

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Cambios en el fenotipo de las células cebadas por
condiciones prevalentes en el microambiente tumoral: el
caso de la hipoxia cíclica**

Tesis que presenta:

M. en C. Deisy Lizbeth Segura Villalobos

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

En la especialidad de:

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Mónica Lamas Gregori

Esta tesis se desarrolló en los laboratorios 11 y 13 del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav, gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) mediante la beca de doctorado con Registro No. 781556 y los Proyectos: CF-2019-51488 y A1-S-25777.

La ciencia experimental es como un rompecabezas, necesita paciencia, perseverancia y, de vez en cuando, alguien que nos ayude a acomodar las piezas.

...

Para Ernesto Griego, por completarme como científica y como ser humano.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis: Dra. Claudia González Espinosa y Dra. Mónica Lamas Gregori, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi doctorado. Gracias por permitirme aprender tanto de ustedes y por todos sus consejos que me ayudaron a culminar con éxito esta etapa de mi vida profesional.

A mi comité sinodal: Dra. Marcela Lizano, Dra. Carmen Sánchez, Dra. Alicia Sánchez, y Dr. David Centurión, no pude tener un mejor jurado. Muchas gracias por acompañarme en este camino, aportando sus ideas que sin duda enriquecieron siempre para bien mi proyecto. Y también por cada pregunta durante los avances, las cuales me hicieron leer más para discutir mejor mis resultados.

Al Dr. Emilio Galván, por aceptar formar parte de mi comité sinodal (a última hora) y por todas las valiosas aportaciones en la escritura de mi tesis.

A Alfredo Ibarra Sánchez, gracias por enseñarme todas las técnicas empleadas, y por darme los “tips” adecuados para obtener mejores resultados. Gracias también por tu amistad durante mi larga estancia en el laboratorio.

A Rodolfo Pérez Lagunes, por todas las facilidades que me brindó para realizar muchos de los experimentos de mi proyecto doctoral. Gracias por todo tu apoyo, pero, sobre todo, gracias por nuestra bonita amistad.

A Ivonne Lezama, por toda la ayuda que me brindó en el laboratorio 13. Sin ella, mi estancia ahí no hubiera tenido tantos días coloridos.

A René Garduño por su valiosa ayuda en la adquisición de las imágenes de microscopía confocal y por todos sus consejos para mejorar mis preparaciones.

A mis compañeros y compañeras del laboratorio 11 y 13, especialmente a Monse Osorio y a Frida Martínez, que se volvieron cómplices de experimentos, sobre todo en los interminables días de la pandemia. Agradezco infinitamente toda su ayuda, sus consejos y sus palabras de aliento en mis días grises.

A mis amigos y amigas que llegaron para quedarse en mi vida. Especialmente a Zyanya Espinosa, Magnolia Martínez y Omar Muñoz, quiénes, sin proponérselo, me han inspirado a continuar en este camino.

A mis padres: Lucio Segura y Margarita Villalobos que siempre me han apoyado en cada paso académico de mi vida. Gracias por todos sus sacrificios y preocupaciones, sin los cuales no hubiera llegado hasta esta etapa de mi vida profesional.

A mis hermanos y hermanas, por todo su apoyo y por hacerme pasar momentos tan agradables, pero, sobre todo, gracias por sentirse orgullosos y orgullosas de mí.

A Ernesto Griego, un ser excepcional que llegó a cambiar mi mundo para bien. Gracias por estar en los momentos más felices y tristes de mi vida, y por creer en mí más que nadie en el mundo.

A mis abuelitos, Clemente y Elvira, donde quiera que estén. Este logro también es suyo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	i
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de las células cebadas	1
1.2. Plasticidad fenotípica de las CCs	2
1.3. Mecanismos de activación de las CCs	4
1.3.1. Vía de señalización del receptor FcεRI	5
1.4. Principales funciones de las CCs	8
1.5. Participación de las CCs en el desarrollo tumoral	9
1.5.1. Relación entre alergias, cáncer y CCs	11
1.6. Características del microambiente tumoral.....	13
1.6.1. Cambios metabólicos en el TME: el caso de la hipoxia	14
1.6.2. La hipoxia tumoral y la vía del factor inducido por hipoxia (HIF)	15
1.6.3. Diferencias entre la chH y la cyH	17
1.7. Hipoxia cíclica y progresión tumoral	17
1.8. Efecto del TME en el cambio de fenotipo de las células inmunes asociadas a los tumores.....	19
1.9. ¿Existe la polarización de las CCs hacia fenotipos bien definidos?	21
1.10. Efecto de la cyH en el cambio de fenotipo de las CCs	22
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general.....	23
4.2. Objetivos particulares	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Animales	24
5.2. Reconstitución de los ratones Wsh.....	24
5.3. Cultivo de células B16-F1 y generación de tumores.....	24
5.4. Inmunofluorescencia de las biopsias de tumores y microscopía confocal	25
5.5. Obtención de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs).....	27
5.6. Protocolo de hipoxia cíclica	27
5.7. Ensayo de viabilidad celular	28
5.8. Extracción de RNA, síntesis de ADNc y PCR.....	28
5.9. Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno.....	29

5.10. Microarreglos	29
5.11. PCR en tiempo real.....	31
5.12. Ensayo de desgranulación.....	32
5.13. Determinación de calcio intracelular	33
5.14. Análisis estadístico	34
6. RESULTADOS	34
6.1. Las CCs infiltran los tumores de melanoma y se localizan en zonas de cyH	34
6.2. La cyH aumenta la expresión génica de <i>Hif-1α</i> y de <i>Vegf</i> , que son considerados marcadores de hipoxia	38
6.3. La cyH induce una mayor producción de ROS dependiente de los períodos alternados de reoxigenación.....	41
6.4. La cyH induce cambios diferenciales en la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias.....	43
6.5. La cyH induce cambios importantes en el transcriptoma de las CCs	44
6.6 La cyH induce una hiperactividad a la activación del receptor FcεRI en las CCs	50
6.7. El fenotipo de hiperactividad en CCs inducido por la cyH se asocia con un aumento de calcio intracelular y una mayor actividad de la fosfolipasa C	51
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIONES.....	65
9. PERSPECTIVAS	65
10. REFERENCIAS.....	66
11. ANEXOS	75
ANEXO I	75
Preparación de soluciones.....	75
ANEXO II	77
Secuencias de oligonucleótidos empleados en las PCRs.....	77
ANEXO III	78
Validación cuantitativa y cualitativa de las muestras para microarreglos	78

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de una célula cebada aislada del peritoneo..	1
Figura 2. Modelo actual de la hematopoyesis humana..	2
Figura 3. La gran variedad de receptores presentes en la membrana de CCs humanas.	5
Figura 4. Vía de señalización del receptor FcεRI en CCs.	8
Figura 5. Efectos de las CCs en la progresión tumoral	10
Figura 6. Principales características del TME.	14
Figura 7. La hipoxia y la vía de HIF-1α.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8. Estructura de la red vascular en un microambiente normal y en un microambiente tumoral...	18
Figura 9. Las CCs promueven el crecimiento del tumor de melanoma.....	35
Figura 10. Las CCs se localizan en zonas asociadas a cyH dentro del tumor de melanoma murino.	38
Figura 11. La cyH induce un aumento en la expresión de marcadores asociados con la hipoxia, sin afectar la viabilidad celular..	40
Figura 12. La cyH induce un incremento en la producción de ROS que es dependiente de los períodos alternados de reoxigenación..	42
Figura 13. La cyH induce cambios diferenciales en la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias, dependiendo de los períodos de hipoxia o reoxigenación.....	44
Figura 14. La cyH induce cambios importantes en el transcriptoma de las CCs, y los genes sobreexpresados se asocian con diferentes procesos biológicos, componentes celulares y vías de señalización.	47
Figura 15. La cyH induce una mayor liberación de β-hexosaminidasa tras la activación del receptor FcεRI en CCs..	51
Figura 16. La cyH induce una mayor actividad de la PLCγ y un incremento en los niveles de Ca ²⁺ intracelular en CCs expuestas a cyH tras ser estimuladas con el complejo IgE/Ag..	53

Figura 17. La cyH induce un incremento en los niveles de ARNm de citocinas relacionadas con la señalización de Ca²⁺ en CCs estimuladas con el complejo IgE/Ag..... 55

Figura 18. La cyH no induce un incremento en los niveles de ARNm de *Il-6*, *Ccl-2*, *Il-3* y *Tgf-β* en CCs estimuladas con el complejo IgE/Ag..... 56

Figura 19. La cyH promueve la plasticidad fenotípica en las CCs al inducir cambios transcriptómicos significativos que conducen a la hiperactividad tras la estimulación con IgE/Ag..... 64

ABREVIATURAS

Ag: antígeno

Akt: proteína cinasa B

BMMCs: células cebadas derivadas de la médula ósea

Ca²⁺: calcio

CCs: células cebadas

chH: hipoxia crónica

cyH: hipoxia cíclica

DEGs: Genes diferencialmente expresados

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ERK: cinasa reguladora por señales extracelulares

FcεRI: receptor de alta afinidad para la IgE

HIF-1α: factor inducible por hipoxia 1 alfa

IgE: inmunoglobulina E

IL: interleucina

CCL-2: ligando 2 de quimiocina con motivo C-C

IgE: inmunoglobulina E

Ag: antígeno

TGF-β: factor de crecimiento transformante beta

O₂: oxígeno

PLC-γ: fosfolipasa C gamma

PIP2: fosfatidilinositol inositol 4,5-bifosfato

DAG: diacilglicerol

IP3: inositol trifosfato

ROS: especies reactivas del oxígeno

TAMCs: células cebadas asociadas a tumores

TME: microambiente tumoral

TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

PHDs: enzimas prolihidroxilasas

FIH: factor inhibidor de HIF-1α

RESUMEN

Las células cebadas (CCs) juegan un papel importante en el desarrollo de los tumores, ejecutando funciones pro o antitumorales dependiendo del tipo y estadio del tumor y de los estímulos del microambiente tumoral (TME) a los que están expuestas. La hipoxia cíclica (cyH) es una característica común de casi todos los tumores sólidos, ya que los vasos sanguíneos no proporcionan un suministro continuo de oxígeno a la masa tumoral. En este trabajo probamos la hipótesis de que las CCs podrían localizarse en zonas sometidas a cyH dentro de los tumores sólidos y modificar, en consecuencia, su perfil transcripcional y sus parámetros de activación. Utilizando un modelo murino de melanoma y microscopía confocal encontramos que un número importante de CCs están presentes en zonas potencialmente sometidas a cyH. Posteriormente, analizamos los cambios transcripcionales de células cebadas murinas derivadas de médula ósea (BMMCs, por sus siglas en inglés) expuestas a un protocolo *in vitro* de cyH, el cual consistió en ciclos intercalados de hipoxia y reoxigenación. Utilizando la tecnología de microarreglos identificamos 2512 genes en las CCs sometidos a cyH cuya expresión mostró cambios en comparación con las células mantenidas en normoxia. El análisis de enriquecimiento funcional reveló que las alteraciones transcriptómicas relacionadas con la cyH correspondían a genes asociados con la fosforilación oxidativa y la vía de señalización FcεRI. De manera interesante, tras un reto con IgE/antígeno (Ag), la desgranulación dependiente de FcεRI, la movilización de calcio y la actividad de PLC-γ aumentaron en las BMMCs expuestas a cyH en comparación con las células mantenidas en condiciones de normoxia. Además, la expresión de citocinas relacionadas con la señalización por calcio, como *Tnf-α*, *Il-4* e *Il-2*, aumentó en las BMMCs expuestas a cyH, tras el reto con IgE/Ag. En conjunto, estos resultados indican que la cyH induce modificaciones transcripcionales en las CCs que se traducen en un cambio fenotípico caracterizado por la hiperreactividad a la estimulación con IgE/Ag. Nuestros resultados proporcionan nueva evidencia del efecto de las condiciones ambientales, como la cyH, en el fenotipo de las

CCs y sugieren que el microambiente intratumoral actúa como un potente modulador de la activación de las CCs que debería ser considerado en el diseño de terapias dirigidas contra la inflamación para controlar el crecimiento del tumor.

ABSTRACT

Mast cells (MCs) play an important role in tumor development, performing pro- or antitumor functions depending on the type and stage of the tumor and the tumor microenvironment stimuli (TME) to which they are exposed. Cyclic hypoxia (cyH) is a common feature of almost all solid tumors since blood vessels fail to provide a continuous supply of oxygen to the tumor mass. In this study, we examined the hypothesis that MCs could locate in cyH-exposed regions inside solid tumors and adjust their transcriptional profile and activation parameters as a result. Utilizing a murine model of melanoma and confocal microscopy, we found that an important number of MCs are present in zones potentially subjected to cyH. Then, we analyzed transcriptional changes of murine bone marrow-derived mast cells (BMMCs) exposed to an *in vitro* protocol of cyH, consisting of interleaved cycles of hypoxia and re-oxygenation. Utilizing microarray technology, we identified 2512 genes in MCs subjected to cyH whose expression displayed changes compared with normoxic cells. Furthermore, functional enrichment analysis revealed that cyH-related transcriptomic alterations affected genes associated with oxidative phosphorylation and the FcεRI signaling pathway. Interestingly, after IgE/antigen (Ag) challenge, FcεRI-dependent degranulation, calcium mobilization, and PLC-γ activity were enhanced in BMMCs exposed to cyH compared to those cells maintained in normoxic conditions. In addition, the expression of calcium signaling-related cytokines such as *Tnf-α*, *Il-4*, and *Il-2* was increased in BMMCs exposed to cyH after IgE/Ag challenge. Taken together, these findings indicate that cyH induces transcriptomic modifications in MCs that are translated into a phenotypic change characterized by hyperresponsiveness to IgE/Ag challenge. Our results provide novel evidence of the effect of environmental conditions such as cyH on MC phenotype and strongly suggest that the intratumoral microenvironment acts as a potent modulator of MCs activation which should be considered in the design of inflammation-targeted therapies to control tumor growth.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de las células cebadas

Las células cebadas (CCs) son células inmunes multifuncionales de origen hematopoyético presentes en todos los tejidos del organismo [1]. Morfológicamente se caracterizan por contener una gran cantidad de gránulos electrodensos en su citoplasma, los cuales están llenos de mediadores inflamatorios preformados que llenan todo el citoplasma de la célula (Figura 1) [2]. La estimulación y activación de las CCs conduce a la liberación de estos mediadores mediante diferentes procesos de secreción, que son dependientes del tipo y la intensidad del estímulo [3]. Una vez liberadas al medio extracelular, estas moléculas amplifican o suprimen las respuestas inmunes innatas y adquiridas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [4].

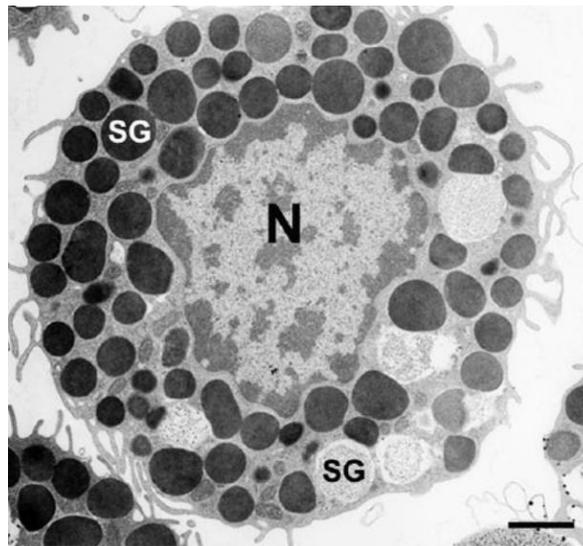


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de una célula cebada aislada del peritoneo donde se puede observar su morfología característica. N: núcleo; SG: gránulos secretorios. Barra de calibración = 1 μ m. Imagen modificada de [2].

1.2. Plasticidad fenotípica de las CCs

En el organismo adulto, las CCs se originan en la médula ósea a partir de un precursor común mieloide, que da origen a diferentes estirpes celulares, incluyendo los macrófagos [5] (Figura 2). Al igual que los macrófagos, se ha demostrado que, al menos en el embrión murino, las CCs presentes en la piel de los adultos, también provienen del saco vitelino [6]. Los precursores de las CCs viajan por la circulación sanguínea y migran rápidamente a los diferentes tejidos del organismo para completar su diferenciación final bajo la influencia de diversas señales del microambiente local [7].

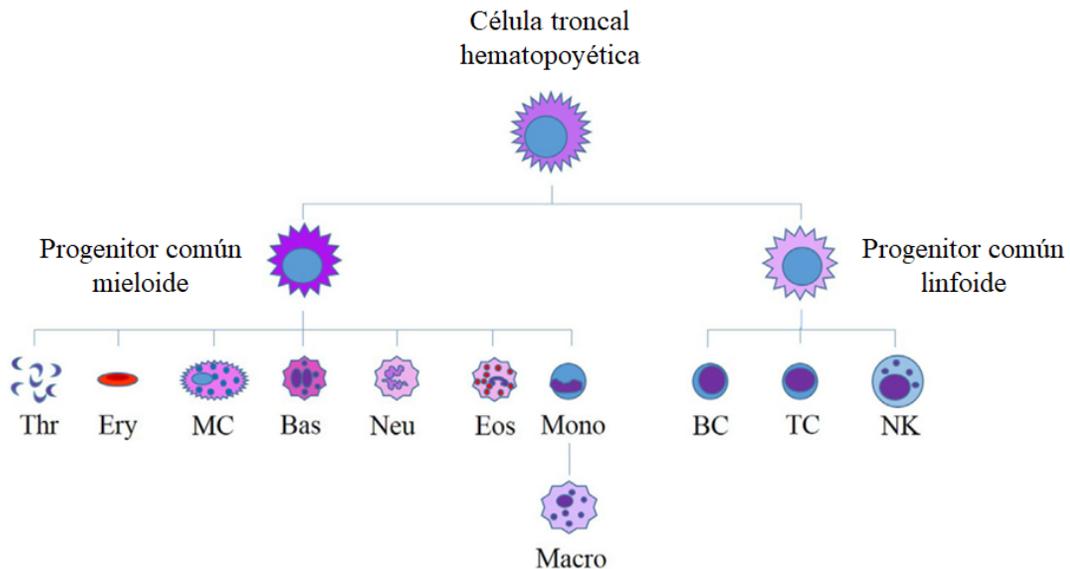


Figura 2. Modelo actual de la hematopoyesis humana. Los precursores comunes mieloides y linfoides se generan a partir de una célula troncal. El precursor mieloide da origen a diferentes estirpes celulares, incluidas las CCs. Thr: plaquetas; Ery: eritrocitos; MC: células cebadas; Bas: basófilos; Neu: neutrófilos; Eos: eosinófilos; Mono: monocitos; Macro: macrófagos; BC: linfocitos B; TC: linfocitos T; NK: linfocitos asesinos naturales. Imagen modificada de [5].

Las CCs se consideran células muy conservadas y antiguas, ya que están presentes en todas las clases de vertebrados [8]. Al igual que otras células del sistema inmune, las CCs pueden polarizarse hacia diferentes subpoblaciones fenotípica y funcionalmente distintas [9]. El típico paradigma de clasificación

agrupa a las CCs en dos subtipos dependiendo del tejido donde se localicen y de su contenido granular. En humanos: las positivas a triptasa (MC_T, del inglés Mast Cell_Tryptase) se localizan principalmente en mucosas; y las positivas a triptasa y quimasa (MC_{TC}, del inglés Mast Cell_Tryptase/chymase), se localizan preferentemente en la piel. Por otra parte, en roedores, se clasifican en CCs de tejido conectivo (CTMC, del inglés Connective Tissue Mast Cells), cuyos gránulos contienen abundante heparina; y en CCs de mucosas (MMC), con poca o nula cantidad de heparina [1,10]. Gracias al empleo de técnicas de secuenciación masiva de nueva generación, se ha establecido que las CCs son células heterogéneas que adquieren una firma transcripcional acorde a los estímulos que reciben del microambiente local donde residen y ha dejado un poco de lado este viejo paradigma de únicamente dos subpoblaciones de CCs para dar paso a una clasificación más precisa basada en su perfil transcripcional [11].

Estudios en humanos y roedores han demostrado que, dependiendo el tejido donde finalmente residan las CCs, éstas van a expresar marcadores de superficie y moléculas de señalización que las hace únicas en comparación con CCs de otros tejidos, demostrando la existencia de muchas más subpoblaciones de CCs [12,13]. Esta plasticidad fenotípica dependiente de cada tejido y la heterogeneidad transcriptómica de las CCs, las hace únicas y alejadas de otras células del sistema inmune como los macrófagos o los linfocitos [12,14].

Los cambios fenotípicos de las CCs ante los diferentes estímulos que reciben del microambiente local van desde diferencias en el contenido de sus gránulos y en los patrones de expresión de citocinas y receptores [15], hasta la susceptibilidad a ser activadas por diferentes estímulos, su capacidad para producir diferentes mediadores inflamatorios y la magnitud de sus respuestas de secreción [16].

1.3. Mecanismos de activación de las CCs

Las CCs liberan una gran variedad de mediadores inflamatorios en respuesta a la activación de sus receptores intracelulares y de membrana [4]. Además, se sabe que las CCs son susceptibles de ser activadas en microambientes hostiles, en donde hay cambios metabólicos importantes como acidificación del medio y disminución en los niveles de oxígeno, y esta activación no sigue la vía clásica de activación que involucra la interacción ligando/receptor [17].

La vía de activación más común en las CCs es a través del receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (IgE), el cual se conoce como FcεRI. La activación de este receptor por complejos IgE/Ag media las reacciones alérgicas, por lo que, la activación de las CCs a través de este receptor ha sido ampliamente estudiada en las reacciones de hipersensibilidad tipo I [18].

Además del FcεRI, las CCs también expresan receptores Fc para IgA e IgG, receptores para adenosina, C3a, citocinas y quimiocinas, y receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés Pathogen-associated molecular pattern), como los receptores tipo Toll (TLRs), que están involucrados en el reconocimiento de agentes patógenos y en la defensa del huésped [19] [1]. En la Figura 3 se muestra un esquema de los receptores de superficie expresados en CCs humanas.

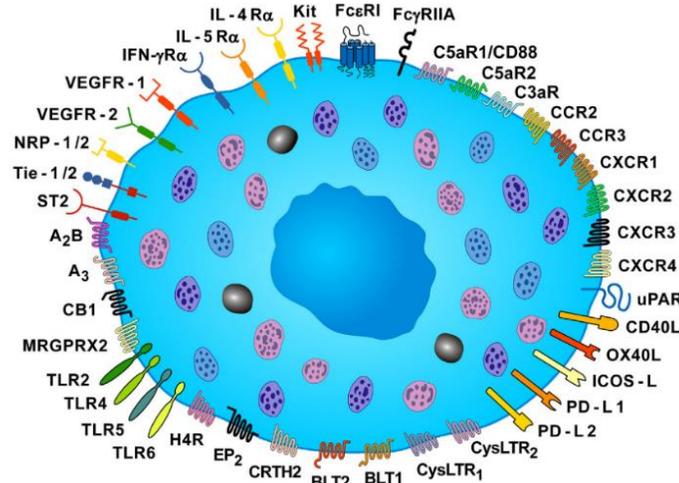


Figura 3. La gran variedad de receptores presentes en la membrana de CCs humanas. Las CCs humanas expresan receptores Fc, como el FcεRI y el FcγRIIA. También expresan al receptor KIT (CD117), el cual es activado por el factor de células progenitoras (SCF, por sus siglas en inglés *Stem cell factor*). Este receptor junto con el FcεRI se consideran marcadores característicos de las CCs. Otra familia de receptores expresados por las CCs, son los receptores de reconocimiento de patrones, como el receptor tipo Toll (TLR)-4, que es activado por el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Además, las CCs expresan receptores para citocinas y quimiocinas, adenosina, endocannabinoides, factores de crecimiento y anafilatoxinas. Finalmente, estas células expresan co-receptores necesarios para la activación de células T, como CD40L, OX40L, ICOS-L, PD-L1 and PD-L2. Imagen tomada de [20].

Gracias a que las CCs expresan una constelación tanto de receptores de superficie como intracelulares, tienen la capacidad de responder a una gran variedad de estímulos inmunológicos y no inmunológicos presentes en el medio extracelular, tanto en contextos fisiológicos como patológicos [8,20]. Debido a que la activación del receptor FcεRI es de suma importancia en la biología de las CCs y en la fisiopatología de las alergias [18], a continuación, se describe con más detalle la vía de señalización desencadenada por este receptor.

1.3.1. Vía de señalización del receptor FcεRI

El receptor FcεRI consta de una subunidad α, que reconoce con gran afinidad a la IgE; una subunidad β y dos subunidades γ, las cuales contienen motivos

de activación en tirosinas (ITAMs, por sus siglas en inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) [21].

