



Universidad de Costa Rica  
Sede Rodrigo Facio  
Facultad de Microbiología

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de  
Licenciatura en Microbiología y Química Clínica

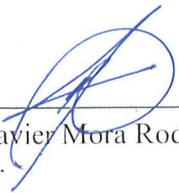
**Efecto de la metformina y tratamientos quimioterapéuticos convencionales  
sobre la producción de citoquinas y expresión de puntos de control inmune  
en un modelo in vitro de cáncer de mama**

Andrea María Vargas Campos

Carné: B 78006

Julio, 2023

Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación



---

Dr. Javier Mora Rodríguez  
Tutor




---

Dr. Ariel Brenes Glenn  
Lector



---

Dra. Elyra Salas Hidalgo  
Lectora



---

Dra. Melissa Granados Zamora  
Presidente del tribunal



---

Dr. Steve Quirós Barrantes  
Profesor designado

## **Agradecimientos**

Me gustaría iniciar este trabajo final de graduación agradeciendo principalmente a toda mi familia por haber estado para mí en todo este proceso educativo, por acompañarme y siempre impulsarme a ser una mejor persona y profesional.

A mi mamá Grettel Campos, por ser una mejor amiga, consejera, la persona más incondicional de todas. Por siempre darme paz, intentar ayudarme en lo que fuera posible y facilitarme la vida; por hacerme más feliz y ser mi fuente de inspiración, por apoyarme en cada una de mis decisiones y siempre darme ánimos y amor. Por realmente confiar en mí desde el primer día e impulsarme a confiar en mi misma.

A mi papá Erick Vargas, por demostrarme que para salir adelante solo se necesita esfuerzo. Por ser un ejemplo de resiliencia para mí y un modelo a seguir como persona, por tranquilizarme siempre y darme exceso de paz en cada momento.

A mi hermana Natalia Vargas, por ser mi fuente de entretenimiento cada día, por chinearme, escucharme, aconsejarme y tratar de ayudarme a hacer las cosas siempre de la mejor forma posible, sin ella la universidad jamás hubiera sido lo mismo.

A mi abuelo German Vargas, por haber sido un segundo papá para mí, por darme la mejor educación posible, por siempre darme todo el amor y dejarme claro que confía plenamente en mí, por siempre hacer lo posible por pasar más tiempo conmigo, aunque eso implicara sentarse conmigo en la sala a escucharme leer la materia de los exámenes.

A mi tutor, el doctor Javier Mora por acompañarme y guiarme en cada parte de este proyecto, por darme la oportunidad de aprender de él y siempre tener la mejor disposición para explicarme cada paso a seguir, aprecio mucho su manera de trabajar y el entusiasmo que demuestra por el trabajo de sus estudiantes.

A todos mis amigos que me han acompañado en todo este proceso, pero principalmente a Alfredo Martínez por ser el mejor amigo que alguien puede tener, por ser mi apoyo incondicional en cada momento y siempre estar para mí.

Por último, le agradezco a la Universidad de Costa Rica y a cada uno de mis profesores durante la carrera por todas las enseñanzas, más allá de lo académico, que atesoraré por el resto de mi vida.

## Índice

<b>Resumen</b>	9
<b>Justificación</b>	10
<b>Objetivo general</b>	12
<b>Objetivos específicos</b>	12
<b>Antecedentes</b>	13
1. Fundamentos del cáncer de mama	13
1.1. Generalidades del cáncer de mama	13
1.2. Epidemiología del cáncer de mama	14
1.3. Genética del cáncer de mama	16
1.4. Línea celular MCF-7	19
2. Inmunología del cáncer de mama	20
2.1. Fases de la inmunoedición	22
2.2. Puntos de control inmune	25
3. Muerte celular	27
3.1. Tipos de muerte celular programada	29
3.1.1. Apoptosis	29
3.1.2. Entosis	29
3.1.3. Necroptosis	30
3.1.4. Piroptosis	30
3.1.5. Ferroptosis	30
3.2. Muerte celular inmunogénica	30
4. Tratamiento	32
4.1. Metformina	34
4.2. Paclitaxel	37
4.3. Epirrubicina	37
<b>Metodología</b>	39
1. Cultivo celular	39
2. Estimulación celular	39
3. Preparación del medio condicionado	39
4. Estimulación celular de MCF7 a partir del medio condicionado	39
5. Extracción de ARN	40
6. Cuantificación de los niveles de expresión de los puntos de control inmune	40
7. Cuantificación de citoquinas	40
8. Análisis de datos	41
<b>Resultados</b>	42
1. Concentración de citoquinas liberadas al estimular la línea celular MCF-7 con las distintas quimioterapias con metformina durante 24 y 48 horas.	42
2. Concentración de citoquinas liberada al estimular la línea celular MCF-7 con el medio condicionado durante 2 y 24 horas	45

3. Niveles de expresión de PD-L1 al estimular la línea celular MCF-7 con las distintas quimioterapias en presencia de metformina durante 24 y 48 horas.	49
<b>Discusión</b>	50
<b>Conclusiones</b>	63
<b>Referencias bibliográficas</b>	64

## Índice de figuras

FIGURA 1. Factores de riesgo y de prevención para el desarrollo de cáncer de mama.	15
FIGURA 2. Hallmarks del cáncer.	16
FIGURA 3. Carcinogénesis de la glándula mamaria.	17
FIGURA 4. Generación de CSC.	19
FIGURA 5. Fases de la inmunoección del cáncer.	23
FIGURA 6. Resumen de las interacciones entre los PIC y sus ligandos	26
FIGURA 7. Concentración de IL-8 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia	42
FIGURA 8. Concentración de MCP-1 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia.	43
FIGURA 9. Concentración de IP-10 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia.	44
FIGURA 10. Concentración de IL-38 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia	45
FIGURA 11. Concentración de IL-8 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.	46
FIGURA 12. Concentración de MCP-1 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.	47
FIGURA 13. Concentración de IP-10 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.	48
FIGURA 14. Concentración de IL-38 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.	49
FIGURA 15. Expresión de PD-L1 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.	50
FIGURA 16. Papel de la metformina en la inhibición de MCP-1.	55
FIGURA 17. Papel de la PD-L1 como regulador de la función inmune.	60
FIGURA 18. Resumen de las principales citoquinas liberadas y de la expresión de PD-L1 en respuesta al tratamiento quimioterapéutico en presencia o ausencia de metformina.	62

## **Índice de tablas**

Tabla I. Funciones de las quimiocinas en el microambiente tumoral del cáncer de mama.	59
---	----

## Abreviaturas

**AMPK** Proteín quinasa activada por adenosín monofosfato

**AMP** Adenosín monofosfato

**ATP** Adenosín trifosfato

**BCL2** Célula B del linfoma 2

**BRCA2** Breast Cancer Associated Gene

**CSC** Células madre tumorales

**CD** Células dendríticas

**CPA** Células presentadoras de antígenos

**CTLA-4** Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

**DAMPs** Patrones moleculares asociados a daño

**DM2** Diabetes Mellitus tipo 2

**EGFR** Factor de crecimiento epidérmico

**ER** Receptor de estrógenos

**FDA** Administración de medicamentos y alimentos

**GM-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

**HER2** Receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2

**HMGB1** Proteínas de caja del grupo de alta movilidad 1

**HR** Receptor de hormonas

**IFN- $\gamma$**  Interferón gamma

**IPIC** Inhibidores de los puntos de control inmune

**LT** Linfocitos T

**miARN** Micro ARNs

**MCF** Fundación de cáncer de Michigan

**MCF-7** Línea celular de cáncer de mama

**MCP** Muerte celular programada

**MDSC** Células supresoras de origen mieloide

**MHC** Complejo mayor de histocompatibilidad

**NADH** Nicotinamida adenina dinucleótido

**NETs** Trampas extracelulares de neutrófilos

**NF- $\kappa$ B** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NK** Células natural killers

**PD-1** Proteína de muerte celular programada 1

**PDL-1** Ligando de la proteína de muerte celular programada 1

**PIC** Puntos de control inmune

**PI3K** Fosfatidilinositol 3-cinasa

**PR** Receptor de progesterona

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**STAT 3** Transductor de señal y activador de la transcripción 3

**SIRT1** Sirtuina 1

**TAM** Macrófagos asociados a tumores

**TCR:** Receptor del linfocito T

**TGF- $\beta$**  Factor de crecimiento transformante beta

**TNF- $\Delta$**  Factor de necrosis tumoral alfa



## **Resumen**

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por tumores malignos y además el más diagnosticado en mujeres en todo el mundo. Su incidencia aumenta constantemente, por ello, a pesar de los avances en su detección y tratamiento, es necesario buscar nuevos métodos terapéuticos y factores predictivos y pronósticos. El objetivo a futuro es individualizar la terapia y brindar un tratamiento en función de la biología del cáncer y así lograr una respuesta temprana a la terapia (Smolarz et al., 2022).

Recientemente, se ha descubierto que la metformina, un agente hipoglicémico prescrito a pacientes con diabetes mellitus II, está relacionada con una mejor respuesta a terapias neoadyuvantes con paclitaxel o epirubicina. En el presente trabajo se hace un estudio celular sobre la secreción de IL-8, IL-38, IP-10 y MCP-1 por parte de la línea celular MCF-7, bajo concentraciones estandarizadas de paclitaxel y epirubicina tanto en presencia como en ausencia de metformina; también se evalúan los niveles de expresión de los puntos de control inmunológico en las células. Entender los mecanismos de regulación que ejercen múltiples terapias sobre la respuesta inmune y el microambiente tumoral es de vital importancia en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y la mejora del pronóstico de los pacientes.

## Justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo el cáncer de mama el más frecuente en la población femenina y a la vez uno de los más importantes a nivel mundial. Esta es una enfermedad multifactorial, cuya incidencia, mortalidad y tasa de supervivencia depende de varios factores, entre ellos el estilo de vida, factores genéticos y el ambiente, entre otros (Momenimovahed, 2019). En Costa Rica, las tasas de incidencia presentan un panorama similar, donde el cáncer de mama ocupa el primer lugar de tumores malignos más frecuentes en mujeres; los casos se reportan desde los 15 años de edad, pero es partir de los 40 años que las tasas de incidencia y mortalidad incrementan significativamente (Sáenz *et al.*, 2015)

Los programas de cribado contra el cáncer de mama tienen como objetivo reducir su mortalidad mediante la detección precoz y el tratamiento eficaz. Esto debido a que una detección tardía podría conllevar a un aumento en la tasa de mortalidad. La Sociedad Americana del Cáncer recomienda el cribado anual en mujeres de 40 a 44 años (Kashyap *et al.*, 2022).

La investigación para el desarrollo de distintas terapias contra el cáncer es cada vez mayor. El enfoque clásico se basa principalmente en tres grandes áreas: la quimioterapia, la cirugía y la radioterapia; no obstante, recientemente se ha fortalecido el estudio de la inmunoterapia como alternativa terapéutica, su principal objetivo es modular la respuesta inmune del paciente de manera que permita inducir un efecto antitumoral y eliminar las células cancerosas. (Tokumaru *et al.*, 2020).

