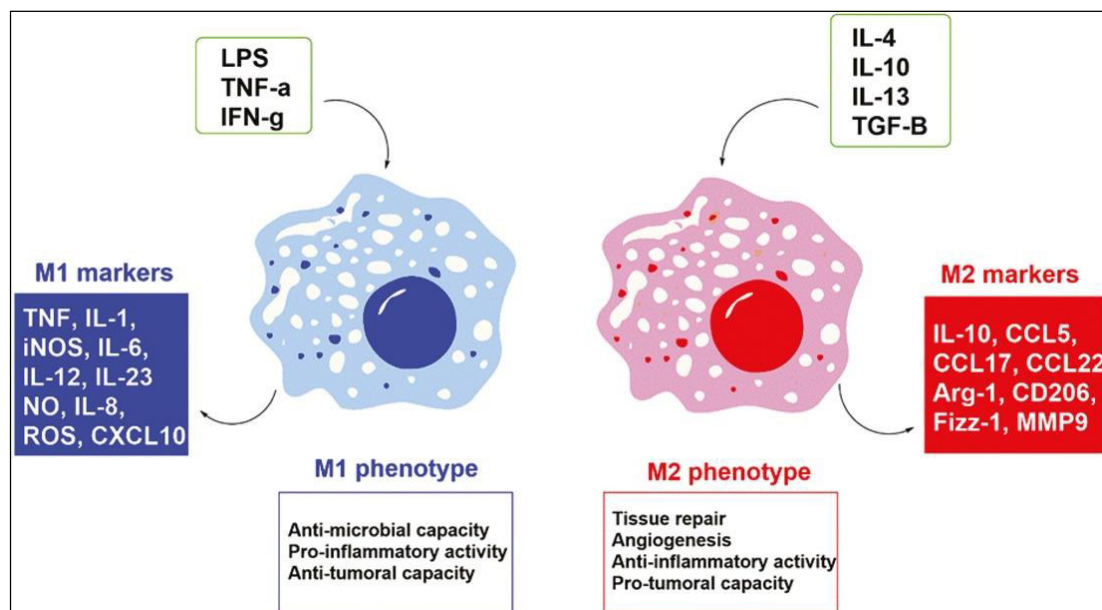


Figura 2. Representación gráfica de la clasificación clásica de macrófagos junto a sus marcadores y funciones (Sadeghi et al., 2024).

No obstante, cuando se activan en el perfil correcto los macrófagos tienen el potencial de matar células tumorales, pueden mediar en la citotoxicidad y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos, provocar daño vascular y necrosis tumoral, y ser intermediarios con componentes del sistema inmune innato y adaptativo, al actuar como células presentadoras de antígenos. Entonces, los macrófagos tienen un doble potencial en el cáncer debido a su plasticidad en respuesta a señales ambientales. Por estas razones es una importante diana en las terapias contra esta enfermedad, teniendo las terapias centradas en macrófagos el potencial de complementar y crear sinergia con las herramientas actuales en la oncología. Tres aspectos principales potencialmente susceptibles de intervención terapéutica son: inhibir su reclutamiento y/o supervivencia en el microambiente tumoral; inhibir su efecto positivo en la angiogénesis; y reversión de su inmunosupresión y restauración de la citotoxicidad antitumoral (Allavena et al., 2008; Mantovani et al., 2022).

1.3. Macrófagos

Se usan varias nomenclaturas para la diferenciación de un macrófago provocada por un agente exógeno, que combinan términos como M1 y M2, activación clásica y alternativa, y otras subdivisiones originadas de los términos anteriores. Estos términos surgieron de cuando se describieron los efectos diferentes de IL-4 en comparación con IFN- γ y /o lipopolisacárido (LPS) sobre la expresión génica. Entendiéndose como alternativa a la activación por medio de IL-4 y clásica a la de los otros dos agentes exógenos comparados. Años después se propuso el término M1 y M2 para la diferenciación de macrófagos, que luego esta nomenclatura fue ampliada para tener en cuenta varios escenarios de diferenciación dando a conocer los términos M2a, M2c, entre otros. Dando la idea de que los perfiles de diferenciación forman parte de un espectro y no se pueden agrupar fácilmente (Murray et al., 2014). La idea de este espectro también se apoya con los análisis realizados en base al transcriptoma de los macrófagos frente a variantes en la diferenciación (Xue et al., 2014).

B

		M(IL-4)	M(Ic)	M(IL-10)	M(GC+TGF-β)	M(GC)	M(-)	M(LPS)	M(LPS+IFN-γ)	M(IFN-γ)
Transcription factors, SOCS proteins	Mouse	pStat6 +++ PStat1 -ve <i>Irf4, Socs2</i>		pStat3 + <i>Nfil3 Sbno2, Socs3</i>				pStat1 + pStat6 -ve <i>Socs1, Nfkbiz</i>	pStat1 + pStat6 -ve <i>Socs1, Nfkbiz, Irf5</i>	pStat1 +++ <i>Socs1</i>
	Human	<i>IRF4, SOCS1*, GATA3*</i>		<i>SOCS3</i>	<i>ID3, RGS1 pSMAD2 +</i>			<i>IRF5</i>	pSTAT1 +++ <i>IRF5, IRF1</i>	pSTAT1 +++ <i>IRF5</i>
Cytokines	Mouse		<i>Il10, Il6</i>	<i>Il10</i>				<i>Tnf, Il6, Il27</i>	<i>Tnf, Il6, Il27, Il23a, Il12a</i>	
	Human							<i>TNF, IL6, IL1B</i>	<i>TNF, IL6, IL1B, IL12A, IL12B, IL23A</i>	
Chemokines	Mouse	<i>Ccl17, Ccl24 Ccl22</i>	<i>Cxcl13, Ccl1 Ccl20</i>							
	Human	<i>CCL4*, CCL13* CCL17, CCL18</i>							<i>CXCL10, IL8</i>	<i>CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11</i>
Scavenger receptors	Mouse							<i>Marco</i>	<i>Marco</i>	
	Human	<i>MRC1*, STAB1 MARCO -ve CD163 -ve</i>				<i>CD163, STAB1, MARCO</i>				
Matrix	Mouse									
	Human	<i>FN, TGFB1, MMP1, MMP12, TG, F13A1*</i>				<i>F13A1+ Negative for markers in M(IL4)</i>		<i>MMP9</i>		
Amino acid metabolism	Mouse	<i>Arg1 +++</i>	<i>Nos2</i>					<i>Arg1+, Nos2 +</i>	<i>Arg1+, Nos2 +++</i>	<i>Nos2 +++, Ido1</i>
	Human								<i>IDO1, KYNU</i>	<i>IDO1, KYNU</i>
Others	Mouse	<i>Retnla, Chi3l3 Alox15</i>	<i>Retnla -ve</i>	<i>Il4ra</i>						
	Human	<i>TGM2*, ADORA3, TGFB2 -ve IL17RB, ALOX15* CD200R*</i>		<i>IL4RA</i>	<i>TGFB2++ ALOX5AP, IL17RB</i>	<i>TGFB2++ ADORA3,</i>		<i>PTX3</i>	<i>GBP1, CCR7, CD40</i>	

Figura 3. Cuadro donde se observan subdivisiones funcionales según el estímulo recibido por los macrófagos con el concepto de espectro M1-M2 (Murray et al., 2014).

Las poblaciones de macrófagos asociados a tumores (MAT) dentro un mismo tumor son heterogéneas, los cuales presentan diferencias moleculares y de función según el microambiente intratumoral donde se ubique. Teniendo así diferentes tipos de MAT a los cuales dirigir las inmunoterapias e investigar el impacto que tienen cada uno sobre el tumor (Movahedi et al., 2010). Los MAT que residen en el microambiente tumoral pueden tener un rol en la dirección de señales ambientales para que ocurra la angiogénesis, la migración e invasión de células cancerosas en cáncer de mama (Williams et al., 2016). Siendo así una población celular de importancia en las progresión y sobrevida del tumor.

El tipo de célula de cáncer de mama tiene la capacidad por si misma de activar al macrófago de una forma particular, sin importar otros componentes del estroma. Una forma de lograr esto es mediante factores solubles secretados por la célula cancerosa que actúan sobre el macrófago regulando vías metabólicas, lo que puede originar diferencias en los macrófagos como en la morfología o en la expresión de moléculas de membrana (Hollmén et al., 2015).

En la activación de los MAT, los marcadores como HLA-DR, CD64 o CD80/86 se los asocia a un perfil similar a M1, pero cuando presentan marcadores como CD206, CD163 y CD204 se relaciona a un perfil similar a M2 (Larionova et al., 2020).

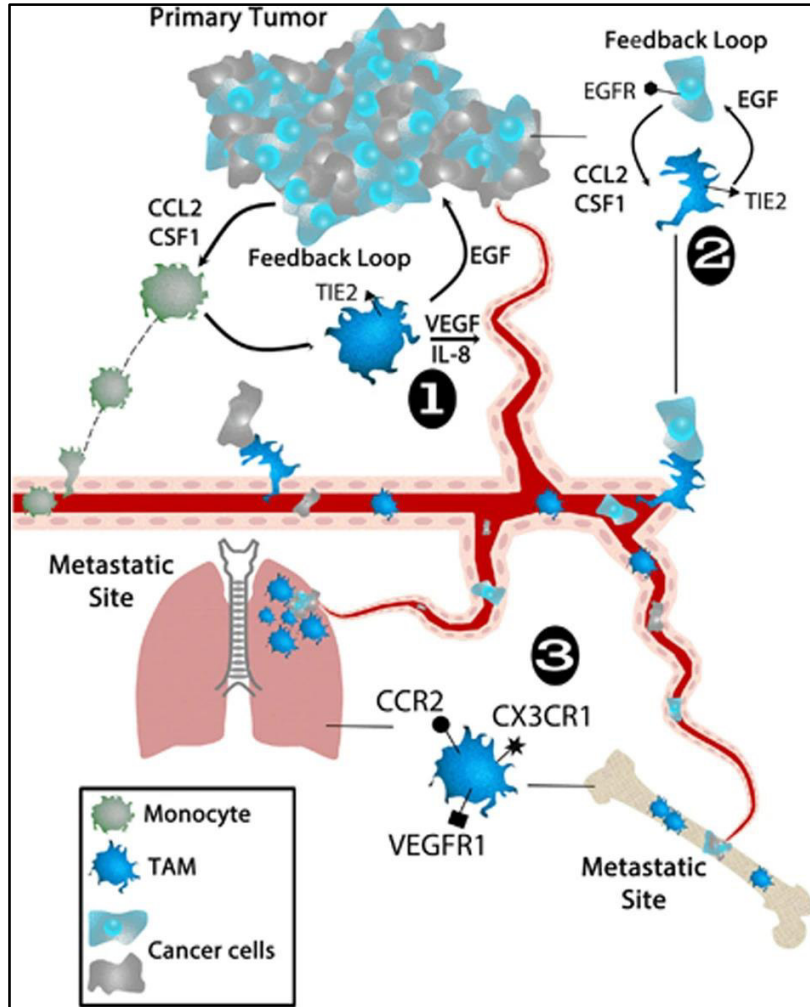


Figura 4. Representación de un tumor primario de mama y su relación con los macrófagos asociados a tumores (Williams et al., 2016).

1.4. Receptores tirosina quinasa y receptores TAM

Los receptores tirosina quinasa (RTK) son un grupo de proteínas de membrana que participan en la comunicación entre células y en la regulación de varios procesos biológicos, como el crecimiento, la motilidad, la diferenciación y el metabolismo celular. Todos los receptores de este grupo comparten una estructura similar, compuesta por un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa intracelular que presenta un extremo carboxilo terminal en forma de cola.

Los RKT se activan mediante dimerización y/u oligomerización del receptor por ligando específico (existen 4 modos de dimerización). Para la mayoría de estos receptores, el cambio de conformación permite la autofosforilación trans de cada dominio tirosina quinasa y la liberación de la auto inhibición cis. Estos cambios permiten que cada dominio tirosina quinasa obtenga su conformación activa. Todo este cambio de conformación en el receptor también recluta y activa una amplia variedad de proteínas de señalización (Du & Lovly, 2018).