La unión de la IgE al FcεRI expresado en las CCs se conoce como sensibilización, y tiene un efecto positivo en la sobrevivencia de las CCs. Se ha demostrado que la IgE (por sí sola) puede inducir un aumento en la síntesis y producción de factores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés Vascular Endothelial Growth Factor) [22,23] (Figura 4A). Dada la alta afinidad del FcεRI por la IgE (KD $\sim 10^{-10}$ M), considerada una de las más altas en farmacología, ésta se encuentra principalmente unida al receptor y hay muy poca IgE como anticuerpo soluble en circulación [4,24].

Por otro lado, cuando la IgE (unida al FcεRI) reconoce a un antígeno específico, dos o más moléculas FcεRI se entrecruzan y activan, dando lugar a una vía de señalización muy compleja que [24] involucra la activación de cinasas de tirosinas (PTKs, por sus siglas en inglés protein tyrosine kinases) como LYN, FYN y SYK. En la Figura 4B se ilustra la cascada de señalización simplificada que se desencadena tras la activación de este receptor, que se ha dividido para su estudio en vía principal, la cual involucra a las cinasas LYN y SYK; y una vía complementaria, en la que participan las cinasas FYN y SYK. La vía principal inicia con la activación de LYN, que fosforila los ITAMs de las cadenas β y γ del FcεRI e induce el reclutamiento de SYK, la cual se asocia principalmente con las cadenas γ del FcεRI y fosforila a un adaptador conocido como LAT (linker for activation of T cells). LAT funciona como una proteína de andamiaje que recluta otras proteínas formando grandes complejos cerca de la membrana plasmática que permiten la amplificación de la señal. Dentro de las proteínas reclutadas por LAT se encuentra la fosfolipasa C gamma (PLCγ), la cual, una vez activada, produce dos segundos mensajeros muy importantes: el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP3), induciendo la activación de la PKC y la liberación de calcio (Ca²⁺) intracelular, respectivamente. Respecto a la vía complementaria, la activación de FYN y SYK inducen el reclutamiento

de otras proteínas como VAV, GRB2 y SOS, probablemente mediante la activación de el adaptador NTAL (non-T-cell activation linker). El complejo GRB2/SOS (compartido en ambas vías) activa a las proteínas RAS, que, en consecuencia, activan la cascada de las MAPK cinasas y conlleva a la activación de factores de transcripción y síntesis de eicosanoides vía la fosfolipasa A2 (PLA2) [21,25].

La respuesta efectora de esta cascada de señalización involucra la secreción rápida y masiva de mediadores inflamatorios preformados, mediante un proceso conocido como desgranulación anafiláctica. Además, la activación del FcεRI induce la síntesis *de novo* de mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, que pueden ser liberados por secreción constitutiva [26]. La desgranulación de las CCs involucra dos eventos claves río abajo de la activación del FcεRI. Por un lado, un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular, dado principalmente por la activación PLCγ, y por otro, la reorganización del citoesqueleto que permitirá la movilización y fusión de los gránulos con la membrana plasmática, para que, finalmente, se libere su contenido [25,27]. Dentro de los mediadores inflamatorios liberados tras la activación del FcεRI, se encuentra la histamina, que, una vez que se une a sus receptores, induce los signos y síntomas clásicos de las reacciones alérgicas [28]. También se liberan enzimas como la β-hexosaminidasa, triptasa y quimasa e incluso citocinas como el TNF-α [29].

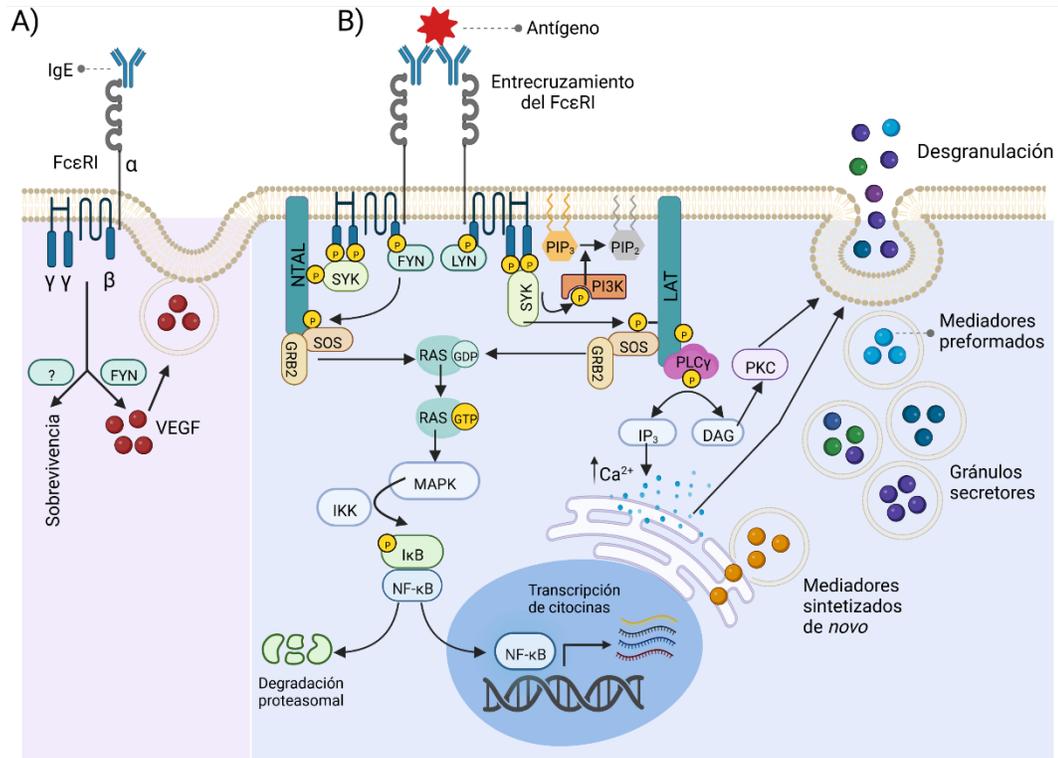


Figura 4. Vía de señalización del receptor FcεRI en CCs. A) La unión de la IgE a la cadena α del FcεRI se relaciona con la supervivencia de las CCs y con un aumento en la síntesis y secreción de VEGF, mediante un mecanismo dependiente de la cinasa FYN. B) El entrecruzamiento del FcεRI induce una cascada de señalización compleja que involucra a cinasas de tirosinas como LYN, FYN y SYK, que fosforilan diferentes proteínas formando grandes complejos moleculares cerca de la membrana celular, y que culmina con la movilización de los gránulos secretores y posterior fusión con la membrana plasmática para la liberación de mediadores inflamatorios preformados y sintetizados de novo. Imagen creada por Segura-Villalobos, 2022.

1.4. Principales funciones de las CCs

Dada su localización estratégica en sitios expuestos al ambiente externo, como la piel y las mucosas, las CCs son de las primeras células en montar una respuesta inmune en contra de un agente potencialmente dañino para el huésped, desempeñando así un papel muy importante en la defensa contra bacterias, parásitos, virus y hongos, así como en la detoxificación de venenos de artrópodos y reptiles [17,19,30]. La activación y desgranulación de las CCs podría ser la base fisiopatológica de numerosas enfermedades, incluidas las

alergias, el asma, enfermedades cardiovasculares, y el cáncer [17,31,32]. Respecto a esto último, se sabe que la participación de las CCs en el desarrollo tumoral es bifásica y parece depender de numerosos factores, como el tipo y estadio del tumor, la localización anatómica de las CCs (ya sea peri o intratumoral), así como de los estímulos que estas células reciben del microambiente local [17,33–35]. Sin embargo, los mecanismos moleculares y los estímulos específicos que llevan a la polarización de las CCs hacia un fenotipo pro o anti tumorigénico no se conocen del todo y son materia de investigación muy activa.

1.5. Participación de las CCs en el desarrollo tumoral

Si bien las CCs han sido ampliamente estudiadas por su participación en las alergias, también son relevantes en enfermedades que cursan con períodos de inflamación crónica, como el cáncer [20]. Las CCs son capaces de infiltrar los tumores sólidos a través de factores quimioatrayentes liberados por las células tumorales, como el SCF. Una vez allí, se conocen como CCs asociadas a tumores o TAMCs por sus siglas en inglés “Tumor-Associated Mast Cells”. La activación y liberación de mediadores por parte de las TAMCs puede tener efectos benéficos o deletéreos en el desarrollo del tumor, que van desde potenciar la respuesta inmune antitumoral a través del reclutamiento de células inmunes, hasta promover procesos necesarios para el crecimiento y progresión del tumor como la angiogénesis, linfangiogénesis, fibrosis y metástasis [36] (Figura 5).

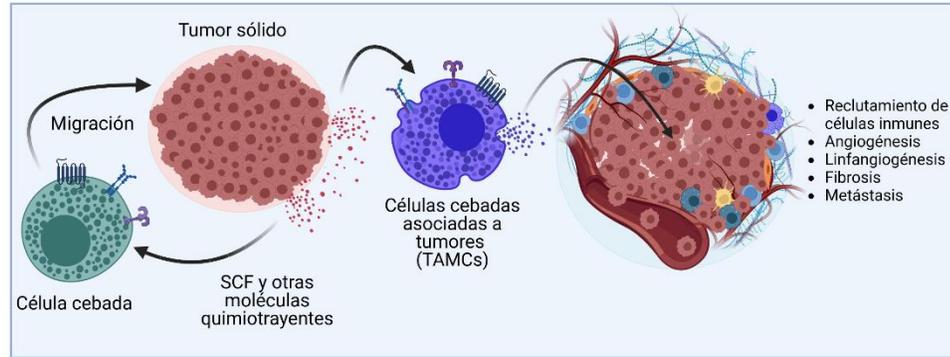


Figura 5. Efectos de las CCs en la progresión tumoral. Las células tumorales liberan factores quimioatrayentes como el SCF que induce la migración de CCs hacia el tumor. Una vez allí, las CCs asociadas a tumores o TAMCs pueden ser activadas por moléculas presentes en ese microambiente, lo cual induce la liberación de mediadores inflamatorios preformados o sintetizados de novo, que van a tener efectos positivos y/o negativos en el desarrollo del tumor. Imagen modificada de [36].

Las CCs son una fuente importante tanto de moléculas pro-tumorigénicas (VEGF-A, TGF- β , adenosina) como anti-tumorigénicas [17,37,38]. En algunas neoplasias como el linfoma de Hodgkin, las CCs tienen un papel pro-tumoral; en otras, como el cáncer de mama, tienen un papel protector, mientras que en algunos tipos de cáncer parecen ser, aparentemente, espectadoras inocentes [39–41]. Estos resultados contradictorios sugieren que el papel de las TAMCs y sus mediadores liberados al TME podría ser específico del tipo de cáncer.

Particularmente, se sabe que el incremento en la infiltración de CCs correlaciona con un aumento en la microvasculatura tumoral y una peor prognosis del melanoma, tanto en biopsias humanas como en modelos murinos [36,42,43]. Estudios *in vitro* en nuestro laboratorio han demostrado que la presencia de IgE monomérica en el medio de cultivo es capaz de inducir la producción del VEGF, y que esto se relaciona con un fenotipo proangiogénico de las CCs. Utilizando un modelo murino de melanoma, se encontró que, en estas condiciones, las CCs favorecen el crecimiento del tumor de melanoma [23], por lo que, al menos en este modelo, las CCs juegan un papel protumoral. De manera interesante se observó que el crecimiento

tumoral se ve favorecido en presencia de altas concentraciones de IgE en el plasma de ratones, por lo que, podría existir una estrecha relación entre la atopia (altas concentraciones de IgE en suero) y el cáncer.

1.5.1. Relación entre alergias, cáncer y CCs

Desde la postulación de la teoría de la inmunovigilancia por el Dr. Paul Ehrlich [44], se han realizado numerosos esfuerzos por elucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales las células del sistema inmune pueden reconocer y erradicar las neoplasias, incluso antes de que se produzcan las manifestaciones clínicas, protegiendo así al huésped del cáncer [45,46]. Esta teoría ha dado lugar a la inmunoterapia contra el cáncer, cuyo objetivo fundamental es utilizar al sistema inmunológico para atacar y eliminar específicamente a las células cancerosas, preservando al mismo tiempo a las células sanas.

Esto ha llevado a pensar que las patologías que cursan con una sobreactivación del sistema inmune, como las alergias, podrían evitar el crecimiento y progresión tumoral. Las reacciones alérgicas son afecciones causadas por la hipersensibilidad del sistema inmune frente a sustancias del entorno que son típicamente inofensivas, pero que, en una persona alérgica puede incluso ocasionar la muerte [47]. Los principales actores de las reacciones alérgicas son la IgE y las CCs, que liberan una gran cantidad de mediadores inflamatorios como la histamina, cuyas acciones desencadenan los signos y síntomas clásicos de estos padecimientos [48].

Desde principios del siglo XX, se ha discutido la relación que existe entre la aparición de tumores malignos y las alergias, y esto ha dado lugar al surgimiento de una nueva disciplina científica conocida como Alergo-Oncología [49]. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos que asocian el riesgo de desarrollar cáncer con las alergias o bien con los niveles altos de IgE en circulación. Algunos estudios sugieren que existe un menor riesgo de padecer cáncer en pacientes que presentan alergias

junto con una menor prevalencia de atopia en pacientes con cáncer [50], mientras que otros, apuntan a un papel de las alergias y la atopia totalmente opuestos [51]. Estos resultados controversiales y contradictorios dificultan una conclusión contundente sobre la relación entre alergias y cáncer y, hasta la fecha, sigue siendo objeto de debate.

Se han propuesto varias hipótesis que tratan de explicar la compleja relación entre la IgE, las alergias y el cáncer [52], las cuales se describen brevemente a continuación:

- a) La hipótesis de la inflamación crónica, que postula que la inflamación desencadenada por las reacciones alérgicas y atópicas provoca daño oxidante y subsecuentes mutaciones genéticas, lo que conduciría a un mayor riesgo de desarrollar cáncer.
- b) La hipótesis del sesgo hacia una respuesta inmune Th2. Este postulado afirma que la atopia favorece las respuestas Th2 sobre las Th1 (que reconocen y atacan al tumor), favoreciendo un entorno inmunosupresor y permisivo para la progresión tumoral.
- c) La hipótesis de la inmunovigilancia afirma que la atopia es un reflejo de una respuesta inmune potenciada, que puede activar células inmunes efectoras capaces de eliminar las células precancerosas.
- d) La hipótesis de la profilaxis propone que los síntomas de las alergias, como la tos y estornudos, pueden expulsar sustancias potencialmente carcinógenas, disminuyendo así el riesgo de desarrollar cáncer.

Respecto a las principales células efectoras de las alergias (las CCs), un estudio reciente demostró un mayor riesgo de desarrollar tumores sólidos (principalmente melanoma) en pacientes diagnosticados con mastocitosis sistémica, una condición caracterizada por un incremento en la densidad y actividad de las CCs [53], sugiriendo que la sobreactivación de las CCs podría estar íntimamente relacionada con el desarrollo de ciertos tumores malignos.

A pesar de que se dispone de un gran número de pruebas para investigar la conexión entre la IgE, las alergias/atopia, CCs y el riesgo de desarrollar cáncer, no se tiene una noción concluyente sobre los mecanismos exactos de dicha relación, debido a que resulta difícil la comparación entre estudios con diferentes aproximaciones experimentales, así como a la falta de seguimiento de patologías asociadas al cáncer. Además, es necesario considerar otros factores que pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer, como el tabaquismo y los antecedentes familiares; así como las condiciones prevalentes en el microambiente donde se desarrolla el tumor, que en determinado momento pueden promover el crecimiento y progresión de éste.

1.6. Características del microambiente tumoral

El microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés Tumor Microenvironment) es el nicho donde se desarrolla el tumor, donde coexisten las células tumorales junto con diferentes poblaciones de células no tumorales, como las células del sistema inmune, que pueden ser residentes de ese tejido o infiltrar los tumores por diferentes mecanismos [54,55]. El TME se caracteriza por formar estructuras muy complejas con los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y la matriz extracelular, generando un entorno caótico y hostil que favorece el crecimiento y metástasis del tumor y puede, en determinado momento, favorecer un estado de inmunosupresión que lo hace invisible y resistente al ataque del sistema inmune [56].

El estudio del TME es de gran importancia, ya que su influencia sobre las células tumorales modifica la respuesta a las terapias convencionales como la radio y la quimioterapia, y, por lo tanto, constituye uno de los mayores retos para el diseño de nuevas terapias contra el cáncer. Además, la creciente evidencia de que las células inmunes asociadas a los tumores pueden eliminar o promover (en algún momento) el crecimiento de estos exige una investigación más detallada de los mecanismos moleculares por los cuales el sistema inmune se vuelve aliado o enemigo en la lucha contra el cáncer.

1.6.1. Cambios metabólicos en el TME: el caso de la hipoxia

El TME se caracteriza por cambios metabólicos asociados con la alta tasa de proliferación de las células tumorales, lo cual implica un aumento en el consumo de glucosa y otros metabolitos por parte de estas células, para poder cubrir el alto gasto energético que implica la división celular. Como consecuencia de esto, el TME se torna un medio ácido, oxidante, inmunosupresor e hipóxico [56,57] (Figura 6). El desbalance entre el suministro y el consumo de oxígeno (O_2), fenómeno conocido como hipoxia, es una característica común de todos los tumores sólidos que se asocia con un peor pronóstico [58–60], por lo que, entender los efectos que tiene esta condición en el TME se vuelve relevante para el diseño de nuevas y mejores terapias contra el cáncer.

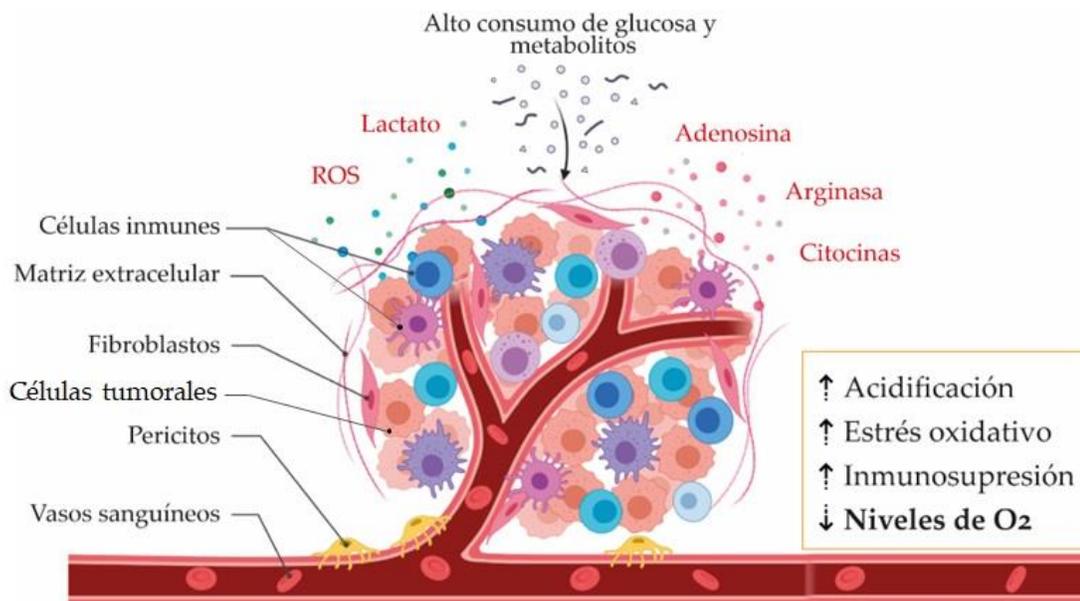


Figura 6. Principales características del TME. El nicho donde se desarrolla el tumor es un ecosistema muy complejo formado por células tumorales y no tumorales, vasos sanguíneos, matriz extracelular, entre otros. Además, las condiciones derivadas del metabolismo anormal de las células tumorales promueven un aumento en la acidificación del medio, estrés oxidativo, inmunosupresión y, de manera muy importante, una disminución en los niveles de O_2 . Imagen modificada de [61].

1.6.2. La hipoxia tumoral y la vía del factor inducido por hipoxia (HIF)

Mantener los niveles adecuados de O₂ es una necesidad primaria para los organismos aerobios, ya que esta molécula funciona como aceptor final de electrones de la cadena de transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa mitocondrial, un proceso clave para la adecuada producción de adenosín trifosfato (ATP), una molécula proveedora de energía para las células [62]. Los niveles normales de O₂ varían dependiendo el tejido u órgano, oscilando entre ~4.6 - 9.4 %, mientras que la concentración de este gas en los tumores alcanza niveles de 1 - 2 % o menos [63]. Recientemente se han descrito dos tipos de hipoxia en los tumores sólidos: la hipoxia crónica (chH), que se caracteriza por un déficit en la concentración de O₂ durante períodos continuos y prolongados de tiempo (de al menos varias horas); y la hipoxia intermitente o cíclica (cyH), que describe períodos fluctuantes de O₂ asociados principalmente a un patrón de hipoxia/reoxigenación [64,65].

Cuando una célula sensa los niveles bajos de O₂, monta una respuesta rápida que le permitirá sobrevivir y/o adaptarse a esta condición adversa, modificando la expresión de genes involucrados en la supervivencia celular y la apoptosis [66]. Se sabe que la hipoxia lleva a la estabilización del factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1), el regulador maestro que coordina la óptima adaptación de la célula a la escasez de O₂. HIF-1 es un factor de transcripción formado por una subunidad β (constitutiva) y una subunidad α (regulada por O₂). En condiciones de normoxia, las enzimas prolin-hidroxilasas (PHDs) hidroxilan residuos de prolina de HIF-1α, lo cual induce su ubiquitinación a través de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL). Esto conduce a la desestabilización y posterior degradación proteasomal de HIF-1α. Otro mecanismo de degradación de HIF-1α es vía el factor inhibidor de HIF (FIH), una enzima que hidroxila la asparagina 803 de HIF-1α y esto bloquea su interacción con p300/CBP, un coactivador del complejo HIF que incrementa la expresión de sus genes blanco [67] (Figura 7, panel izquierdo). Tanto las PHDs como FIHs son enzimas que utilizan como cofactor al O₂, por lo que, en

condiciones de hipoxia, HIF-1 α no se degrada, y en consecuencia se acumula y transloca al núcleo, donde forma un heterodímero con HIF-1 β . Este complejo transcripcional se une a los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) para inducir la expresión de varios genes blancos de HIF (Figura 7, panel derecho). Estos genes se relacionan con mecanismos de adaptación a la hipoxia, como el aumento de la generación de ATP por vías anaeróbicas a través de la glucólisis, el aumento del suministro de O₂ a través de la angiogénesis y el aumento de la oxigenación de la sangre a través de la eritropoyesis [68]. Además, se sabe que HIF-1 α induce la proliferación celular y la migración, por lo que desempeña un papel fundamental en la supervivencia y progresión del tumor [67,69].

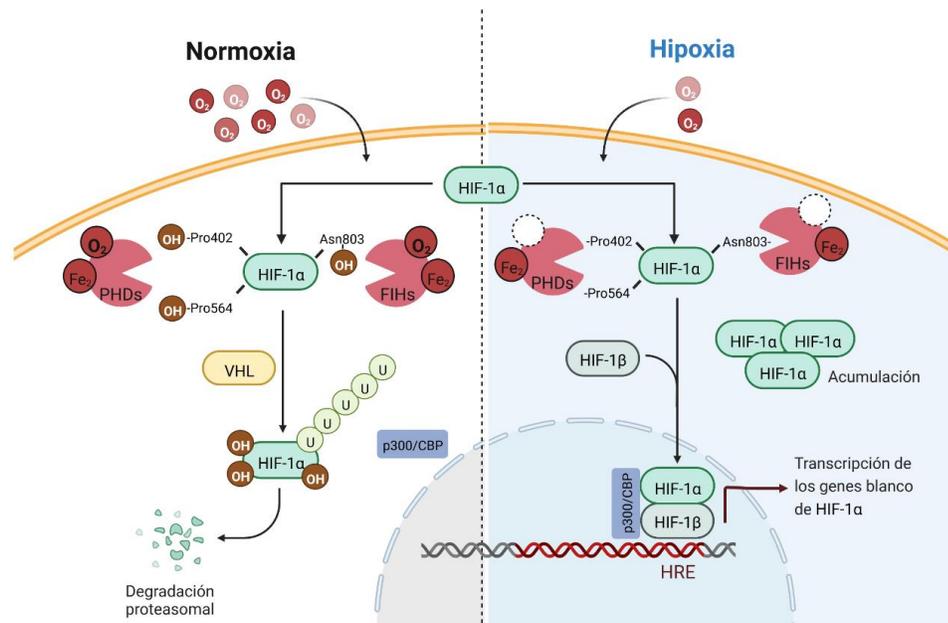


Figura 7. La hipoxia y la vía de HIF-1 α . En condiciones de normoxia, las prolinhidroxilasas (PHDs) hidroxilan a HIF-1 α en dos residuos específicos de prolina (402 y 564), marcándolo para su degradación proteasomal en un proceso mediado por la ubiquitinación dependiente de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL). Por otro lado, el factor inhibidor de HIF (FIH) hidroxila a HIF-1 α en la asparagina 803, lo cual impide la unión del coactivador transcripcional p300/CBP (izquierda). Bajo condiciones de hipoxia, las PHDs y FIHs son incapaces de hidroxilar las subunidades de HIF- α , por lo que, esta proteína se acumula y se transloca al núcleo donde forma un dímero con HIF-1 β y se une a los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) en el ADN, para, finalmente, inducir la transcripción de genes blancos de HIF (derecha). Imagen creada por Segura-Villalobos, 2022.