Numerosos estudios sugieren que cada paciente con cáncer de mama tiene un perfil epigenético y transcripcional distinto, esto puede llevar a una reducción en la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, se ha explorado la heterogeneidad del cáncer de mama utilizando la información genética para así comprender mejor cuál es la biología de la enfermedad y procurar brindar una terapia personalizada a cada paciente para lograr una mejor respuesta al tratamiento (Kashyap *et al.*, 2022).

La metformina ha sido el fármaco de primera línea para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II durante décadas, siendo en la actualidad el hipoglucemiante más prescrito. Estudios retrospectivos asocian el uso de metformina con una reducción de la incidencia del cáncer y de las muertes relacionadas con él. Sin embargo, a pesar de la amplia investigación

sobre sus efectos moleculares en las células cancerosas, su modo de acción sigue siendo controversial. Además, reduce significativamente el riesgo de cáncer de mama, en comparación con las pacientes que no utilizan metformina, y es independiente del estado diabético (Faria et al., 2019).

Sin embargo, la mejora en las tasas de respuesta a las inmunoterapias sigue siendo un gran reto para el tratamiento del cáncer en general. Teniendo en cuenta la infiltración relativamente limitada de células T en la mayoría de los cánceres de mama, el desarrollo de estrategias novedosas dirigidas a permitir una infiltración linfocitaria suficiente, así como a generar respuestas de células T *de novo* que se superpongan al entorno tumoral inmunosupresor, puede ser clave para el éxito de este tipo de terapia en pacientes con cáncer de mama (García-Aranda & Redondo, 2019).

## **1. Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de la metformina y de los tratamientos quimioterapéuticos convencionales sobre la producción de citoquinas y expresión de puntos de control inmune en una línea celular humana de cáncer de mama.

### **Objetivos específicos**

- a. Analizar el perfil de citoquinas liberado por la línea celular MCF7 tratada con metformina sola o en combinación con epirubicina y paclitaxel.
  
- b. Cuantificar la concentración de citoquinas liberadas por células estimuladas con medio condicionado generado de células tratadas con metformina sola o en combinación con epirubicina y paclitaxel.
  
- c. Evaluar los niveles de expresión de los puntos de control inmunológico en células estimuladas con medio condicionado generado a partir de células tratadas con metformina sola o en combinación con epirubicina y paclitaxel.

## **Antecedentes**

### **1. Fundamentos del cáncer de mama**

#### **1.1. Generalidades del cáncer de mama**

El cáncer de mama es un tipo de cáncer que se da a partir del crecimiento y proliferación errática de las células que se originan en el tejido mamario, donde se cuenta con dos tipos principales de tejidos, los tejidos glandulares y los tejidos estromales. Hay varios tipos de tumores que pueden desarrollarse en diferentes áreas de la mama, la mayoría de los tumores son el resultado de cambios no cancerosos dentro del seno. Por ejemplo, el cambio fibroquístico, en donde las mujeres desarrollan quistes (paquetes acumulados de líquido), fibrosis (formación de tejido conectivo similar a una cicatriz), bultos y áreas de engrosamiento, sensibilidad o dolor en los senos (Harbeck et al., 2019).

Se han descrito dos teorías hipotéticas para el inicio y progresión del cáncer de mama: la teoría de las células madre y la teoría estocástica. La teoría de las células madre sugiere que todos los subtipos tumorales derivan de las mismas células madre o progenitoras, en donde las mutaciones adquiridas por las células madre darán lugar a los diferentes fenotipos tumorales; mientras que la teoría estocástica propone que cada subtipo tumoral inicia a partir de un único tipo de célula madre o progenitora diferenciadas. Aunque ambas teorías están respaldadas, ninguna de ellas explica por completo el origen del cáncer (Sun et al., 2017).

El cáncer de mama se considera un trastorno genético debido a las mutaciones, alteraciones y cambios genéticos que se dan durante su desarrollo. La alteración de la vía metabólica en las células de cáncer, en comparación a las células normales, proporciona una gran cantidad de energía para el crecimiento celular descontrolado (Anindita, et al., 2020). Inicialmente diversos estudios demostraron que los tumores absorben enormes cantidades de glucosa en comparación con el tejido circundante y que esta se fermenta para producir lactato, incluso en presencia de oxígeno, dicha situación originó el término “glicólisis aeróbica”. Posteriormente, se observó que la respiración por sí sola podía mantener la viabilidad del tumor, lo que llevó a la conclusión de que, para eliminar las células tumorales mediante la privación de energía, había que suprimir tanto la glucosa como el oxígeno. En estudios posteriores sobre la heterogeneidad de la glicólisis en los distintos tipos de tumores, se descubrió que la magnitud de la respiración en los tumores era variable, y muchos tumores mostraban una cantidad sustancial de respiración, por lo que se concluyó que las células tumorales no sólo presentan glicólisis aerobia, sino que también pueden realizar fermentación según las condiciones genéticas y ambientales (Liberti, 2016).

Otro aspecto por tomar en cuenta durante el desarrollo del cáncer es el microambiente tumoral, que desempeña un papel vital en el inicio y la progresión del cáncer de mama. Por ejemplo, los macrófagos pueden generar un microambiente inflamatorio mutagénico, que puede promover la angiogénesis y permitir que las células cancerosas escapen al rechazo inmunitario. Además, se han observado diferentes patrones de metilación del ADN entre el microambiente normal y el asociado a tumores, lo que indica que las modificaciones epigenéticas en el microambiente tumoral pueden promover la carcinogénesis. Recientemente, una nueva subclase de células malignas dentro de los tumores denominada células madre tumorales (CSC) se ha asociado con el inicio, escape y recurrencia del tumor. Esta pequeña población de células, que pueden desarrollarse a partir de células madre o progenitoras de tejidos normales, tienen la capacidad de autorrenovación y resistencia a terapias convencionales, como la quimioterapia y la radioterapia (Sun et al., 2017).

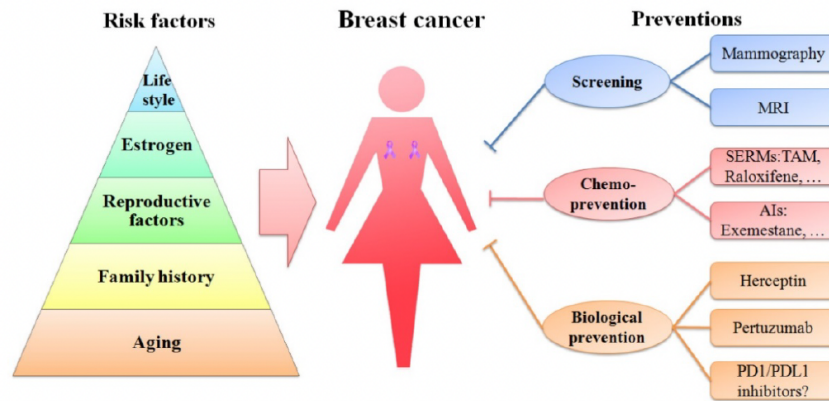
## **1.2. Epidemiología del cáncer de mama**

Estudios sobre la epidemiología del cáncer han determinado que el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común a nivel mundial y el más frecuente en mujeres, con un porcentaje de incidencia mayor en países desarrollados. Sin embargo, se ha visto que la mortalidad debido a este tipo de cáncer se incrementa en países en vías de desarrollo, esto debido al mayor alcance a nivel diagnóstico y terapéutico en los países más desarrollados (Momenimovahed, 2019).

Por otra parte, el cáncer de mama ha demostrado tener una mayor incidencia en mujeres, con hasta un 99% de incidencia en esta población. Estudios han revelado que <1% de todos los cánceres de mama ocurren en hombres, y cuando están presentes, predomina en hombres con historial de desbalances hormonales, exposición a radiación o historia familiar de cáncer de mama; entre los factores de riesgo de mayor peso con un mayor peso en hombres, se encuentra la mutación en el gen BRCA2. Además, la incidencia aumenta con la edad, ya que suele estar asociado a personas con edades mayores a 50 años. Sin embargo, en personas jóvenes los tumores suelen ser de mayor tamaño, estar en estadios más avanzados y la supervivencia suele ser menor. (Momenimovahed, 2019).

Diversos estudios han demostrado que la incidencia del cáncer de mama tiene un aspecto multifactorial, y varía dependiendo del estilo de vida, factores genéticos y ambientales de cada persona. Entre los principales factores predisponentes destacan la edad (riesgo aumentado en mujeres mayores de 40 años), los factores reproductivos como la menarquia precoz, menopausia tardía, edad tardía del primer embarazo o baja paridad que

pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama, y los estrógenos tanto endógenos (producidos por el ovario en mujeres premenopáusicas) como exógenos (obtenidos de anticonceptivos orales o de terapia hormonal sustitutiva) están asociados al riesgo de cáncer de mama (Sun et al., 2017).

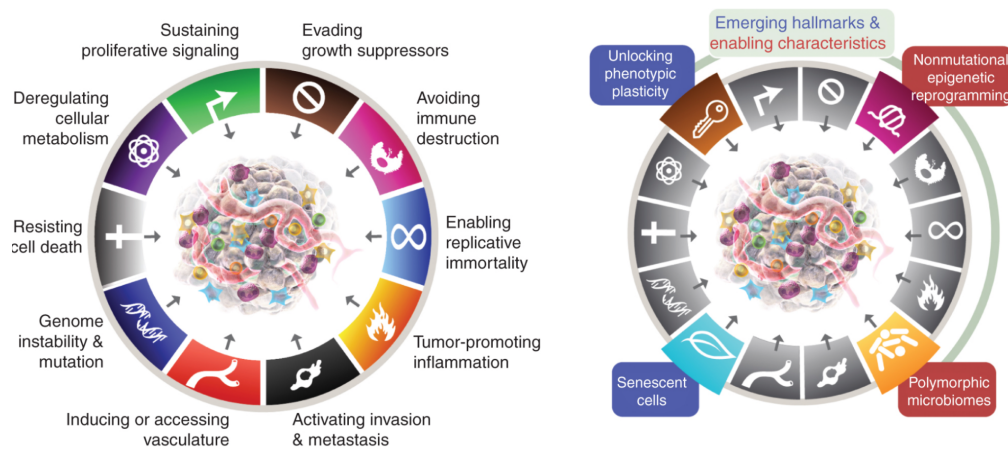


**FIGURA 1. Factores de riesgo y formas de prevención para el desarrollo de cáncer de mama.** La edad, historia familiar, factores reproductivos, estrógenos y estilo de vida son cinco factores de riesgo importantes en el cáncer de mama. Fuente: Sun et al., 2017

Otro factor predisponente de suma importancia es la genética, se estima que aproximadamente el 10% de los cánceres de mama son hereditarios y están asociados con antecedentes familiares, aunque esto varía con frecuencia según el país de origen y la etnia. Estudios han determinado que personas con un familiar de primer grado que ha tenido cáncer de mama tienen un riesgo relativo elevado de padecer cáncer de mama de aparición temprana (antes de los 35 años). Sin embargo, la historia familiar de cáncer de mama se asocia con un riesgo individual "errático" compuesto por diferentes variables, incluido el tamaño de la familia y factores ambientales; por lo que se han desarrollado modelos como el "Family History Score" para llegar a conocer el riesgo atribuido a la historia familiar (Harbeck et al., 2019).