En los RTK tenemos presente a la familia TAM (el nombre deriva de la primera letra de cada receptor que forma esta familia, Tyro3, Axl, y MerTK), que no tienen importancia en el desarrollo embrionario, pero sí funcionan como reguladores homeostáticos en tejidos y sistemas de órganos adultos con constante renovación. Destacan en el sistema inmunológico, reproductivo, hematopoyético, vascular y nervioso. Existen dos ligandos que actúan en estos receptores, Gas6 y Proteína S (Pros1). Los dominios extracelulares de los receptores TAM están compuestos por dos módulos extracelulares que se configuran en una configuración de dos más dos. Las regiones aminos terminales de estos ectodominios llevan dominios en tándem relacionados con inmunoglobulinas que median la unión con el ligando. Luego presentan un dominio transmembrana que lleva a un dominio con una proteína tirosina quinasa catalíticamente competente. Los dos ligandos son proteínas grandes (alrededor de 80kDa), que comparten la misma disposición multidominio y son 42% idénticas. Estos ligandos presentan un dominio globulina transportadora de hormona sexuales (SHBG) el cual se une a los dominios inmunoglobulina del receptor e induce la dimerización y activación del receptor. Además, presentan un dominio Gla en el extremo amino el cual tiene presente carboxilaciones postraduccionales dependiente de vitamina K y esto permite unirse a la fosfatidilserina (PtdSer). Esta PtdSer debido a las flippasas se limita a estar en la cara interna de la membrana plasmática teniendo contacto con el citoplasma, pero en las células apoptóticas esta disposición cambia (por inactivación de las flippasas) y PtdSer se muestra en la cara externa. Siendo esto último una señal para fagocitar esa célula muerta (Lemke, 2013). Existe una activación atípica de los receptores TAM independiente del ligando, esta se probó en estudios de sobreexpresión de Axl y Tyro3 donde ocurría la dimerización del receptor a pesar de no tener presente ningún ligando (Linger et al., 2008).

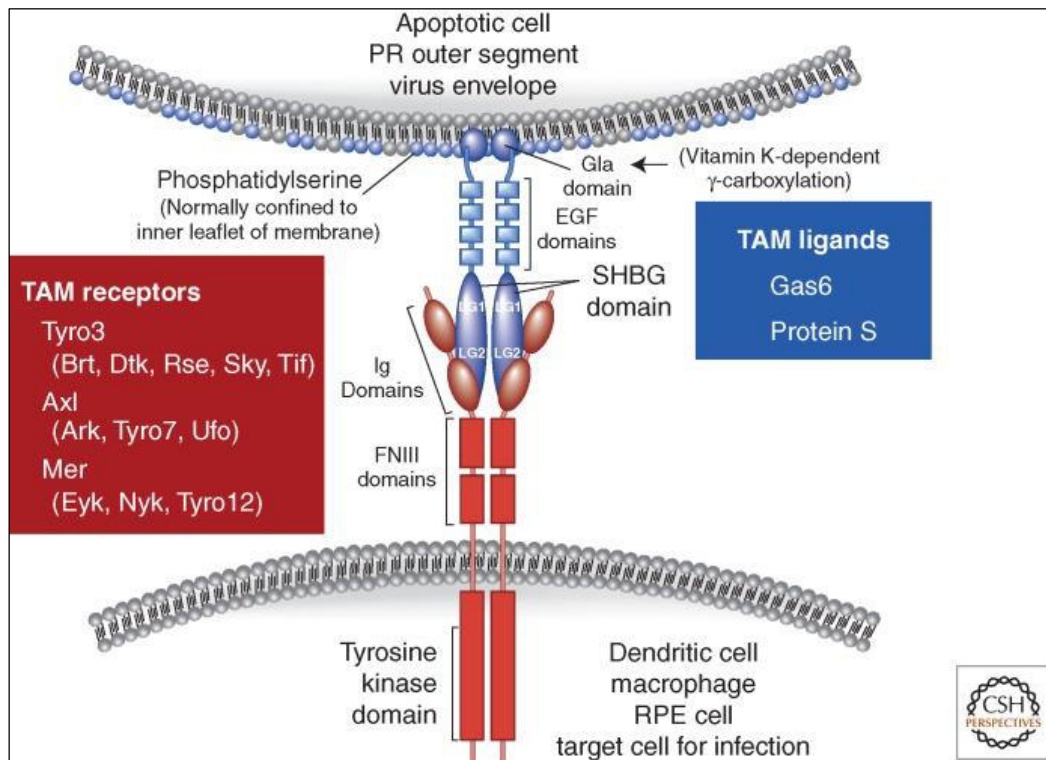


Figura 5. Representación de los receptores TAM y sus ligandos (Lemke, 2013).

La señalización del receptor TAM tiene un papel importante en la fagocitosis y eliminación de células en apoptosis de tejidos adultos, por estos mismo, se los ve presentes en los fagocitos del sistema inmune principalmente en los macrófagos. Pero, además, intervienen en la inhibición por retroalimentación de la respuesta inmune innata a los patógenos presente en los macrófagos y células dendríticas (Lemke, 2013).

El control celular de la atenuación de la señal de estos receptores es importante porque su continua señalización puede ayudar a generar varios estados patológicos. Para realizar este freno de señal de los receptores tirosina quinasa la célula tiene varios métodos, de los cuales algunos se han explorado como posibles mecanismos regulares de TAM (Linger et al., 2008).

Los estímulos de los receptores TAM producen diversas funciones celulares dependiendo de la combinación receptor/ligando, del tipo celular y del microambiente. Con el avance de los estudios en esta área, se hace evidente que los receptores TAM pueden desempeñar funciones superpuestas y cooperativas. En macrófagos y células dendríticas los TAM tienen funciones de eliminación de células apoptóticas, donde las células apoptóticas expresan fosfatidilserina en su superficie, la cual se une entre otras cosas a los ligandos Gas6 y Proteína S. Los macrófagos expresan los tres receptores TAM, esto es lo que sugiere un posible mecanismo mediante el cual los TAM y sus ligandos podrían mediar

en el reconocimiento de células apoptóticas. Además, los receptores TAM presentan la función de secreción de citoquinas en macrófagos y células dendríticas (Linger et al., 2008).

Las anexinas son una familia de proteínas que comparten estructura y características funcionales. Dentro de esta familia, la Anexina V es una anexina extracelular que se une con alta afinidad a fosfolípidos de carga negativa como la fosfatidilserina (PtdSer) (Reutelingsperger & van Heerde, 1997). Debido esta unión, en presencia de Anexina V la PtdSer no podría interactuar con ligandos GAS6 y PROS1 evitándose la unión de estos ligandos a los receptores TAM.

El potencial oncogénico de las quinasas del receptor TAM fue evidente ya que cada miembro de la familia fue clonado originalmente desde una célula cancerígena y los primeros estudios demostraron que estos receptores exhiben la capacidad de transformar fibroblastos NIH3T3 y Linfocitos BaF3 *in vitro*. Existen varias formas en que se pueden activar protooncogenes como los receptores TAM, entre ellas la amplificación y mutaciones genéticas, la escisión proteolítica y la expresión alterada de proteínas; Cada una de estas opciones puede dar como resultado una enzima continuamente activa y/o proteínas expresadas en exceso o ectópicamente que no están reguladas por los mecanismos normales. Hoy en día, a través de varias técnicas se demostró que los receptores TAM se expresan ectópicamente o sobreexpresan en una amplia variedad de cánceres humanos (Linger et al., 2008).

La desregulación de los receptores TAM se asocia con el crecimiento tumoral y la metástasis debido a su participación en vías oncogénicas, todo esto lleva a un creciente interés en investigar el tratamiento del cáncer mediante la inhibición de los receptores. Se encuentran varios inhibidores de receptores TAM en desarrollo preclínico y clínico para el cáncer, siendo por ahora la inhibición de Axl y MerTK las de mayor interés como estrategia terapéutica por sus efectos antitumorales (Aehnlich et al., 2021; Miao et al., 2023). Es difícil determinar el mecanismo preciso dentro del microambiente tumoral por el cual esta inhibición provoca efectos antitumorales, por esta razón en este trabajo se tratará de conocer la acción de esta inhibición sobre los macrófagos que es una parte específica del microambiente tumoral.

2. Objetivos

El presente trabajo tiene como por objetivo general: *Comprender el rol de los receptores TAM y sus ligandos en los macrófagos del microambiente tumoral del cáncer de mama triple negativo.*

Para llegar a este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Comparar la diferenciación de macrófagos por medio de estímulos conocidos con la activación dada por medio condicionado proveniente de una línea celular de cáncer de mama triple negativo, identificando a que perfil se asemeja más
- Determinar la implicancia de la familia TAM en la diferenciación de macrófagos estimulados por medio condicionado proveniente de una línea celular de cáncer de mama triple negativo a través del estudio del efecto de bloqueantes de los ligandos de los receptores TAM.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos generales

- **Buffer Fosfato Salino (PBS):** PBS (10X) pH 7.4 de Gibco™, el cual se diluye para su uso a 1X con agua destilada.
- **Suero Fetal Bovino (FBS):** Fetal Bovine Serum de Gibco™.
- **Solución Fisiológica:** Solución Cloruro de Sodio 0,9% Tecsolpar.
- **Medio de cultivo RPMI:** Medio RPMI 1640 de Gibco™.
- **Medio de cultivo DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose without L-Glutamine de Sartorius.
- **Dimetilsulfóxido (DMSO):** Dimetilsufoxido p.a. de Biopack.
- **Ficoll:** Ficoll Paque Plus Cytiva.

3.2. Obtención de células mononucleares

Las células mononucleares totales (CMT) fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica recogidas con anticoagulante (citrato de sodio) de donantes sanos proporcionadas por la fundación Hemocentro Argentino, tras la firma del correspondiente consentimiento informado. Los aislamientos se realizaron mediante centrifugación de gradiente de densidad utilizando ficoll, y siempre se trabajó bajo condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar. El protocolo para el aislamiento fue el siguiente:

- Las muestras de sangre anticoagulada llegan en tubos falcón de 50ml.
- Se realiza una centrifugación de 1200 RPM por 15 minutos, obteniendo dos fases: una fracción celular y un plasma rico en plaquetas.
- El sobrenadante (plasma rico en plaquetas) es descartado o trasvasado a otro tubo si se lo quiso conservar.
- La fracción celular se diluye al doble del volumen inicial con solución fisiológica y se homogeniza, para disminuir el peso de la sangre y no romper el ficoll.
- La fracción celular diluida se trasvasa cuidadosamente a un tubo falcón de 50 ml que contiene un volumen proporcional de solución de ficoll. De esta forma se

generan dos fases que mantienen la proporción 1 parte de Ficoll (12 ml): 3 partes de fracción celular diluida (36 ml) (Figura 6).

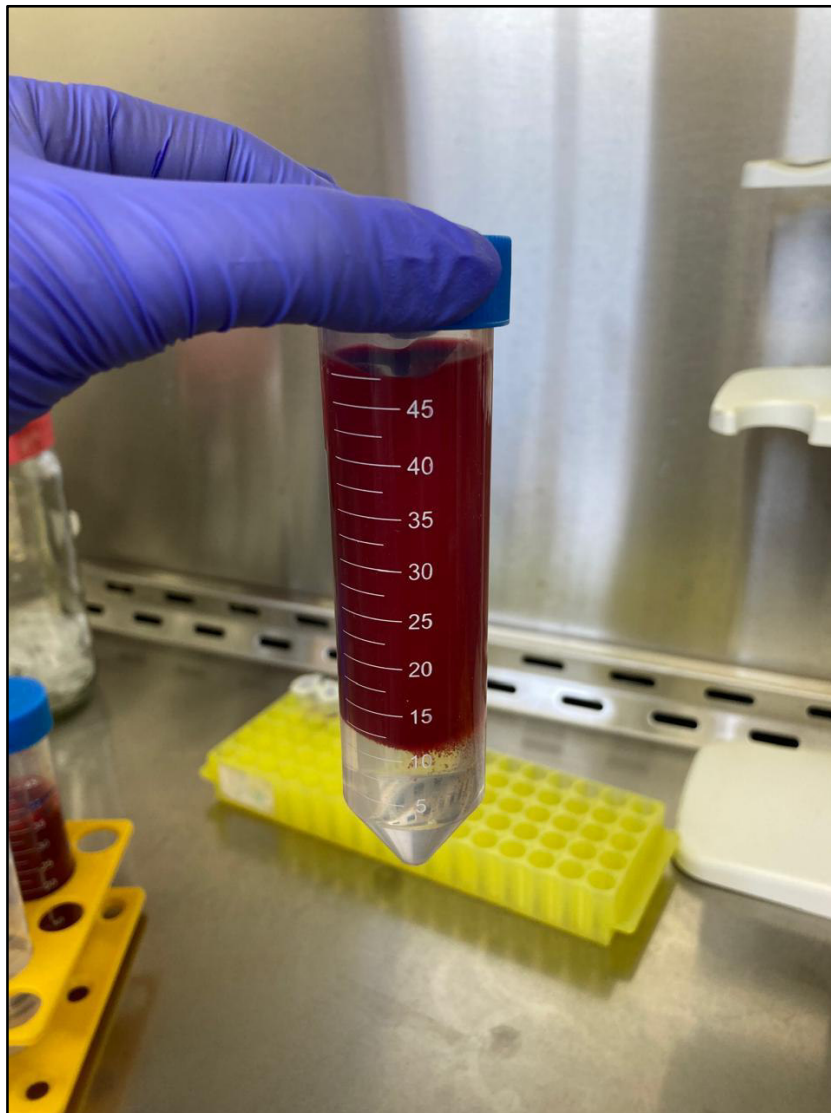


Figura 6. Tubo falcón con las dos fases formadas, la superior de sangre diluida y la inferior de ficoll.