1.6.3. Diferencias entre la hipoxia crónica (chH) y la hipoxia cíclica (cyH)

Los efectos de la chH y la cyH han sido estudiados principalmente en células endoteliales y en líneas tumorales, y se han encontrado diferencias principalmente en las vías de señalización desencadenadas por cada tipo de hipoxia. Se ha demostrado que la cyH, en comparación con la chH, induce una mayor acumulación de HIF-1 α , después de cada período de reoxigenación, y que estos períodos de reoxigenación incrementan la producción de ROS y la fosforilación de ciertas proteínas como Akt, ERK1/2 y la eNOS [70]. El incremento en la producción de ROS se debe a que la cyH induce la sobreexpresión de la subunidad 4 de la NADPH oxidasa, un complejo enzimático que es fuente importante de ROS en la célula [71].

También se ha demostrado que las células endoteliales sometidas a cyH, en comparación con las sometidas a chH, son más resistentes al estrés proapoptótico inducido por privación de suero o por radiación, y que además, incrementan su capacidad de migración y de formación de túbulos [59]. Todos estos resultados se han obtenido utilizando protocolos de cyH cortos (por ejemplo: 3-4 ciclos de 1 h al 1% de O₂ por 30 min de reoxigenación). Esto concuerda con las determinaciones *in vivo* de los niveles de O₂ en diferentes tumores sólidos, en la cual se demostró que, utilizando tecnología de imagen en tiempo real, los períodos de hipoxia/reoxigenación varían de minutos a horas [72].

1.7. Hipoxia cíclica y progresión tumoral

El aumento de la demanda de O₂ por parte del tumor en crecimiento induce un proceso angiogénico o formación de nuevos vasos sanguíneos, con la finalidad de reestablecer los niveles normales de O₂ y el remodelado de la vasculatura tumoral [59]. Sin embargo, estos vasos sanguíneos son estructural y funcionalmente anormales y dan como resultado una microcirculación alterada, llevando a la deficiencia en el transporte de O₂. La estructura caótica y poco jerárquica de la red de vasos sanguíneos que alimentan al tumor tiene

como consecuencia una perfusión irregular del tejido tumoral (Figura 8), exponiendo a las células a períodos alternos de baja concentración de O_2 (hipoxia) y reoxigenación [60,64]; es decir, existe un patrón de cyH en los tumores sólidos, por lo que este tipo de hipoxia ha tomado gran relevancia en el diseño de nuevas terapias contra el cáncer.

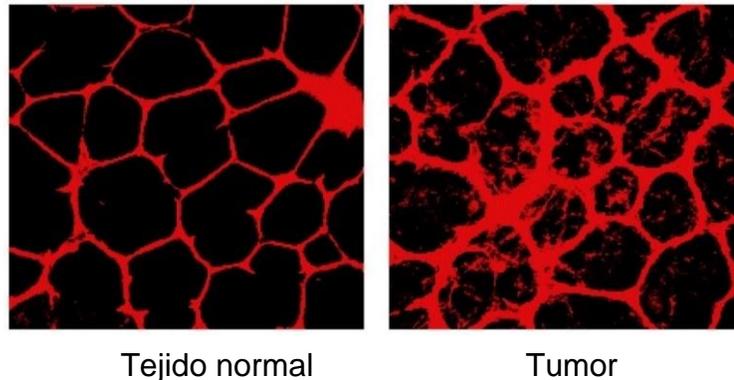


Figura 8. Estructura de la red vascular en un microambiente normal y en un microambiente tumoral. La inyección del colorante rojo de dextrán revela que la red vascular de un tejido normal presenta poca permeabilidad, que se observa por los perfiles bien delineados de estos vasos (izquierda); mientras que la red vascular asociada al tumor presenta una tinción difusa, debido a que hay fuga del colorante, el cual difunde hacia los tejidos cercanos (derecha). Imagen tomada de [73].

Los efectos de la cyH en el desarrollo tumoral no se conocen del todo debido a la dificultad que implica estandarizar protocolos que validen la repetición de los ciclos de hipoxia/reoxigenación [74]. Pese a esto, se ha demostrado que la cyH es capaz de inducir la activación de factores de transcripción, como NF- κ B, tanto en células endoteliales como en células tumorales [65,75], y que la activación de dichos factores afecta el comportamiento de las células tumorales a través de cambios en la expresión de diversos genes, lo cual conduce a cambios en su fenotipo. Respecto a esto, Olbryt y colaboradores utilizaron perfiles globales de expresión génica para evaluar tres líneas celulares de cáncer (melanoma, cáncer de ovario y cáncer de próstata) que fueron sometidas a protocolos de cyH e chH. Los resultados mostraron que, la cyH, en comparación con la chH, aumenta la expresión del gen que codifica

para la IL-8, del activador de plasminógeno tipo urocinasa (PLAU) y de genes relacionados con la vía del factor de crecimiento epidérmico (EGF) [76]. Haciendo un análisis más detallado, Boidot y colaboradores expusieron 20 diferentes tipos de líneas celulares de cáncer, a períodos de hipoxia/reoxigenación (30 min al 1 % de O₂ seguidos de 30 min al 21 % de O₂ por 24 ciclos) o a hipoxia prolongada (24 h al 1% de O₂), y observaron alteraciones específicas en la expresión de genes, únicamente cuando las células fueron sometidas a cyH [77].

En general, el papel de la cyH en el desarrollo tumoral se relaciona con la inducción de un fenotipo canceroso mucho más agresivo, en comparación con la chH. Diversos estudios han demostrado que, la cyH potencia la migración, invasión y metástasis de diversas líneas tumorales; y las hace menos sensibles a las terapias convencionales como la radio y quimioterapia [64,78]. De hecho, aunque la chH también promueve la progresión tumoral y la resistencia a las terapias convencionales, las grandes cantidades de ROS producidas durante los períodos de reoxigenación, hacen que la cyH sea única, por lo que, las vías de señalización específicas desencadenadas por este tipo de hipoxia podrían ser blancos terapéuticos en el diseño de nuevas terapias para el cáncer.

1.8. Efecto del TME en el cambio de fenotipo de las células inmunes asociadas a los tumores

Los cambios fisicoquímicos del TME modifican el fenotipo no solo de las células tumorales, sino también el de las células que rodean al tumor o están interactuando directamente con éste. El conjunto de estas células no tumorales recibe el nombre de estroma, y está compuesto principalmente por: fibroblastos, células endoteliales, pericitos, y, de manera importante, por células del sistema inmune innato y adaptativo (ver Figura 6) [79]. Dentro de las células inmunes innatas del linaje mielóide que más infiltran los tumores sólidos, se encuentran los macrófagos, las células dendríticas (DCs) y, de especial interés para este trabajo, las CCs [80]. Dadas sus capacidades

plásticas, las células del sistema inmune innato pueden adquirir diferentes características y presentar una gran diversidad de fenotipos que favorecen el crecimiento y desarrollo del tumor [33,81].

Consistente con esta idea, los macrófagos presentan fenotipos bien definidos dependiendo de su mecanismo de activación. Por ejemplo, la activación por la *vía clásica*, se lleva a cabo a través de ligandos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o el IFN- γ , compuestos que inducen un fenotipo proinflamatorio o M1; mientras que la activación por la *vía alterna*, ocurre mediante ligandos como IL-4 y/o IL-13 y los polariza hacia un fenotipo predominantemente antiinflamatorio o “reparador” (M2) [82]. Por otra parte, en el TME existen diversos estímulos que pueden activar a los macrófagos, como la hipoxia. Sin embargo, la estimulación por hipoxia no se clasifica como estímulo M1 o M2 y es referida como M1-like para los macrófagos con función anti-tumorigénica y M2-like para los que presentan una actividad pro-tumorigénica [33,83].

Al igual que los macrófagos, las CCs pueden cambiar su fenotipo dependiendo del tejido donde residan y de los estímulos que reciben [15]. Aunque no existe una clasificación detallada de los fenotipos expresados por las CCs, se sabe que son células con una gran plasticidad, lo cual está sustentado por diversos estudios que han demostrado que son el tipo celular que posee más variaciones a nivel transcripcional, comparadas con otras células del sistema inmune; y que, incluso las CCs aisladas de diferentes tejidos muestran un perfil de expresión genética muy variado [10,12]. Hasta la fecha no existen estudios que se centren en diferenciar los fenotipos de las CCs en condiciones patológicas específicas, como el cáncer, donde el microambiente es muy variado y puede, sin duda, modificar las características fenotípicas de este tipo celular.

1.9. ¿Existe la polarización de las CCs hacia fenotipos bien definidos?

La gran plasticidad de las CCs sugiere que pueden modificar su fenotipo en diferentes contextos celulares. Sin embargo, hasta la fecha no hay panel de marcadores específicos que puedan diferenciar a estos fenotipos de CCs. Se ha propuesto que, en un contexto patológico, las CCs se polarizarían a dos fenotipos distintos, similares a los fenotipos de los macrófagos. Estos dos fenotipos hipotéticos se denominan MC1 y MC2 (MC, del inglés Mast Cells), y están relacionados con un perfil de secreción de mediadores pro y antiinflamatorios, respectivamente. De acuerdo con esta novedosa idea, el fenotipo MC1 se caracterizaría por una baja expresión de IL-10 y la capacidad de inducir un alto infiltrado celular inflamatorio, mientras que el fenotipo MC2 se caracterizaría por una elevada síntesis y liberación de IL-10, lo que llevaría a un débil infiltrado celular inflamatorio [84]. En el contexto del cáncer, el fenotipo MC2 podría promover el reclutamiento de células T reguladoras (Tregs) hacia el TME, lo que promovería un ambiente inmunosupresor que podría impedir la correcta identificación y eliminación del tumor por parte del sistema inmune, y, por lo tanto, al igual que los macrófagos M2-like, las CCs con fenotipo MC2 se relacionarían con un papel protumoral. Esta hipótesis está sustentada por estudios hechos en biopsias de tumores (específicamente cáncer gástrico y carcinoma hepatocelular), donde se encontró una correlación positiva entre la triptasa (marcador de CCs) y FOXP3, un marcador de células Tregs [85,86].

De acuerdo con esta hipótesis, otros autores han sugerido que los mediadores inflamatorios liberados por las células MC1 podrían tener un rol antitumoral, mientras que las MC2, desempeñarían un papel protumoral [17,36]. Es importante resaltar la participación del TME en esta función dual de las CCs, ya que, los estímulos presentes en este nicho podrían estar polarizando a las CCs hacia uno u otro fenotipo.

1.10. Efecto de la cyH en el cambio de fenotipo de las CCs

Hasta la fecha, el efecto de la cyH en el cambio de fenotipo de las CCs no ha sido investigado. Sin embargo, se sabe que las CCs modifican su perfil de secreción en condiciones de chH. Un trabajo pionero demostró que CCs derivadas de cordón umbilical humano expuestas a hipoxia continua, aumentaron la secreción de IL-6 de todo un panel de citocinas, y esta IL-6 se relacionó con la sobrevivencia de las CCs [87].

Evidencias de nuestro laboratorio sugieren que hay un incremento en el número de CCs asociadas a tumores de melanoma murino y que estas células se localizan en regiones hipóxicas dentro del tumor [42]. Además, las BMDCs expuestas a un protocolo de chH aumentan la secreción de la quimiocina CCL-2 y la translocación de canales de Ca^{2+} tipo L hacia la membrana celular en vesículas positivas para la proteína LAMP-2 [36,42]. Esto sugiere que la hipoxia es capaz de modificar el fenotipo de las CCs y posiblemente induce cambios transcripcionales que las hace más susceptibles de ser activadas, ya que la reubicación de la proteína LAMP-2 en la membrana plasmática está asociada al proceso de desgranulación tanto en CCs como en basófilos [88,89].

Así pues, es posible hipotetizar que las condiciones del TME podrían modificar las propiedades plásticas de las CCs y llevarlas hacia un fenotipo más susceptible de ser activado por diferentes estímulos. Al ser la cyH una característica importante del microambiente de los tumores sólidos y, considerando que las CCs presentan una gran plasticidad fenotípica, el presente trabajo se centró en establecer y validar un modelo experimental de este tipo de hipoxia y evaluar los cambios transcriptómicos que puede inducir sobre las CCs, asociados al papel protumoral de este tipo celular en el melanoma.

2. JUSTIFICACIÓN

El TME desempeña un papel muy importante en la progresión y metástasis de los tumores sólidos, y una de sus principales características es la cyH. Sin embargo, existen pocos estudios enfocados a estudiar la influencia que tiene este tipo de hipoxia en las células inmunes asociadas a tumores. Por otro lado, se sabe que las CCs infiltran los tumores sólidos y una vez allí pueden ser activadas por diferentes estímulos del TME, como la cyH. A pesar de eso, la participación de las CCs en el cáncer sigue siendo controversial y no se sabe si tienen un papel pro o antitumoral. Estudiar los diferentes fenotipos que expresan las CCs en condiciones de cyH permitirá identificar marcadores importantes para determinar su papel en el desarrollo tumoral.

3. HIPÓTESIS

- I. Las CCs estarán presentes en zonas asociadas a cyH en un tumor de melanoma murino.
- II. La cyH inducirá cambios en el fenotipo de las CCs relacionados con el papel protumoral de este tipo celular.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar los cambios transcripcionales y fenotípicos de las CCs expuestas a cyH y relacionarlos con el posible papel de estas células en la progresión tumoral.

4.2. Objetivos particulares

- I. Evaluar la presencia de CCs en zonas de cyH dentro del tumor, utilizando un modelo murino de melanoma y microscopía confocal.
- II. Estandarizar un modelo de cyH en CCs mediante la expresión de algunos marcadores relacionados con este tipo de hipoxia.

- III. Analizar, mediante RT-PCR y microarreglos, si la cyH induce cambios en el transcriptoma de las CCs.
- IV. Validar algunos de estos marcadores por RT-qPCR y pruebas funcionales.
- V. Caracterizar el fenotipo de las CCs inducido por la cyH, utilizando aproximaciones moleculares y farmacológicas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron ratones de una edad aproximada de 8-12 semanas y un peso entre 25-30 g. Los grupos utilizados fueron: ratones C57BL/6J (WT), ratones c-kit W^{sh}/W^{sh} (carentes de CCs o Wsh) y ratones c-kit W^{sh}/W^{sh} reconstituidos con CCs de animales WT (Wsh Rec). Los animales se mantuvieron con ciclos 12/12 de luz-obscuridad, temperatura (23 ± 2 °C) y humedad relativa controladas, con acceso libre a agua y comida. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 y fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética del Cinvestav (CICUAL), bajo el protocolo No. 015-12.

5.2. Reconstitución de los ratones Wsh

Los animales Wsh fueron reconstituidos con 2×10^6 BMBCs de 6 a 8 semanas de edad, las cuales fueron lavadas y resuspendidas en buffer Tyrode's sin albúmina y posteriormente fueron inyectadas vía intravenosa en la cola de los ratones, los cuales fueron monitoreados durante 4-6 semanas y, transcurrido este tiempo, se utilizaron para la generación de los tumores de melanoma.

5.3. Cultivo de células B16-F1 y generación de tumores

La línea celular B16-F10 fue adquirida de la ATCC (CRL-6323) y fue cultivada siguiendo las indicaciones de la ficha técnica. Brevemente, las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), y una vez que alcanzaron una confluencia aproximada del 80 % - 90 %, fueron despegadas con una solución de tripsina/EDTA al 0.05% y

resembradas en otra placa de cultivo. Para la inoculación en ratones, se usaron células que al menos hubieran tenido 3 pases desde su descongelación. Una vez despegadas las células, se lavaron 2 veces con Tyrode's sin albúmina y fueron resuspendidas en 12-15 μ L de este mismo medio, para posteriormente inocular este volumen en los diferentes grupos de ratones.

Para la generación de tumores primarios, los ratones WT, Wsh y Wsh Rec fueron anestesiados con una mezcla de ketamina /xilacina a una dosis de 40/4 mg/kg, respectivamente. Una vez anestesiados, se inocularon vía subcutánea con 500,000 células B16-F10 en el pabellón de la oreja izquierda, mientras que en la oreja derecha se inoculó solo vehículo (Tyrode's sin albúmina). Los ratones se monitorearon hasta observar el crecimiento tumoral, lo cual tomó aproximadamente 3-4 semanas. Posteriormente, los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con pimonidazol (Hypoxyprobe™), a una dosis de 60 mg/kg 30 min antes del sacrificio mediante inhalación de CO₂. Los tumores fueron extirpados y fueron pesados para evaluar el crecimiento en los diferentes grupos de ratones. Además, estos tumores fueron colocados en una solución de paraformaldehído al 4% durante 48 h, y posteriormente en una solución de sacarosa al 30% durante otras 48 h. Al finalizar este tiempo, los tumores fueron almacenados a 4°C en sacarosa 30% m/v hasta su posterior uso. La preparación de medios y soluciones utilizadas en esta técnica se describen en el anexo I.

5.4. Inmunofluorescencia de las biopsias de tumores y microscopía confocal

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los tumores obtenidos de animales C57BL6/J fueron embebidos en Tissue Tek O.C.T. (Sakura Finetek) y se hicieron cortes de aproximadamente 30 μ m utilizando un criostato (Modelo Hyrax C25, Carl Zeiss). Las rebanadas de tumores fueron depositadas en una placa de cultivo de 24 pozos, donde fueron lavadas con PBS-1X e incubadas con cloruro de amonio (NH₄Cl, 50 mM) para disminuir la autofluorescencia del

tejido. Después de esto, las rebanadas fueron lavadas con una solución de PBS más Tween 20 al 0.1 % (PBS-T) para retirar el exceso de NHCl_4 y se boquearon durante 2 h a temperatura ambiente, con una solución que contenía 3% de albúmina, 5% de suero de burro y 0.3% de Tritón. La preparación de las soluciones mencionadas en este protocolo se describe en el anexo I.

Para la detección de las zonas hipóxicas, las rebanadas de tumores se incubaron con un anticuerpo anti-pimonidazol conjugado con FITC a una dilución de 1:150, durante toda la noche a 4 °C. En las mismas preparaciones, se utilizaron anticuerpos anti-triptasa (1:50) y anti-CD31 (1:100) para detectar CCs y vasos sanguíneos, respectivamente. Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las rebanadas de los tumores se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos (Alexa-647 para triptasa y Alexa-546 para CD31) a una dilución de 1:500, durante 2 h a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:500) durante 5 minutos. Por último, el exceso de DAPI se eliminó lavando con PBS-T tres veces, y las muestras se montaron con DABCO en un portaobjetos para su posterior análisis en el microscopio confocal.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss Airscan LSM-800 con un objetivo de 10X y 40X (solo para ampliaciones). En todos los experimentos, se realizaron controles negativos utilizando el mismo protocolo para inmunofluorescencia, pero omitiendo el paso de la incubación con los anticuerpos primarios, y no se observó ninguna señal significativa en presencia únicamente de los anticuerpos secundarios, lo que indica una alta especificidad de los anticuerpos utilizados. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software Zen 2.3 SP1, Blue Edition, y el software Fiji-ImageJ (NIH) acoplado con el plugin JaCoP. El análisis de colocalización se realizó mediante los coeficientes de Manders (M1 y M2), que calculan el porcentaje de la señal total de un canal (canal 1) que se sobrepone con la señal del otro (canal 2) y viceversa.

5.5. Obtención de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMCs)

Las BMMCs se obtuvieron de ratones C57BL6/J (4-6 semanas de edad), a los cuales se les extrajo la médula ósea de la tibia. Estas células se cultivaron *in vitro* en medio RPMI suplementado con 20 ng/mL de IL-3, 10% de suero fetal bovino inactivado, 25 mM de HEPES, 50 μ M de β -mercaptoetanol, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina (ver anexo I), con lo cual se logró la diferenciación hacia CCs después de 4 semanas. El medio de cultivo se cambió cada 7 días, eliminando las células adheridas cada vez, y los cultivos celulares se mantuvieron a una densidad de $1.0 - 1.5 \times 10^6$ células/mL en una incubadora a 37°C con 5 % de CO₂ durante al menos 5 semanas. Para todos los experimentos reportados en este trabajo, se utilizaron cultivos de 6-8 semanas de edad y a una densidad de 2.0×10^6 células/mL.

5.6. Protocolo de hipoxia cíclica

Las condiciones de hipoxia se indujeron *in vitro* utilizando una incubadora Memmert modelo INC108 (Büchenbach, Alemania), que se gasificó con 95% de N₂ y 5% de CO₂ hasta alcanzar una concentración de O₂ del 1-2 %. Para generar las condiciones de cyH, se sembraron las BMMCs en placas de 24 pozos y se expusieron a 4 ciclos de 1 h de hipoxia (1% de O₂) alternada con una reoxigenación de 30 minutos (21% de O₂). Este protocolo se tomó de un estudio previo en células endoteliales [65], ya que en la literatura no hay reportes de protocolos de cyH validados en CCs.

Para estandarizar las condiciones de la cyH, las BMMCs se recolectaron al final de cada período de hipoxia y reoxigenación (H1, R1, H2, R2, H3, R3, H4, R4), siendo las células H1 las que fueron expuestas a 1 h de hipoxia, las células R1 las sometidas a 1 h de hipoxia más 30 min de reoxigenación, y así sucesivamente hasta el final del protocolo de la cyH (6 h en total). Por otro lado, las células normóxicas fueron expuestas a las mismas condiciones, pero en concentraciones normales de O₂ (21%) durante 6 h. En algunos

experimentos, las BMMC fueron incubadas durante un periodo continuo de 2.5 h al 1% de O₂ para inducir condiciones de chH.

5.7. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad de las BMMCs expuestas al protocolo de cyH fue evaluada usando el Kit de viabilidad Muse™ Count & Viability (Millipore) siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Brevemente, 1.0×10^6 células hipóxicas o normóxicas fueron incubadas durante 5 min a temperatura ambiente con diferentes reactivos incluidos en el Kit a una dilución 1:10. Tanto las células viables como no viables se tiñen diferencialmente en función de su permeabilidad a los colorantes de ADN presentes en los reactivos. Finalmente, las células fueron leídas en el Muse™ Cell Analyzer, y se obtuvieron los gráficos correspondientes para cada grupo experimental analizado.

5.8. Extracción de RNA, síntesis de ADNc y PCR

2.0×10^6 BMMCs expuestas a normoxia o cyH fueron lisadas con 500 µL de TRIzol (Sigma) y posteriormente se extrajo el ARN a través de la técnica fenol-cloroformo-isopropanol. El ARN aislado fue resuspendido en 7 µL de RNA Secure™ (Thermo Fisher), y su calidad y cantidad fue evaluada usando el NanoDrop 2000. Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se utilizaron 2 µg de RNA y los reactivos del Kit Revert Aid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). La retrotranscripción se hizo utilizando las siguientes condiciones de termociclado: 5 min a 65°C, 60 min a 42°C y 10 min a 70°C. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

La expresión de *Hif-1a*, *Vegf*, *Tnf-a*, *Ccl-2*, *Il-6*, *Il-4*, *Il-2*, *Tgf-b*, y *Gapdh*, fue determinada por PCR en punto final, usando 5 µL de cada muestra de ADNc y oligonucleótidos específicos para cada gen (ver tabla I, anexo II). Los protocolos de termociclado para estos genes fueron tomados de [90] y el número de ciclos para cada gen fueron previamente reportados (ver tabla I, anexo II). Finalmente, los productos de PCR fueron cargados en un gel de

agarosa al 2%, y se corrieron utilizando un buffer a base de trizma, ácido bórico y EDTA (TBE-1X, para preparación ver anexo I), para finalmente ser visualizados usando bromuro de etidio. La intensidad de cada banda se cuantificó utilizando el equipo MiniBIS Pro y normalizando con la *Gapdh*, que fue el gen usado como referencia.

5.9. Determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno

La producción intracelular de ROS fue determinada por fluorimetría utilizando la sonda DCFH₂-DA, la cual, en presencia de ROS se oxida a DCF y emite fluorescencia, de tal forma que, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ROS producidas por las células. Después de exponer a las BMMCs (2.0×10^6 células/mL) al protocolo de cyH, éstas fueron recolectadas, centrifugadas e incubadas por 30 min a 37°C con DCFH₂-DA a una concentración final de 10 µM. Posteriormente, las células se centrifugaron y se recuperó el pellet celular, el cual se resuspendió con IGEPAL (0.1%) (para preparación ver anexo I), y el sobrenadante celular fue utilizado para hacer la medición en el luminómetro BioTek MicroplateFLx800 a una longitud de onda de 488/565 nm (excitación/emisión). La producción basal de ROS fue medida en células incubadas en condiciones de normoxia durante 6 h. En algunos experimentos específicos, las BMMCs fueron expuestas a hipoxia continua 2 h y posteriormente a un período de reoxigenación de 1 hora. Para este caso particular, se utilizaron como control células mantenidas en normoxia durante 3 h.