Los rasgos distintivos del cáncer o "hallmarks" del cáncer se propusieron como un conjunto de capacidades funcionales adquiridas por las células a medida que pasan de la normalidad a estados de crecimiento neoplásico, más concretamente capacidades son cruciales para formar tumores malignos. En la actualidad, los ocho "hallmarks" comprenden las capacidades para mantener la señalización proliferativa, eludir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir/acceder a la vasculatura, activar la invasión y la metástasis, reprogramar el metabolismo celular y evitar

la destrucción inmunitaria. Más recientemente, la desregulación del metabolismo celular y la evitación de la destrucción inmunitaria se segregaron como "sellos emergentes" (Hanahan, 2022).



**FIGURA 2. Hallmarks del cáncer.** Descripción de los diferentes hallmarks del cáncer así como las características emergentes. Fuente: Hanahan, 2022

Estos “hallmarks” son el centro de múltiples investigaciones con la finalidad de caracterizar molecularmente al cáncer y desarrollar nuevas herramientas terapéuticas dirigidas contra los mecanismos celulares y vías de señalización que se encuentran alterados en esta patología (Pérez-Cabeza De Vaca et al., 2017). Sin embargo, por sí solos, no abordan las complejidades de la patogénesis del cáncer, en consecuencia, surgen las "características facilitadoras", que son las condiciones (mecanismos moleculares y celulares) aberrantes de la neoplasia que proporcionan los medios para que las células cancerosas y los tumores pueden adoptar estos rasgos funcionales (Hanahan, 2022).

### 1.3. Genética del cáncer de mama

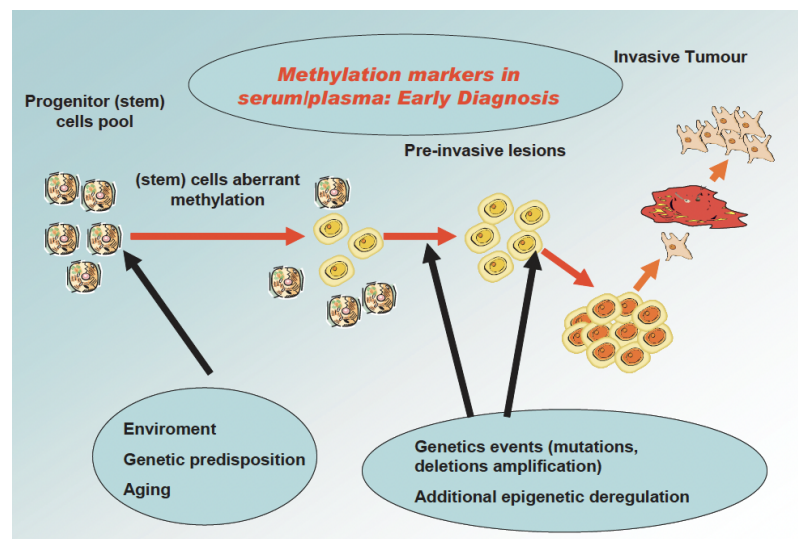
Estudios relacionados con el cáncer han concluido que esta es una enfermedad provocada por la acumulación de anomalías genéticas que implican mutaciones en oncogenes y/o en genes supresores de tumores. Sin embargo, la carcinogénesis es en realidad un proceso de varios pasos que implica cambios tanto genéticos (cambios asociados modificaciones en la secuencia del ADN) como epigenéticos, que pueden provocar el silenciamiento de genes supresores de tumores y/o la activación de oncogenes (Basse & Arock, 2015).

La epigenética hace referencia a los cambios hereditarios en la expresión génica que no están asociados a modificaciones en las secuencias de ADN. Existen distintos mecanismos que inician y mantienen las modificaciones epigenéticas, entre ellas la metilación del ADN y



las modificaciones postraduccionales de las histonas son los mejor comprendidos, sin embargo, estos cambios también se ven influenciados por los microARNs (miARN) (Basse & Arock, 2015). En las células sanas, los patrones de metilación del ADN se conservan a través de la división celular, lo que permite la expresión del conjunto particular de genes celulares necesarios para ese tipo de célula y bloquea la expresión de secuencias insertadas exógenamente (Parella, 2010).

En las células cancerosas, se produce una desregulación de los patrones de metilación del ADN que conduce a la hipometilación e hipermetilación de las islas CpG asociadas a genes de cáncer; esta metilación aberrante de las islas CpG, junto con las modificaciones postranscripcionales de histonas, desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y están implicadas en gran medida en la inactivación de genes relacionados con el cáncer. Las pruebas sugieren que las células madre que son el objetivo de múltiples mutaciones y desregulaciones epigenéticas ven afectado el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación, lo que en última instancia conduce al desarrollo y la progresión de los tumores (Parrella, 2010). Recientemente se han estudiado los acontecimientos epigenéticos que se producen en las células madre cancerosas, y se ha determinado que estas se desarrollan a partir de una población de células madre normales a causa de cambios ambientales, genéticos y, principalmente, epigenéticos (Basse & Arock, 2015).



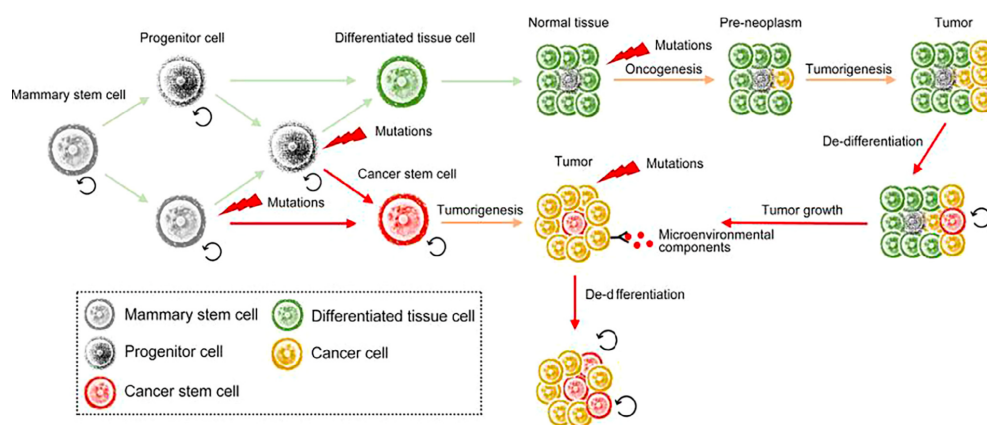
**FIGURA 3. Carcinogénesis de la glándula mamaria.** La carcinogénesis es el resultado de factores genéticos, epigenéticos y ambientales que afectan a las células madre, determinando una ventaja de crecimiento que a través de procesos de selección clonal conduce al desarrollo de lesiones preinvasivas que desembocan en cáncer de mama. Fuente: Parella, 2010.

En el cáncer de mama, varios genes están hipermetilados en comparación con el tejido no canceroso, entre los que se incluyen genes implicados en la evasión de la apoptosis (*RASSF1A*, *HOXA5*, *TWIST1*), el potencial de replicación ilimitada (*CCND2*, *p16*, *BRCA1*, *RARβ*), el crecimiento (*ERα*, *PGR*) y la invasión tisular y la metástasis (*CDH1*) (3,17,24,25). Estos genes no sólo están hipermetilados en las células tumorales, sino que muestran un mayor silenciamiento epigenético en el epitelio normal que rodea la zona tumoral y por lo tanto se cree que una vez establecidas las alteraciones epigenéticas en los tejidos premalignos, las modificaciones se acumularán a medida que progrese la enfermedad (Dworkin et al., 2009).

A nivel genético, se han encontrado dos marcadores moleculares de importancia en el cáncer de mama, el receptor de estrógeno o progesterona, conocido como receptor de hormonas (HR), y que se expresa en el 70% de casos de cáncer de mama invasivos; y el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) que se sobreexpresa aproximadamente en un 20% de los casos de cáncer de mama. Teniendo en cuenta lo anterior, el cáncer de mama se subdivide en 3 categorías principales: el primero es el tipo HR+/HER2 - en el cual las células tumorales son positivas para el receptor de estrógenos o progesterona, el segundo es el tipo HER2 +/HR + o HR -, en el cual las células tumorales expresan HER2 con o sin expresión del HR, y finalmente está el triple negativo (para el receptor de estrógenos, progesterona y HER2) en el cual aún no están bien descritos los criterios de positividad para el HR o el HER2 (Waks & Winer, 2019).

Además, se ha estudiado la presencia de genes que al sufrir mutaciones o amplificaciones anormales desempeñan un papel clave en los procesos de iniciación y progresión tumoral, entre ellos destacan tres. Los primeros son los BRCA1/2 que están localizados en el cromosoma 17q21 y 13q12, ambos codifican proteínas supresoras de tumores por lo que su deficiencia provoca desregulación de los puntos de control, duplicación anormal del centrosoma y, finalmente, la apoptosis; sus mutaciones se heredan de manera autosómica dominante. En segundo lugar, se encuentra HER2, que se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, su expresión se activa principalmente por amplificación y reordenamiento, su sobreexpresión aumenta el número de células madre cancerosas, lo que es de mal pronóstico. Finalmente, está el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 7. Las vías de señalización descendentes del EGFR promueven la proliferación e invasión celular, la angiogénesis y la protección de las células frente a la apoptosis, por lo que su sobreexpresión es de mal pronóstico y está presente en más de la mitad de los casos de cáncer de mama triple negativo (Sun et al., 2017).

En los últimos años se ha propuesto el modelo de células madre cancerosas, que indica que estas son capaces de autorrenovarse, recapitular la heterogeneidad de los tumores originales y diferenciarse en un nuevo tumor. La Asociación Americana para la Investigación del Cáncer propuso una definición consensuada de una célula madre cancerosa, que es "una célula dentro de un tumor que posee la capacidad de autorrenovarse y causar los linajes heterogéneos de células cancerosas que componen un tumor". Evidencias recientes sugieren que estas células pueden ser no sólo consecuencia de mutaciones que sobre activan la capacidad de autorrenovación de las células, sino también resultado de la dediferenciación de las células cancerosas inducida por mutaciones somáticas o por componentes microambientales (Bai et al., 2018).



**FIGURA 4. Generación de CSC.** Las mutaciones oncogénicas en las células madre y progenitoras mamarias pueden dar lugar a CSC, estas células conducen a la tumorigénesis debido a mutaciones genéticas o epigenéticas celulares, así como a los diferentes componentes microambientales. Fuente: Bai et al., 2018.

#### 1.4. Línea celular MCF-7

La línea celular MCF-7 es comúnmente utilizada para la investigación de modelos *in vitro* en cáncer de mama, ya que son positivas para el receptor de estrógeno (ER) y progesterona (PR). Se comenzaron a utilizar en la Fundación de Cáncer de Michigan (MCF), de donde derivan sus siglas; estas células fueron aisladas del derrame pleural de una paciente de 69 años con cáncer de mama en estado de metástasis. Su utilidad en el estudio de resistencia a terapias se debe a que es una línea celular con bajo potencial maligno, invasivo y metastásico, que son fácilmente cultivables y mantienen la expresión del receptor de estrógeno (ER) aún al ser tratadas con terapias (Comsa, 2015).

Las células MCF-7 son dependientes de la concentración de estrógenos para su proliferación, por lo que en una situación de disminución de estrógenos proceden a aumentar la expresión del ER, con una tasa de proliferación disminuida durante el primer mes de cultivo; esto es indicativo de que durante este tiempo no encuentran mecanismos compensatorios para la disminución de estrógenos (Comsa, 2015).