- Se realiza una centrifugación de 2500 RPM por 30 minutos, de la cual se obtienen tres fases (Figura 7): una amarilla (plasma), una blanca (ficoll) y otra roja (eritrocitos y polimorfonucleares).



Figura 7. En este tubo falcón se puede observar la fase de plasma (A), el anillo o halo (B), la fase de ficoll (C) y la fase de eritrocitos junto a polimorfonucleares (D).

- Entre la fase de plasma y ficoll se forma una interface compuesta por los leucocitos mononucleares proveniente de la sangre periférica (CMT) (Figura 7).
- Se toma esta interface (anillo o halo) con cuidado para trasvasarla a un nuevo tubo falcón donde se diluye con abundante PBS.
- Se realiza una centrifugación a 2500 RPM por 15 minutos, se descarta el sobrenadante dejando solamente el pellet. Primer lavado.
- Este pellet se vuelve a resuspender con PBS para volver a centrifugar en las mismas condiciones que el paso anterior. Segundo Lavado.
- El sobrenadante se descarta y se resuspende el pellet en 5ml de PBS/FBS2%.

- De esta última muestra se toma una alícuota de 10 ul para diluir en trypan blue 4% y contar en cámara de Neubauer (Figura 8).

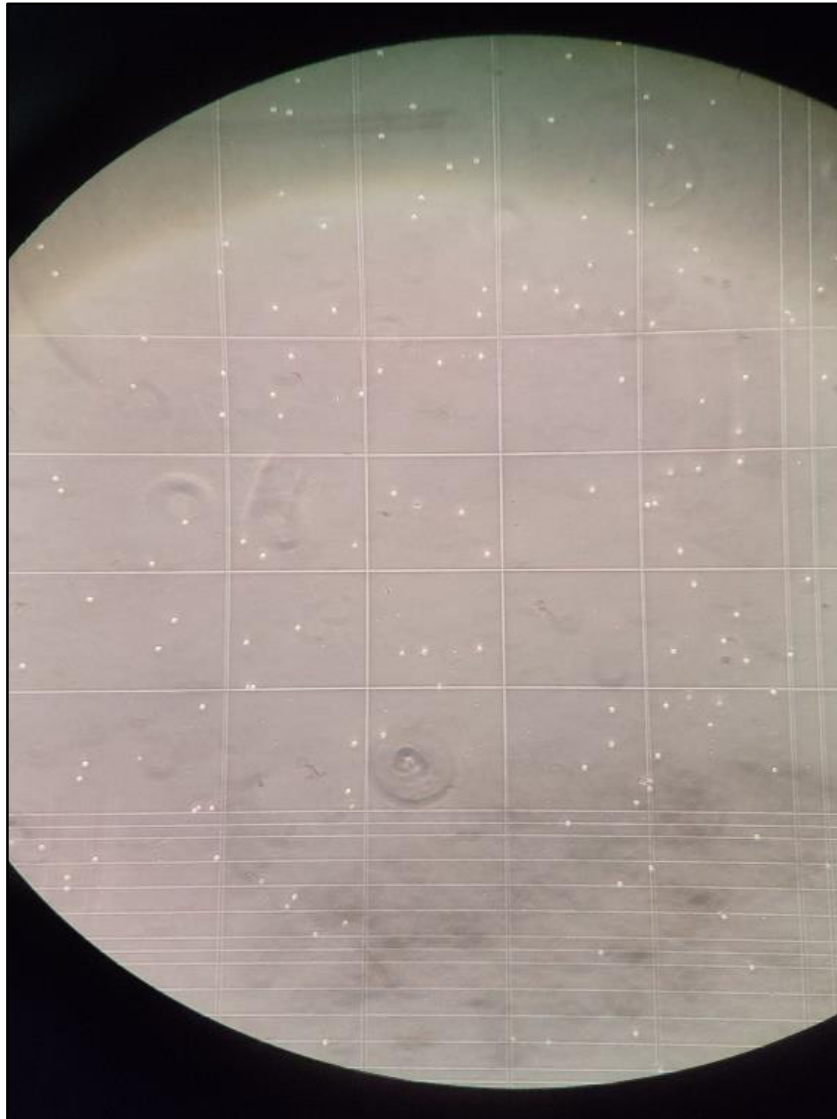


Figura 8. Imagen de uno de los sectores de la cámara de Neubauer al momento de contar las células.

Las CMT obtenidas son utilizadas ese mismo día para el aislamiento de monocitos o resuspendidas en FBS puro con el adicional de 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) y criopreservadas en el freezer -80°C .

3.3. Aislamiento de monocitos CD14+

Para el aislamiento de monocitos CD14+ se usó un kit de selección positiva (MojoSort™ Human CD14 Selection Kit) sobre la muestra de CMT previamente obtenida, utilizando un imán (EASYSEP™) y siguiendo el protocolo recomendado. El cual consiste en los siguientes pasos:

- La muestra a procesar debe estar en 100ul y contener $\leq 20 \times 10^6$ células.
- El medio recomendado para re suspender las células debe ser PBS + FBS 2% + EDTA 1mM.
- Se adicionan 5 ul del anticuerpo (Ac anti CD14 conjugado con biotina), se homogeniza e incuba durante 15 minutos en hielo.
- El tubo contenedor de las partículas magnéticas conjugadas a estreptavidina se homogeniza por 30 segundos con el vortex.
- Se adicionan 5 ul de las partículas magnéticas, se homogeniza e incuba durante 15 minutos en hielo.
- Se trasvasa la muestra a un tubo de sorting y se lleva a un volumen final de 2,5ml con el medio recomendado.
- Se coloca el tubo de sorting en el imán durante 5 minutos (Figura 9).

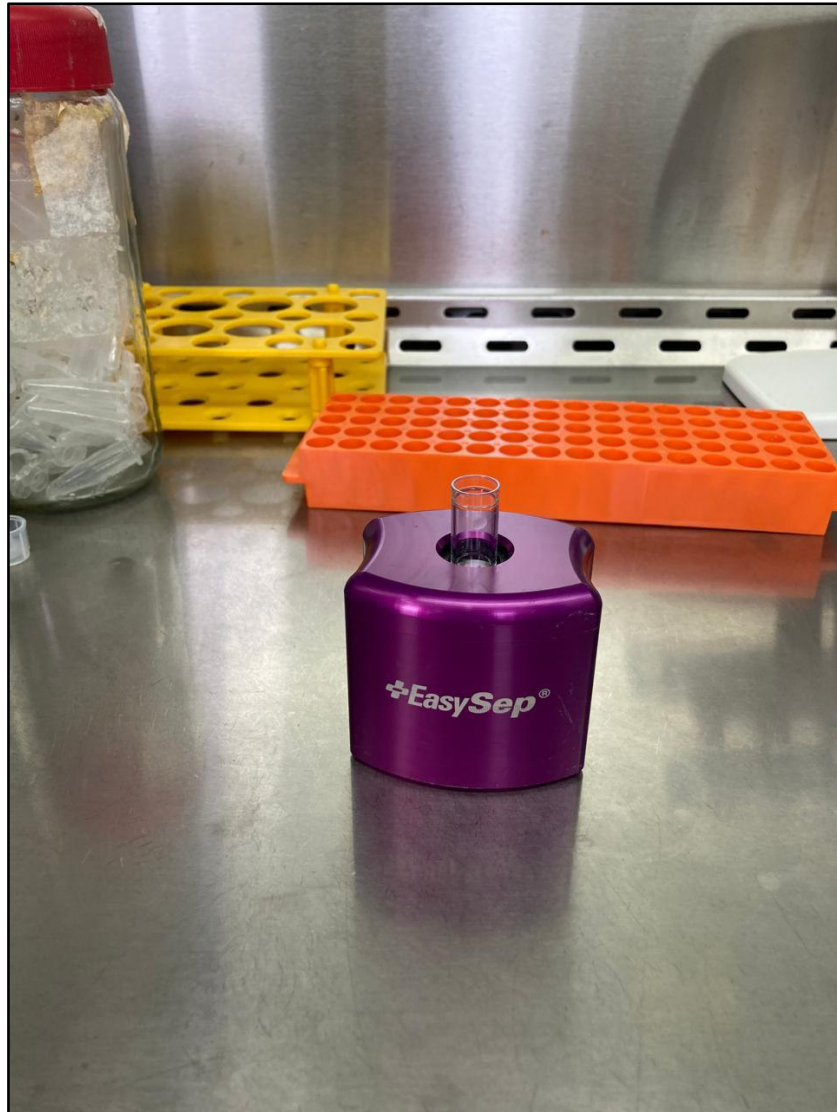


Figura 9. Tubo de sorting con la muestra dentro del imán.

- Se descarta el sobrenadante por inversión sin quitar el tubo del imán.
- Este último paso de sorting se repite una vez más, resuspendiendo las células en 2,5 ml de medio recomendado y pasándolas por el imán.
- Finalmente, se resuspenden las células en PBS/FBS2% para alicuotar y contar en cámara de Neubauer (Figura 8).

Luego de obtener el número de células se centrifuga la muestra, se descarta el sobrenadante y se lleva al volumen deseado con medio RPMI completo (RPMI suplementado con 10% FBS y 1mM penicilina/estreptomicina).

3.4. Cultivo de monocitos y diferenciación a macrófago

Las muestras purificadas de monocitos CD14+ fueron luego utilizadas para cultivo celular y diferenciación a macrófagos. Se trabajó con placas multiwell para cultivo celular de 48 pocillos, utilizando una concentración inicial de 250.000 células en 250ul de RPMI completo por pocillo. El protocolo para la diferenciación celular fue el siguiente:

- Primer día: Se siembran 250.000 monocitos por cada pocillo necesario para el experimento.
- Quinto día: Se remueve la mitad del volumen inicial (125ul) y se adiciona nuevo medio de cultivo, medio condicionado o vehículo (DMEM completo) según corresponda. A su vez, en este momento se añaden los estímulos correspondientes a cada perfil para los controles y los bloqueantes cuando sea necesario.
- Séptimo día: Se despegan los macrófagos en frío utilizando PBS FBS 2% EDTA 1mM y se trasvasan a tubos eppendorf para continuar con la marcación de antígenos de superficie.

En el transcurso de los días de incubación la placa multiwell permanece en estufa a 37°C y 5% de CO₂. A continuación, se detalla en la tabla 1 las distintas condiciones experimentales y como fueron realizadas.

Condición experimental	Concentración de estímulos al día 5
M0	RPMI completo nuevo
M1	RPMI completo nuevo junto a interferón gamma (50mg/ml) y LPS (10ng/ml).
M2a	RPMI completo nuevo junto a interleucina 4 (40ng/ml).
M2c (dexametasona)	RPMI completo nuevo junto a dexametasona (0,1uM).
M2c (IL-10)	RPMI completo nuevo junto a interleucina 10 (50ng/ml).
Medio condicionado (MC)	Medio DMEM proveniente del cultivo de células MDA-MB 231.
Vehículo	DMEM completo nuevo.

Vehículo + Anexina V	DMEM completo nuevo junto a Anexina V (1 ug/ml).
Medio condicionado (MC) + Anexina V	DMEM proveniente del cultivo de células MDA-MB 231 junto a Anexina 5 (1 ug/ml).
Medio condicionado (MC) + Anticuerpo anti PROS1 + Anticuerpo anti GAS6	DMEM proveniente del cultivo de células MDA-MB 231 junto a Anticuerpo anti PROS1 (2ug/ml) y Anticuerpo anti GAS6 (2ug/ml).

Tabla 1. Relación entre los perfiles de macrófagos y las condiciones que se utilizaron para conseguir ese perfil.

3.5. Línea celular

En todo este trabajo utilizamos la línea celular MDA-MB 231 (Figura 10), la cual es una línea celular tumoral de cáncer de mama triple negativo ya que no tiene receptores para ER, PR ni sobreexpresa el factor de crecimiento HER2. La línea celular se cultiva en medio DMEM con 10% FBS (Se mantiene en incubadora húmeda a 37°C con atmosfera de 5% de dióxido de carbono), se le realizan pasajes cuando llega a un nivel de confluencia del 80% y se trabaja siempre con pasajes menores a 5 a partir de que se descongelo la muestra.

Cuando el flask de cultivo celular alcanza un nivel de confluencia del 80% y es momento de realizar el pasaje, se toma el sobrenadante con cuidado de no despegar las células adheridas al flask. Este sobrenadante se centrifuga con el fin de quitar la mayor cantidad de células. El sobrenadante resultante libre de células es el medio condicionado que se utilizó en este trabajo, el cual fue alicuotado y almacenado en freezer a -20°C hasta su uso.