5.10. Microarreglos

Para el ensayo de microarreglos se utilizó un pool de ARN obtenido de tres diferentes cultivos de BMMCs (4.0×10^6 células por cultivo), que fueron evaluados funcionalmente mediante el ensayo de desgranulación (ver protocolo más adelante y resultados en el anexo III) y posteriormente incubados en normoxia (2.5 h al 21% O₂) o en cyH (1 h al 1% O₂ + 30 min al 21 % O₂ + 1 h al 1% O₂). El ARN de cada cultivo se obtuvo como se describe en la sección 4.8. y una vez obtenido, se evaluó mediante un gel de agarosa

para corroborar la integridad de la muestra extraída. Posteriormente, se hizo un pool de las tres muestras y se volvió a cuantificar y a evaluar la integridad del ARN (ver anexo III). Este ARN, tanto de las BMMCs normóxicas como hipóxicas, fue enviado a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (IFC), donde se realizó el microarreglo. Primero se sintetizó el ADNc de cada muestra utilizando 10 µg de ARN y oligonucleótidos marcados dUTP-Alexa 555 y dUTP-Alexa 647. La incorporación del fluoróforo al ADNc se analizó determinando la absorbancia a 555 y 650 nm para Alexa555 y Alexa647, respectivamente. Cada muestra se marcó de la siguiente manera: Alexa555 se utilizó para las células normóxicas mientras que Alexa647 se utilizó para las células hipóxicas. Finalmente se hibridaron cantidades iguales de ADNc marcado proveniente de ambas muestras (juntas), con los 22,000 oligonucleótidos de ratón “arreglados” en el chip. Esto se llevó a cabo durante 14 h a 42°C en una solución de hibridación (UniHyb).

La adquisición y cuantificación de las imágenes del microarreglo se realizó en un lector GenePix 4100-A con su software adjunto GenePix (Molecular Devices). Para cada punto (gen), se calculó la intensidad de fluorescencia obtenida de cada fluoróforo, utilizando el software ArrayPro Analyzer de Media Cybernetics, como previamente se ha reportado [91]. Los datos obtenidos de este análisis se depositaron en la plataforma del NCBI Gene Expression Omnibus (GEO), y se puede tener acceso a ellos con el número [GSE201828](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE201828).

5.10.1. Análisis masivo de los datos obtenidos del microarreglo mediante el empleo de herramientas bioinformáticas

Para el análisis de los genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés Differentially Expressed Genes) se utilizó el programa genArise, desarrollado en el IFC. Este programa permite identificar los DEGs en la condición experimental (en este caso cyH) en comparación con el control (en este caso N). Para esto, se utilizó el valor de Z-score de cada gen, el cual se define como el número de desviaciones estándar que un dato se recorre de la media poblacional. Entre más grande sea este número, hay más

probabilidades que es dato sea diferente. En este estudio se consideraron los genes con un valor de Z-score >1.5 (genes sobreexpresados) y > -1.5 (genes subexpresados), donde la probabilidad de que estos genes sean diferentes de la media poblacional es $\geq 90\%$, basándose en la regla 68-95-99.7.

Para comprender las posibles funciones biológicas de los DEGs en cyH, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando la plataforma informática de acceso libre DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>). En esta plataforma, los genes sobreexpresados se agruparon y analizaron en términos de la Ontología Genética (GO), que incluye componentes celulares, procesos biológicos y funciones moleculares. Además, también se analizaron las vías de señalización utilizando la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Este análisis nos permitió identificar los procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y vías de señalización que fueron asociadas y enriquecidas con estos genes sobreexpresados en hipoxia cíclica. Para todos estos análisis, se utilizó la prueba exacta de Fisher y un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

5.11. PCR en tiempo real

Para validar los resultados obtenidos del microarreglo, utilizamos la técnica de PCR en tiempo real, ya que, por su gran sensibilidad, nos permite detectar cambios pequeños en la expresión de los genes de interés. Se utilizaron oligonucleótidos específicos de los genes seleccionados para la validación del microarreglo, cuyas secuencias se muestran en la tabla II de la sección de anexos (anexo II). Cada reacción de PCR se realizó por triplicado, utilizando 150 ng de cDNA purificado (3 μ L), 0.5 μ M de cada oligonucleótido (sentido y anti-sentido) y 5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific), en un volumen final de 10 μ L. Las muestras se amplificaron utilizando el termociclador PikoReal Real-Time PCR System 96 (Thermo Fisher Scientific) y las siguientes condiciones de termociclado: 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, y 60

°C por 45 segundos. Se utilizó un paso adicional con un rango de temperatura de 65-95°C para generar una curva de disociación (curva Melt), la cual permitió verificar la generación de un solo amplicón para cada par de oligonucleótidos (ver tabla II, anexo II). Para determinar el valor de Cq (ciclo de cuantificación) de cada reacción se utilizó el PikoReal Software V 2.2. El valor de Cq se utilizó para calcular la expresión relativa de cada gen con la fórmula de la $2^{-\Delta\Delta Cq}$ mediante el método de Livak [92], usando como gen control la expresión de la *Gapdh*.

5.12. Ensayo de desgranulación

La desgranulación de las CCs se evaluó midiendo la liberación de la enzima β -hexosaminidasa mediante un ensayo colorimétrico. Para esto, 2.0×10^6 BMBCs fueron incubadas en condiciones de normoxia (2.5 h al 21% O₂), cyH (H2) o chH (2.5 h al 1% O₂) y se sensibilizaron con 100 ng/mL de IgE anti-dinitrofenol (anti-DNP clona SPE-7, Sigma) 1 h antes de terminar cada protocolo. Posteriormente, las células se estimularon con diferentes concentraciones de DNP-HSA (1, 3, 9 y 27 ng/mL) o con PMA + A23187 (ambos a una concentración de 1 μ M) durante 30 min en medio Tyrodes/BSA (para preparación ver anexo I) a 37°C y 21% de O₂.

La cuantificación de la β -hexosaminidasa se realizó midiendo la hidrólisis del sustrato para esta enzima, el p-nitrofenol-N-acetil- β -D-glucosamina (p-NAG, Sigma), ya que el producto de esta reacción (enzima-sustrato) es un compuesto cromogénico que puede ser fácilmente detectable por colorimetría y que es directamente proporcional a la enzima liberada. Para esto, en una placa de 96 pozos se colocaron 40 μ L/pozo de p-NAG seguidos de 60 μ L de sobrenadante de cada muestra o el lisado celular con Tritón al 0.5% para obtener el total de enzima almacenada en las CCs (100%). La placa se incubó durante 1 h a 37°C y, posteriormente, se agregaron 120 μ L/pozo de solución stop (para preparación ver anexo I). Finalmente, la absorbancia de cada muestra se midió por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro de

placa (Tecan SUNRISE) a una longitud de onda de 405 nm. El porcentaje de desgranulación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de desgranulación} = \frac{(\text{Densidad óptica de la muestra})(100)}{\text{Densidad óptica del control tratado con tritón}}$$

5.13. Determinación de calcio intracelular

La concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ fue determinada por fluorimetría utilizando Fura 2-AM, un compuesto utilizado ampliamente como indicador de Ca^{2+} . Para este experimento se utilizaron 10×10^6 BMMCs, las cuales fueron incubadas en normoxia o cyH, y, 1 h antes de finalizar el protocolo, fueron sensibilizadas con IgE (100 ng/mL). Después, se marcaron con Fura 2-AM (5 μ M) en buffer Tyrodes/BSA y se incubaron durante 30 min a 37°C en condiciones de normoxia. Transcurrido este tiempo, las BMMCs cargadas con Fura 2-AM se lavaron 2 veces con PBS-1X para retirar el exceso de Fura 2-AM y se colocaron en una cubeta de cuarzo. Los cambios de fluorescencia se determinaron a 340/510 nm (longitud de onda de excitación/emisión del Fura 2-AM), utilizando un espectro-fluorómetro (Fluoromax 3). Durante todo el experimento, las células se mantuvieron a 37°C y en agitación. La fluorescencia basal se registró durante 100 s, y posteriormente se agregó el Ag (27 ng/mL), el cual se registró durante 500 s. Al final de los experimentos, la fluorescencia máxima (F_{max}) se registró midiendo la fluorescencia tras la adición de una solución de Tritón al 10%, lo que permitió liberar todo el Fura 2-AM contenido en la célula; mientras que la fluorescencia mínima (F_{min}) se obtuvo añadiendo el agente quelante del Ca^{2+} EGTA (200 mM). Finalmente, la $[Ca^{2+}]_i$ se calculó utilizando la ecuación de Grynkiewicz [93]:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right)$$

Kd = constante de disociación del Fura 2-AM, cuyo valor es 224 nm.

F= valor de fluorescencia a un determinado tiempo

Los datos obtenidos fueron normalizados y reportados como el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ con respecto a la fluorescencia basal (sin Ag). Además, los datos se ajustaron a una función monoexponencial para calcular la constante de velocidad (K).

5.14. Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes, de tres cultivos diferentes. Todas las comparaciones estadísticas fueron realizadas entre las células mantenidas en N vs aquellas expuestas a cyH, a menos que se especifique otra cosa. La distribución normal de los datos fue evaluada utilizando la prueba Shapiro-Wilk. En base a los resultados arrojados de la prueba de normalidad, las comparaciones entre los grupos evaluados se analizaron por pruebas paramétricas y no paramétricas, dependiendo si los datos pasaron o no dicha prueba. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba *post hoc* Tukey. En todos los experimentos, los datos fueron considerados significativos siempre y cuando tuvieran un $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Las CCs infiltran los tumores de melanoma y se localizan en zonas de cyH

Para evaluar la participación de las CCs en el crecimiento tumoral, así como su localización en el TME, se utilizó un modelo murino de melanoma, tal y como se ilustra en la Figura 9A. Tras la inoculación subcutánea de las células de melanoma, encontramos que, los tumores crecen en ratones WT, pero no en ratones carentes de CCs (Wsh), y, si estos ratones Wsh se reconstituyen con CCs de animales WT, se puede observar nuevamente el crecimiento del tumor igual que el de un animal WT (Figura 9B). Estos datos indican que las CCs favorece el crecimiento del tumor de melanoma murino, tal y como

previamente se ha demostrado por distintos laboratorios, incluyendo el nuestro [23].

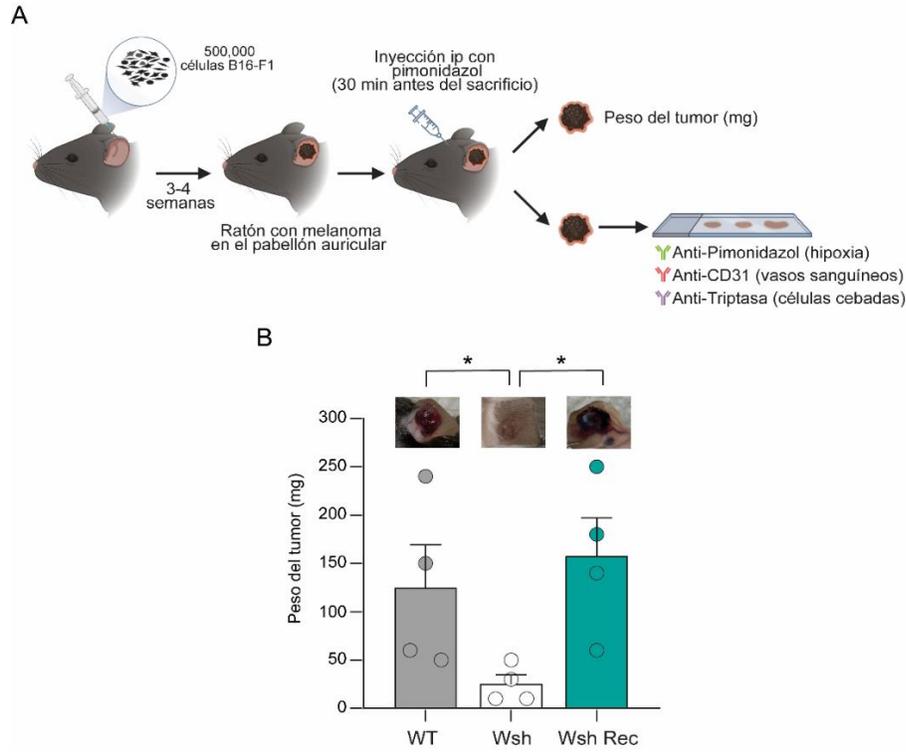


Figura 9. Las CCs promueven el crecimiento del tumor de melanoma. (A) Diseño experimental del modelo de melanoma murino utilizando diferentes grupos de ratones. **(B)** Micrografías del crecimiento tumoral en ratones WT, Wsh y Wsh Rec, junto con su barra que indica el peso del tumor extirpado en mg. * $p < 0.05$ mediante t de Student. $n = 4$ tumores de animales independientes.

Se sabe que las CCs infiltran los tumores de melanoma murino y se localizan preferencialmente en zonas hipóxicas [42], pero no se ha demostrado si estas células están expuestas a cyH dentro del tumor. Para analizar este aspecto, utilizamos cortes de tejido proveniente de las biopsias de tumores extraídos de ratones previamente inyectados con pimonidazol. Las rebanadas fueron incubadas en presencia de anticuerpos específicos para detectar zonas hipóxicas (positivas para pimonidazol), células endoteliales de los vasos sanguíneos (positivas para CD31) y CCs (positivas para triptasa) (ver Figura 9A). En la Figura 10A se observa la estructura del tumor con el ESID, el infiltrado celular con DAPI en color azul y las zonas hipóxicas en color verde

(positivas para pimonidazol), donde también se pudieron distinguir zonas normóxicas (negativas a pimonidazol, en color negro) en el mismo corte del tumor. Además, el cartílago de la oreja fue intensamente marcado por el pimonidazol, ya que es un tejido pobremente vascularizado y representa un buen control de nuestro marcador de hipoxia (Figura 10A, flecha blanca).

Al analizar la vasculatura tumoral, se encontró que los vasos sanguíneos (marcados con CD31 en color rojo) colocalizan con las zonas hipóxicas, sugiriendo la existencia de zonas sometidas a cyH dentro del tumor (Figura 10B). Además, el coeficiente de Manders (que analiza % de sobreposición entre dos marcas) demostró que la señal de CD31 y pimonidazol tuvieron un alto grado de colocalización ($97,8 \pm 1,6\%$), lo que sugiere que casi todos los vasos sanguíneos detectados en las biopsias del tumor son pobremente funcionales (por ejemplo el tejido cercano a esos vasos presenta hipoxia), mientras que el porcentaje de sobreposición entre pimonidazol y CD31 fue significativamente menor ($23,6 \pm 2,1\%$), lo que indica que las grandes áreas hipóxicas dentro del tumor no se encuentran con la correcta perfusión (Figura 10C).

Posteriormente se evaluó la presencia de CCs en las zonas del tumor asociadas a cyH. Como se puede observar en la Figura 10D, las células positivas a triptasa (color morado) también estuvieron presentes en zonas positivas a pimonidazol y CD31 (Figura 10D, flechas rojas). Para corroborar la presencia de CCs en zonas positivas a pimonidazol y CD31 en la biopsia tumoral, se hizo una magnificación a 40X y se encontró que las células positivas a triptasa rodean un vaso sanguíneo de gran calibre, que se encuentra en una zona hipóxica (Figura 10E). Finalmente, se analizó el porcentaje de sobreposición entre las señales de triptasa y pimonidazol, y se encontró que está cercano a 100%, corroborando que las CCs están localizadas en zonas hipóxicas dentro del tumor. Curiosamente, la colocalización entre triptasa y CD31 fue significativamente menor (triptasa/pimonidazol = $97.8 \pm 1.6\%$ vs triptasa/CD31 = $63.9 \pm 7.3\%$; Figura

10F), sugiriendo que, al menos dentro del tumor de melanoma, las CCs parecen tener una localización anatómica diferente al resto del organismo, donde estas células están muy cerca o adosadas a los vasos sanguíneos [94].

En conjunto, estos resultados confirman la existencia de una vasculatura intratumoral pobremente funcional, asociada con la presencia de cyH, y demuestran, por primera vez, que las TAMCs no están asociadas de manera importante a los vasos sanguíneos, pero están presentes en zonas de cyH dentro del tumor de melanoma, y que, probablemente puedan estar siendo activadas por esta condición metabólica en este nicho tumoral.

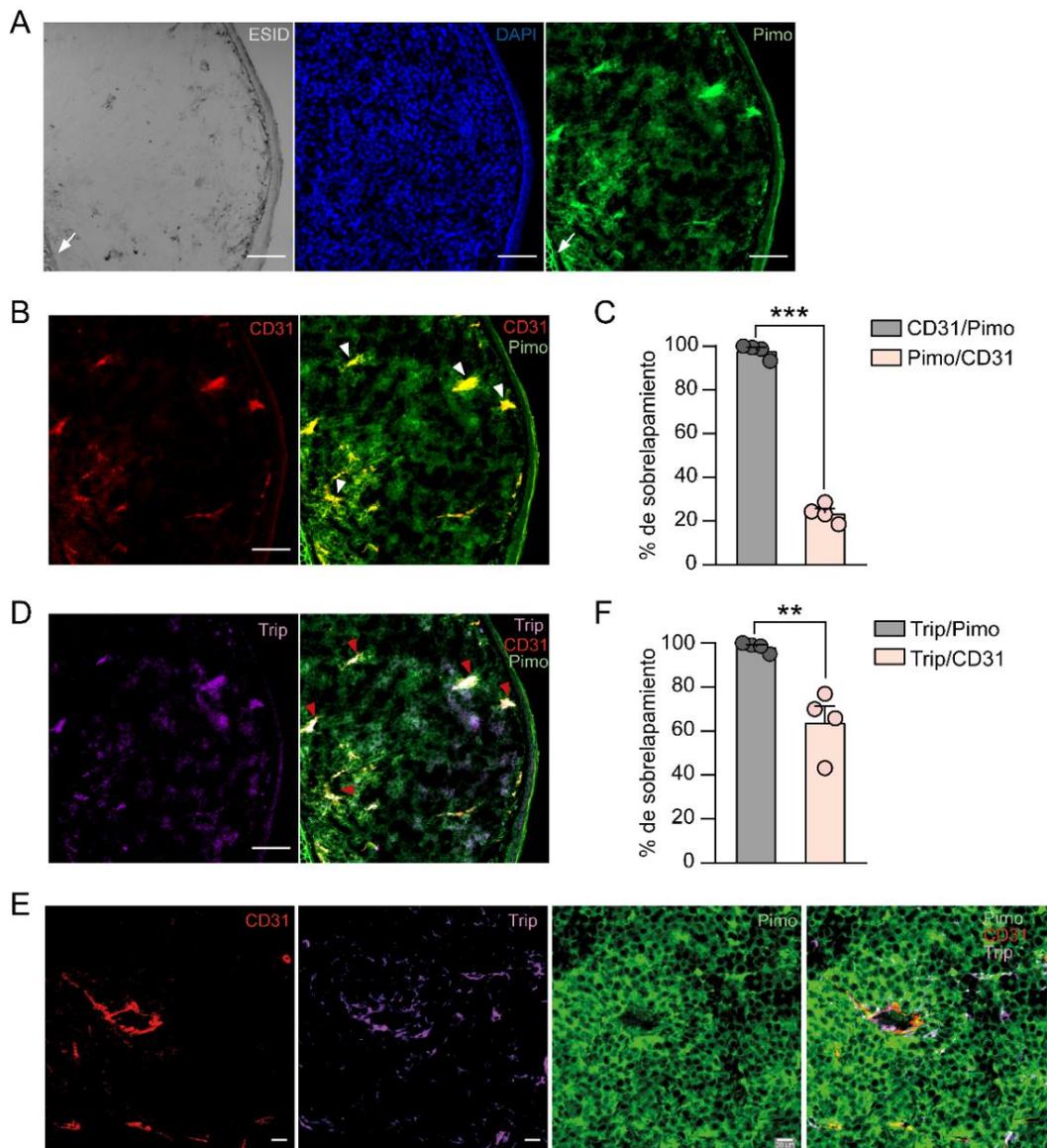


Figura 10. Las CCs se localizan en zonas asociadas a cyH dentro del tumor de melanoma murino. (A) Imagen representativa de microscopia confocal que muestra la morfología típica del pabellón auricular, donde el cartílago de la oreja está señalado con una flecha blanca. La masa tumoral la podemos apreciar con el marcaje de los núcleos celulares con DAPI (azul) mientras que las zonas hipóxicas están marcadas con pimonidazol verde. **(B)** Imagen que representa la vasculatura tumoral marcada con CD31 (rojo) y la colocalización de esta marca con pimonidazol. **(C)** Cuantificación del porcentaje de sobreposición entre CD31/pimonidazol y pimonidazol/CD31, empleando los coeficientes de Manders. **(D)** Imagen representativa que muestra las CCs asociadas a tumores, marcadas con triptasa (morado) y su colocalización con las áreas del tumor positivas a pimonidazol y a CD31. **(E)** Zoom de una región del tumor que muestra un vaso sanguíneo de gran calibre marcado con CD31, que está rodeado por células positivas a triptasa, y ambos marcajes están en las zonas hipóxicas del tumor. **(F)** Valores de los coeficientes de Manders que indican el porcentaje de triptasa/CD31 y viceversa. Barra de calibración para el objetivo de 10X = 100 μm ; objetivo 40X = 20 μm ; grosor del corte de tumor: 30 μm . *** $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$ vs grupos señalados, mediante una prueba t de Student. $n=4$ biopsias tumorales de al menos 4 animales independientes. Pimo: pimonidazol; Trip: triptasa.

6.2. La cyH aumenta la expresión génica de *Hif-1 α* y de *Vegf*, que son considerados marcadores de hipoxia

Para caracterizar los efectos de la cyH en CCs, se estandarizó un protocolo *in vitro* utilizando una incubadora de desplazamiento de oxígeno (O_2), que inyecta nitrógeno (N_2) hasta obtener una concentración del 1% de O_2 . Se generaron BMMCs de ratones C57BL6/J y estas células fueron expuestas al protocolo de cyH, que consistió en 4 ciclos de 1 h al 1% de O_2 más 30 minutos de reoxigenación a 21% de O_2 . En la Figura 11A se presenta un esquema donde se explica el protocolo de cyH seguido en este trabajo. Como grupo control, se utilizaron células expuestas a condiciones de normoxia (21% de O_2 , durante 6 h, que fue lo que duró en total el protocolo de cyH).

Para corroborar la validez de este protocolo, se analizó la expresión relativa de dos marcadores de hipoxia: *Hif-1 α* y *Vegf*, tanto en los períodos de hipoxia (H1, H2, H3 y H4) como de reoxigenación (R1, R2, R3 y R4). Como podemos observar en la Figura 11B, hay un aumento significativo en la expresión de

estos marcadores después del segundo y tercer período de hipoxia (H2 y H3), comparado con los niveles observados en condiciones de N, y no se encontraron diferencias en el cuarto ciclo de hipoxia/reoxigenación (H4 y R4). Para el caso de *Hif-1 α* , se puede observar que, en los períodos de reoxigenación R2 y R3, la expresión de este ARNm disminuye de manera significativa, con respecto a su período previo de hipoxia (H2 y H3, respectivamente), y, entre H2 y H3 no existe diferencia en la expresión de *Hif-1 α* (Figura 11C). La disminución en la expresión de *Hif-1 α* durante estos períodos de reoxigenación puede deberse a que, una vez que regresa el O₂, la célula activa mecanismos para degradar a este factor de transcripción, tal como se ha demostrado en células endoteliales [95].

Por otro lado, el factor de transcripción HIF-1 α induce la expresión de muchos genes, entre ellos, *Vegf*. Como podemos observar en la Figura 11B, el ARNm de *Vegf* (2 isoformas) presentó un aumento que se mantuvo hasta el período R3, mientras que en H4 y R4 los niveles de expresión fueron muy similares a los observados en normoxia (Figura 11D). Adicionalmente, encontramos que estos cambios transcripcionales desencadenados por la cyH no indujeron una muerte celular significativa, ya que la viabilidad fue superior al 95% (Figura 11E), y este valor fue muy similar al observado en condiciones de normoxia (Figura 11F).