El desarrollo del cáncer de mama no es solamente controlado por el receptor de estrógeno y progesterona sino también por receptores de factores de crecimiento asociados a la membrana plasmática, siendo los más importantes el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), ambos presentes en las células MCF7 (Comsa, 2015)

## **2. Inmunología del cáncer de mama**

El sistema inmunitario es un regulador crítico de la biología tumoral al favorecer o inhibir el desarrollo, el crecimiento, la invasión y la metástasis de los tumores. Es por lo que durante los últimos años se han desarrollado estrategias terapéuticas para activar el sistema inmune de una manera adecuada y de esta forma eliminar a las células tumorales; sin embargo, no todos los tumores responden de igual manera a las estrategias inmunomoduladoras, esta observación evidencia la heterogeneidad del cáncer (Beatty & Gladney, 2015).

Un principio central de la inmunología del cáncer es que el sistema inmunitario reconoce las células que presentan transformación maligna e induce su reconocimiento y eliminación. Esto fue propuesto con la hipótesis de la inmunovigilancia, que postulaba el papel del sistema inmunitario en el control del desarrollo y crecimiento de las células transformadas, sin embargo, esta hipótesis se ha actualizado y se ha llegado a la conclusión de que el sistema inmune no solo protege del desarrollo tumoral. También tiene la capacidad de seleccionar tumores con menor antigenicidad o inmunogenicidad y promover su crecimiento, en un proceso conocido como inmunoedición del cáncer; que les permite a los tumores evadir el sistema inmune. Sin embargo, algunos tumores pueden escapar mediante el reclutamiento de leucocitos inmunosupresores, que orquestan un microambiente que evita la respuesta antitumoral (Beatty & Gladney, 2015).

El desarrollo de cáncer es el resultado de la acumulación de mutaciones somáticas y la desregulación de oncogenes y genes supresores de tumores. Estas anomalías genéticas a menudo crean neoantígenos en las células cancerosas, muchos de los cuales son reconocidos por el sistema inmunitario. Sin embargo, el cáncer se puede desarrollar en organismos

inmunocompetentes; por lo que se ha propuesto la evasión de la inmunovigilancia es una de las características del cáncer. Esto se logra mediante la inducción de LT tolerogénicos, inmunoedición del cáncer y la generación de un microambiente tumoral que sea supresor de la respuesta inmune (Lu & Finn, 2008).

En una respuesta inmunitaria típica, los antígenos son captados por células dendríticas (CD), que maduran y presentan el péptido antigénico por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a los LT de los ganglios linfáticos, las cuales migran hacia el foco de infección, inflamación o lesión. El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) son fundamentales en el proceso de maduración de las CD y la activación de los macrófagos. A su vez, las CD liberan citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que dan forma a la respuesta de las células natural killers (NK) y los LT (Schowalter, 2017).

La regulación inmunitaria normal requiere citocinas como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) para limitar la actividad de los LT y los macrófagos para así reducir la inflamación, poner fin a las respuestas inmunitarias y proteger al huésped de los daños causados por el sistema inmunitario. Los tumores utilizan este tipo de mecanismos de inmunosupresión para evadir las células inmunitarias, por ejemplo, impidiendo que los LT o NK alcancen y eliminen las células tumorales. Además, expresan antígenos poco inmunogénicos que son indistinguibles de los autoantígenos tolerados (Schowalter, 2017).

Por otra parte, los tumores tienen la capacidad de perder su antigenicidad, esto puede deberse a la selección inmune de células cancerosas que carecen de antígenos tumorales inmunogénicos, así como deficiencias en la presentación de antígenos; sin embargo, dado que las células malignas son muy diferentes, sigue sin estar claro cómo cuantificar eficazmente la antigenicidad de un cáncer. Un enfoque podría ser determinar la frecuencia de mutaciones somáticas como predictor de neoantígenos, al plantear la posibilidad de que la frecuencia mutacional tumoral pueda correlacionarse con la respuesta a la inmunoterapia; sin embargo, no todos los neoantígenos serán inmunogénicos, y los antígenos no mutados pueden ser clave para la inmunoterapia del cáncer. Además, se debe tomar en cuenta la capacidad de las células para la presentación de antígenos, ya que si pierden esta capacidad logran escapar a la eliminación inmunomediada por LT (Beatty & Gladney, 2015).

Los tumores que conservan suficiente antigenicidad para ser reconocidos pueden escapar disminuyendo su inmunogenicidad. Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos que infiltran el tumor pueden aumentar la molécula inmuno inhibidora ligando de

la proteína de muerte programada 1 (PD-L1) en células malignas, estos hallazgos sugieren que la expresión de PD-L1 puede asociarse con la respuesta del tumor a la inmunoterapia, sin embargo, es importante recordar que los tumores son heterogéneos por lo tanto no todos se desenvuelven de la misma manera (Beatty & Gladney, 2015).

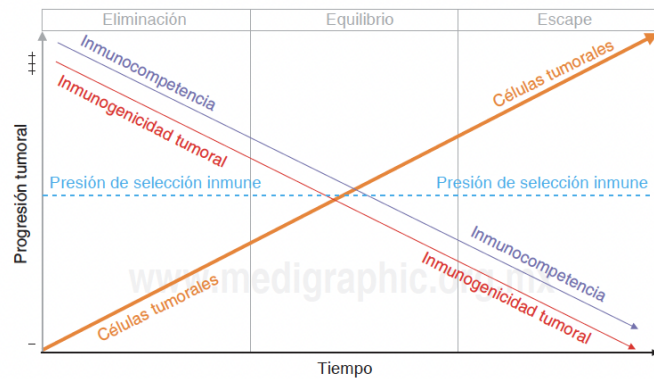
En entornos fisiológicos y patológicos la epigenética desempeña un papel fundamental en la regulación de la transcripción génica, ya que alteraciones en genes que codifican supresores tumorales, citoquinas supresoras o puntos de control inmune (PIC) pueden conducir a una activación deficiente de la inmunidad antitumoral, escape inmunitario, resistencia a fármacos y contribuir al desarrollo y progresión del cáncer (Saleh, 2020). Las células tumorales eluden la inmunovigilancia y progresan al suprimir la inmunidad antitumoral; los PIC revigorizan las respuestas al promover la eliminación de las células tumorales. Los tumores inflamatorios presentan un alto grado de respuesta a la inmunoterapia debido a que los PIC pueden activar las reacciones inmunitarias e inhibir la evasión inmune (Darvin et al., 2018).

Las interacciones entre la proteína de muerte programada 1 (PD-1) y sus ligandos, B7-H1/PD-L1 y B7-DC/PD-L2, conducen a la inactivación de los LT para mantener la homeostasis inmunitaria y prevenir la autoinmunidad. La activación de la vía PD-1/PD-L1 está relacionada con inflamación inmune. Los ligandos de los PIC se encuentran comúnmente en las células tumorales, y estas interacciones funcionan en tándem con la infiltración de células inmunosupresoras para favorecer el escape del tumor. Por tanto, el bloqueo de la vía inhibidora PD-1/PD-L1 puede activar los LT, liberando citocinas inflamatorias y gránulos citotóxicos para eliminar las células tumorales (Darvin et al., 2018).

## **2.1. Fases de la inmunoedición**

Mediante la presión de la selección inmune, se puede favorecer el crecimiento de tumores con una menor inmunogenicidad, que escapan al reconocimiento en hospederos con un sistema inmunológico funcional. Para describir la capacidad del sistema inmunológico de amoldar la inmunogenicidad de tumores se creó el concepto de inmunoedición, que es un proceso dinámico que consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Jacobó-Velásquez et al., 2018). Sin embargo, en algunos casos las células tumorales pueden entrar directamente en las fases de equilibrio o de escape sin pasar por una fase anterior. Además, factores externos pueden influir en la direccionalidad del flujo, como por ejemplo el estrés ambiental, el deterioro del sistema inmunitario e incluso la intervención

inmunoterapéutica en el crecimiento de las células tumorales en pacientes con cáncer (Schreiber et al., 2011).



**FIGURA 5. Fases de la inmunoedición del cáncer.** Células tumorales con alta inmunogenicidad probablemente serán eliminadas con éxito. Con el paso del tiempo, pueden surgir células con menor inmunogenicidad, capaces de eludir la respuesta inmunológica del hospedero. Fuente: Jacobo-Velásquez, 2018.

Durante la fase de eliminación el sistema inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para erradicar el crecimiento de tumores de forma exitosa, debido a la infiltración de células inmunológicas en el tumor. Existen diversos mecanismos que pueden llevar a la eliminación temprana de tumores al alertar al sistema inmune. Un ejemplo de esto son las señales de peligro como los IFN de tipo I que se inducen al inicio del desarrollo tumoral y activan las células dendríticas para promover respuestas antitumorales. También hay que tener en cuenta el papel de los patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) que se liberan directamente de las células tumorales moribundas, así como el daño en el ADN que induce la transformación temprana en las células vecinas. Sin embargo, ante la ausencia de estas señales, las células transformadas pueden pasar desapercibidas por el sistema inmune (Jacobo-Velásquez et al., 2018).

Aunque la activación de la inmunidad innata puede proteger frente al desarrollo tumoral, en la mayoría de los sistemas las respuestas eficaces contra el cáncer requieren la expresión adicional de antígenos tumorales capaces de propagar la expansión de LT CD4 + y CD8 + efectoras. Por lo tanto, se necesita una activación coordinada y equilibrada de la inmunidad innata y adaptativa para proteger al huésped frente a un tumor en desarrollo. Si se completa la destrucción de las células tumorales, la fase de eliminación representa el punto final del proceso de inmunoedición del cáncer (Schreiber et al., 2011).

Posteriormente, las células tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación entran en la fase de equilibrio, esta etapa depende únicamente del sistema inmunológico

adaptativo, por lo tanto, participan interleuquinas como la IL-12 y el IFN- $\gamma$ ; así como las células T CD4 + y CD8 + . En este punto, la presión de selección inmune puede inducir la formación de células tumorales con inmunogenicidad reducida que tendrán una mayor capacidad de sobrevivir en un hospedero inmunocompetente. Durante esta fase ocurre la eliminación continua de células tumorales acompañada de una emergencia de variantes celulares resistentes (Jacobo-Velásquez et al., 2018). En la fase de equilibrio, el sistema inmunitario mantiene las células tumorales residuales en un estado de latencia, es decir, que pueden residir en los pacientes durante décadas antes de reanudar su crecimiento como tumores primarios recurrentes o metastásicos al estar controlados (Schreiber et al., 2011).

Finalmente, las células tumorales entran en la fase de escape cuando han sido capaces de eludir el reconocimiento y/o la destrucción inmunitaria. Adicionalmente, las células tumorales pueden presentar resistencia contra los mecanismos citotóxicos de las células inmunes. Por ejemplo, con la expresión de moléculas anti apoptóticas (mediante la activación persistente de factores de transcripción pro oncogénicos como el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) o la expresión de moléculas efectoras antiapoptóticas como las células B del linfoma 2 (BCL-2)). Además, existen diversos factores producidos por las células tumorales que contribuyen a la formación de un microambiente inmunodeprimido que induce el reclutamiento de células inmunes capaces de inhibir la respuesta antitumoral del hospedero (Jacobo-Velásquez et al., 2018).