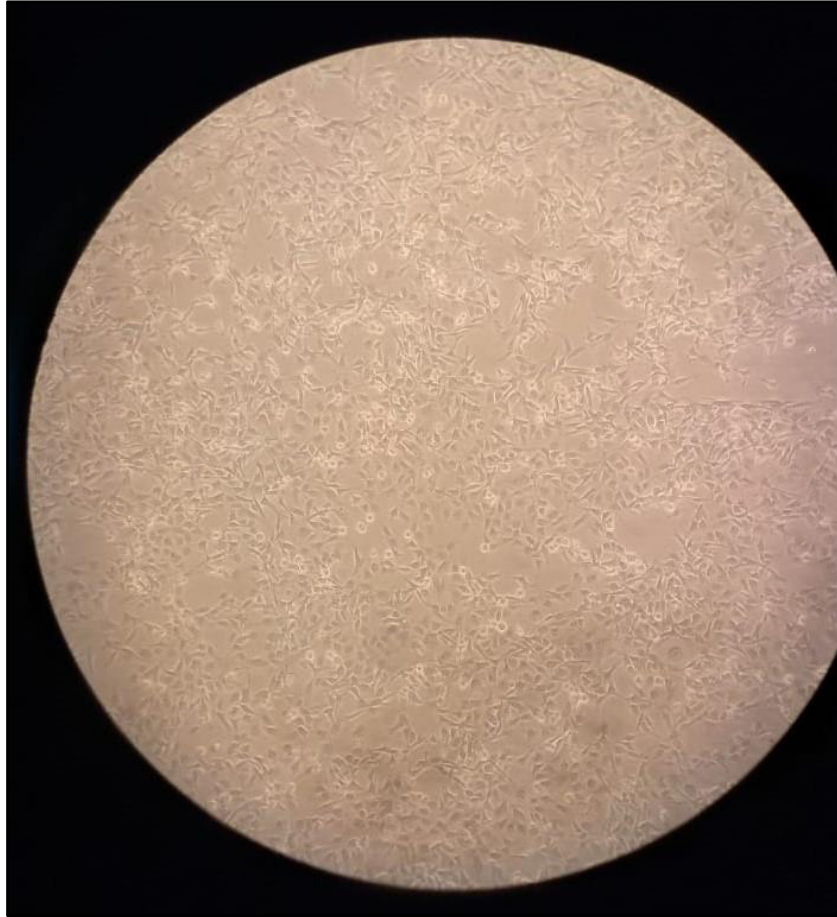


Figura 10. Imagen de la línea MDA MB231 en cultivo con aproximadamente un 70% de confluencia.

3.6. Citometría de flujo

Para evaluar la diferenciación celular y viabilidad de los macrófagos se utilizó la citometría de flujo. El equipo que se usó fue el BD FACSCanto y los datos resultantes se analizaron con el programa FlowJo v10. Para acondicionar la muestra y ser evaluada por citometría de flujo se siguió el siguiente protocolo:

- De los pocillos de placa multiwell donde se cultivan los macrófagos se retira cuidadosamente el sobrenadante para descartarlo, con el fin de dejar solamente en el pocillo los macrófagos que permanecían adheridos al fondo.
- Se agregan 200 μ l de PBS + FBS 2% + EDTA 1mM a cada pocillo.
- La placa multiwell se deja 10 minutos en hielo.

- Luego de ese tiempo, mientras la placa multiwell permanecía en frío se procede a generar un movimiento continuo del PBS + FBS 2% + EDTA 1mM dentro del pocillo con micropipeta. Esto se realiza para que el movimiento del líquido desprenda los macrófagos adheridos al fondo de la placa.
- Luego de verificar que los macrófagos ya no se encuentran adheridos al fondo la placa, se trasvasa el contenido del pocillo a un eppendorf.
- Los eppendorf se centrifugan 5 minutos a 800G. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en PBS 1X para trasvasarlo a una placa de fondo en U.
- La placa de fondo en U se centrifuga a 400G por 5 minutos y se descarta el sobrenadante por inversión.
- En cada pocillo se adicionan 20 ul de una dilución 1/1000 de colorante fluorescente Zombie Violet (Zombie Violet™ Fixable Viability Kit de BioLegend) en PBS 1x, homogeneizando con la micropipeta.
- Se deja en hielo por 20 minutos la placa. Cumplido ese tiempo, se adicionan 180 ul de PBS por pocillo y se centrifuga la placa por 5 minutos a 400G con el fin de realizar un lavado. Se descarta el sobrenadante por inversión.
- En cada pocillo se adiciona homogeneizando 20 ul de un coctel de anticuerpos, preparado en PBS/FBS 2% que contiene una dilución 1/100 de cada anticuerpo mencionado a continuación (Tabla 2).

Antígeno	Clon de Anticuerpo	Fluorescencia	Marca	Concentración madre
CD11b	M1/70	PECy7	BioLegend	200 ug/ml
HLADR	L243	PE	BioLegend	40 ug/ml
CD206	15-2	AF488	BioLegend	400 ug/ml
CD64	10.1	AF647	BioLegend	150 ug/ml
CD163	GHI/61	PERCP	BioLegend	200 ug/ml

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para marcar antígenos de superficie.

- Se deja la placa por 30 minutos sobre hielo.
- Cumplido el tiempo se adicionan 180 ul de PBS/FBS 2% para lavar y se centrifuga la placa por 5 minutos a 400G. Se descarta el sobrenadante por inversión.

- En cada pocillo se adiciona homogenizando 20 ul de fijador (CitoFix).
- La placa queda por 20 minutos en hielo. Luego de esto se lava adicionando 180 ul de PBS/FBS 2% y centrifugando la placa a 400 G por 5 minutos. Se descarta el sobrenadante por inversión.
- El pellet se resuspendio en 200 ul de PBS 1X, listo para que la muestra se pase por el citómetro de flujo.

Además de las muestras de macrófagos con las condiciones experimentales, también se analizó en el citómetro una muestra de macrófagos sin condición experimental y sin la marcación con anticuerpos fluorescentes para tenerlo como control de la auto fluorescencia propia de las células. Por otra parte, otro control realizado fue la marcación de macrófagos con cada uno de los anticuerpos fluorescentes individualmente para determinar la propagación de la fluorescencia de cada fluorocromo sobre los canales de lectura de los demás fluorocromos y poder compensar este error.

Luego de pasar la muestra por el citómetro se nos entregó un archivo con los eventos generados, que al abrirlo en el software nos marcaba los eventos en relación de side scatter (SSC) y forward scatter (FSC) (Figura 11).

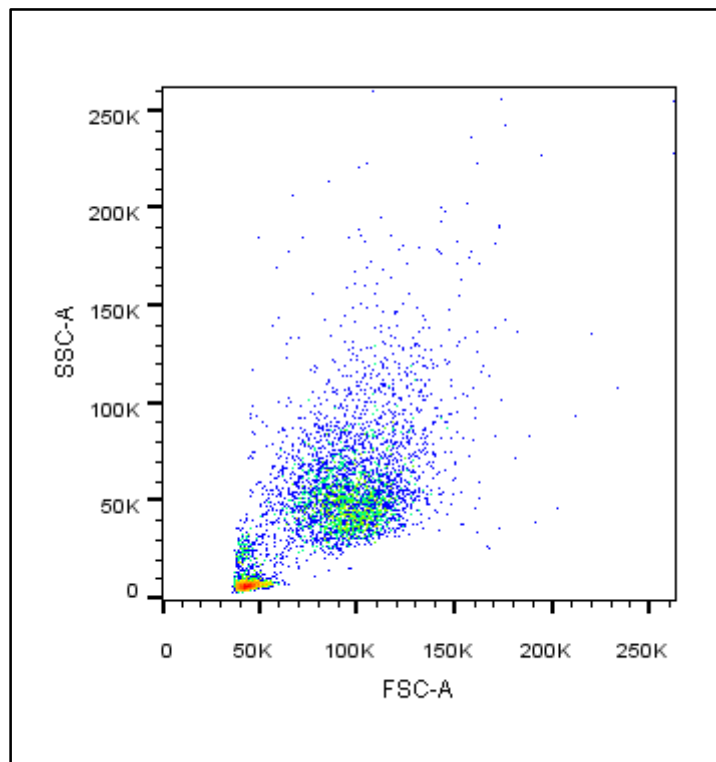


Figura 11. Eventos comparados según SSC (complejidad celular) y FSC (tamaño celular).

La estrategia que utilizamos para analizar las muestras consistía en un primer gate llamado “singlets” el cual permite discriminar los eventos que representan una única célula de aquellos eventos que representan dos o más células juntas para esto se enfrentaron dos ejes dimensionales (altura y área) de un mismo parámetro (FSC) y se seleccionan los eventos que mantienen una relación 1:1 para ambas dimensiones. A partir de la población seleccionada anteriormente generamos un segundo gate donde se enfrentaron el eje de tamaño celular (FSC) y el canal de lectura de V450 con el fin de tomar los eventos que no presenten intensidad en V450 (Negativo a Z. Violet, colorante que penetra en las células muertas). De esta última población seleccionada, se genera un tercer gate donde los ejes seleccionados fueron el canal de lectura para el marcador de CD11b y el tamaño celular (FSC), seleccionando la nube de eventos que presenta intensidad para el canal de lectura de PECy7 (positivo a CD11b). Toda esta estrategia se representa en la figura 12.

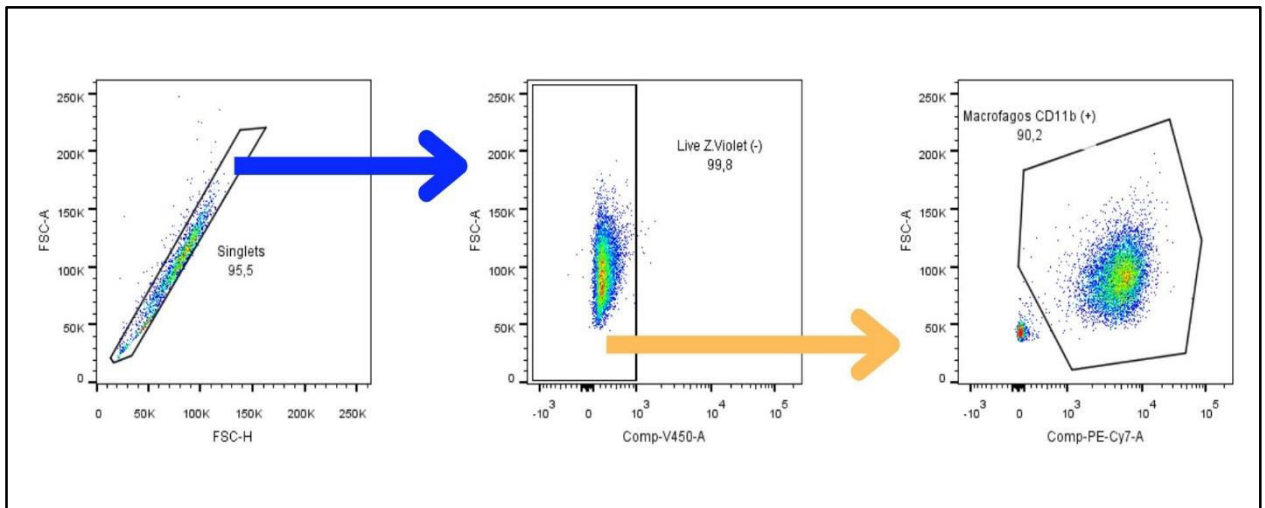


Figura 12. Representación de la estrategia utilizada para llegar a los eventos de interés para el análisis.

Después de realizar todos estos gates llegamos a obtener los eventos que son de nuestro interés, eventos de células vivas individuales y que expresan CD11b (marcador de macrófago), para ser analizados por medio de histogramas con los canales de lecturas para los marcadores de CD206, CD163, HLADR, y CD64 (Figura 13).