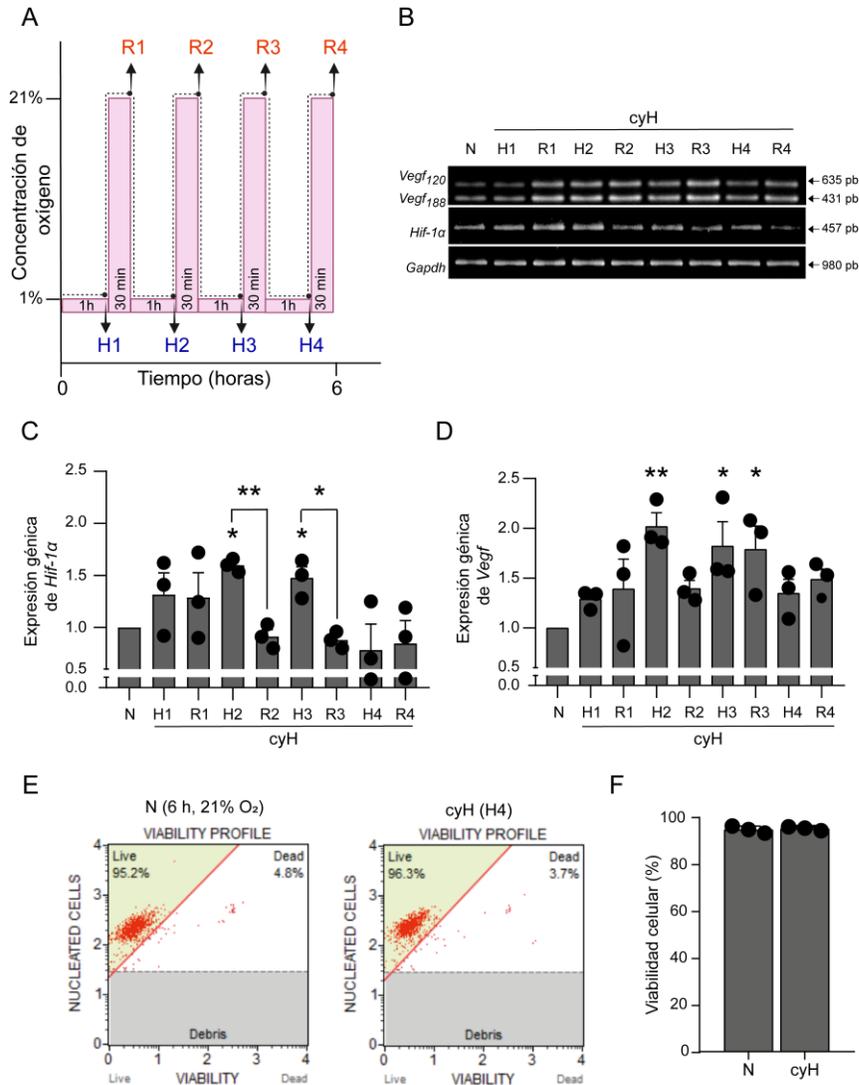


Figura 11. La cyH induce un aumento en la expresión de marcadores asociados con la hipoxia, sin afectar la viabilidad celular. (A) Esquema del protocolo de cyH que ilustra la duración de los períodos de hipoxia/reoxigenación a los cuales fueron sometidas las BMMCs. Las flechas indican el punto en el cual las células fueron recolectadas. **(B)** Gel de agarosa representativo que muestra los niveles de ARNm de *Hif-1α* y *Vegf* evaluados por PCR en punto final, tanto en BMMCs sometidas al protocolo de cyH como aquellas mantenidas en condiciones de normoxia (6 h a 21% O₂). **(C)** Análisis densitométrico de la expresión de *Hif-1α* y **(D)** *Vegf*, utilizando como control la expresión de *Gapdh*. **(E y F)** Perfil de viabilidad de BMMCs expuestas al protocolo de cyH (R4) o mantenidas en condiciones de normoxia (6 h a 21% de O₂), junto con su cuantificación correspondiente. **p*<0.05 y ***p*<0.01. Comparación estadística entre normoxia y grupos señalados, mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. *n* = 3 experimentos utilizando cultivos de BMMCs diferentes. N: normoxia; cyH: hipoxia cíclica.

6.3. La cyH induce una mayor producción de ROS dependiente de los períodos alternados de reoxigenación.

Los periodos de reoxigenación intercalados con los periodos de hipoxia son una característica distintiva de la cyH, en comparación con otros tipos de hipoxia, como la hipoxia crónica (chH) [71,95]. Esta reoxigenación intermitente podría desencadenar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) e inducir estrés oxidativo por mecanismos que involucran a la cadena respiratoria mitocondrial, ya que las mitocondrias son la principal fuente de ROS en las células [96]. Debido a lo anterior, evaluamos la producción de ROS en BMMCs sometidas al protocolo de cyH, utilizando el reactivo 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), el cual, en presencia de ROS, se oxida a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto que fluorescente. Por lo tanto, la intensidad de fluorescencia de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de ROS.

En la Figura 12A podemos observar que la cyH induce un incremento significativo en la producción de ROS en el segundo y tercer ciclo del protocolo de cyH (H2, R2 y R3). Durante el cuarto ciclo de hipoxia/reoxigenación, los niveles de ROS no fueron estadísticamente diferentes a los observados en condiciones de normoxia (N = 100; H4 = $110,78 \pm 2,13$; R4 = $116,6 \pm 5,42$). De manera interesante, el mayor incremento en la producción de ROS se encontró durante el segundo período de reoxigenación (R2), y este aumento fue incluso mayor que su previo período de hipoxia (H2 = $115,46 \pm 1,93$; R2 = $135,60 \pm 3,33$). Estos datos indican que la cyH induce estrés oxidativo en las BMMCs, que se ve potenciado en los períodos de reoxigenación, particularmente en el segundo período (R2).

Para demostrar que el incremento en la producción de ROS es dependiente de los períodos de reoxigenación alternados del protocolo de cyH, se decidió comparar la producción de ROS entre 2 h continuas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación (chH + reoxigenación) y 2 h de hipoxia más los dos períodos de reoxigenación alternados (cyH, R2), como se ilustra en la Figura 12B.

Podemos observar que el aumento en la producción de ROS depende de los periodos de reoxigenación alternados; ya que si estos dos períodos de reoxigenación se dan de manera continua (2 h de hipoxia + 1 h de reoxigenación), no hay un incremento tal y como se observa en las células sometidas a los dos ciclos de hipoxia/reoxigenación alternados (Figura 12C).

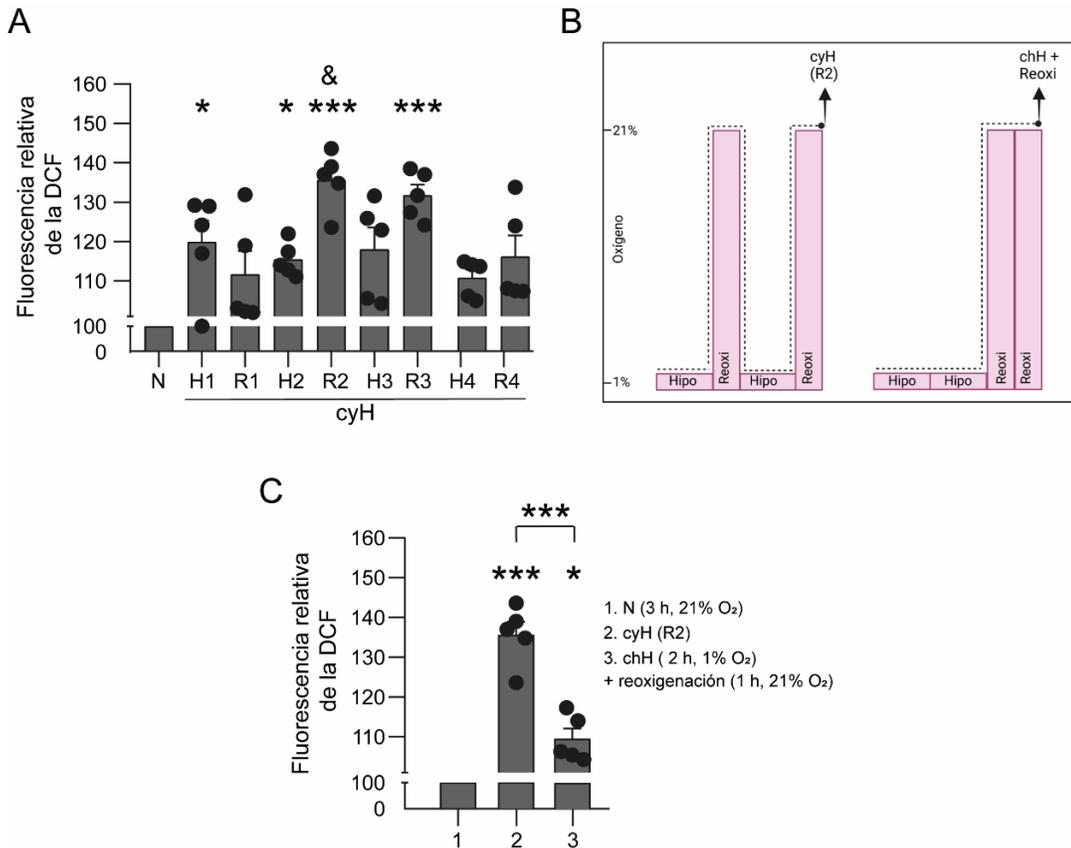


Figura 12. La cyH induce un incremento en la producción de ROS que es dependiente de los períodos alternados de reoxigenación. (A) Gráfica que ilustra la producción de ROS en BMMCs sometidas al protocolo de cyH en comparación con aquellas que se mantuvieron en normoxia. La producción de ROS fue medida indirectamente mediante la oxidación de la DCF-DA a DCF, que es un compuesto fluorescente. **(B)** Diseño experimental empleado para demostrar la participación de los períodos de reoxigenación alternados en la producción de ROS. **(C)** Producción de ROS en BMMCs incubadas en normoxia, cyH o chH + reoxigenación. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs normoxia y grupos señalados; & $p < 0.05$ vs H2, mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. $n = 5$ experimentos independientes utilizando cultivos diferentes de BMMCs. N: normoxia; cyH: hipoxia cíclica; chH: hipoxia crónica; Hipo: hipoxia; Reoxi: reoxigenación.

6.4. La cyH induce cambios diferenciales en la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias

Debido a que se observaron cambios importantes en la producción de ROS durante el segundo ciclo de hipoxia/reoxigenación (H2/R2) y, a fin de saber si la hipoxia o la reoxigenación era más importante en el cambio fenotípico de las CCs, se analizó la expresión de algunas citocinas que son secretadas por estas células y cuya secreción ha sido validada en nuestro laboratorio.

Se analizaron los ARNm de 5 citocinas utilizando la segunda hora de exposición a hipoxia (H2) y el segundo periodo de reoxigenación (R2), tal y como se muestra en el esquema del diseño experimental, donde las flechas indican el punto exacto donde se recolectaron las células (Figura 13A). Como podemos observar, el patrón de expresión de estas citocinas, tanto en H2 como en R2, es diferencial. Comparado con las células en normoxia, la expresión de *Tnf- α* , una típica citocina proinflamatoria, aumentó de manera significativa en H2, y este incremento se ve potenciado en R2 (Figura 13B). En contraste, la quimiocina *Ccl-2*, que es la encargada de atraer otras células al sitio de la lesión, aumentó su expresión en H2, pero no en R2, donde su expresión parece no cambiar con respecto a los niveles de expresión observados en condiciones de normoxia (Figura 13C). Un mismo patrón se observó con la expresión de *Il-6*, *Il-4* y *Tgf- β* (Figura 13D, E y F). Con estos datos podemos concluir que hay una expresión diferencial de citocinas en BMMCs expuestas al protocolo de cyH y que los períodos de hipoxia y reoxigenación son importantes para inducir o reprimir la expresión de genes.

Tras la observación de que los cambios más significativos en la expresión génica se llevaron a cabo en el segundo ciclo de hipoxia/reoxigenación de nuestro protocolo de cyH (concretamente en el período de hipoxia H2), se decidió utilizar este tiempo para analizar los cambios transcripcionales en las BMMCs, y, en los siguientes experimentos, las células en período H2 se denominan células expuestas a cyH.

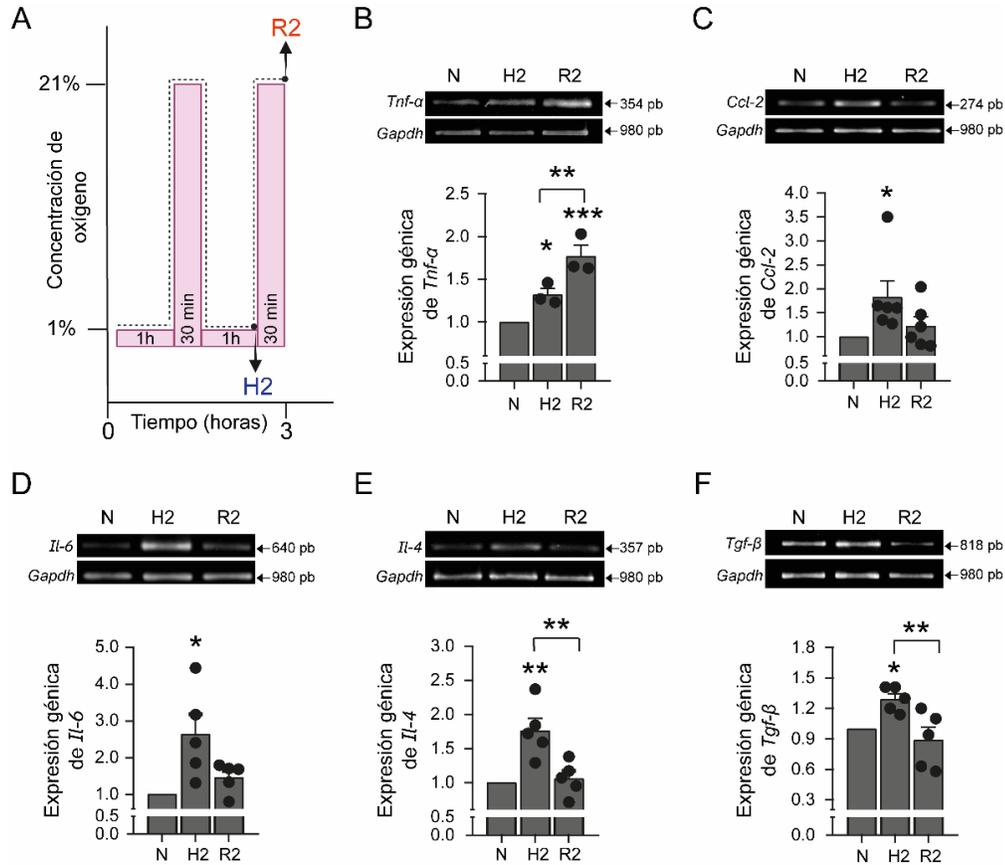


Figura 13. La cyH induce cambios diferenciales en la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias, dependiendo de los períodos de hipoxia o reoxigenación. (A) Esquema que muestra el protocolo de cyH y los tiempos a los cuales fueron recolectadas las muestras, para su posterior análisis mediante PCR en punto final. **(B-F)** Imágenes representativas de geles de agarosa que muestran la expresión de las citocinas indicadas (arriba) junto con su análisis densitométrico, utilizando como control la expresión de la *Gapdh* (abajo). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs normoxia y grupos señalados, ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. $n = 3-5$ experimentos independientes utilizando cultivos diferentes de BMMCs. N: normoxia.

6.5. La cyH induce cambios importantes en el transcriptoma de las CCs

Con la finalidad de ampliar el estudio de los ARNm alterados por la cyH en las CCs, se realizó un análisis transcriptómico más extenso de BMMCs expuestas a cyH, empleando la tecnología de microarreglos. Para visualizar mejor los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre células mantenidas en normoxia o sometidas al protocolo de cyH, se hizo un diagrama de volcán

utilizando el \log_2 del número de veces de cambio (*fold change*, eje de las X) y el logaritmo negativo del valor de P (eje de las Y) para cada gen. La Figura 14A muestra los 1265 genes sobreexpresados y los 1247 subexpresados (puntos rojos y verdes, respectivamente). En color negro están los genes que no cambiaron o que son podrían ser falsos positivos de acuerdo con el valor de P (se consideró un valor de $P \leq 0.05$, cuyo logaritmo negativo es ≈ 1.3) y está marcado con una línea punteada gris (Figura 14A). Además, todos los datos obtenidos del microarreglo (datos crudos) fueron depositados en la plataforma de libre acceso GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>), y se puede acceder a ellos con el siguiente número: GSE201828.

Posteriormente, los DEGs sobreexpresados se agruparon y analizaron en la plataforma bioinformática de DAVID, donde un total de 950 genes coincidieron con el genoma del ratón. El análisis funcional con esta herramienta bioinformática reveló que la firma transcripcional de las CCs expuestas a cyH se asocia con diferentes procesos biológicos, componentes celulares, funciones moleculares y vías de señalización (tabla 1). Adicionalmente, se construyeron gráficas que nos ilustran el número de genes asociados con cada categoría y, de manera jerárquica, el enriquecimiento de éstas, tomando en cuenta el valor negativo del logaritmo de P. Entre más grande sea este valor, el valor de P es más pequeño, y por lo tanto hay un mayor enriquecimiento de esa categoría. Para el caso de los procesos biológicos y componentes celulares se graficaron las primeras 5 categorías de ambos (Figura 14B).

Particularmente, los procesos biológicos más enriquecidos y con el mayor número de genes asociados fueron la transcripción y la regulación de la transcripción (Figura 14B, círculos verdes). Los transcritos de estas categorías están implicados en la metilación del ADN (como la *Dnmt1* y *Dnmt3a*); la regulación del proceso de corte y empalme (*splicing*) en respuesta a la hipoxia, como *Srsf5* (factor de empalme rico en serina y arginina); genes involucrados en las funciones de la ARN polimerasa, como *Brf1*; (subunidad del factor de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa III) y algunos factores de

transcripción como *Maf* y los receptores a glucocorticoides como *Nr3c1* y *Nr2e3* (ver tabla 1). Esto sugiere que el conjunto de genes que aumentan en cyH podría estar desencadenando cambios importantes en el perfil transcripcional de las CCs y que estos cambios podrían estar asociados a modificaciones epigenéticas, a la inducción de la expresión génica y al *splicing* alternativo. Estos dos últimos procesos están íntimamente ligados a la respuesta que montan las células para adaptarse a las condiciones de hipoxia, tal y como ocurre en otras células inmunitarias como los macrófagos y las células T [66,97,98]. Cabe resaltar que, la localización celular que más se enriqueció con los genes sobreexpresados en cyH, fue el núcleo; pero también se encontraron enriquecidas otras estructuras celulares como la mitocondria y el citoplasma, donde podemos observar que un gran número de genes fueron asociados a estos componentes celulares (Figura 14B, círculos naranjas).

También se evaluaron las 10 vías de señalización más enriquecidas en BMMCs expuestas a cyH y se encontró que, la vía de la fosforilación oxidativa fue la más importante (Figura 14C). Este hallazgo concuerda con el estímulo al que fueron sometidas las células, es decir, al ser el O₂ una molécula indispensable para la producción eficiente de ATP a través de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, al disminuir la concentración de O₂, la célula responde expresando genes que se relacionan con la producción de esta molécula energética [99].

De manera interesante, la segunda vía más enriquecida fue la vía de señalización del receptor FcεRI (Figura 14C). Esta categoría solo incluyó 8 transcritos (de los 950 analizados), pero esos ARNm codifican proteínas importantes que participan en la cascada de señalización del receptor FcεRI, a diferentes niveles (tabla 2). Por ejemplo, *Fcer1g*, que codifica para las cadenas γ y del FcεRI y poseen ITAMs que transducen señales tras la activación de este receptor; *Pla2g4a*, que codifica un miembro de la fosfolipasa A2 citosólica que participa en la síntesis de mediadores lipídicos; y *Map2k6*, que codifica una proteína cinasa-cinasa activada por mitógenos (MAPKK) que

regula la activación de varios factores de transcripción y conducen a la síntesis *de novo* de muchas quimiocinas y citocinas. Estos tres genes fueron validados mediante PCR en tiempo real, y, como era de esperarse, la expresión de los tres ARNm incrementó al menos dos veces en BMMCs expuestas a cyH, en comparación con las células mantenidas en normoxia (Figura 14D).

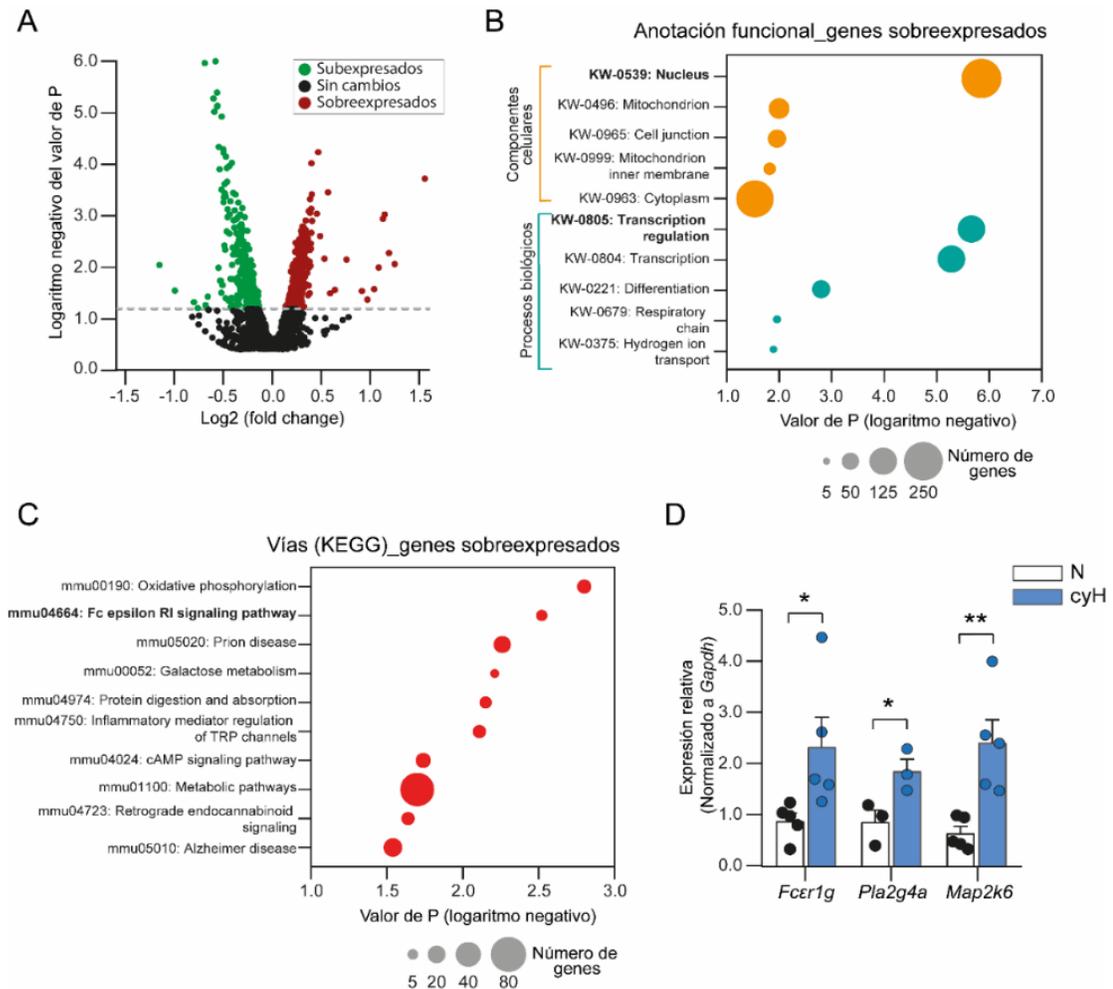


Figura 14. La cyH induce cambios importantes en el transcriptoma de las CCs, y los genes sobrexpresados se asocian con diferentes procesos biológicos, componentes celulares y vías de señalización. (A) Diagrama de volcán que ilustra los genes que cambiaron en BMMCs expuestas al protocolo de cyH en comparación con aquellas mantenidas en condiciones de normoxia. Los puntos verdes representan los genes subexpresados y los puntos rojos los genes sobrexpresados. **(B)** Análisis funcional de los 950 genes sobrexpresados en BMMCs expuestas al protocolo de cyH, donde se puede observar el top 5 de los procesos biológicos y componentes celulares enriquecidos junto con el número de genes asociados en cada categoría. **(C)** Top 10 de vías de señalización

enriquecidas en BMMCs expuestas al protocolo de cyH. El número de DEGs asociados con cada vía se ilustran de acuerdo con el tamaño del círculo. **(D)** Validación de algunos genes asociados a la vía de señalización del FcεRI, utilizando PCR en tiempo real. *p < 0.05 y **p < 0.01 vs N mediante la prueba t de Student. n = 3-5 experimentos independientes utilizando cultivos diferentes de BMMCs. N: normoxia; cyH: hipoxia cíclica.

Tabla 1. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes sobreexpresados en CCs expuestas a cyH.