Por otro lado, la pérdida de expresión antigénica tumoral es uno de los mecanismos de escape mejor estudiados, y puede producirse al menos de tres formas: (i) a través de la aparición de células tumorales que carecen de expresión de antígenos de rechazo, (ii) a través de la pérdida de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I que presentan estos antígenos a los LT específicos del tumor, o (iii) a través de la pérdida de la función de procesamiento de antígenos dentro de la célula tumoral que es necesaria para producir el epítipo peptídico antigénico y cargarlo en la molécula del MHC de clase I. El resultado final es la generación de variantes de células tumorales poco inmunogénicas que se vuelven "invisibles" (Schreiber et al., 2011).

Además, los LT reguladores desempeñan un papel clave en la inhibición de las respuestas antitumorales huésped, estos son los LT CD4 + que expresan de forma constitutiva CD 25 y el factor de transcripción Foxp3. Cuando estas se estimulan, inhiben la función de los LT mediante la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ , la expresión de moléculas coestimuladoras negativas como el antígeno 4 del linfocito T



citotóxico (CTLA-4), PD-1 y PD-L1 y con el consumo de IL-2, que es fundamental para la función de los LT (Schreiber et al., 2011)

## **2.2. Puntos de control inmune e inmunoterapia**

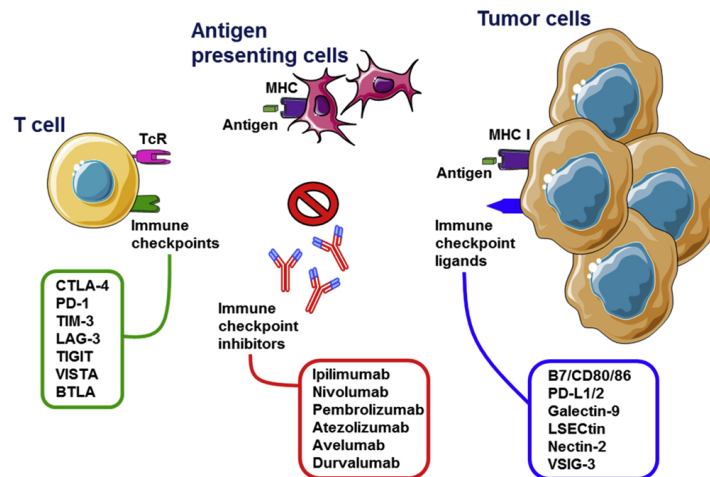
El funcionamiento del sistema inmunitario se basa en el equilibrio de fuerzas opuestas, si este se altera, se produce la autoinmunidad, inmunodeficiencias, inflamación exacerbada o cáncer. Existen muchos controles intrínsecos, por ejemplo, los PIC que son "frenos" esenciales para mantener el equilibrio. Sin embargo, el cáncer evoluciona hasta utilizar estas moléculas para evadir su destrucción, por lo tanto, la sobreexpresión de PIC contribuye a la progresión del cáncer. Entre los más destacados se encuentran el CTLA-4 y PD-1 (Tokumaru, 2019). El crecimiento tumoral se ve favorecido por el aumento de los PIC en el microambiente tumoral, ya que suprimen la respuesta de los LT citotóxicos (Toor et al., 2020).

Los LT reguladores desempeñan un papel fundamental en la supresión de la autoinmunidad, ellos expresan CD25 que sirve como marcador de linaje y el gen Foxp3 para prevenir trastornos. Aunque son indispensables para el mantenimiento de la homeostasis, en condiciones malignas favorecen la progresión del tumor, por lo que suelen estar aumentados tanto en circulación como en el microambiente tumoral en distintos tipos de cáncer. Además, su infiltración está asociada a una disminución en los LT CD8 +, lo que correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, de ovario y gástricos (Sasidharan Nair & Elkord, 2018).

Los LT se activan por medio de la presentación de antígenos mediante (i) MHC II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA) y (ii) MHC I en las células tumorales, reconocidas por el receptor de LT (TCR). Los PIC como PD-1 y CTLA-4 se expresan en LT, sin embargo, las interacciones con sus ligandos en las células tumorales conducen a la inactivación de los LT con lo que impiden la destrucción de las células neoplásicas. Como solución, se han desarrollado anticuerpos monoclonales como el ipilimumab contra CTLA-4 o el nivolumab y el pembrolizumab contra PD-1 para inhibir estas interacciones y garantizar una activación sostenida de los LT y de esta forma lograr respuestas antitumorales eficaces (Toor et al., 2020).

Las células cancerosas sobreexpresan ligandos inhibidores debido a la señalización oncogénica y en respuesta a citoquinas inflamatorias para aumentar la tolerancia tumoral y así evadir al sistema inmunitario. Los tumores que expresan ligandos de PIC responden mejor a los inhibidores de los puntos de control inmune (IPIC) por ejemplo, los tumores PD-L1 +

responden mejor a los inhibidores de PD-1/PD-L1 en comparación con los tumores PD-L1-. No obstante, en algunos casos, pacientes con alta expresión de ligandos de PIC no responden al bloqueo, esto puede deberse a la presencia de otros mecanismos reguladores y compensatorios que afectan a la biología inmunitaria del tumor (Toor et al., 2020).



**FIGURA 6. Resumen de las interacciones entre los PIC y sus ligandos, así como la intervención terapéutica.** Los LT se activan mediante la presentación de antígenos, las interacciones de los PIC con sus ligandos en las células tumorales conducen a la inactivación de los LT por lo que se han desarrollado anticuerpos monoclonales para inhibir estas interacciones. Fuente: Toor et al., 2020.

Entre los principales PIC destacan CTLA-4 que se expresa de forma constitutiva en los LT reguladores. Este compete con la molécula coestimuladora CD28 por la unión a los ligandos B7: (i) CD80 y (ii) CD86 en las CPA para amortiguar la activación de los LT, limitando la señalización del TCR e inhibiendo la proliferación de LT. Por lo tanto, un aumento de expresión de CTLA-4 en el microambiente tumoral se ha relacionado con un mal pronóstico (Toor et al., 2020).

Por otro lado, se encuentra el PD-1 que es una proteína transmembrana que desempeña un papel fundamental en el escape de los tumores y cuya señalización implica interacciones con sus ligandos PD-L1 y PD-L2, que contrarrestan la estimulación del TCR. Este se expresa principalmente en los LT activados tras la estimulación del TCR o la exposición a citoquinas como IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21. Las interacciones con sus ligandos en las CPA o células tumorales conducen a una producción alterada de citoquinas inflamatorias, detención del ciclo celular y disminución de la transcripción de proteínas de supervivencia celular. Por lo general, este no es detectable en tejidos normales por lo que el

bloqueo de los ejes PD-1/PD-L1 ha mostrado respuestas positivas en neoplasias malignas (Toor et al., 2020).

A diferencia de los CTLA-4, que se expresa exclusivamente en los LT, la PD-1 también se expresa en los linfocitos B, lo que sugiere la fuerte implicación de esta molécula en la regulación inmunitaria. Se ha descrito que en pacientes con cáncer de mama los LT reguladores coexpresan niveles elevados de PD-1 y CTLA-4 en el microambiente tumoral para crear un entorno que permita la supervivencia de las células tumorales (Sasidharan Nair & Elkord, 2018).

Los avances en la explotación de la inmunidad antitumoral del huésped para combatir los tumores han presentado efectos prometedores. Sin embargo, se han presentado tres grandes obstáculos: 1) bajo número de LT específicos debido a la eliminación clonal; 2) escasa activación de inmunidad innata y acumulación de CPA tolerogénicas en el microambiente tumoral; 3) formación de un microambiente tumoral inmunosupresor. Otras investigaciones descubrieron mecanismos subyacentes que desarman la inmunidad en el microambiente tumoral como por ejemplo la acumulación de células inmunomoduladoras (macrófagos M2-like, CD inmaduras, LT reguladores y células supresoras) que disminuyen la respuesta inmunitaria de los LT, la expresión de los ligandos del receptor PD-1 (PD-L1/PD-L2), expresión reducida de antígenos tumorales y del MHC en células cancerosas. Estos hallazgos condujeron al desarrollo del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4, la terapia de depleción de LT reguladores y el bloqueo de PIC, incluyendo PD-1 y PD-L1/L2 (Ho & Liu, 2016).

### **3. Muerte celular**

La muerte celular se puede clasificar de distintas maneras, tomando en cuenta cambios morfológicos en las células, el inductor del proceso de muerte, o la activación/supresión de la respuesta inmune. En cuanto a la capacidad de activación o supresión inmune, es importante considerar la importancia del reconocimiento de DAMPs por parte de células inmunes, lo que dicta la diferencia entre la muerte celular "silenciosa" y la muerte celular inmunogénica, esto debido a que los DAMPs se liberan de las células moribundas e inducen respuestas inmunitarias. Esta clasificación aplica de igual manera para las células transformadas, las cuales también pueden activar el sistema inmune. En términos generales, la muerte celular fisiológica o apoptosis es intrínsecamente tolerogénica, mientras que la muerte celular patológica o necrosis es inherentemente inmunogénica y provoca

reacciones inflamatorias. Sin embargo, se ha demostrado que hay apoptosis que pueden ser inmunogénicas y necrosis tolerogénicas (Green et al., 2009).

Entre los diferentes tipos de muerte celular destaca la apoptosis, que es un tipo de “muerte programada” que el organismo utiliza para deshacerse de células que ya no son útiles. Uno de sus rasgos distintivos es que no debe causar ningún daño al tejido; esto se consigue movilizando macrófagos u otras células con capacidad fagocítica para que engullan a la célula moribunda antes de que se descomponga y libere material inmunogénico que provoque inflamación. El envío de señales por parte de las células apoptóticas podría ser un indicativo de que la apoptosis es un evento suicida. Además, no solo se requieren células con capacidad fagocítica, sino también sistemas de circulación sanguínea y linfática que les permitan migrar (Liu et al., 2018).

La apoptosis también es conocida por su papel como mecanismo supresor de tumores, este mecanismo está bien caracterizado y requiere fundamentalmente la activación de las caspasas. No obstante, las células tumorales pueden adquirir resistencias que las dotan de ventajas de supervivencia para promover la evolución y el crecimiento tumoral, así como el fracaso del tratamiento. La característica más conocida de una célula apoptótica es su capacidad para provocar su propia fagocitosis por parte de células tisulares como células dendríticas, fibroblastos, endoteliales y, sobre todo, macrófagos, que son los fagocitos de células apoptóticas. Este proceso requiere señales como la exposición de la fosfatidilserina en la membrana externa generadas por las células moribundas. Aunque la apoptosis sigue siendo el tipo de muerte celular más conocido, existen otros mecanismos como la necroptosis, la piroptosis y la ferroptosis. Estos programas parecen actuar como mecanismos de defensa en tejidos normales, así como en la prevención y erradicación de tumores. (Morana et al., 2022).