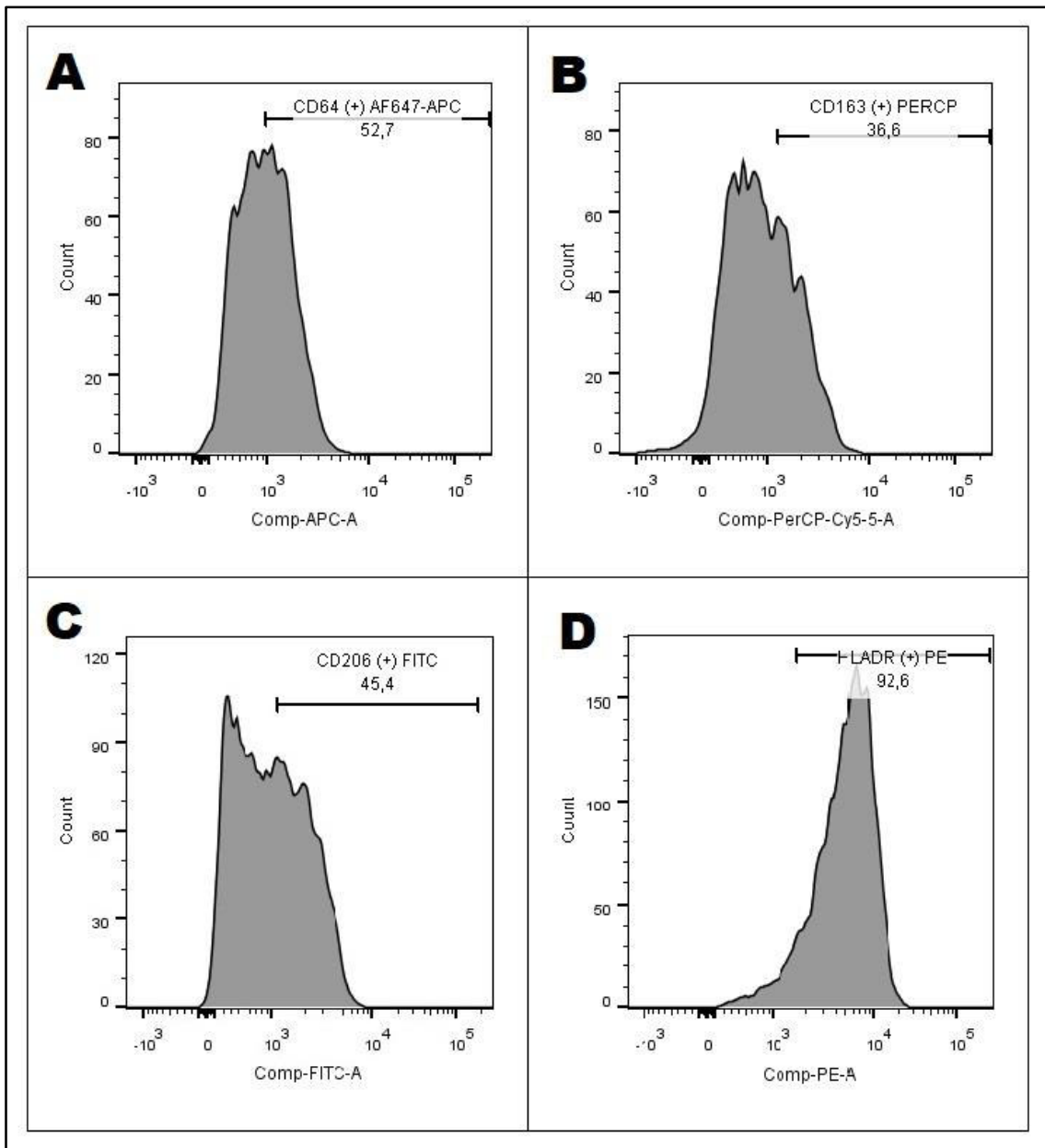


Figura 13. Ejemplo de histogramas que fueron analizados para cada antígeno de superficie que utilizamos. Siendo el histograma A de CD64, B de CD16, C de CD206 y D de HLADR.

3.7. Análisis de datos y estadística

Los datos numéricos obtenidos fueron cargados al software GraphPad Prism 8, desde donde se generaron todos los gráficos de resultados y se obtuvieron todos los parámetros estadísticos. Las significancias de las diferencias entre los resultados se analizaron a

través del test de kruskal wallis seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Dunn (cuando eran más de dos grupos de muestras a comparar) o a través del test mann whitney (cuando eran solo dos grupos de muestras a comparar). Se consideró significativo a aquellos p menores a 0,05.

4. Resultados

A partir de un grupo de 14 muestras de donadores sanos de ambos géneros se evaluó la expresión de marcadores de perfil en macrófagos. En todos los gráficos utilizados en los resultados se muestran tanto los valores individuales como la media y la variabilidad expresada como error estándar de la media (SEM).

4.1. Perfil de macrófagos control

Con la intención de tener controles de la expresión de los marcadores de perfil de macrófagos como referencia, para así poder compararlos con las condiciones desconocidas de nuestro medio condicionado, se expusieron macrófagos a condiciones experimentales estándar para cada perfil (Tabla 1). Los marcadores utilizados fueron CD206, CD163, CD64 y HLADR. Para su análisis se comparó la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de estos marcadores y el porcentaje de positividad, pero se decidió que la MIF discriminaba ligeramente mejor los perfiles.

Los controles obtenidos mostraron que la expresión de CD206 es mayor en perfiles como M2a y M2c (Dexametasona) como se observa en la Figura 14. La expresión de HLADR (Figura 15) y CD64 (Figura 16) es mayor en el perfil M1. Por su parte, CD163 presenta aumentada la expresión en ambas diferenciaciones a M2c (Figura 17).

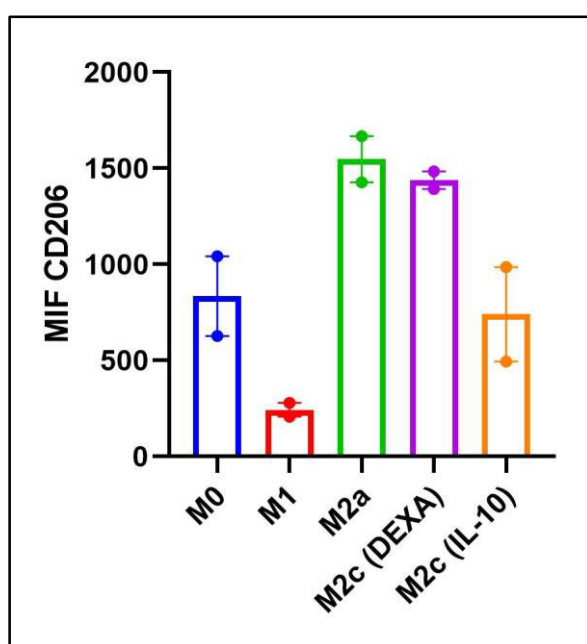


Figura 14. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD206 en los controles.

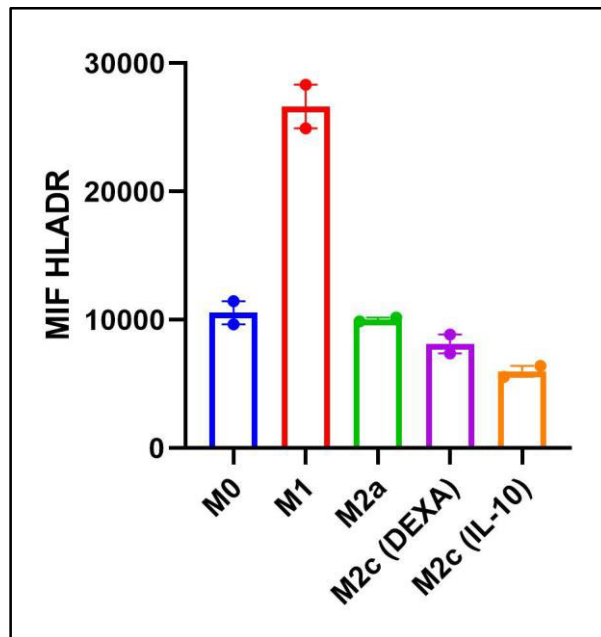


Figura 15. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador HLADR en los controles.

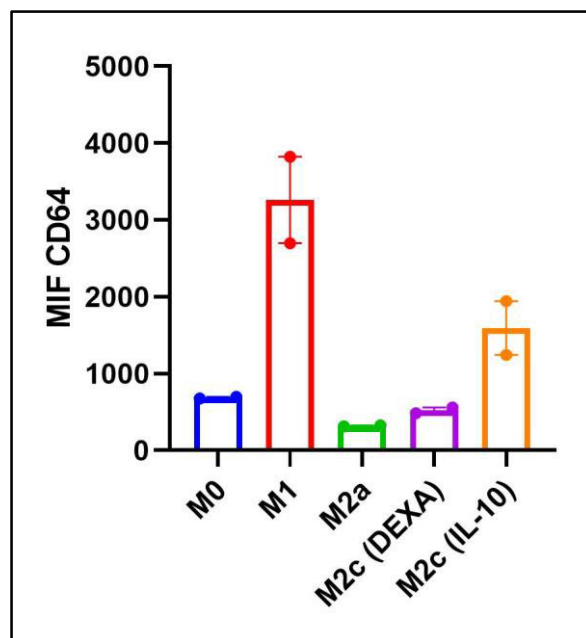


Figura 16. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD64 en los controles.

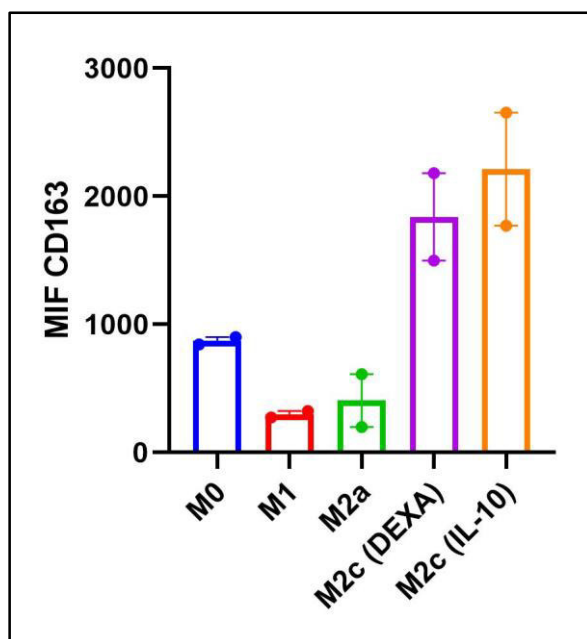


Figura 17. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD163 en los controles.

4.2. Cambios en la expresión de marcadores de macrófago inducido por el medio condicionado

Se quiere conocer los cambios de expresión que provoca el medio condicionado sobre los macrófagos y, además comparar esta expresión por medio condicionado con los controles propuestos anteriormente y concluir a que perfil se asemeja.

Para lo primero, comparamos la expresión de los marcadores en medio condicionado frente a DMEM que es el vehículo. En este caso, el DMEM no tiene ningún componente que active los macrófagos por lo que su perfil se asemeja al de M0 de referencia. Como resultado obtuvimos que el medio condicionado aumenta la expresión de CD206 (Figura 18) y disminuye la expresión de HLADR (Figura 19) en comparación al vehículo, por otra parte, CD64 (Figura 20) y CD163 (Figura 21) no tuvieron cambios apreciables. También notamos cambios morfológicos característicos en los macrófagos expuestos al medio condicionado (Figura 30).

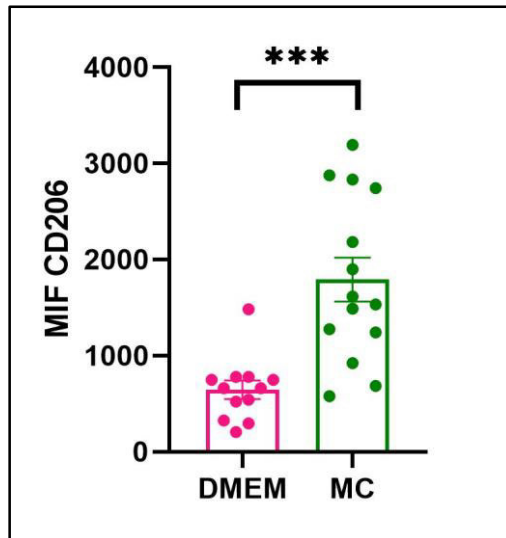


Figura 18. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD206 de medio condicionado y DMEM. Teniendo diferencia significativa con *** $p < 0.001$ (n=12).

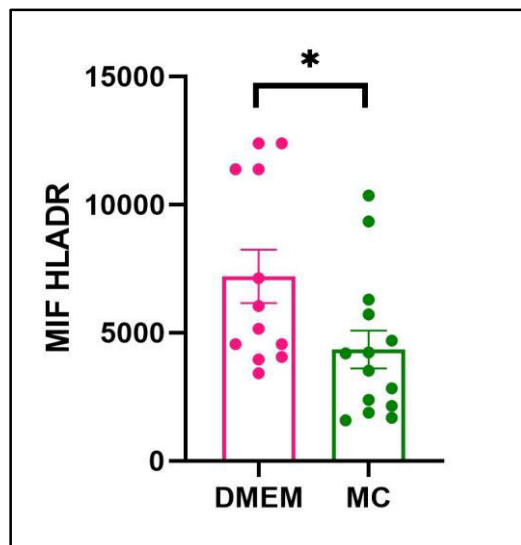


Figura 19. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador HLADR de medio condicionado y DMEM. Teniendo diferencia significativa con * $p < 0.05$ (n=12).