Anotación Funcional	Genes			Valor de P
Regulación de la transcripción (KW-0805)	<i>Dnmt1</i> <i>Dnmt3a</i>	<i>Nr3c1</i> <i>Nr2e3</i>	<i>Srf5</i>	9.2×10^{-7}
Transcripción (KW-0804)	<i>Brf1</i> <i>Maf1</i>	<i>Maf</i> <i>Mafb</i>	<i>Ccar1</i> <i>Taf3</i>	2.2×10^{-6}
Unión al AND (KW-0238)	<i>Aebp2</i> <i>Ash2l</i> <i>Pou3f3</i>	<i>Pou4f1</i> <i>Tead1</i>	<i>Ang2</i> <i>Sox4</i>	6.8×10^{-5}
Fosforilación oxidativa (mmu00190)	<i>Atp5g2</i> <i>Atp5j2</i> <i>Atp6v1e1</i> <i>Atp5l</i> <i>Atp4b</i>	<i>Ndufs4</i> <i>Ndufb5</i> <i>Ndufb2</i> <i>Ndufb4</i>	<i>Ndufa3</i> <i>Ndufa5</i> <i>Ndufc1</i> <i>Cox10</i>	1.6×10^{-3}
Metabolismo de la galactosa (mmu00052)	<i>B4galt1</i> <i>B4galt2</i>	<i>Akr1b7</i> <i>Galt</i>	<i>Gale</i>	6.2×10^{-3}
Vía de señalización del AMPc (mmu04024)	<i>Atp1a2</i> <i>Adcy4</i>	<i>Edn2</i>	<i>Ppp1cb</i>	1.8×10^{-2}
Carcinogénesis química – Especies reactivas del oxígeno (mmu05208)	<i>Cyp1b1</i> <i>Gstm6</i>	<i>Pik3cb</i>	<i>Sod1</i>	3.7×10^{-2}

Anotación Funcional	Genes			Valor de P
Respuesta inflamatoria (KW-0395)	<i>Bcl6</i> <i>Ccl21a</i>	<i>Cxcl13</i>	<i>Cx3cl1</i>	9.5×10^{-1}
Vía de señalización del receptor FcεRI (mmu04664)	<i>Fcer1g</i> <i>Alox5ap</i> <i>Mapk8</i>	<i>Map2k6</i> <i>Pik3cb</i> <i>Pla2g4a</i>	<i>Raf1</i> <i>Vav3</i>	3.0×10^{-3}

Los códigos entre paréntesis (columna izquierda) fueron designados por la herramienta de anotación funcional de la plataforma DAVID. Valores de P, prueba exacta de Fisher. Entre más pequeño sea el valor, mayor es el enriquecimiento.

Tabla 2. Genes asociados con la vía de señalización del FcεRI.

ID del gen	Nombre/símbolo	Z-score
NM_010185	Subunidad gamma del receptor de inmunoglobulina épsilon de alta afinidad (<i>Fcer1g</i>)	1.91
NM_009663	Araquidonato 5-lipooxigenasa (<i>Alox5ap</i>)	1.63
NM_016700	Proteína cinasa activada por mitógenos 8 / JNK (<i>Mapk8</i>)	1.59
NM_011943	Proteína cinasa activada por mitógenos 6 (<i>Map2k6</i>)	2.42
NM_029094	Subunidad catalítica beta de la fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinasa (<i>Pik3cb</i>)	1.54
NM_008869	Fosfolipasa A2, grupo IVA (citósólica, dependiente del calcio) (<i>Pla2g4a</i>)	1.63
NM_029780	proto-oncogén, serina-treonina cinasa (<i>Raf1</i>)	1.58
NM_020505	Oncogén Vav3 (<i>Vav3</i>)	1.71

El valor de Z-score fue obtenido del microarreglo

6.6 La cyH induce una hiperactividad a la activación del receptor FcεRI en las CCs

Debido a que la vía de señalización del FcεRI controla muchas de las funciones fisiopatológicas de las CCs, y es de suma importancia para su diferenciación y maduración [18], decidimos validar la funcionalidad de esta vía y nos preguntamos si la cyH podría inducir una mayor respuesta de secreción tras un reto capaz de estimular al FcεRI. Para esto, las BMMCs fueron incubadas en normoxia o cyH y sensibilizadas con 100 ng/mL de IgE una hora antes de terminar el protocolo. Posteriormente, se estimularon con diferentes concentraciones de antígeno (Ag) y se evaluó la liberación de la enzima β-hexosaminidasa, utilizada como marcador de desgranulación. Como se puede observar en la Figura 15A, las BMMCs expuestas al protocolo de cyH no modifican su liberación basal de β-hexosaminidasa, es decir, la cyH *per se* no induce la liberación de mediadores preformados en CCs. Sin embargo, cuando las células se retan con Ag, se observa un aumento significativo en el porcentaje de liberación de esta enzima, que es mucho mayor en las células expuestas a cyH en comparación con las que permanecieron en normoxia. El porcentaje máximo de desgranulación fue observado a la concentración de 3 ng/mL, siendo de $37.0 \pm 2.5\%$ en células hipóxicas y de $20.0 \pm 3.1\%$ en células normóxicas (Figura 15A). En el caso de las BMMCs expuestas a chH (2 h 30 min al 1% O₂), no se observó diferencia significativa en el porcentaje de liberación de β-hexosaminidasa en comparación con las células normóxicas (chH $18.5 \pm 1.6\%$ vs normoxia $20.0 \pm 3.1\%$, Figura 15A, línea morada). Estos datos nos permiten concluir que hay diferentes mecanismos moleculares desencadenados por la cyH y la chH, y que es la cyH induce un fenotipo de hiperactividad en BMMCs tras ser estimuladas con el complejo IgE/Ag.

Para comprobar que este efecto de hiperactividad en CCs es dependiente de la vía de señalización del FcεRI, estimulamos a las células con un activador de la PKC combinado con un ionóforo de calcio (A23187), una combinación que es capaz de inducir la desgranulación de las CCs, pero de manera

independiente del receptor FcεRI. Como podemos observar, ese estímulo provocó un aumento en la liberación de la β-hexosaminidasa tanto en células incubadas en normoxia ($38.7 \pm 3.2\%$) como en aquellas sometidas al protocolo de cyH ($42.3 \pm 8.1\%$), pero no hubo diferencia entre ambas condiciones (Figura 15B), sugiriendo que la hiperactividad observada en las BMMCs expuestas a cyH, es dependiente de la activación del receptor FcεRI.

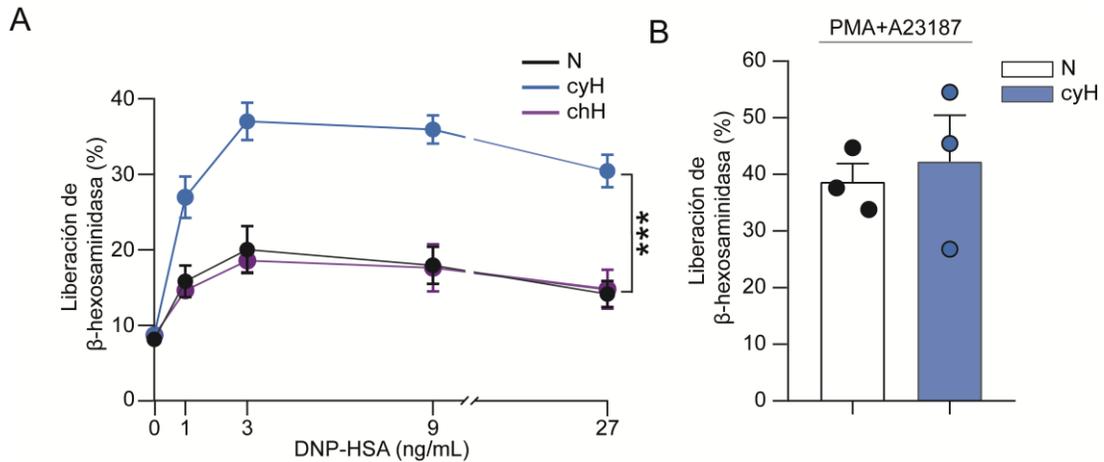


Figura 15. La cyH induce una mayor liberación de β-hexosaminidasa tras la activación del receptor FcεRI en CCs. (A) Gráfica que muestra el porcentaje de liberación de la enzima β-hexosaminidasa en BMMCs expuestas al protocolo de cyH, chH o mantenidas en normoxia. Las células se sensibilizaron 1 h con 100 ng/mL de IgE y posteriormente se estimularon con diferentes concentraciones de Ag. **(B)** Liberación de β-hexosaminidasa utilizando un estímulo que no activa al receptor FcεRI. Las BMMCs fueron expuestas a cyH o mantenidas en normoxia y posteriormente se estimularon con PMA y A23187 (ambos a una concentración de 1 μM), para finalmente mediar la liberación de β-hexosaminidasa en el sobrenadante celular. *** $p < 0.001$ vs normoxia, mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. n = 3-9 experimentos independientes utilizando cultivos de BMMCs diferentes. N: normoxia; cyH: hipoxia cíclica; chH: hipoxia crónica.

6.7. El fenotipo de hiperactividad en CCs inducido por la cyH se asocia con un aumento de calcio intracelular y una mayor actividad de la fosfolipasa C

Con la finalidad de dilucidar los cambios moleculares que llevan a la hiperactividad de las CCs en condiciones de cyH, decidimos analizar algunos

eventos tempranos de la cascada de señalización del FcεRI que son indispensables en la desgranulación anafiláctica de las CCs. Debido a que la fosfolipasa C gamma (PLCγ) es una enzima importante en el aumento de Ca²⁺ intracelular tras la activación del FcεRI y que el Ca²⁺ es necesario para la movilización y fusión de los gránulos con la membrana plasmática [100], hipotetizamos que la actividad de esta enzima podría estar aumentada en BMMCs expuestas a cyH. Para probar esta hipótesis, evaluamos la desgranulación en BMMCs expuestas a normoxia o cyH, en presencia o ausencia de un inhibidor de la PLCγ (el U73122). La Figura 16A muestra las curvas de inhibición de desgranulación en ambas condiciones, donde podemos observar que el U73122 inhibe la desgranulación de manera dependiente de la concentración tanto en BMMCs expuestas a cyH como en aquellas mantenidas en normoxia. Sin embargo, las células hipóxicas necesitan más concentración del inhibidor para alcanzar el 50% de inhibición en la desgranulación, en comparación con las células normóxicas (IC_{50N} = 0.03 ± 0.006 μM; IC_{50cyH} = 0.09 ± 0.02 μM; Figura 16B). Estos datos indican que las BMMCs sometidas al protocolo de cyH muestran una menor sensibilidad al efecto del inhibidor U73122 y sugieren una mayor actividad de la PLCγ en las células sometidas al protocolo de cyH.

Se sabe que la PLCγ hidroliza el fosfolípido de membrana PIP₂ (fosfatidilinositol inositol 4,5-bifosfato) para generar dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP₃). Este último se une a sus receptores en el retículo endoplasmático e induce una liberación masiva de Ca²⁺ intracelular, que es esencial para la desgranulación de las CCs (referencia). Con esto en mente, nos preguntamos si el aumento en la actividad de la PLCγ estaría relacionado con una mayor concentración de Ca²⁺ intracelular en CCs expuestas a cyH. Para responder esta pregunta, utilizamos el compuesto Fura 2-AM como indicador de Ca²⁺, debido a que, en presencia de ese catión, el compuesto es fluorescente. Como podemos observar en la Figura 16C, las BMMCs normóxicas e hipóxicas, previamente sensibilizadas con IgE, aumentan su concentración intracelular de Ca²⁺ tan pronto como el

Ag es adicionado. Sin embargo, el aumento de Ca^{2+} intracelular es mucho mayor en BMMCs incubadas en cyH en comparación con las células mantenidas en normoxia, y este incremento es estadísticamente diferente (normoxia = 136.80 ± 5.22 ; cyH = 167.47 ± 8.95 ; Figura 16D).

Dada la cinética exponencial de la movilización de Ca^{2+} intracelular, los datos se ajustaron a una función exponencial y se obtuvo la constante de velocidad K, que nos indica, en este caso particular, qué tan rápido se alcanza este incremento de Ca^{2+} . En las BMMCs expuestas a cyH el valor de K fue mayor al observado en células mantenidas en normoxia ($K_N = 0.005573$ vs $K_{\text{cyH}} = 0.006437$; Figura 16C, línea continua), indicando que el aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, no solo es mayor, sino que se alcanza mucho más rápido en BMMCs hipóxicas.

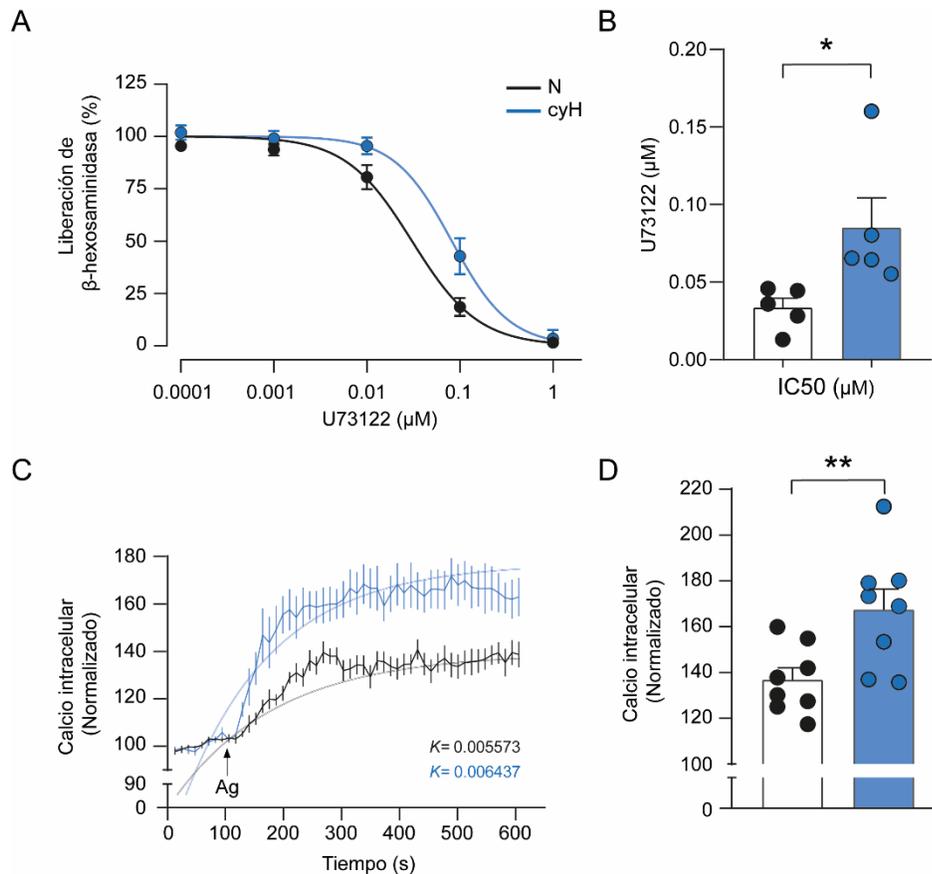


Figura 16. La cyH induce una mayor actividad de la PLC γ y un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular en CCs expuestas a cyH tras ser estimuladas con el complejo IgE/Ag. (A) Curva de inhibición de la desgranulación en BMMCs normóxicas o hipóxicas, pre-

incubadas con diferentes concentraciones de U73122 por 15 min. Posteriormente las células fueron estimuladas con Ag (9 ng/mL) durante 30 min. **(B)** Gráfica que representa los valores de la concentración inhibitoria 50 (IC50) a los cuales se inhibió la desgranulación tanto en BMMCs expuestas al protocolo de cyH como aquellas mantenidas en condiciones de normoxia. **(C)** Gráfica que ilustra la movilización de Ca^{2+} intracelular en BMMCs expuestas al protocolo de cyH o mantenidas en normoxia. Las células fueron sensibilizadas 1 h antes de terminar el protocolo de cyH y posteriormente fueron marcadas con Fura 2-AM por 30 minutos. La concentración de Ca^{2+} fue mediada durante 100 segundos (basal) y durante 600 segundos después del reto con Ag (27 ng/mL). La constante K fue calculada mediante el ajuste de una función monoexponencial. **(D)** Gráfica que ilustra el incremento máximo de Ca^{2+} intracelular de cada experimento independiente, tanto en células sometidas a cyH como aquellas mantenidas en normoxia. n = 5-8 experimentos independientes utilizando diferentes cultivos de BMMCs.

6.8. Las CCs expuestas a cyH aumentan la expresión génica de citocinas dependientes de la señalización por Ca^{2+} tras la estimulación con IgE/Ag

Se sabe que la señalización río debajo de un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ involucra la activación de factores de transcripción como el NF- κ B y NFAT, los cuales inducen la transcripción de diversas citocinas [101]. Con la finalidad de comprobar si la cyH induce cambios transcripcionales en BMMCs sensibilizadas con IgE y estimuladas con Ag, decidimos evaluar la expresión de citocinas relacionadas con la señalización de Ca^{2+} . Como podemos observar en la Figura 17A, la expresión de *Tnf- α* , *Il-4* e *Il-2* fue, al menos dos veces mayor en BMMCs hipóxicas en comparación con las BMMCs normóxicas (Figura 17B, C y D), mientras que la expresión génica de citocinas que aparentemente no dependen de la señalización de Ca^{2+} (como *Il-6*, *Ccl-2*, *Il-3* y *Tgf- β*), tuvieron niveles muy similares tanto en BMMCs incubadas en cyH como en normoxia (Figura 18).

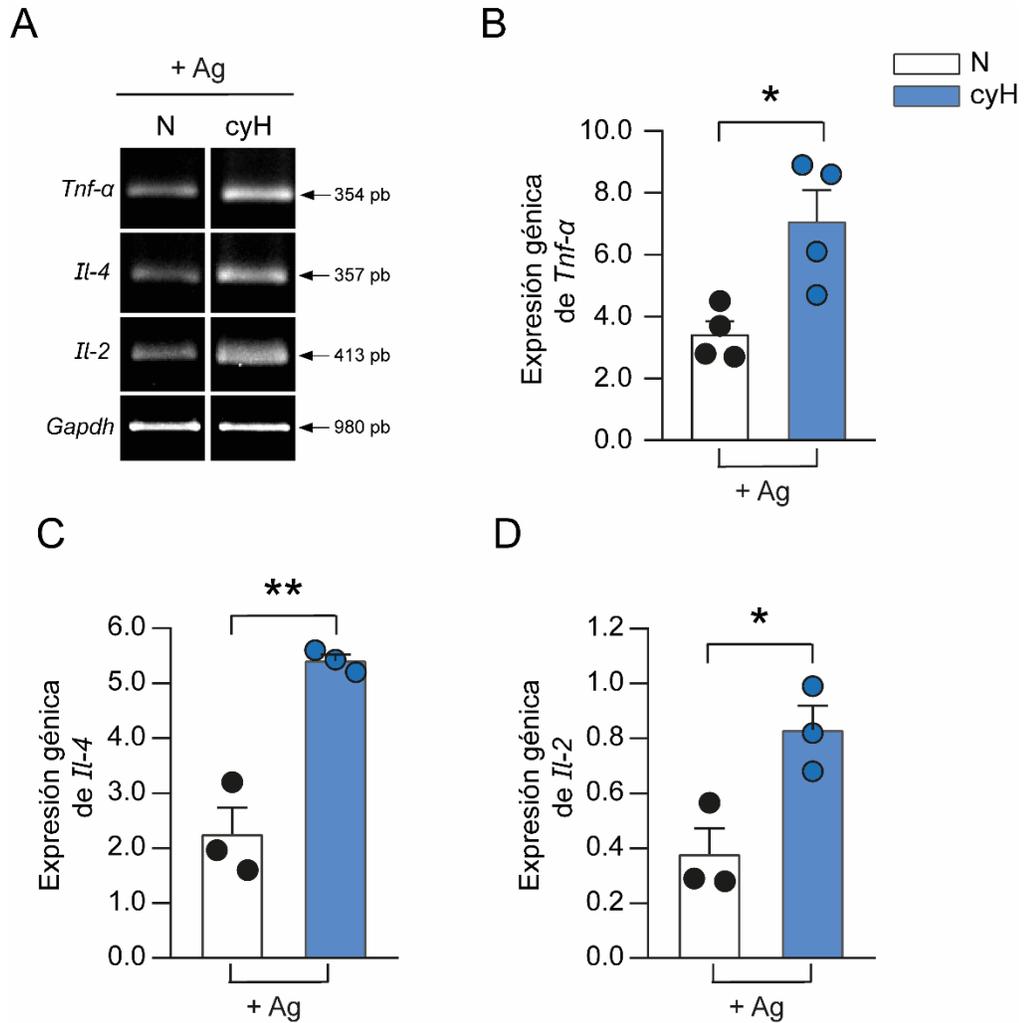


Figura 17. La cyH induce un incremento en los niveles de ARNm de citocinas relacionadas con la señalización de Ca^{2+} en CCs estimuladas con el complejo IgE/Ag. (A) Imagen representativa de un gel de agarosa que muestra la expresión de *Tnf-α*, *Il-4* e *Il-2* en BMMCs normóxicas o hipóxicas estimuladas con Ag durante 2 h. La expresión génica se midió mediante PCR en punto final. **(B-D)** Gráficas que muestran el análisis densitométrico de los amplicones de *Tnf-α*, *Il-4* e *Il-2* en BMMCs expuestas al protocolo de cyH o mantenidas en normoxia, tras el reto con el complejo IgE/Ag. El aumento en la expresión génica de cada citocina fue evaluado con respecto a las BMMCs normóxicas o hipóxicas sin estimulación, es decir, sin el reto antigénico, y se normalizó utilizando la expresión de la enzima *Gapdh*. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs N mediante una prueba t de Student. $n = 3-5$ experimentos independientes utilizando cultivos de BMMCs diferentes. N: normoxia; cyH: hipoxia cíclica.

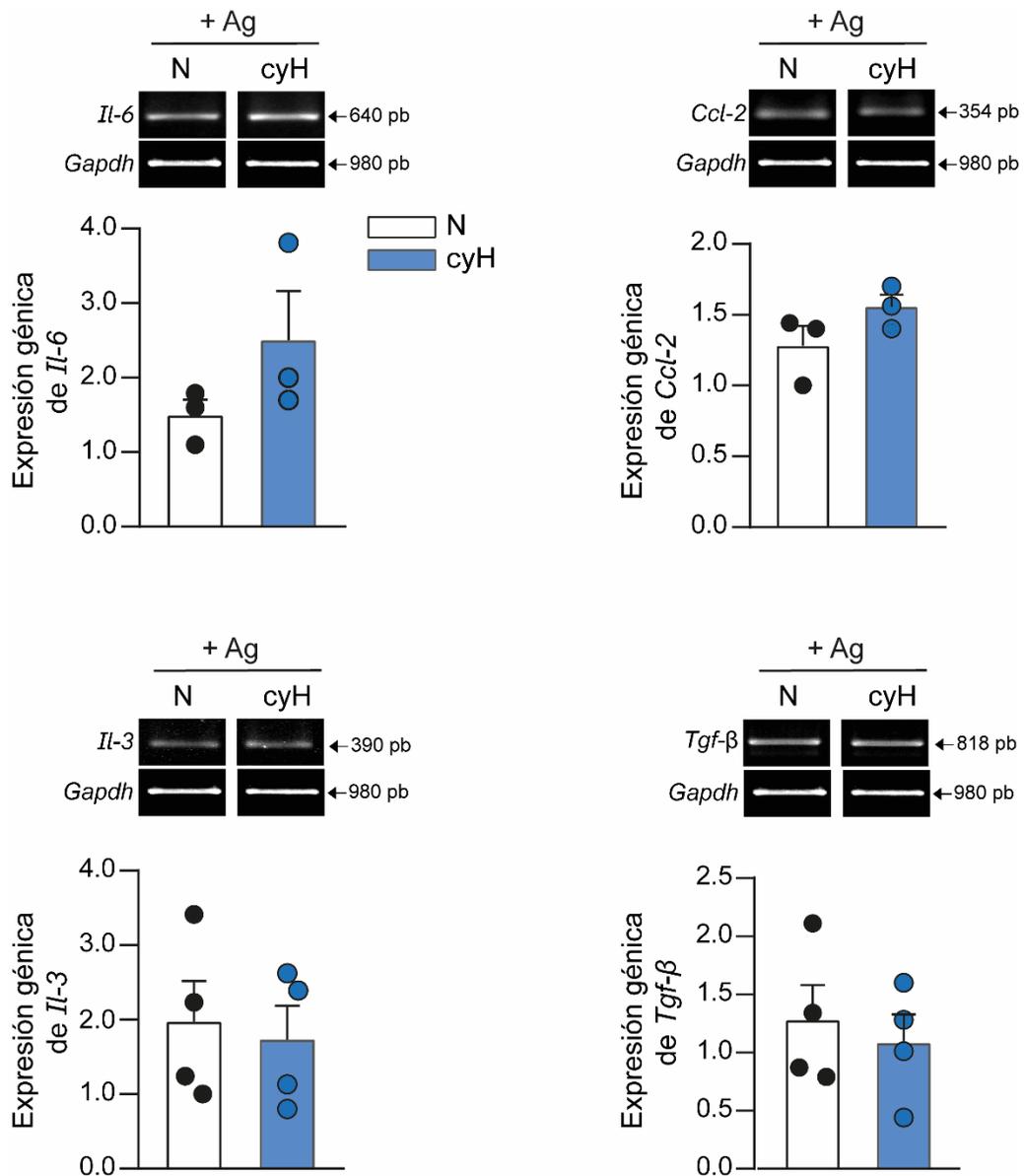


Figura 18. La cyH no induce un incremento en los niveles de ARNm de *Il-6*, *Ccl-2*, *Il-3* y *Tgf-β* en CCs estimuladas con el complejo IgE/Ag. Imágenes representativas de geles de agarosa que muestran la expresión de citocinas en BMMCs normóxicas o hipóxicas estimuladas con Ag durante 2 h, junto con el análisis densitométrico de los amplicones de cada citocina. La expresión génica se determinó mediante PCR en punto final. El aumento en la expresión génica de cada citocina fue evaluado con respecto a las BMMCs normóxicas o hipóxicas sin estimulación (sin Ag), utilizando como gen control la expresión de la *Gapdh*. n = 3-4 experimentos independientes utilizando cultivos de BMMCs diferentes. N: normoxia; cyH: hipoxia cíclica.