Por otro lado, existe la muerte celular senescente que es cuando las células mueren por envejecimiento durante el recambio celular fisiológico. Sin embargo, cuando durante este proceso se genera estrés en la célula *per sé*, como por ejemplo por mutaciones en el ADN, fragmentación cromosómica, entre otros, se da la muerte celular inducida por estrés. En este caso la célula detendrá su proliferación, en la fase G1 o S del ciclo celular, para reparar el ADN; sin embargo, cuando la mutación es irreparable, la célula activa un programa de muerte para suicidarse y que así la mutación no se transmita (Liu et al., 2018).

Cuando el estrés celular es exógeno, causado por factores externos como infecciones, puede llevar a la célula a muerte por necrosis. Este proceso comienza con cambios irreversibles en el núcleo, las mitocondrias y otros orgánulos. Posteriormente las células necróticas pueden fusionarse, haciendo que los contornos de las células individuales sean

indistintos y formando un foco de células gruesas, material granular, amorfo o hialino. Este proceso es considerado un “homicidio” celular debido a que su causante es una fuente exógena. (Liu et al., 2018).

El hecho de que el organismo tenga la intención de minimizar el efecto nocivo de las células muertas en sus cuerpos hace que los macrófagos tengan una doble función en la inflamación: Por un lado, son componentes inflamatorios importantes, pero por otro lado, su función es evitar que se produzca inflamación al deshacerse rápidamente de las células moribundas o muertas (Liu et al., 2018).

### **3.1. Tipos de muerte celular programada**

La capacidad de un organismo para obligar a cualquiera de sus células a morir es un proceso evolutivamente ventajoso que tiene como objetivo salvaguardar al organismo en su conjunto. Durante muchos años, la muerte celular ha sido sinónimo del término "apoptosis"; sin embargo, numerosos estudios han descubierto la existencia de modos contextualmente diferentes de muerte celular programada o regulada (MCP). Sin embargo, dado que sólo las más importantes en el contexto del cáncer son la apoptosis, entosis, necroptosis, piroptosis y ferroptosis (Koren et al., 2021).

#### **3.1.1. Apoptosis**

De los diversos tipos de MCP, la apoptosis es el mejor conocido y estudiado, se manifiesta con cambios en la morfología de la célula, como la formación de burbujas en la membrana, la fragmentación nuclear y la descomposición del ARNm. Los restos finales de la célula se empaquetan en cuerpos apoptóticos, que son rápidamente eliminados por los fagocitos en un proceso denominado esferocitosis. La apoptosis puede ser tanto inmunogénica como no inmunogénica, mientras que la necroptosis y la piroptosis, estimulan una respuesta proinflamatoria. Para la ejecución de la apoptosis es fundamental la activación de las caspasas ejecutoras, que median la escisión proteolítica de proteínas vitales dentro de la célula. La forma en que una célula moribunda alcanza este punto de ejecución puede lograrse a través de dos mecanismos interconectados: las vías intrínseca (mitocondrial) y extrínseca (receptor de muerte) (Koren et al., 2021).

#### **3.1.2. Entosis**

La entosis deriva del griego *entos* que significa “dentro” y se ve facilitada por las cadherinas, que permiten a las células penetrar activamente en las células vecinas. A diferencia de la fagocitosis, que depende de la exposición a señales, las células entóticas invasoras proporcionan la fuerza motriz para la entrada celular mediante la contracción de actomiosina. Tras la ingestión, las células entóticas internalizadas son eliminadas por sus

huéspedes a través de la vacuola asintótica, una membrana endocítica, que rodea a la célula invasora. Las proteínas de la maquinaria de la autofagia intervienen en la maduración de la vacuola entótica, que procede a la fusión de los lisosomas, la degradación y la muerte de la célula invasora. (Koren et al., 2021).

### **3.1.3. Necroptosis**

La necroptosis puede iniciarse en respuesta a estrés celular, daño o infección a través de varios medios. Acontecimientos como el bloqueo de la actividad catalítica de las caspasas o inhibición de la apoptosis inclinan la muerte celular hacia la formación del necrosoma. Este sirve como un eficaz "modo de reserva" para eliminar las células dañadas o infectadas, así como para alertar adecuadamente al sistema inmunitario (Koren et al., 2021).

### **3.1.4. Piroptosis**

La muerte celular piroptótica representa una interesante modalidad de necrosis que es utilizada principalmente por las células inmunitarias innatas en respuesta a perturbaciones celulares, daños y señales inducidas por patógenos. Se manifiesta con la activación de miembros de la superfamilia gasdermina (GSDM), principalmente GSDMD y GSDME, que se oligomerizan para crear grandes poros en la membrana plasmática. Tras su formación, se liberan factores proinflamatorios, la célula se hincha y la membrana se rompe. La activación de la GSDMD está mediada en gran medida por las caspasas inflamatorias (Koren et al., 2021).

### **3.1.5. Ferroptosis**

La ferroptosis *per sé* no es exactamente una forma de suicidio celular, sino una forma de autolesión que puede conducir a la muerte, provocada por la oxidación extrema y la destrucción de los lípidos de la membrana plasmática. Es un proceso dependiente del hierro y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en donde los átomos de hierro libres dentro de la célula reaccionan con el peróxido de hidrógeno promoviendo la oxidación excesiva de los ácidos grasos poliinsaturados. Las células ferroptóticas muestran morfologías celulares distintas, incluyendo la ausencia o reducción o de la cresta interna mitocondrial. El secuestro de átomos de hierro libres y la eliminación de ROS, así como la limitación de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados pueden servir como medidas de protección a las células contra la ferroptosis. Actualmente, la ferroptosis representa un módulo intrigante en la terapia del cáncer, ya que parece que muchos tipos de cáncer desactivan la maquinaria ferroptótica para su supervivencia (Koren et al., 2021).

## **3.2. Muerte celular inmunogénica**

En los últimos años ha surgido el concepto de muerte celular inmunogénica (MCI), es decir, una modalidad de muerte celular que estimula una respuesta inmune contra los antígenos de células muertas, en particular cuando estos antígenos se derivan de células cancerosas. Este modelo se propuso por primera vez en el contexto de la quimioterapia contra el cáncer, basado en evidencia clínica que indica que las respuestas inmunitarias específicas del tumor pueden determinar la eficacia de las terapias contra el cáncer con fármacos citotóxicos convencionales (Kroemer et al., 2013).

Varios elementos como la antigenicidad de la célula moribunda, su estrés antes de morir, las propiedades de la entidad inductora de muerte y la disponibilidad de células inmunes trabajan juntos para determinar si la muerte celular es inmunogénica o no. Las células cancerosas pueden seguir la vía fisiológica para morir, o incluso imitar aspectos de la apoptosis (exposición de fosfatidilserina para ocultar los DAMPS), por lo que niveles aumentados de apoptosis se asocian con un peor pronóstico. (Pitt et al., 2017).

Aunque la apoptosis se considera un evento inmunológicamente "silencioso", ciertos estímulos pueden inducir subtipos de apoptosis que provocan respuestas inmunitarias contra los componentes de la célula moribunda. Entre ellos el uso de algunos agentes quimioterapéuticos y de radioterapia pueden alterar el infiltrado inmunitario en los tumores, un buen ejemplo es cómo ciertos agentes contra el cáncer aumentan la proporción de LT. Un aumento de LT se correlaciona con una respuesta terapéutica favorable; con las células T helper (Th1) productoras de IFN- $\gamma$ , mediador clave de la erradicación tumoral, al igual que la producción de IL-17 por parte de los LT  $\gamma\delta$ . La infiltración tumoral de esta población de linfocitos es un prerrequisito para la posterior acumulación de células NK capaces de detectar y transformar las señales de muerte celular en respuestas de LT antitumorales (Pitt et al., 2017). Es por esto que el desarrollo del cáncer depende en gran parte del microambiente tumoral, ya que tiene una composición heterogénea que abarca diferentes linajes celulares con diversos niveles de diferenciación como células neoplásicas, endoteliales, inmunitarias, entre otras. Las células apoptóticas atraen y polarizan a los macrófagos hacia estados de activación reparadora y regenerativa tipo M2. Es probable que entre los factores desencadenantes de la apoptosis en el microambiente tumoral se encuentren la deficiencia de nutrientes y oxígeno por una proliferación de células tumorales superior a la angiogénesis, donde clones malignos no logran sobrevivir porque carecen de las características de las células cancerosas necesaria para su supervivencia (Morana et al., 2022).

Entre las posibles señales inmunogénicas procedentes de células moribundas se encuentran las proteínas que aparecen en la superficie de estas, como la calreticulina, las

proteínas de choque térmico y las moléculas lipídicas que se desplazan de la lámina interna de la membrana plasmática a la externa, como la fosfatidilserina. Estos DAMPs se liberan o se exponen en la superficie de las células moribundas y determinan la endocitosis por parte de las células apoptóticas, la activación de las células CD, el desarrollo de antígenos y la formación de anticuerpos. El receptor de reconocimiento de patrones se expresa en las CD y reconoce algunos DAMPs que estimulan la captación de antígenos (Green et al., 2009).

Muchos inductores de MCI son quimioterapéuticos que no sólo destruyen las células cancerosas, sino que también provocan la liberación de señales inmunogénicas. Estas señales son un componente clave asociado con la liberación de DAMPS, así como con la activación del sistema inmune, y que llevan a las CD a madurar y reconocer mediadores inflamatorios o antígenos liberados por las células cancerosas moribundas (Schowalter, 2017).

Sin embargo, la endocitosis de células apoptóticas puede impedir la maduración de las CD, dejándolas en un estado inmaduro tolerogénico. Además, las CD pueden presentar material apoptótico a los LT CD8+, lo que puede llevar a inmunosupresión, debido a que no las presentan a los LT CD4+, sino solo a los LT CD8+. La muerte celular inducida por la activación del ligando de muerte TRAIL (TNF-inductor de apoptosis relacionado a ligando), que lleva a la apoptosis de los LT mal activados. Durante la apoptosis, los ROS oxidan un residuo cisteína en la proteína de caja del grupo de alta movilidad 1 (HMGB1). Esto hace que la HMGB1 sea ineficaz para promover respuestas inmunitarias. La liberación de mediadores inmunosupresores por las células apoptóticas garantiza un microentorno tolerogénico (Pitt et al., 2017).

La mayoría de los agentes que causan MCI son capaces de desencadenar la liberación de citocinas de las células inmunitarias, donde destacan la liberación de IFN- $\gamma$  y de los LT citotóxicos que promueven la inmunidad antitumoral. Otras citocinas liberadas son los mediadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6, que al activar el sistema inmune, le permiten actuar eficazmente contra los tumores (Schowalter, 2017).

#### **4. Tratamiento**

Existen diferentes opciones para el tratamiento del cáncer de mama, como la mastectomía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, entre otras, y su uso radica en función de las características clínico-patológicas individuales. Por ejemplo, la mastectomía se utiliza para cáncer en etapas tempranas con intención curativa, mientras que los fármacos convencionales pueden emplearse como agente único o en combinaciones para minimizar el riesgo de recurrencia. En el caso de tumores con ER+ o HER2+, el tamoxifeno o el



trastuzumab, respectivamente, contribuyen a mejorar sustancialmente la tasa de supervivencia a largo plazo (Bai et al., 2018).