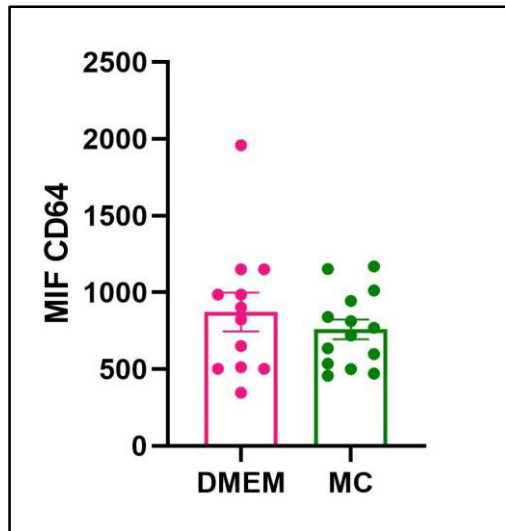


Figura 20. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD64 de medio condicionado y DMEM.

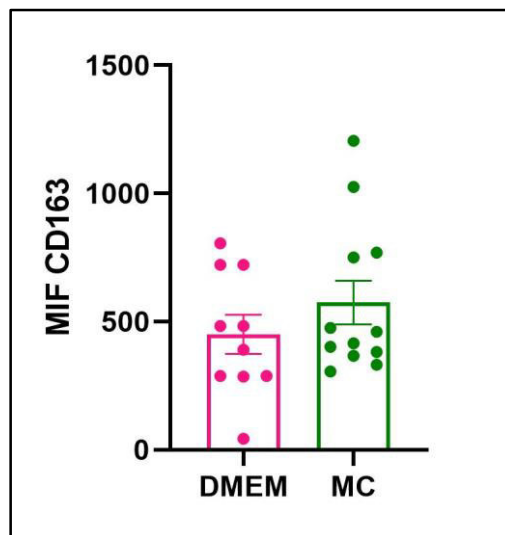


Figura 21. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD163 de medio condicionado y DMEM.

Para determinar a qué perfil de los controles se asemeja el medio condicionado se comparó todos los resultados previos en una misma tabla. Resultados donde se puede observar que el medio condicionado (MC) en la expresión de CD206 (Figura 22), de HLADR (Figura 23), de CD64 (Figura 24), y de CD163 (Figura 25) se asemeja a un perfil M2, y no al perfil M1. Teniendo en cuenta los resultados de CD206 y CD163 se podría decir que se asemeja más específicamente a un perfil M2a.

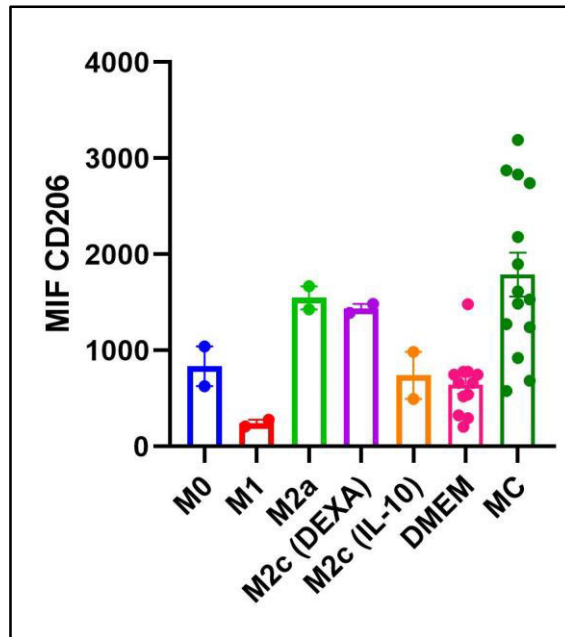


Figura 22. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD206 de medio condicionado, DMEM y los controles.

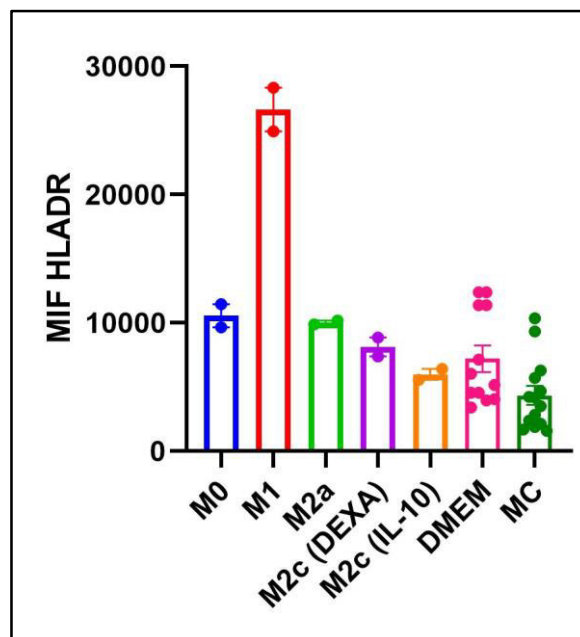


Figura 23. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador HLADR de medio condicionado, DMEM y los controles.

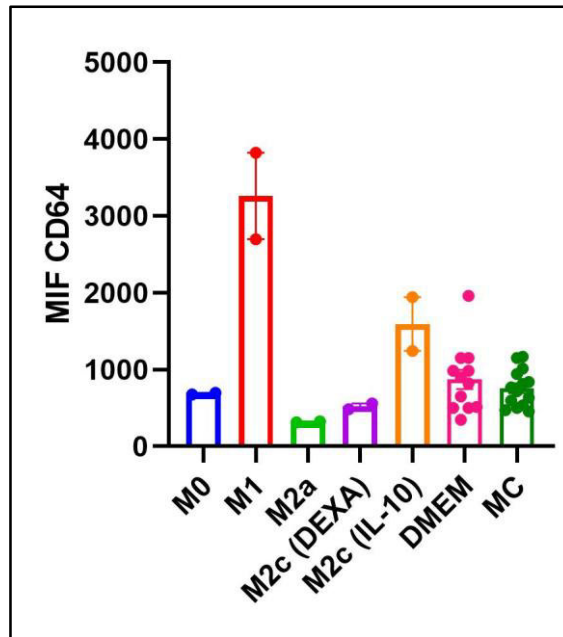


Figura 24. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD64 de medio condicionado, DMEM y los controles.

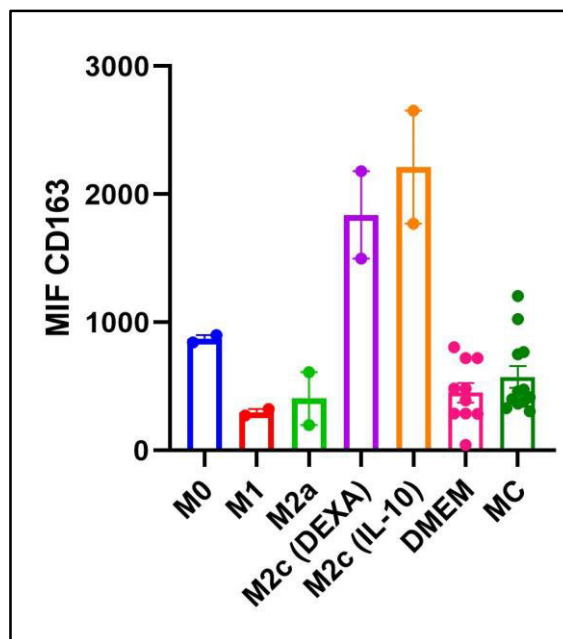


Figura 25. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD163 de medio condicionado, DMEM y los controles.

4.3. Anexina V como molécula capaz de revertir la diferenciación de macrófagos inducida por medio condicionado

Con el fin de observar cómo afectan los receptores TAM en la expresión de marcadores de macrófagos se buscó formas de intervenir en la señalización de estos receptores, una de esas formas fue utilizar un competidor de los ligandos de los receptores TAM (PROS1 y GAS6). La anexina V tiene varias funciones, entre ellas, la capacidad de unirse a la fosfatidilserina. Por lo anterior, la anexina V compite por la unión a fosfatidilserina con lo ligandos PROS1 y GAS6, reduciendo el número de ligandos unidos a fosfatidilserina capaces de activar los receptores TAM.

Para poder descartar cualquier cambio que produzca la anexina V por sí sola en la expresión de marcadores de macrófagos se aplicó el control de DMEM con Anexina V y así deducir que comportamiento tiene la anexina V por sí sola, independiente a la familia TAM. En los resultados podemos observar que en HLADR (Figura 26) y CD64 (Figura 27) no hay cambios apreciables cuando está presente la Anexina V, y en cuanto a CD163 (Figura 28) se observa una tendencia a aumentar la expresión pero que es efecto propio de la Anexina V. Donde sí se observó una capacidad diferencial de la anexina V fue en el marcador CD206 (Figura 29) teniendo una tendencia a aumentar de la MIF en comparación al DMEM solo y una disminución significativa en comparación al medio condicionado (MC) permitiéndonos concluir que la disminución de este marcador respecto al MC se debe al bloqueo de la anexina V en la señalización TAM.

Además, en presencia de anexina V se vio la reversión de los cambios morfológicos provocados por el medio condicionado (Figura 30).

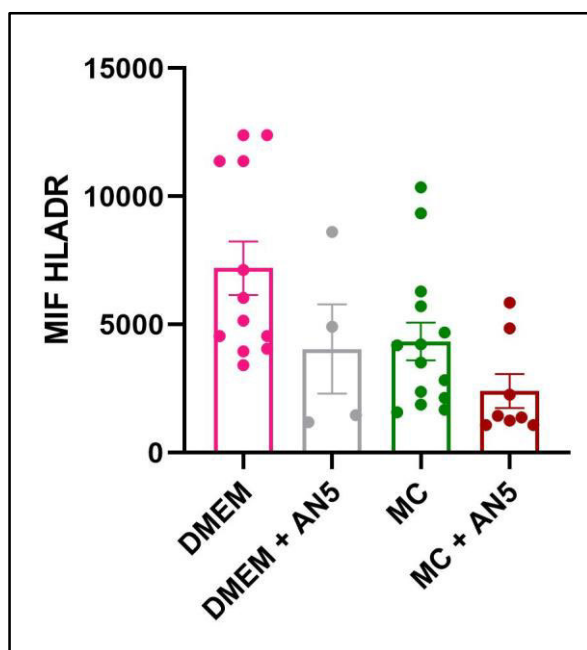


Figura 26. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador HLADR frente a DMEM, MC y Anexina V (AN5).

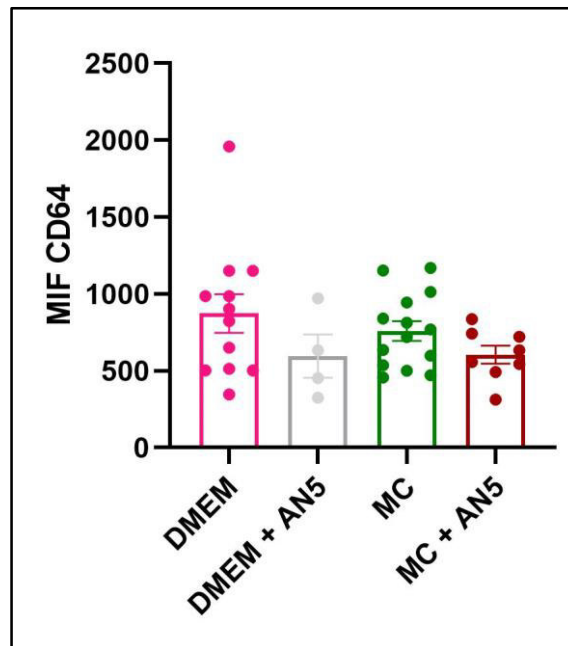


Figura 27. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD64 frente a DMEM, MC y Anexina V (AN5).

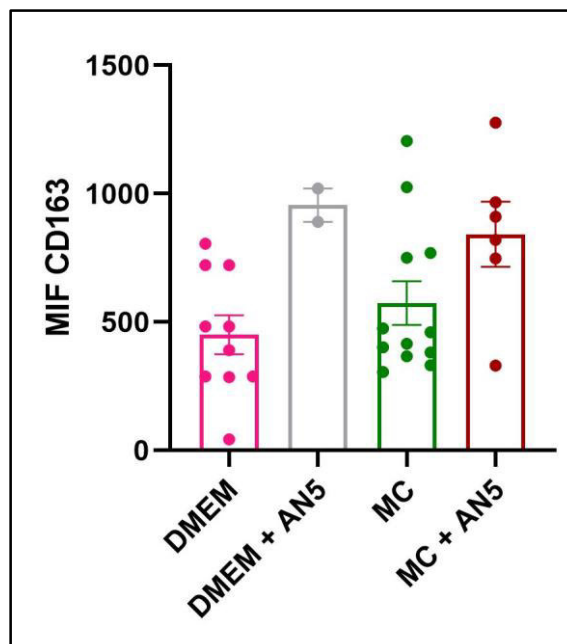


Figura 28. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD163 frente a DMEM, MC y Anexina V (AN5).