En conjunto, los datos experimentales obtenidos en este proyecto indican que las CCs están presentes en zonas de cyH dentro del tumor de melanoma y que, esta condición prevalente del microambiente tumoral podría polarizarlas hacia diferentes fenotipos. Particularmente, la exposición a cyH, modifica el perfil transcripcional de las BMDCs y las vuelve mucho más sensibles a la estimulación con IgE/Ag, afectando la transcripción génica solo de ciertas citocinas inflamatorias. Las repercusiones de este cambio fenotípico en la progresión tumoral aguardan para ser exploradas, ya que se sabe que, hay una relación muy estrecha entre el cáncer y las alergias, y el esclarecimiento de los mecanismos moleculares que conducen a que las CCs se polaricen hacia un fenotipo pro o antitumoral, podría ayudar al diseño de nuevas herramientas farmacológicas que tengan como blanco la activación de las células cebadas asociadas a tumores.

7. DISCUSIÓN

La presencia de CCs en biopsias de tumores malignos ha sido ampliamente descrita tanto en humanos como en modelos animales [20,36]; sin embargo, los mecanismos por los cuales este tipo celular ejerce funciones pro o antitumorales, no se conocen del todo. Se sabe que las CCs actúan como un arma de doble filo en el contexto del cáncer y se ha sugerido que esto depende del tipo y estadio del tumor, del organismo en estudio y de los estímulos que estas células reciban del TME. La activación de las CCs por estímulos del TME podría llevarlas a que sintetizen y liberen mediadores inflamatorios capaces de favorecer o limitar la proliferación de las células tumorales, formación de vasos sanguíneos y/o la respuesta inmune contra el tumor [36]. De todos los factores presentes en el TME que podrían modificar el fenotipo de las CCs (como por ejemplo la adenosina, IL-33, lactato, entre otros), la hipoxia cíclica (cyH) es de los menos estudiados.

En el presente trabajo se puso a prueba la hipótesis de que la cyH podría inducir cambios importantes en el perfil transcripcional y funciones de las CCs. Para explorar tales cambios, primero evaluamos la presencia de CCs en zonas

expuestas a cyH en tumores de melanoma murino. Después, implementamos y validamos un protocolo experimental de cyH *in vitro* utilizando a las BMMCs como modelo de estudio. Finalmente, realizamos un análisis transcriptómico masivo de las BMMCs expuestas a cyH haciendo uso de la tecnología de microarreglos. Los principales resultados de este estudio son: 1) las CCs se localizan preferencialmente en zonas del tumor de melanoma expuestas a hipoxia tanto crónica como cíclica; 2) *in vitro*, la cyH induce cambios transcripcionales en las BMMCs, incrementando la expresión de 1265 genes, algunos de los cuales codifican para proteínas involucradas en el proceso de transcripción, fosforilación oxidativa, y vías de señalización como la vía del FcεRI; y 3) la cyH induce un cambio fenotípico en las CCs, caracterizado por una hiperactividad de secreción tras un reto antigénico. A continuación, discutiremos cada uno de estos hallazgos en el orden mencionado.

Las CCs se localizan preferencialmente en zonas del tumor de melanoma expuestas a hipoxia tanto crónica como cíclica

El microambiente tumoral (TME) es un ecosistema virtual de interacciones complejas en el que coexisten células genéticamente transformadas y fenotípicamente adaptadas a condiciones hostiles. La dinámica de esas interacciones determina la tasa de crecimiento del tumor, el escape del sistema inmune y la metástasis [102]. Se ha demostrado que la hipoxia es una característica distintiva del TME, y que en los tumores sólidos los niveles de O₂ son fluctuantes, esto debido a una angiogénesis anormal caracterizada por la formación de vasos sanguíneos disfuncionales que a menudo llegan a tener fugas, lo que conduce a patrones de hipoxia/reoxigenación dentro del tumor [103]. Los análisis de estas fluctuaciones de O₂ en tumores *in vivo*, han permitido establecer algunos criterios anatómicos para definir que cierto tejido presenta zonas potencialmente sometidas a cyH [64,72]. Nuestros resultados indican que, efectivamente los tumores sólidos presentan este patrón de hipoxia/reoxigenación, ya que encontramos zonas dentro del tumor que fueron positivas tanto para pimonidazol como para CD31. Estas dos moléculas han

sido ampliamente utilizadas como marcadores de hipoxia y vasos sanguíneos, respectivamente [81,104]. Nuestros resultados indican que, aún en presencia de vasos sanguíneos, el tejido permanece hipóxico y esto podría sugerir una vasculatura anormal o deficiente.

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de CCs en la mayoría de los tumores sólidos [36]; sin embargo, nuestro trabajo demuestra, por primera vez, la presencia de CCs (usando triptasa como marcador de este tipo celular) en zonas potencialmente sometidas a cyH. Además, encontramos que algunas de estas células positivas para triptasa no colocalizaron con CD31, lo que sugiere que, al menos en el tumor de melanoma murino, las CCs siguen un patrón de distribución diferente a las condiciones normales, ya que se sabe que este tipo celular se localiza cerca de vasos sanguíneos [94]. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que las CCs están presentes en zonas hipóxicas dentro del tumor de melanoma y no solo eso, también se reveló que estas células estaban hipóxicas [42]. En el presente estudio, refinamos esta observación y demostramos que las CCs dentro del tumor de melanoma están localizadas en áreas expuestas a cyH, lo cual podría promover alteraciones particulares en el fenotipo de las CCs que podrían relacionarse con su papel pro o antitumoral en el cáncer.

La cyH induce cambios transcripcionales en las CCs

Para caracterizar estas posibles alteraciones fenotípicas inducidas por la cyH dentro del tumor de melanoma, utilizamos un modelo *in vitro* que simula los patrones de hipoxia/reoxigenación en los tumores. Este protocolo se basó en reportes previos donde las mediciones de O₂ en tumores *in vivo* revelaron una frecuencia de 0.5 a 1 ciclo de hipoxia por hora [72]. Los efectos de los ciclos de hipoxia/reoxigenación fueron evaluados en distintos parámetros de la fisiología de las BMMCs, y encontramos que la cyH induce un aumento en la expresión de marcadores asociados a la hipoxia como *Hif-1α* y *Vegf*; así como un aumento considerable en la producción de ROS, que es característico en los períodos de reoxigenación y que ha sido reportado como un distintivo de

este tipo de hipoxia [71]. Nuestros resultados concuerdan con aquellos estudios realizados en otros tipos celulares como células endoteliales y células tumorales [76,95], sugiriendo funciones conservativas de la vía de HIF-1 α en las BMMCs expuestas a condiciones de cyH. De manera interesante encontramos un incremento en la expresión del ARNm de *Tnf- α* en el segundo período de reoxigenación (R2) con respecto a su previo período de hipoxia (H2) (ver Figura 13B), lo que podría explicarse por el mayor aumento de ROS en los períodos de reoxigenación (Figura 11), ya que las ROS pueden activar factores de transcripción como NF- κ B y estimular la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α [105].

Para identificar con más detalle los cambios transcripcionales en BMMCs expuestas a cyH, se utilizó la tecnología de microarreglos, y encontramos que estas células aumentan la expresión de genes que se asocian con diferentes procesos biológicos, componentes celulares y vías de señalización, relacionados con la capacidad de la célula para responder adecuadamente a las condiciones de hipoxia. Por ejemplo: una de las vías más enriquecidas fue la vía de la fosforilación oxidativa, donde encontramos la sobreexpresión de genes que codifican para las subunidades de la ATP sintasa y para enzimas requeridas en la cadena de transporte de electrones como la NADPH deshidrogenasa o complejo I. Estos resultados indican que la cyH induce cambios transcripcionales que se asocian con la producción de ATP, y esto es consistente con los cambios energéticos con los cuales debe lidiar la célula al haber una disminución de O₂, ya que esta molécula funciona como el aceptor final de la cadena de transporte de electrones y es indispensable para la eficiente producción de ATP [96,99]. Las implicaciones funcionales de este importante cambio metabólico en CCs expuestas a cyH permanece como una cuestión que necesita ser investigada.

Además de los cambios metabólicos, la firma transcripcional de las CCs expuestas a cyH se relacionó con el enriquecimiento de procesos como la transcripción, la regulación transcripcional y la unión al ADN. Algunos de los

genes sobreexpresados en estas categorías codifican enzimas importantes para la metilación del ADN, como *Dnmt1* y *Dnmt3a*; otros genes alterados como *Brf1*, *Taf3* y *Tead1*, codifican proteínas necesarias para el complejo de iniciación de la transcripción; o genes como *Srsf5* y *Ang2*, que codifican el factor de empalme 5 rico en serina y arginina y el factor de crecimiento 2 de la angiopoyetina, respectivamente.

Nuestros hallazgos concuerdan con el conocimiento que se tiene acerca de que cualquier célula en condiciones de hipoxia modifica su expresión génica, lo que le permite activar mecanismos de adaptación que promueven la sobrevivencia celular ante esta condición adversa [98,106]. De manera interesante, se sabe que la hipoxia es una condición que altera muchos patrones de *splicing* alternativo, un proceso crítico para la adaptación de las células al microambiente normal y tumoral. Este proceso está mediado por varios polipéptidos, entre ellos las proteínas SR, como el SRSF5 [98]. Un estudio demostró, en células de cáncer de próstata, que la expresión y los niveles de fosforilación de las proteínas SRSFs (particularmente en SRSF5) se incrementan significativamente en la hipoxia [97]. Además, también se ha demostrado que la expresión de *Ang2* aumenta en condiciones de hipoxia [97]. Aunque ambos reportes apoyan nuestros resultados, este es el primer trabajo que evalúa la firma transcripcional de las CCs en un ambiente de cyH, y abre el panorama para seguir investigando los mecanismos por los cuales este tipo celular se adapta a ambientes adversos en condiciones patológicas.

Uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo fue el enriquecimiento de la vía de señalización del FcεRI en BMMCs expuestas a cyH. Se sabe que la activación de este receptor conduce a la desgranulación de las CCs y a la producción de mediadores lipídicos y diversas citocinas inflamatorias [18]. Tomando en cuenta esto, decidimos validar la funcionalidad de esta vía y encontramos que las CCs hipóxicas aumentan la secreción de la enzima β-hexosaminidasa tras la estimulación con IgE/Ag, en comparación con células normóxicas. Curiosamente, algunos de los genes sobreexpresados en cyH que

se asociaron con esta vía, como el *Fcer1g* y *Alox5ap*, también se encuentran aumentados en otras condiciones patológicas como la osteoartritis [107]. Dado que la osteoartritis se caracteriza por la inflamación de los tejidos y la baja perfusión de O₂ [108], es posible especular que un aumento de los elementos de señalización asociados al complejo FcεRI (y por ende una elevada activación de las CCs) podría ser un marcador distintivo de los entornos con bajos niveles de O₂.

A pesar de que encontramos cambios transcripcionales interesantes, el perfil de citocinas inducido por la cyH no concuerda con los marcadores característicos de los macrófagos M1 o M2. Esto sugiere que la cyH podría no ser suficiente para polarizar a las CCs hacia un fenotipo parecido al de los macrófagos, o bien, se podría pensar que las CCs no siguen el paradigma de polarización de los macrófagos, debido a que los estudios transcripcionales sugieren que las CCs son células muy diferentes a los macrófagos y otras estirpes celulares [12,14].

Cambio fenotípico de las CCs inducido por la cyH

El fenotipo hipersecretor de las CCs expuestas a cyH se caracterizó por un aumento en la actividad de la enzima PLCγ, en la movilización de Ca²⁺ y en la expresión de citocinas asociadas a la señalización de Ca²⁺, como *Tnf-α*, *Il-4* e *Il-2*, pero, hasta la fecha se desconocen las implicaciones que podría tener este cambio de fenotipo en el desarrollo tumoral. Lo que sí se sabe es que los pacientes con mastocitosis sistémica tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores sólidos, especialmente melanoma y cáncer de mama [53]. Por lo tanto, una sobreactivación de las CCs podría contribuir al establecimiento y desarrollo del tumor, ya que la mastocitosis sistémica se caracteriza por un aumento en la densidad y actividad de las CCs [109].

Varios estudios sugieren que las CCs podrían ser hiperreactivas a los estímulos presentes en el microambiente tisular en estados patológicos. Por ejemplo, se ha observado un aumento de la desgranulación de las CCs y de

la liberación de triptasa en biopsias de tejidos de pacientes con osteoartritis, lo que sugiere que el microambiente inflamatorio e hipóxico característico de esta patología podría activar las CCs [107]. Por otro lado, se ha demostrado que el lipopolisacárido bacteriano (LPS) es capaz de activar a las CCs infiltradas en el melanoma murino e inducir la secreción de CXCL10, lo cual promueve el reclutamiento de células T y la respuesta inmune antitumoral [110]. Además, un estudio reciente demostró que las CCs expuestas a chH (24 h al 1% de O₂) aumentan la secreción de la quimiocina CCL-2. Este aumento fue dependiente de la producción de ROS y de la translocación de canales de Ca²⁺ tipo L a la membrana plasmática [42]. Curiosamente, se ha observado que la hipoxia promueve la translocación membranal de vesículas positivas para LAMP2 [36]. Este fenómeno se ha asociado con la activación de las CCs y los basófilos [88], que podría estar relacionada con la movilización de gránulos a la membrana plasmática y, en última instancia, con el aumento de la desgranulación de las CCs, tal y como observamos en este trabajo.

Por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio sugieren un aumento de la actividad del sistema de señalización del FcεRI en las CCs asociadas a tumores, ya que, se observó un mayor crecimiento del tumor de melanoma en ratones administrados con altas cantidades de IgE (ratones atópicos), en comparación con aquellos ratones que fueron administrados con vehículo [23]. Estos datos sugieren que las CCs presentes en el tumor son más sensibles a la activación dependiente de IgE, lo que, a su vez, promueve la angiogénesis tumoral [23]. Otro estudio demostró que las alergias aumentan el crecimiento del tumor y la resistencia a la inmunoterapia de forma dependiente de la histamina [111]. Sin embargo, se desconoce si las CCs asociadas a tumores podrían liberar histamina en respuesta a la cyH y promover el crecimiento tumoral.

A pesar de que en este trabajo demostramos que las CCs expuestas a cyH modifican su fenotipo y son hiperreactivas tras un reto con IgE/Ag, los resultados no pueden extrapolarse directamente a modelos *in vivo* de

crecimiento tumoral, ya que las BMMCs tienen limitaciones como modelo celular totalmente diferenciado. Son necesarios muchos más estudios para demostrar que la cyH del microambiente tumoral polariza a las CCs hacia un fenotipo hiper-secretor. Por ejemplo, el aislamiento de las CCs del tumor, con una manipulación mínima o la secuenciación del ARN de células individuales permitiría saber si el cambio fenotípico inducido por la cyH es específico de la activación del FcεRI o si puede extenderse a otros estímulos presentes en el TME.

Finalmente, los principales hallazgos del presente trabajo y las probables implicaciones fisiopatológicas se resumen en la Figura 19.

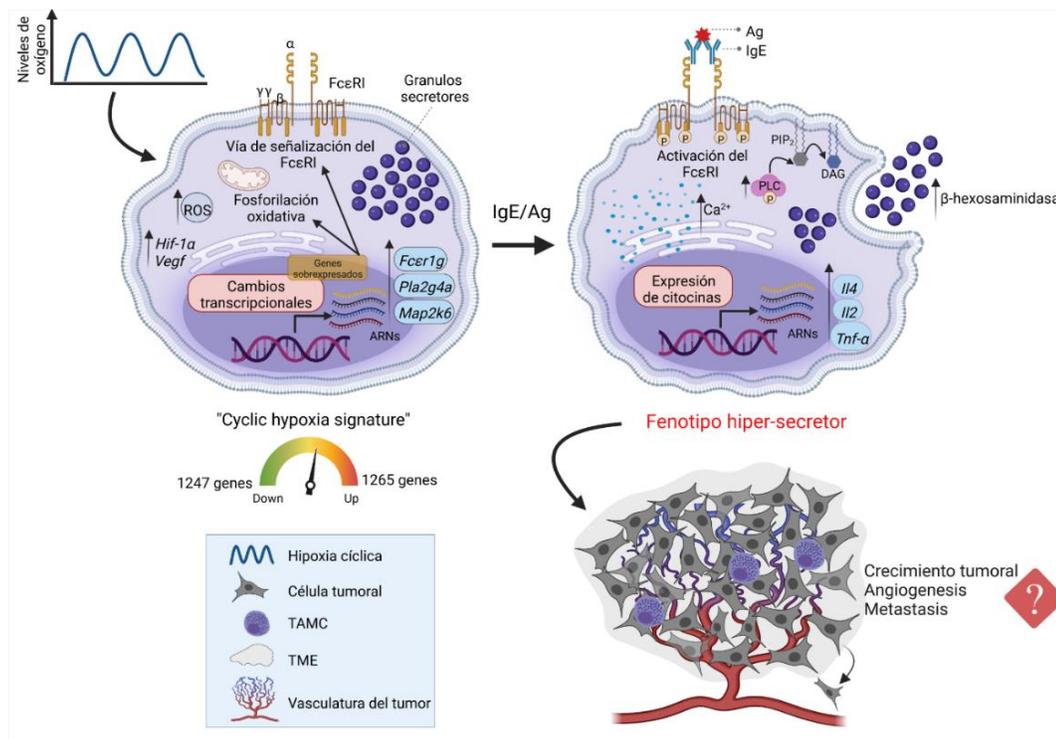


Figura 19. La cyH promueve la plasticidad fenotípica en las CCs al inducir cambios transcriptómicos significativos que conducen a la hiperactividad tras la estimulación con IgE/Ag. Las CCs expuestas a cyH aumentan su producción de ROS y modifican su perfil transcripcional. Entre los genes regulados al alza se encuentran marcadores clásicos de hipoxia como *Hif-1α* y *Vegf*. Además, estos genes se asocian a vías como la fosforilación oxidativa y a la vía de señalización del FcεRI. Un aumento de elementos importantes en la vía de señalización del FcεRI conduce a una sobreactivación de la enzima PLCγ y un

aumento en la movilización de Ca^{2+} intracelular, lo que culmina en un aumento de la desgranulación y de la expresión de ARNm de citocinas, como *Tnf- α* , *Il-2* e *Il-4*. Este fenotipo hiperreactivo de las CCs activadas por el complejo IgE/Ag podría promover la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis. TAMC: célula cebada asociada al tumor; TME: Microambiente tumoral. Imagen creada con BioRender.com.

8. CONCLUSIONES

La cyH induce cambios importantes en el transcriptoma de las CCs, los cuales se traducen en un cambio de fenotipo que aumenta la respuesta de desgranulación tras la activación del receptor Fc ϵ RI en este tipo celular. Esta hiperactividad esta inducida por las cyH se caracterizó por un aumento en la actividad de la PLC γ junto con el incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular y su señalización. Además, nuestros resultados demuestran por primera vez que, las CCs se localizan en zonas sometidas a cyH dentro de los tumores de melanoma murino.

9. PERSPECTIVAS

- Profundizar en el mecanismo por el cual la cyH induce una hiperactividad en las CCs.
- Evaluar la secreción de otros mediadores, como la histamina y derivados del ácido araquidónico, en respuesta a la activación del Fc ϵ RI con IgE/Ag en células hipóxicas.
- Determinar si la hiperactividad de las CCs en cyH es específica del receptor Fc ϵ RI, o si la activación de otros receptores como el TLR4 podría inducir una hiperactividad de estas células.
- Evaluar la participación de las ROS en la hiperactividad de las CCs expuestas a cyH y estimuladas con IgE/Ag.
- Determinar si las CCs asociadas a tumores de melanoma también presentan este perfil transcripcional y fenotipo de hiperactividad.

- Evaluar el papel de las alergias en la progresión tumoral utilizando el modelo de melanoma murino.
- Probar el efecto de un antihistamínico en la progresión tumoral del melanoma murino.

10. REFERENCIAS

1. Frossi B, Mion F, Tripodo C, Colombo MP, Pucillo CE. Rheostatic Functions of Mast Cells in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses. *Trends Immunol.* 2017;38(9):648–56.
2. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(10):698–738.
3. Espinosa-Riquer ZP, Segura-Villalobos D, Ramírez-Moreno IG, Pérez Rodríguez MJ, Lamas M, Gonzalez-Espinosa C. Signal Transduction Pathways Activated by Innate Immunity in Mast Cells: Translating Sensing of Changes into Specific Responses. *Cells.* 2020;9(11):2411.
4. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol.* 2015;6(January):620.
5. Gimple RC, Bhargava S, Dixit D, Rich JN. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev.* 2019;33(11–12):591–609.
6. Gentek R, Ghigo C, Hoeffel G, Bulle MJ, Msallam R, Gautier G, et al. Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity.* 2018;1160–71.
7. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 2010;3(2):111–28.
8. Valent P, Akin C, Hartmann K, Nilsson G, Reiter A, Hermine O, et al. Mast cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: From Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. *Theranostics.* 2020;10(23):10743–68.
9. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1035–44.
10. Saito H, Matsumoto K, Okumura S, Kashiwakura J-I, Oboki K, Yokoi H, et al. Gene expression profiling of human mast cell subtypes: an in silico study. *Allergol Int.* 2006;55(2):173–9.
11. Cildir G, Yip KH, Pant H, Tergaonkar V, Lopez AF, Tumes DJ. Understanding mast

- cell heterogeneity at single cell resolution. *Trends Immunol.* 2021;42(6):523–35.
12. Dwyer DF, Barrett NA, Austen KF, Immunological Genome Project Consortium. Expression profiling of constitutive mast cells reveals a unique identity within the immune system. *Nat Immunol.* 2016;17(7):878–87.
 13. Dwyer DF, Ordovas-Montanes J, Allon SJ, Buchheit KM, Vukovic M, Derakhshan T, et al. Human airway mast cells proliferate and acquire distinct inflammation-driven phenotypes during type 2 inflammation. *Sci Immunol.* 2021;6(56).
 14. Plum T, Wang X, Rettel M, Krijgsveld J, Feyerabend TB, Rodewald H-R. Human Mast Cell Proteome Reveals Unique Lineage, Putative Functions, and Structural Basis for Cell Ablation. *Immunity.* 2020;52(2):404-416.e5.
 15. Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L, Pucillo CEM. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev.* 2018;282(1):35–46.
 16. Beghdadi W, Madjene LC, Benhamou M, Charles N, Gautier G, Launay P, et al. Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity. *Front Immunol.* 2011;2:1–15.
 17. Varricchi G, de Paulis A, Marone G, Galli SJ. Future Needs in Mast Cell Biology. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):1–25.
 18. Nagata Y, Suzuki R. FcεRI: A Master Regulator of Mast Cell Functions. *Cells.* 2022;11(4).
 19. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(10):787–99.
 20. Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Marone G, Iannone R, Marone G, et al. Are Mast Cells MASTers in Cancer? *Front Immunol.* 2017;8(APR):424.
 21. Kraft S, Kinet JP. New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):365–78.
 22. Kinet J-P. THE HIGH-AFFINITY I g E RECEPTOR (FcεRI): From Physiology to Pathology . *Annu Rev Immunol.* 1999;17(1):931–72.
 23. Jiménez-Andrade GY, Ibarra-Sánchez A, González D, Lamas M, González-Espinosa C. Immunoglobulin E induces VEGF production in mast cells and potentiates their pro-tumorigenic actions through a Fyn kinase-dependent mechanism. *J Hematol Oncol.* 2013;6:56.
 24. Metzger H. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol Rev.* 1992;125:37–48.
 25. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol.* 2002;3(8):741–8.
 26. Rivera J, Fierro NA, Olivera A, Suzuki R. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol.* 2008;98:85–120.
 27. Manetz TS, Gonzalez-Espinosa C, Arudchandran R, Xirasagar S, Tybulewicz V,

- Rivera J. Vav1 Regulates Phospholipase C γ Activation and Calcium Responses in Mast Cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21(11):3763–74.
28. Arthur GK, Cruse G. Allergic Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2022;2022:788.
 29. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):478–94.
 30. Marshall JS, Portales-Cervantes L, Leong E. Mast Cell Responses to Viruses and Pathogen Products. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17):1–18.
 31. Gurish MF, Austen KF. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med.* 2001;194(1):F1-5.
 32. Sobiepanek A, Kuryk Ł, Garofalo M, Kumar S, Baran J, Musolf P, et al. The Multifaceted Roles of Mast Cells in Immune Homeostasis, Infections and Cancers. *Int J Mol Sci.* 2022;23(4):2249.
 33. Albini A, Bruno A, Noonan DM, Mortara L. Contribution to tumor angiogenesis from innate immune cells within the tumor microenvironment: Implications for immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;9.
 34. Conti P, Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tetè S, et al. Review: Role of mast cells in tumor growth. *Ann Clin Lab Sci.* 2007;37(4):315–22.
 35. Marichal T, Tsai M, Galli SJ. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(5):269–79.
 36. Segura-Villalobos D, Ramírez-Moreno IG, Martínez-Aguilar M, Ibarra-Sánchez A, Muñoz-Bello JO, Anaya-Rubio I, et al. Mast Cell-Tumor Interactions: Molecular Mechanisms of Recruitment, Intratumoral Communication and Potential Therapeutic Targets for Tumor Growth. *Cells.* 2022;11(3):349.
 37. Ávila-Rodríguez D, Segura-Villalobos DL, Ibarra-Sánchez A, González-Espinosa C, Macías-Silva M. TGF- β y células cebadas: reguladores del desarrollo del tumor. *TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas.* 2020;23:1–11.
 38. Komi DEA, Redegeld FA. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(3):313–25.
 39. Dyduch G, Kaczmarczyk K, Okoń K. Mast cells and cancer: enemies or allies? *Pol J Pathol.* 2012;63(1):1–7.
 40. Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol Histopathol.* 2004;19(1):259–70.
 41. Derakhshani A, Vahidian F, Alihasanzadeh M, Mokhtarzadeh A, Lotfi Nezhad P, Baradaran B. Mast cells: A double-edged sword in cancer. *Immunol Lett.* 2019;209:28–35.
 42. Ramírez-Moreno IG, Ibarra-Sánchez A, Castillo-Arellano JI, Blank U, González-Espinosa C. Mast Cells Localize in Hypoxic Zones of Tumors and Secrete CCL-2 under Hypoxia through Activation of L-Type Calcium Channels. *J Immunol.* 2020;204(4):1056–68.