Los tratamientos quimioterapéuticos reducen eficazmente la masa tumoral, sin embargo, los pacientes pueden presentar recaídas. Las CSC impulsan la aparición de tumores y dan lugar a una progenie diferenciada que constituye el grueso del tumor; estos contienen un pequeño número de células madre autorrenovables que, a diferencia de la mayoría de las células tumorales, son resistentes a la quimioterapia, por lo que tras el tratamiento pueden regenerarse. Por este motivo, los fármacos que se dirijan a las células madre cancerosas son muy prometedores para el tratamiento del cáncer (Hirsh et al., 2009). La terapia sistémica neoadyuvante, se ha popularizado para el cáncer de mama en estadio precoz o localmente avanzado, su objetivo principal es reducir el estadio del tumor para lograr una cirugía menos agresiva, con menos complicaciones postoperatorias y mejores resultados (Rojas, 2016). Entre los tratamientos mayormente utilizados como terapia neoadyuvante se encuentran el Paclitaxel y la Epirubicina.

Por otra parte, las estrategias diseñadas para aprovechar el sistema inmunitario son el foco de varios tratamientos, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales diseñados para interrumpir las señales inhibitorias recibidas por los LT a través de CTLA-4 ha demostrado beneficios en la supervivencia a largo plazo de algunos pacientes con metástasis (Beatty & Gladney, 2014). Su objetivo es generar una respuesta inmunitaria robusta, estimulando los linfocitos para erradicar las células tumorales (Schowalter, 2017).

Además, las pruebas acumuladas sugieren que el bloqueo de vías clave de los PCI puede inducir una inmunidad antitumoral eficaz, ya que les permiten a las células T reactivas al tumor superar los mecanismos inhibidores reguladores y generar respuestas antitumorales eficaces; por lo tanto, PD-1, PDL-1 y CTLA-4 han surgido como los principales blancos terapéuticos. Los pacientes tratados con IPIC se clasifican en tres categorías: respondedores, no respondedores y los que mostraron una respuesta inicial seguida de progresión de la enfermedad. La generación inadecuada o defectuosa de LT podría ser responsable del fracaso de las IPIC (Toor et al., 2020).

Uno de los principales obstáculos para que la inmunoterapia contra el cáncer sea más eficaz radica en un concepto básico de biología celular: el metabolismo. Este campo está cobrando impulso gracias a la constatación de que una remodelación metabólica defectuosa subyace a respuestas inmunitarias anti tumorales deficientes. Además se ha observado que el control del metabolismo puede mejorar la inmunidad antitumoral y sinergizar con los inhibidores de puntos de control existentes (Verdura, 2019).

A pesar de los avances en el diagnóstico precoz y la terapéutica dirigida, un factor importante que limita el éxito del tratamiento es el establecimiento de resistencia a la quimioterapia. Los mecanismos de quimiorresistencia son múltiples y pueden estar influenciados por numerosos factores relacionados con la farmacología sistémica individual, así como con propiedades adquiridas por las células cancerosas. Entre ellas se incluyen modificaciones en la farmacocinética celular, que conducen a la activación/inactivación del fármaco, interacciones fármaco-objetivo, mecanismos de reparación de daños en el ADN, evasión de la apoptosis y resistencia al estrés oxidativo inducido por fármacos (Marinello et al., 2019).

A nivel clínico uno de los fármacos más utilizados para tratar tumores sólidos es la doxorubicina. Este ha tenido un éxito relativo en el tratamiento del cáncer de mama, sin embargo, se ha descrito como un potente inductor de quimiorresistencia. Por su parte, la metformina ha presentado efectos antiproliferativos en numerosos subtipos de cáncer de mama y se ha demostrado que puede sensibilizar a las células multirresistentes (Marinello et al., 2019).

#### **4.1. Metformina**

En la década de 1920, se observó que los tumores absorbían enormes cantidades de glucosa en comparación con el tejido circundante y que esta se fermentaba para producir lactato, incluso en presencia de oxígeno; dicha situación originó el término "glucólisis aeróbica". Sin embargo, se observó que la respiración por sí sola podía mantener la viabilidad del tumor; lo que llevó a la conclusión de que, para eliminar las células tumorales mediante la privación de energía, había que suprimir tanto la glucosa como el oxígeno (Liberti, 2016).

La metformina, una reconocida biguanida, es el fármaco de primera línea para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), es un hipoglucemiante oral que reduce muy eficazmente la gluconeogénesis hepática, mejora la sensibilidad a la insulina potenciando la captación periférica de glucosa y disminuye tanto la glucosa plasmática basal como la posprandial. Este fármaco antidiabético se considera uno de los reductores de la glucosa más seguros, causa acidosis láctica en pocos pacientes, pero se puede superar fácilmente controlando la función renal. La metformina también tiene actividad antiinflamatoria, antiapoptótica, anticancerígena, entre otras (Anindita, et al., 2020).

Se ha demostrado que la metformina actúa sobre el cambio metabólico que impulsa la expansión de los LT CD8 + de memoria, ya que facilita el cambio de un estado anabólico dependiente de glucosa a un estado catabólico. La presentación crónica y repetida de antígenos tumorales a los TCR conduce a la pérdida gradual de su capacidad para secretar

múltiples citoquinas y finalmente llevan a apoptosis en un proceso conocido como agotamiento inmunitario (Verdura, 2019). Este agotamiento va acompañado de cambios fenotípicos en los LT CD8<sup>+</sup>, incluida la expresión de marcadores de agotamiento como la molécula de punto de control inmunitario PD-1. Se ha demostrado que la metformina protege a los LT CD8<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> de la apoptosis al tiempo que restaura la producción de citoquinas mediante su conversión de un fenotipo LT de memoria central a un fenotipo de LT efectores de memoria totalmente activos contra los tumores que circulan principalmente en sangre, bazo y tejidos periféricos (Verdura, 2019).

Un análisis sobre pacientes con carcinoma de mama en fase inicial que tomaban metformina sugirió que las pacientes diabéticas que recibían quimioterapia neoadyuvante tenían una tasa de respuesta mayor, en comparación con las pacientes que tomaban otros fármacos para la diabetes (De A, et al., 2019). Además, Hirsch et al., 2009, muestran que la metformina tuvo una actividad sinérgica junto con los agentes quimioterapéuticos dirigidos contra las células madre del cáncer de mama en modelos *in vitro* e *in vivo*. La reducción de la insulina circulante podría regular el desarrollo del cáncer y el estadio en el momento del diagnóstico en mujeres diabéticas con cáncer de mama (De A, et al., 2019).

La metformina aumenta la captación de glucosa por el músculo, lo que reduce el nivel de insulina en plasma y contribuye a reducir la proliferación de células tanto preneoplásicas como neoplásicas (De A, et al., 2019). La metformina se cree que podría ejercer parte de su acción a través de una interacción directa con la mitocondria al inhibir el complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto lleva a una disminución en la producción de adenosín trifosfato (ATP) por parte de la mitocondria y por lo tanto al aumento en la cantidad de adenosín monofosfato (AMP). Este aumento en la concentración de ADP es asociado a una disminución en la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), en el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna y en la tasa de consumo de oxígeno (Foretz, et al., 2019).

La metformina necesita un transportador catiónico orgánico para entrar en las células. Sin embargo, no se metaboliza, sino que se elimina en su forma original a través de los riñones. El mecanismo clave de su actividad anti-hiperglucémica se basa en la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado, lo que se traduce en una disminución de los niveles de glucosa en sangre. Como las células cancerosas presentan un mayor consumo de glucosa, el uso de metformina podría controlar eficazmente el desarrollo del cáncer debido a que causa estrés energético en las células al inhibir la función mitocondrial, lo que reduce el metabolismo de la glucosa a través del ciclo del ácido cítrico (Zhao et al., 2020).

La proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) es una proteína cinasa heterotrimérica de serina/treonina que actúa como un sensor de energía celular que mantiene el equilibrio energético dentro de la célula y ha demostrado tener un papel en la inhibición de la proliferación de células tumorales. Lleva a cabo su actividad antitumorogénica de múltiples maneras, incluyendo la detención del ciclo celular asociada a la estabilización de p53. Así mismo produce la inhibición del crecimiento celular mediante la supresión de la síntesis de macromoléculas celulares, incluyendo ácidos grasos, triglicéridos, colesterol, glucógeno, ARN ribosomal y proteínas. Mecánicamente, inhibe el complejo pro-oncogénico diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) y, por tanto, dificulta la traducción de muchas proteínas esenciales para el rápido crecimiento celular. Sus efectos indirectos se traducen en la atenuación de las vías insulina/IGF-1, que se sabe que están reguladas al alza en muchos tipos de cáncer (Al-Wahab et al., 2015).

A medida que se ha ido avanzando con los estudios, se han descubierto varios mecanismos de acción de la metformina. Ejemplo de ello es la supresión del crecimiento de las células cancerosas al detener el ciclo celular. La metformina es transportada al interior de las células hepáticas en donde genera estrés y activación de la vía AMPK. Esta vía activa la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis hepática, esto lleva a un aumento del consumo de glucosa en los hepatocitos y por lo tanto disminuye su disponibilidad en circulación, lo que lleva a una disminución del crecimiento tumoral (Zhao et al., 2020).

Los niveles elevados de glucosa inducen el crecimiento tumoral y están relacionados con la resistencia a la quimioterapia, por lo que la acción antiproliferativa y apoptótica de la metformina depende de la concentración de glucosa (De A. et al., 2019). Además, Menéndez et al., 2012 describió que la metformina es "sintéticamente letal" en ausencia de glucosa en el carcinoma de mama, por lo que sugirió que la glucosa es un factor crítico para la apoptosis de las células cancerosas, esto debido a que en circunstancias de alto nivel de glucosa, la metformina sólo provoca la detención de la proliferación celular. No obstante, en situaciones de estrés por privación de glucosa, la metformina eludió la capacidad de los oncogenes para proteger a las células de carcinoma de la apoptosis.

En resumen, las propiedades anticancerígenas de la metformina podrían explicarse por su efecto sobre la proliferación de células tumorales y su regulación metabólica. Un estudio in vivo demostró que la metformina reduce el volumen y el peso de los tumores, así como también disminuye la migración tumoral (Xiao et al., 2017). Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado, si la mejoría en la respuesta clínica inducida por la Metformina en combinación con agentes quimioterapéuticos está relacionada a una regulación inmunológica

directa desencadenada durante el proceso citotóxico que activa una respuesta inmune antitumoral.

#### **4.2. Paclitaxel**

La mayoría de los fármacos sistémicos utilizados en el tratamiento del cáncer son hidrofóbicos, no dirigidos y tóxicos, por lo que provocan graves efectos secundarios. En los últimos años, los dos principales agentes quimioterapéuticos utilizados en el cáncer de mama avanzado han sido las antraciclinas (doxorrubicina y daunorrubicina) y los taxanos (paclitaxel y docetaxel). Sin embargo, provocan efectos secundarios graves, por ejemplo, la doxorrubicina y la daunorrubicina tienen efectos cardiotoxicos mortales, mientras que el paclitaxel y el docetaxel provocan reacciones de hipersensibilidad, neurotoxicidad y supresión de la médula ósea (Ansari et al., 2021).