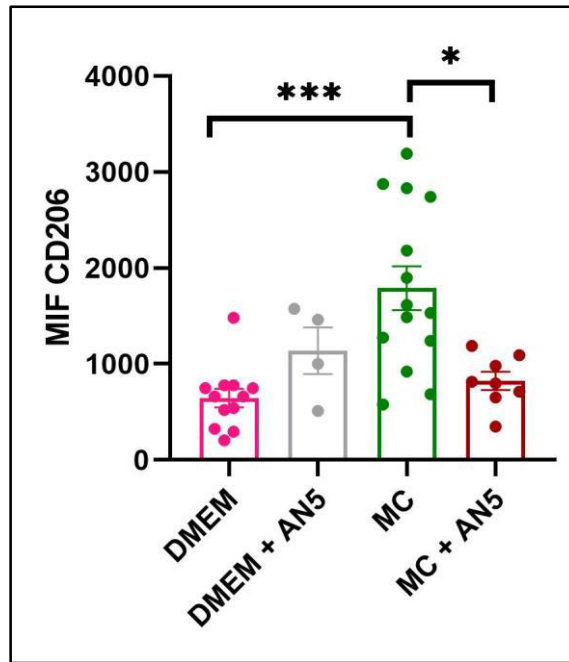


Figura 29. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD206 frente a DMEM, MC y Anexina V (AN5). Teniendo diferencia significativa con *** $p < 0.001$ (n=12) y * $p < 0.05$ (n=8).

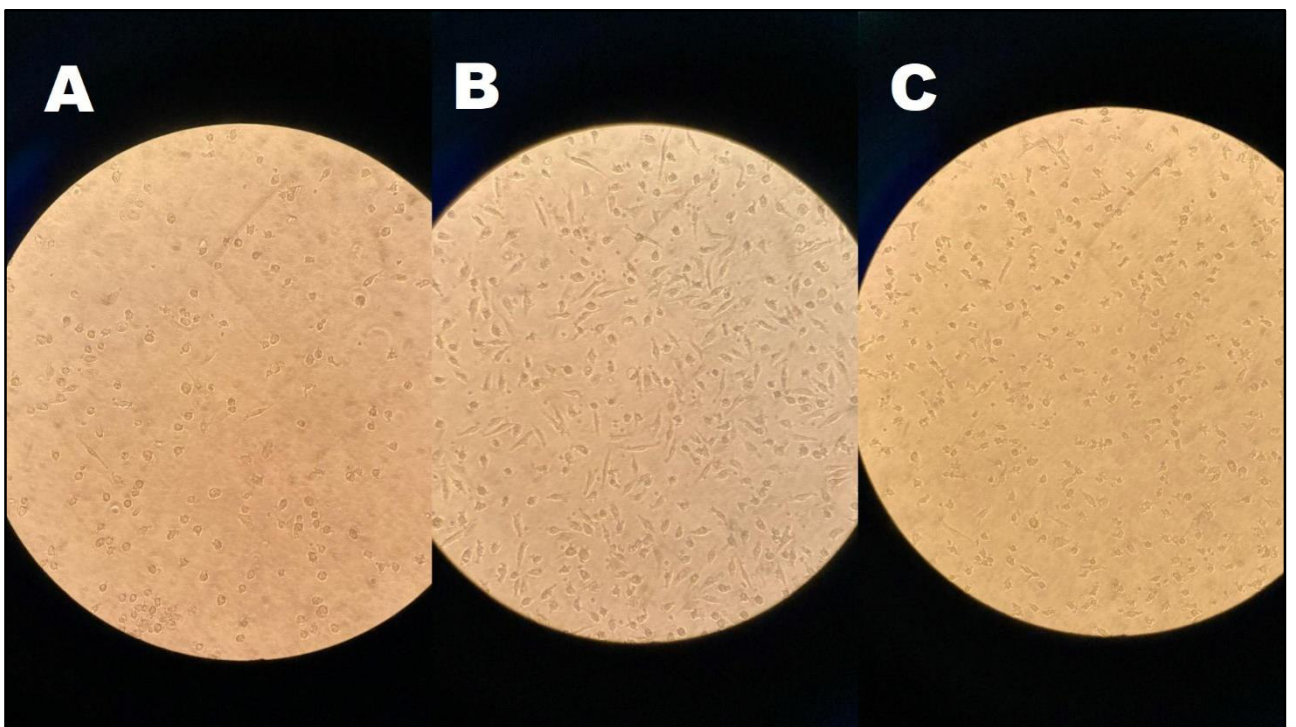


Figura 30. Cambios morfológicos de los macrófagos frente a las diversas condiciones experimentales. Siendo la imagen A la morfología en DMEM, B la morfología en medio condicionado, y C la morfología en medio condicionado con Anexina V.

4.4. Bloqueo de ligandos de GAS6 y PROS1 como forma de revertir la diferenciación de macrófagos inducida por medio condicionado

Para conocer el efecto de la disminución de los ligandos GAS6 y PROS1 de forma más específica se utilizaron anticuerpos anti GAS6 y PROS1, para poder bloquearlos y evitar la activación de los receptores TAM. Se los utilizo en conjunto a ambos anticuerpos.

En los resultados de CD206 (Figura 31) podemos ver como el aumento significativo que se da en medio condicionado se ve mitigado por la presencia de los anticuerpos bloqueantes de GAS6 y PROS1 llevando su expresión a niveles similares a los del DMEM (M0).

En el caso del marcador de M1 HLADR (Figura 32) no se observan cambios significativos de la MIF respecto al medio condicionado por sí solo, indicando que los ligandos TAM no son responsables del cambio en la expresión de este marcador por parte del medio condicionado. Por su parte, el bloqueo de los ligandos generó una disminución significativa de CD64 en presencia del medio condicionado (Figura 33).

En el marcador de perfil M2c, el CD163 (Figura 34) también observamos una tendencia a la disminución del marcador frente a los bloqueantes, pero al tener solo dos repeticiones no podemos ver su significancia.

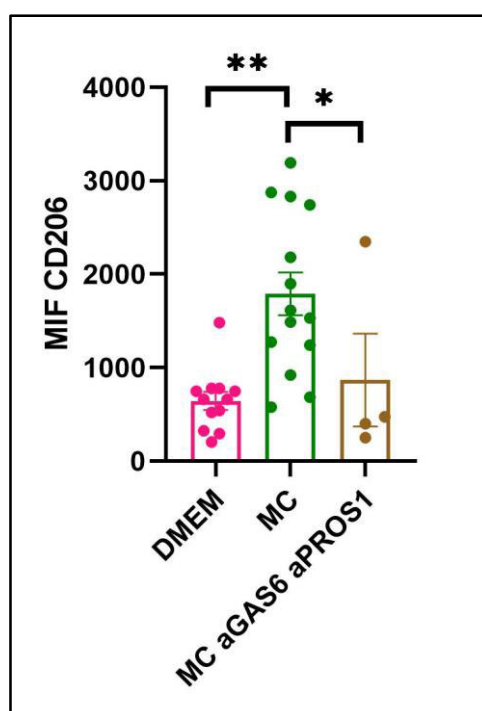


Figura 31. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD206 frente a DMEM, MC y anticuerpos bloqueantes. Teniendo diferencia significativa con ** $p < 0.01$ (n=12) y * $p < 0.05$ (n=4).

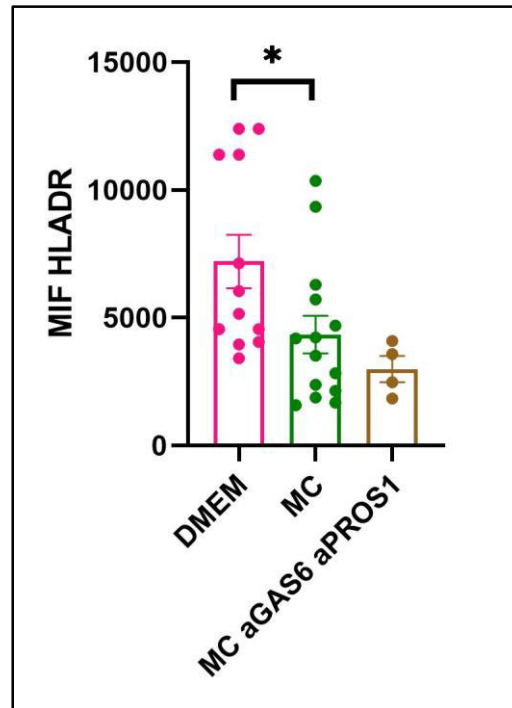


Figura 32. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador HLADR frente a DMEM, MC y anticuerpos bloqueantes. Teniendo diferencia significativa con * $p < 0.05$ (n=12).

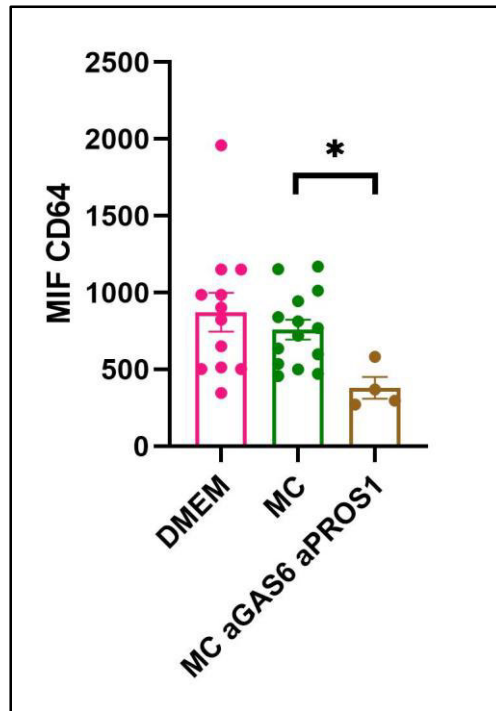


Figura 33. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD64 frente a DMEM, MC y anticuerpos bloqueantes. Teniendo diferencia significativa con * $p < 0.05$ (n=4).

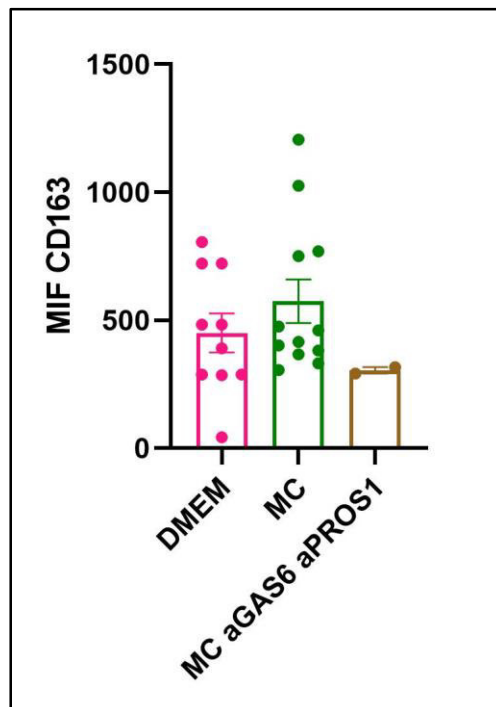


Figura 34. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador CD163 frente a DMEM, MC y anticuerpos bloqueantes.

5. Discusión y conclusión

Aunque desconocemos la composición exacta del medio condicionado proveniente de la línea celular MDA MB231 (con características de cáncer de mama triple negativo), con los resultados obtenidos podemos confirmar que uno o varios de los componentes del medio condicionado están provocando cambios morfológicos, y un aumento de expresión de CD206 o receptor de manosa (MMR) en macrófagos. Diferenciación también observada en otro trabajo donde utilizaron la misma línea celular, pero con una metodología diferente (Hollmén et al., 2015). Además, desde nuestros resultados observamos una disminución de la expresión de HLADR. Todos estos cambios nos hacen creer que las células tumorales proveniente de tumores triple negativos, como nuestra línea celular de estudio, tienen la capacidad de secretar moléculas al microambiente que mantienen a los macrófagos con una diferenciación protumoral, como en un perfil tipo M2.