43. Dvorak AM, Mihm MC, Osage JE, Dvorak HF. Melanoma. An ultrastructural study of the host inflammatory and vascular responses. *J Invest Dermatol.* 1980;75(5):388–93.
44. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft.* 1909;42(1):17–47.
45. Rao S, Gharib K, Han A. Cancer Immun-surveillance by T Cells [Internet]. Vol. 342, *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier Ltd; 2019. 149–173 p.
46. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991–8.
47. Debelic M. Immunology and allergy--the twins. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1991;1(4):231–4.
48. González-de-Olano D, Álvarez-Twose I. Mast Cells as Key Players in Allergy and Inflammation. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2018;28(6):365–78.
49. Jensen-Jarolim E, Achatz G, Turner MC, Karagiannis S, Legrand F, Capron M, et al. AllergoOncology: the role of IgE-mediated allergy in cancer. *Allergy.* 2008;63(10):1255–66.
50. Penichet ML, Jensen-jarolim E. *Cancer and IgE.* Totowa, NJ: Humana Press; 2010.
51. Kantor ED, Hsu M, Du M, Signorello LB. Allergies and Asthma in Relation to Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(8):1395–403.
52. Mccraw AJ, Chauhan J, Bax HJ, Stavrika C, Osborn G, Grandits M, et al. Insights from IgE Immune Surveillance in Allergy and Cancer for Anti-Tumour IgE Treatments. 2021;1–17.
53. Molderings GJ, Zienkiewicz T, Homann J, Menzen M, Afrin LB. Risk of solid cancer in patients with mast cell activation syndrome : Results from Germany and USA. *F1000Res.* 2017;6:1889;1–12.
54. Yu YR, Ho PC. Sculpting tumor microenvironment with immune system: from immunometabolism to immunoediting. *Clin Exp Immunol.* 2019;197(2):153–60.
55. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. 2013;14(10).
56. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015;368(1):7–13.
57. Kaymak I, Williams KS, Cantor JR, Jones RG. Immunometabolic Interplay in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 2021;39(1):28–37.
58. Vaupel, Peter; Mayer, Arnulf; Briest SHM. Hypoxia in breast cancer: Role of blood flow, oxygen diffusion distances, and anemia in the development of oxygen depletion. In: *Oxygen Transport to Tissue.* Springer; 2005. p. 333–42.
59. Martinive P, Defresne F, Bouzin C, Saliez J, Lair F, Grégoire V, et al. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: Implications for anticancer therapies. *Cancer Res.* 2006;66(24):11736–44.

60. Kochan-jamrozy K, Moszy A, Collawn JF. miRNA networks modulate human endothelial cell adaptation to cyclic hypoxia. 2019;54:150–60.
61. Pellegrino M, Del Bufalo F, De Angelis B, Quintarelli C, Caruana I, de Billy E. Manipulating the metabolism to improve the efficacy of CAR T-cell immunotherapy. *Cells*. 2021;10(1):1–16.
62. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):870–9.
63. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:83-92.
64. Michiels C, Tellier C, Feron O. Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1866(1):76–86.
65. Tellier C, Desmet D, Petit L, Finet L, Graux C, Raes M, et al. Cycling hypoxia induces a specific amplified inflammatory phenotype in endothelial cells and enhances tumor-promoting inflammation in vivo. *Neoplasia*. 2015;17(1):66–78.
66. Colgan SP, Furuta GT, Taylor CT. Hypoxia and Innate Immunity: Keeping Up with the HIFsters. *Annu Rev Immunol*. 2020;38(1):341–63.
67. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*. 2014;41(4):518–28.
68. Lee J-W, Bae S-H, Jeong J-W, Kim S-H, Kim K-W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36(1):1–12.
69. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):378–89.
70. Martinive P, Defresne F, Quaghebeur E, Daneau G, Crockart N, Grégoire V, et al. Impact of cyclic hypoxia on HIF-1 α regulation in endothelial cells – new insights for anti-tumor treatments. *FEBS J*. 2008;276:509–18.
71. Hsieh C-H, Shyu W-C, Chiang C-Y, Kuo J-W, Shen W-C, Liu R-S. NADPH oxidase subunit 4-mediated reactive oxygen species contribute to cycling hypoxia-promoted tumor progression in glioblastoma multiforme. *PLoS One*. 2011;6(9):e23945.
72. Matsumoto S, Yasui H, Mitchell JB, Krishna MC. Imaging cycling tumor hypoxia. *Cancer Res*. 2010;70(24):10019–23.
73. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. Garland Science; 2014.
74. Toffoli S, Roegiers A, Feron O, Van Steenbrugge M, Ninane N, Raes M, et al. Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: Role of HIF-1. *Angiogenesis*. 2009;12(1):47–67.
75. Cao K, Tait SWG. Apoptosis and Cancer: Force Awakens, Phantom Menace, or Both? 1st ed. Vol. 337, *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.; 2018. 135–152 p.
76. Olbryt M, Habryka A, Student S, Jarzab M, Tyszkiewicz T, Lisowska KM. Global gene

- expression profiling in three tumor cell lines subjected to experimental cycling and chronic hypoxia. *PLoS One*. 2014;9(8).
77. Boidot R, Branders S, Helleputte T, Rubio LI, Dupont P, Feron O. A generic cycling hypoxia-derived prognostic gene signature: application to breast cancer profiling. *Oncotarget*. 2014;5(16):6947–63.
 78. Chen W-L, Wang C-C, Lin Y-J, Wu C-P, Hsieh C-H. Cycling hypoxia induces chemoresistance through the activation of reactive oxygen species-mediated B-cell lymphoma extra-long pathway in glioblastoma multiforme. *J Transl Med*. 2015;13(1):389.
 79. Siemann DW. Tumor Microenvironment. *Tumor Microenvironment*. 2010.
 80. Cheng S, Li Z, Gao R, Xing B, Gao Y, Yang Y, et al. A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell*. 2021;184(3):792-809.e23.
 81. Carmona-Fontaine C, Deforet M, Akkari L, Thompson CB, Joyce JA, Xavier JB. Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(11):2934–9.
 82. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425–
 83. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002;196(3):254–65.
 84. Presta I, Donato A, Zaffino P, Spadea MF, Mancuso T, Malara N, et al. Does a polarization state exist for mast cells in cancer? *Med Hypotheses*. 2019;131:109281.
 85. Jiang L, Hua Y, Shen Q, Ding S, Jiang W, Zhang W, et al. Role of mast cells in gynecological neoplasms. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18:773–81.
 86. Zhao Y-B, Yang S-H, Shen J, Deng K, Li Q, Wang Y, et al. Interaction between regulatory T cells and mast cells via IL-9 and TGF- β production. *Oncol Lett*. 2020;20(6):360.
 87. Gulliksson M, Carvalho RFS, Ullerås E, Nilsson G. Mast cell survival and mediator secretion in response to hypoxia. *PLoS One*. 2010;5(8):1–8.
 88. Grützkau A, Smorodchenko A, Lippert U, Kirchhof L, Artuc M, Henz BM. LAMP-1 and LAMP-2, but not LAMP-3, are reliable markers for activation-induced secretion of human mast cells. *Cytometry A*. 2004;61(1):62–8.
 89. Knol EF, Mul FPJ, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(3 Pt 1):328–38.
 90. Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Olivera A, Hobson JP, Martinez MEC, Oliveira-dos-Santos A, et al. Preferential Signaling and Induction of Allergy-promoting Lymphokines Upon Weak Stimulation of the High Affinity IgE Receptor on Mast Cells. *J Exp Med*. 2003;197(11):1453–65.

91. Luna-Moreno D, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Ramírez J, Díaz-Muñoz M. Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic sub-cellular fractions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;146(4):632–43.
92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
93. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260(6):3440–50.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3838314>
94. Cheng LE, Hartmann K, Roers A, Krummel MF, Locksley RM. Perivascular mast cells dynamically probe cutaneous blood vessels to capture immunoglobulin E. *Immunity.* 2013;38(1):166–75. 22
95. Martinive P, Defresne F, Quaghebeur E, Daneau G, Crockart N, Grégoire V, et al. Impact of cyclic hypoxia on HIF-1alpha regulation in endothelial cells--new insights for anti-tumor treatments. *FEBS J.* 2009;276(2):509–18.
96. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):660–6.
97. Bowler E, Porazinski S, Uzor S, Thibault P, Durand M, Lapointe E, et al. Hypoxia leads to significant changes in alternative splicing and elevated expression of CLK splice factor kinases in PC3 prostate cancer cells. *BMC Cancer.* 2018;18(1):355.
98. Farina AR, Cappabianca L, Sebastiano M, Zelli V, Guadagni S, Mackay AR. Hypoxia-induced alternative splicing: the 11th Hallmark of Cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):110.
99. Hwang HJ, Lynn SG, Vengellur A, Saini Y, Grier EA, Ferguson-Miller SM, et al. Hypoxia Inducible Factors Modulate Mitochondrial Oxygen Consumption and Transcriptional Regulation of Nuclear-Encoded Electron Transport Chain Genes. *Biochemistry.* 2015;54(24):3739–48.
100. Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, Zhang W, Sommers CL, Love PE, et al. LAT is essential for Fc(epsilon)RI-mediated mast cell activation. *Immunity.* 2000;12(5):525–35.
101. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 1997;386(6627):855–8.
102. Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(6):1091–103.
103. Bader SB, Dewhirst MW, Hammond EM. Cyclic Hypoxia: An Update on Its Characteristics, Methods to Measure It and Biological Implications in Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;13(1):1–20.
104. Koyasu S, Tsuji Y, Harada H, Nakamoto Y, Nobashi T, Kimura H, et al. Evaluation of

- Tumor-associated Stroma and Its Relationship with Tumor Hypoxia Using Dynamic Contrast-enhanced CT and (18)F Misonidazole PET in Murine Tumor Models. *Radiology*. 2016;278(3):734–41.
105. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):103–15.
106. Natoli G, Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. *Nat Immunol*. 2019;20(7):783–92.
107. Wang Q, Lepus CM, Raghu H, Reber LL, Tsai MM, Wong HH, et al. IgE-mediated mast cell activation promotes inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Elife*. 2019;8:1–23.
108. Li M, Yin H, Yan Z, Li H, Wu J, Wang Y, et al. The immune microenvironment in cartilage injury and repair. *Acta Biomater*. 2022;140:23–42.
109. Kim D-K, Cho Y-E, Komarow HD, Bandara G, Song B-J, Olivera A, et al. Mastocytosis-derived extracellular vesicles exhibit a mast cell signature, transfer KIT to stellate cells, and promote their activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(45):E10692–701.
110. Kaesler S, Wölbing F, Kempf WE, Skabytska Y, Köberle M, Volz T, et al. Targeting tumor-resident mast cells for effective anti-melanoma immune responses. *JCI insight*. 2019;4(19):1–15.
111. Li H, Xiao Y, Li Q, Yao J, Yuan X, Zhang Y, et al. The allergy mediator histamine confers resistance to immunotherapy in cancer patients via activation of the macrophage histamine receptor H1. *Cancer Cell*. 2022;40(1):36-52.e9.
112. Narravula S, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia. *J Immunol*. 2001;166(12):7543–8.
113. Matsuura T, Takahashi K, Nakayama K, Kobayashi T, Choi-Miura N-H, Tomita M, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57(Kip2) null embryos. *FEBS Lett*. 2002;532(3):283–8.
114. Dasgupta S, Jana M, Zhou Y, Fung YK, Ghosh S, Pahan K. Antineuroinflammatory effect of NF- κ B essential modifier-binding domain peptides in the adoptive transfer model of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 2004;173(2):1344–54.
115. Kim TS, Lee H-M, Yoo H, Park YK, Jo E-K. Intracellular Signaling Pathways that Regulate Macrophage Chemokine Expression in Response to Mycobacterium abscessus. *J Bacteriol Virol*. 2012;42(2):121.
116. Adebanjo OA, Moonga BS, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, et al. Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca²⁺ sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol*.

- 1998;142(5):1347–56.
117. Hassuneh MR, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Evidence for the participation of interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in the regulation of autonomous growth and tumorigenesis of transformed cells of lymphoid origin. *Blood*. 1997;89(2):610–20.
 118. Biedermann T, Mailhammer R, Mai A, Sander C, Ogilvie A, Brombacher F, et al. Reversal of established delayed type hypersensitivity reactions following therapy with IL-4 or antigen-specific Th2 cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(5):1582–91.
 119. Lee H-S, Choi E-J, Choi H, Lee K-S, Kim H-R, Na B-R, et al. Oral Administration of 4-Hydroxy-3-Methoxycinnamaldehyde Attenuates Atopic Dermatitis by Inhibiting T Cell and Keratinocyte Activation. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144521.

11. ANEXOS

ANEXO I

Preparación de soluciones

Medio DMEM para cultivar las células B16-F1

DMEM (#catálogo: 31600-034, Gibco).....	5 g
Bicarbonato de sodio.....	0.75 g
Piruvato de sodio (Sigma).....	5 mL del stock
Aminoácidos no esenciales (Gibco).....	5 mL del stock
Penicilina/Estreptomina (Gibco).....	6 mL del stock
Antibiótico/Antimicótico (Gibco).....	5 mL del stock
Suero fetal bovino inactivo (Gibco).....	50 mL

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 500 mL con H₂O miliQ, posteriormente filtrar con unidad de filtración de 0.22 µm (#catálogo 441117, Corning).

Almacenar a 4 °C.

Medio RPMI para cultivo de BMMCs

RPMI (#catálogo:).....	10 g
Bicarbonato de sodio.....	2 g
IL-3.....	20 ng/mL
HEPES	25 mM
B-mercaptoetanol	50 µM
Piruvato de sodio (Sigma).....	10 mL del stock
Aminoácidos no esenciales (Gibco).....	10 mL del stock
Penicilina/Estreptomina (Gibco).....	12 mL del stock
Antibiótico/Antimicótico (Gibco).....	10 mL del stock
Suero fetal bovino inactivo (Gibco).....	100 mL

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000 mL con H₂O miliQ, posteriormente filtrar con unidad de filtración de 0.22 µm (#catálogo 441117, Corning).

Almacenar a 4 °C.

Buffer Tyrode´s-BSA

Cloruro de sodio (NaCl, Sigma).....	7.88 g
Cloruro de potasio (KCl, Sigma).....	0.372 g
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ , Sigma).....	0.203 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂ , Sigma).....	0.264 g
Glucosa (Sigma).....	1.009 g
Hepes 1M pH 7.0 (Sigma).....	20 mL
Albúmina sérica bovina fracción V (Sigma).....	0.5 g

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L con H₂O miliQ, posteriormente filtrar en unidad de filtración de 0.22 µm y almacenar a 4 °C.

Nota: Para preparar el **buffer Tyrode´s sin albúmina** se siguió el mismo procedimiento, pero sin agregar los 0.5 g de albúmina sérica bovina fracción V.

Tripsina / EDTA al 0.05%

Tripsina al 25% (Gibco).....	10 mL
EDTA (Sigma).....	0.25 g

Aforar a 500 mL con H₂O miliQ y filtrar en unidad de filtración de 0.22 µm. Almacenar a 4°C.

PBS 1X

Disolver 2 tabletas de PBS (Sigma) en 400 mL de H₂O miliQ. Esterilizar en autoclave.

TBE 5X

Trizma® Base (Sigma).....	54 g
Ácido bórico (Sigma).....	27.5 g
EDTA (Sigma).....	4.2 g

Ajustar pH a 8.0, aforar a 1 L y almacenar a temperatura ambiente. Para preparar el buffer de corrida 1X (el utilizado para la electroforesis), disolver 100 mL de buffer TBE 5X en 400 mL de H₂O miliQ.

PFA al 4%

Disolver 2 g de PFA en 50 mL de PBS 1X. Ajustar el pH a 7.4, filtrar y usar inmediatamente.

Solución Stop

Disolver 1.05 g de carbonato de sodio (Na₂CO₃) más 0.84 g de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) en 100 mL de agua miliQ. Almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO II

Secuencias de oligonucleótidos empleados en las PCRs

Tabla I. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR en punto final

Gen	Secuencia sentido	Secuencia anti-sentido	Ref
<i>Hif-1α</i>	5'-CTCAAAGTCGGACAGCCTCA-3'	5'-CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT-3'	[112]
<i>Vegf</i>	5'-CTGCTCTCTTGGGTCCACTGG-3'	5'-CACCGCCTTGGCTTGTACAT-3'	[113]
<i>Tnf-α</i>	5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGT GATCG GTCC-3'	5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTG ACG GTGTGGG-3'	[114]
<i>Ccl-2</i>	5'-ACTCAAGCCAGCTCTCTCTT-3'	5'-TTCCTTCTTGGGGTCAGCAC-3'	[115]
<i>Il-6</i>	5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGA GACT-3'	5'-CACTAGGTTGCCGAGTAGATC TC-3'	[116]
<i>Il-4</i>	5'-CCAGCTAGTTGTCATCCTGCT CTTCTTTCTCG-3'	5'-CAGTGATGTGGACTTGGACTCA TTCAT GGTGC-3'	[117]
<i>Tgf-β</i>	5'-CGCAACAACGCCATCTATGAG AAA-3'	5'-TTGCAGGAGCGCACAATCATG TTG-3'	*
<i>Il-2</i>	5'- TTCAAGCTCCACTTCAAGCTCTACA GCGGAAG-3'	5'-GACAGAAGGCTATCCATCTCCT CAGA AAGTCC-3'	[117]
<i>Il-3</i>	5'-GATACCCACCGTTTAACCAGAACG TTG-3'	5'-TCCACGGTTAGGAGAGACG GAG-3'	[118]
<i>Gapdh</i>	5'-TGAGGTCCGTGTGAACGGATTT GGC-3'	5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCAC CAC-3'	[116]

*Estas secuencias fueron diseñadas en Primer-BLAST (NCBI) por nuestro laboratorio.

Tabla II. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real

Gen	Secuencia sentido	Secuencia anti-sentido
<i>Map2k6</i>	5'-ATGTCTCAGTCGAAAGGCAAG-3'	5'-TTGGAGTCTAAATCCC GAGGC-3'
<i>Pla2g4a</i>	5'-CAGCACATTATAGTGG AACACCA-3'	5'-AGTGTCCAGCATATCGCCAAA-3'

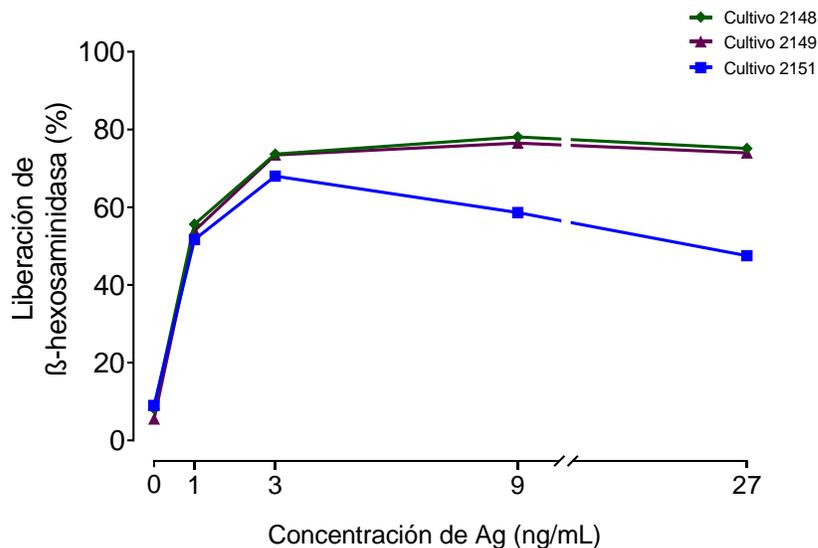
<i>Fcer1g</i>	5'-CTCCTTTTGGTGGGAACA-AGC-3'	5'-GGGTAAGGA CAATACCATACAAAAA-3'
<i>Gapdh</i>	5'-ATTGTGGAAGG GCTCATGAC-3'	AGTGGATGCAGGGATGATGT-3

Todas las secuencias fueron seleccionadas y tomadas de la plataforma PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>), excepto las secuencias para el *Fcer1g*, que fueron tomadas de [119].

ANEXO III

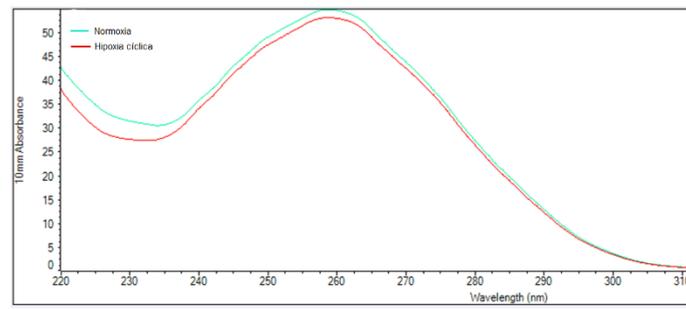
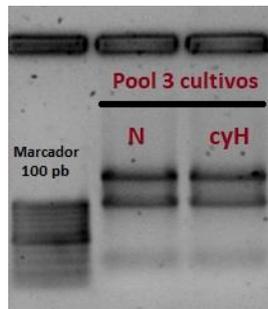
Validación cuantitativa y cualitativa de las muestras para microarreglos

-Evaluación funcional de los 3 cultivos usados para la extracción de ARN utilizado en los microarreglos.



Las células de los 3 cultivos fueron estimuladas con diferentes concentraciones de Ag y posteriormente se evaluó la liberación de la enzima β -hexosaminidasa, como se describe en la sección 5.13. Como podemos observar, los 3 cultivos celulares responden a la estimulación antigénica liberando la enzima β -hexosaminidasa (desgranulan), lo cual nos habla de que estas células son funcionales.

-Evaluación de la cantidad y calidad del pool de RNA utilizado para los microarreglos



Gel de agarosa 1.5% que muestra las dos subunidades del ribosoma, sin otras bandas presentes, lo cual es un indicativo de que el ARN extraído de células expuestas al protocolo de cyH y mantenidas en normoxia no está degradado (panel derecho). Adicionalmente, el espectro de absorción de estas muestras de ARN indica que no hay presencia de contaminantes, ya que se puede observar un solo pico (panel izquierdo).