Con la intención de intervenir en la señalización de los receptores TAM, una primera prueba fue utilizar la anexina V la cual por su afinidad con fosfatidilserina es un competidor de los ligandos PROS1 y GAS6, aunque la anexina V tiene otras funciones no ligadas a los receptores TAM que afecta a la diferenciación del macrófago, nos sirve para obtener un primer acercamiento. De estos resultados observamos que la anexina V por si sola en los macrófagos tiene una tendencia a aumentar la expresión de CD206, resultado esperado (Kang et al., 2024), aunque en menor medida que el medio condicionado. Pero cuando la anexina V está presente con el medio condicionado observamos que el gran aumento de la expresión de CD206 en macrófagos y los cambios morfológicos causados por el medio condicionado se vieron revertidos con valores de expresión de CD206 similares a los de un perfil M0 y una morfología también acorde a este. Esto último, nos da a entender que hay una interacción de la anexina V con los componentes del medio condicionado que evita la diferenciación del macrófago a un perfil tan marcado por su aumento de CD206 y morfología característica.

Por otra parte, la expresión de HLADR no se vio afectada por la presencia de anexina en comparación a los cambios provocados por el medio condicionado, lo que nos hace pensar que los componentes del medio condicionado que afectan a la expresión de CD206 y HLADR son diferentes, y actúan por vías de señalización diferentes. Sugiriendo un

vínculo entre la señalización de la familia TAM y la expresión de CD206, pero no con la de HLADR.

En cuanto a CD163 y CD64, con los resultados obtenidos no podemos confirmar ningún aumento ni disminución de su expresión debido al medio condicionado. Lo único que podemos ver que la anexina V por si sola tiende a aumentar la expresión de CD163, cambios de expresión que no se ven afectados por la presencia de medio condicionado, por lo tanto, son propios de la anexina V.

Al intervenir directamente con anticuerpos dirigidos al bloqueo específico de PROS1 y GAS6, observamos que el aumento de la expresión de CD206 provocado por el medio condicionado se ve atenuado. Esto nos lleva a suponer que el aumento de la expresión de CD206 en macrófagos se debe a la presencia de los ligandos GAS6 y/o PROS1 en el medio condicionado proveniente de la línea MDA MB231, siendo la activación de los receptores TAM la señal para provocar este cambio en la expresión. En resultados preliminares no mostrados en esta tesis, el mayor efecto de atenuación se observa cuando bloqueamos PROS1, dándonos a entender que este ligando tiene una mayor importancia en la diferenciación cuando se trabaja con esta línea celular. A su vez, esto se puede respaldar con los resultados no publicados del grupo donde observaron por citometría de flujo intracitoplasmática que la línea MDA MB231 tiene alta expresión del ligando PROS1 en comparación con una mínima del ligando GAS6. Además, cada receptor TAM tiene una respuesta distinta para cada ligando, siendo PROS1 más potente en la activación de Tyro3 (Tsou et al., 2014) lo que respalda que el efecto de atenuación de los ligandos sea distinto según cual receptor TAM sea activado en la expresión de CD206.

En cuanto a HLADR, CD64 y CD163, en base a los resultados obtenidos con el bloqueo de ligandos GAS6 y PROS1, solamente CD64 se ve afectado y tiene una disminución significativa. Es posible que la adición de estos anticuerpos al medio condicionado este afectando el balance de señales de los componentes del medio condicionado que interviene en la expresión de CD64, pero los resultados no son claros como para afirmar que la expresión de CD64 está regulada por los receptores TAM.

En conclusión, la línea MDA MB231 genera un microambiente capaz de aumentar la expresión de CD206 y disminuyen la expresión de HLADR en macrófagos, llevándolos a un perfil protumoral similar M2a. Los resultados surgieron que los receptores TAM y sus ligandos están involucrados en los cambios de expresión en CD206, pudiendo ser el bloqueo de estos receptores una forma de cambiar el microambiente tumoral y favorecer la actividad antitumoral de los macrófagos.

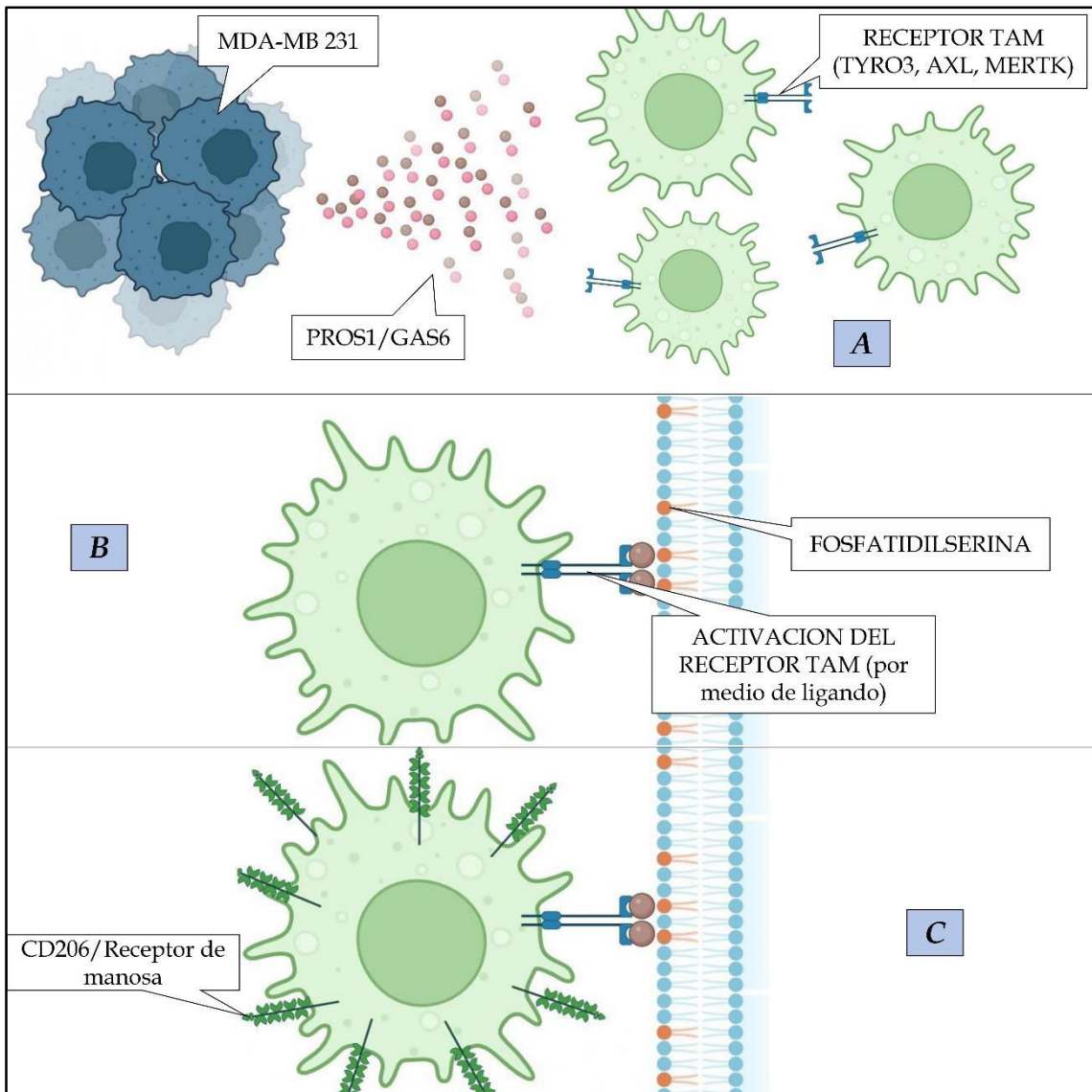


Figura 35. Conclusión final. En el sector A se representa el escenario inicial donde la línea celular MDA-MB 231 tiene la capacidad de liberar PROS1/GAS6 al microambiente tumoral donde están presentes macrófagos infiltrados. En el sector B observamos como los ligandos PROS1/GAS6 se unen a la fosfatidilserina y así activan los receptores TAM presentes en los macrófagos infiltrados. En el sector C se representa como la activación de los receptores TAM induce a un aumento de la expresión de CD206 en la membrana de los macrófagos infiltrados (Imagen creada con biorender).

6. Bibliografía

- Aehnlich, P., Powell, R. M., Peeters, M. J. W., Rahbech, A., & thor Straten, P. (2021). TAM Receptor Inhibition–Implications for Cancer and the Immune System. *Cancers*, 13(6), 1195. <https://doi.org/10.3390/cancers13061195>
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., & Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.07.004>
- Bates, J. P., Derakhshandeh, R., Jones, L., & Webb, T. J. (2018). Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 556. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4441-3>
- Borri, F., & Granaglia, A. (2021). Pathology of triple negative breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 72, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.06.005>
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- Criscitiello, C., & Curigliano, G. (2013). Immunotherapeutics for breast cancer. *Current Opinion in Oncology*, 25(6), 602–608. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000020>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>

- Derakhshan, F., & Reis-Filho, J. S. (2022). Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 17(1), 181–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042420-093238>
- Disis, M. L. (2010). Immune Regulation of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(29), 4531–4538. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.2146>
- Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, & Bray F. (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. <https://gco.iarc.who.int/today>
- Hollmén, M., Roudnicky, F., Karaman, S., & Detmar, M. (2015). Characterization of macrophage - cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Scientific Reports*, 5(1), 9188. <https://doi.org/10.1038/srep09188>
- Kang, B., Jia, Z., Dong, Y., Li, W., & Zhang, W. (2024). Recombinant human annexin A5 accelerates diabetic wounds healing by regulating skin inflammation. *Regenerative Therapy*, 27, 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2024.03.013>
- Kasikara, C., Davra, V., Calianese, D., Geng, K., Spires, T. E., Quigley, M., Wichroski, M., Sriram, G., Suarez-Lopez, L., Yaffe, M. B., Kotenko, S. v., de Lorenzo, M. S., & Birge, R. B. (2019). Pan-TAM Tyrosine Kinase Inhibitor BMS-777607 Enhances Anti-PD-1 mAb Efficacy in a Murine Model of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*, 79(10), 2669–2683. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2614>
- Larionova, I., Tuguzbaeva, G., Ponomaryova, A., Stakheyeva, M., Cherdyntseva, N., Pavlov, V., Choinzonov, E., & Kzhyshkowska, J. (2020). Tumor-Associated

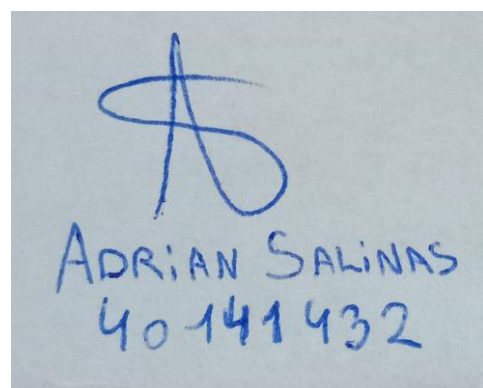
Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.566511>

- Lemke, G. (2013). Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a009076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009076>
- Linger, R. M. A., Keating, A. K., Earp, H. S., & Graham, D. K. (2008). TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer (pp. 35–83). [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00002-X)
- Loi, S., Dushyanthen, S., Beavis, P. A., Salgado, R., Denkert, C., Savas, P., Combs, S., Rimm, D. L., Giltane, J. M., Estrada, M. v., Sánchez, V., Sanders, M. E., Cook, R. S., Pilkinton, M. A., Mallal, S. A., Wang, K., Miller, V. A., Stephens, P. J., Yelensky, R., ... Balko, J. M. (2016). RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 22(6), 1499–1509. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1125>
- Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., & Garlanda, C. (2022). Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 21(11), 799–820. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00520-5>
- Miao, Y. R., Rankin, E. B., & Giaccia, A. J. (2023). Therapeutic targeting of the functionally elusive TAM receptor family. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00846-8>
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., de Baetselier, P., & van Ginderachter, J. A. (2010). Different Tumor Microenvironments Contain Functionally Distinct

Subsets of Macrophages Derived from Ly6C(high) Monocytes. *Cancer Research*, 70(14), 5728–5739. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4672>

- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*, 41(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Reutelingsperger, C. P. M., & van Heerde, W. L. (1997). Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 53(6), 527–532. <https://doi.org/10.1007/s000180050067>
- Sadeghi, M., Khayati, S., Dehnavi, S., Almahmeed, W., Sukhorukovi, V. N., & Sahebkar, A. (2024). Regulatory impact of statins on macrophage polarization: mechanistic and therapeutic implications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgae024>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tsou, W.-I., Nguyen, K.-Q. N., Calarese, D. A., Garforth, S. J., Antes, A. L., Smirnov, S. v., Almo, S. C., Birge, R. B., & Kotenko, S. v. (2014). Receptor Tyrosine Kinases, TYRO3, AXL, and MER, Demonstrate Distinct Patterns and Complex Regulation of Ligand-induced Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), 25750–25763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.569020>

- Williams, C. B., Yeh, E. S., & Soloff, A. C. (2016). Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *Npj Breast Cancer*, 2(1), 15025. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.25>
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., ... Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*, 40(2), 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006>
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., & Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 1991–2001. <https://doi.org/10.1172/JCI35180>
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., & Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 59–73. <https://doi.org/10.1038/nri2216>



ADRIAN SALINAS
40-141432