El paclitaxel pertenece a la familia de fármacos citoesqueléticos dirigidos contra los microtúbulos y su efecto se basa principalmente en su mecanismo apoptótico, este promueve la polimerización de los heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina incluso si los factores necesarios para el ensamblaje de los microtúbulos (por ejemplo, el trifosfato de guanina, GTP) están ausentes. Además, suprime la despolimerización de los microtúbulos y, por lo tanto, bloquea el ciclo celular en las interfases G0/G1 y G2/M para inhibir la división celular y, finalmente, conducir a la apoptosis celular, sin embargo, sus efectos apoptóticos dependen en gran medida de la dosis y el tiempo de exposición (Ansari et al., 2021). Los taxanos también bloquean los efectos antiapoptóticos de la familia de genes BCL-2 e inducen la activación del gen TP53, con la consiguiente detención mitótica que conduce a la muerte celular (Vishnu & Roy, 2011).

El tratamiento con paclitaxel también estimula la generación de radicales de oxígeno y la acumulación de hidróperóxido en las células cancerosas mediante la mejora de la actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa; esto conduce a su potente efecto anticancerígeno. También se ha demostrado que una combinación de paclitaxel y metformina previene el crecimiento de células de cáncer e induce su apoptosis mediante el aumento de los radicales de oxígeno intracelulares y la reducción del potencial de membrana mitocondria (Ansari et al., 2021).

#### **4.3. Epirubicina**

Las antraciclinas son la piedra angular de la quimioterapia contra el cáncer de mama, las más utilizadas son la doxorrubicina y la epirubicina. No obstante, presentan varios efectos adversos como cardiotoxicidad, supresión ósea, bajo recuento de células que puede llevar a de leucemia secundaria y la caída del cabello. Aunque, la epirubicina es

terapéuticamente equivalente a la doxorrubicina, tiene un perfil de toxicidad más favorable (Khasraw et al., 2012). Además, ha sido probada como tratamiento de primera elección contra el cáncer de mama localmente avanzado, y ha demostrado beneficios al permitir la erradicación de micrometástasis y la reducción del volumen del tumor primario, facilitando así la resección quirúrgica total o parcial del tumor (Ramírez-Torres et al., 2016).

La epirubicina forma complejos con el ADN intercalándose entre pares de bases, e inhibiendo la actividad de la topoisomerasa II al estabilizar el complejo ADN-topoisomerasa II. Esto provocará la inhibición de la replicación del ADN y, en última instancia, impedirá la síntesis de ARN y proteínas. En las últimas décadas, la administración de nanofármacos podría superar varias limitaciones de las terapias convencionales, como la escasa solubilidad en agua, la biodistribución inespecífica y la biodisponibilidad limitada del fármaco (Fathian et al., 2019).

## **Metodología**

### **1. Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular MCF7 proveniente de cáncer de mama humano, la cual se cultivó en medio RPMI 1640 (1x), suplementado con glutamax, anti – anti (Antibiótico y antimicótico) y suero fetal bovino (SFB) al 10% en frascos de cultivo T25. Estas se incubaron a 37°C en una atmósfera con una concentración de CO2 al 5%.

### **2. Estimulación celular**

Se utilizaron placas adherentes de 6 pocillos donde se sembraron aproximadamente 500 000 células/pocillo y se rotularon de la siguiente manera

Control	Epirubicina	Epirubicina + Metformina
Metformina	Paclitaxel	Paclitaxel + Metformina

Al siguiente día se estimularon las células correspondientes con metformina a una concentración de 2.5 mM y al resto de los pocillos se les agregó RPMI. Posteriormente las células se trataron con las quimioterapias respectivas, la concentración utilizada de paclitaxel y epirubicina es de 2.56 y 0.27 ug/ml respectivamente. A las 24 horas se recolectaron los sobrenadantes obtenidos después de la estimulación.

### **3. Preparación de medio condicionado**

Se sembraron las células en 6 placas de 10 cm que se rotularon de la siguiente manera 1) control, 2) metformina, 3) epirubicina, 4) paclitaxel, 5) epirubicina + metformina, 6) paclitaxel + metformina. Al día siguiente las correspondientes se estimularon con metformina y posteriormente se les agregó paclitaxel o epirubicina según fuera el caso en concentraciones de 2.56 y 0.27 ug/ml respectivamente. Posteriormente, se realizaron lavados con 500 ul de PBS estéril y se añadió medio fresco a cada placa por 24 horas adicionales. El medio condicionado se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

### **4. Estimulación celular de MCF7 a partir del medio condicionado**

Se sembraron placas de 6 pozos con la línea celular MCF-7 hasta tener una confluencia del 80-90%. Las células se estimularon con el medio condicionado de los diferentes tratamientos quimioterapéuticos según lo explicado en el apartado 2.3 y se incubaron por 2 horas. Luego, se removió el medio y se realizaron dos lavados con 500 ul de PBS estéril. Posteriormente, se agregó medio de recolección y se realizaron 2 tiempos de incubación, a las 2 y 24 horas. Pasado el tiempo, se recogió el sobrenadante y se depositó en tubos estériles rotulados según cada tratamiento quimioterapéutico y se guardaron las células cultivadas en monocapa para realizar el procedimiento de extracción de ARN.

## **5. Extracción de ARN**

Se cultivaron células en monocapa en dos placas de 6 pozos, una se incubó por 2 horas y otra por 24 horas, se recolectaron y lisaron con el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) en tubos estériles, a los cuales se les añadió cloroformo y se mezclaron suavemente por inversión.

Todo procedimiento en que se utilizó el TRIzol y el cloroformo se realizó en la capilla de extracción de gases. Las muestras se centrifugaron para obtener la separación de las fases y se recolectó la fase acuosa (superior) que contiene principalmente el ARN. La fase con ARN se traspasó a un tubo nuevo al cual anteriormente se le añadió el isopropanol. Se incubó, centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 2 lavados al pellet obtenido con etanol frío al 75%. Nuevamente se llevó a cabo la centrifugación de las muestras y se resuspendió el pellet por pipeteo en agua libre de ARNasas. Concluida la solubilización, se determinó el rendimiento y la pureza del ARN obtenidos utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher) mediante la relación de las absorbancias a 260/280 nm y a 260/230 nm la pureza de la muestra.

## **6. Cuantificación de los niveles de expresión de los puntos de control inmunológico**

Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real a partir del kit comercial Power Up SYBR™ Green Master mix de la casa comercial Thermo fisher Scientific (catálogo: A25742), siguiendo las especificaciones del fabricante.

## **7. Cuantificación de citoquinas**

Se realizó la cuantificación de un panel de citoquinas mediante citometría de flujo incluyendo IL-8, IP-10 y MCP-1. Se utilizaron los kits comerciales Flex Set Cytometric Bead Array de BD Biosciences de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las muestras se



analizaron en el citómetro de flujo Cytoflex LX (Beckman Coulter). El análisis y cuantificación de la IL-38 se realizó mediante un ELISA que se describe a continuación.

#### Cuantificación de la secreción de interleuquina-38

Por medio del protocolo de la técnica de inmunoensayo (ELISA) para la determinación de IL-38 del Laboratorio de Quimiosensibilidad Tumoral del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) se llevó a cabo la cuantificación de secreción de la IL-38. Se realizó un recubrimiento de las placas para ELISA con los estándares y las muestras, las cuales corresponden a los sobrenadantes obtenidos de los experimentos correspondientes y se realizó una incubación por una noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, se realizó el recubrimiento de la placa con el anticuerpo primario de IL-38, seguido del anticuerpo anti-rata biotinilado, la adición de peroxidasas (HRP) y del sustrato, con los tiempos de incubación establecidos, Por último, se realizó la medición de la absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia a 630 nm

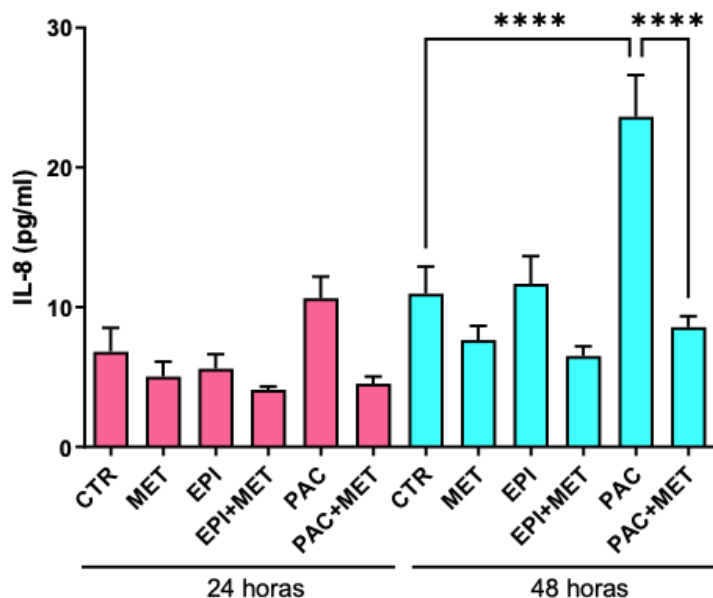
#### **8. Análisis de datos**

Los datos se analizaron para lograr determinar los valores de citoquinas liberadas por las células utilizando el programa de análisis del Cytoflex LX (Beckman Coulter). Los resultados obtenidos se graficaron y analizaron utilizando el programa Graph Pad, donde se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre los grupos experimentales.

## Resultados

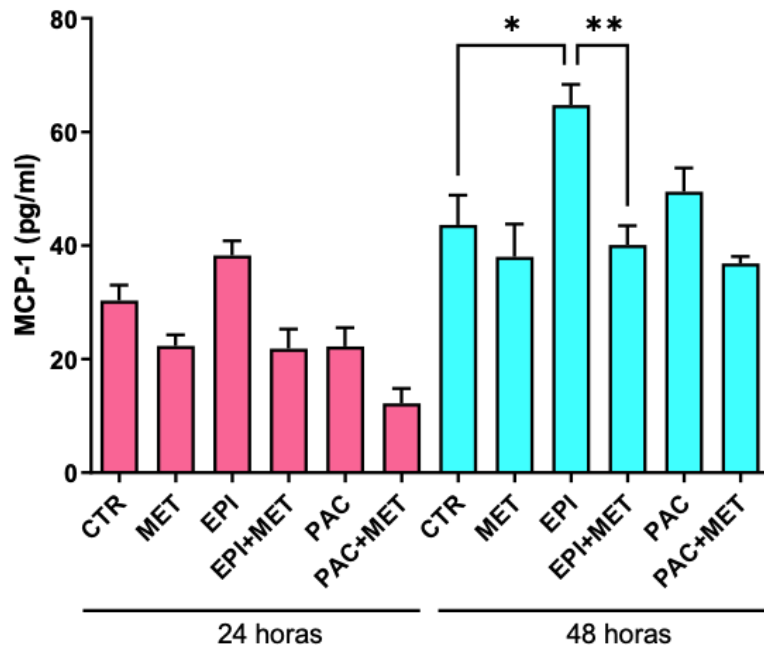
### 1. Concentración de citoquinas liberadas al estimular la línea celular MCF-7 con las distintas quimioterapias con metformina durante 24 y 48 horas.

Al finalizar la estimulación de 24 y 48 horas de la línea celular MCF-7 con epirubicina y paclitaxel en presencia o ausencia de metformina, se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de citoquinas IL-8, MCP-1, e IP-10 liberadas en cada pocillo durante este tiempo utilizando el citómetro de flujo Cyto Flex LX.



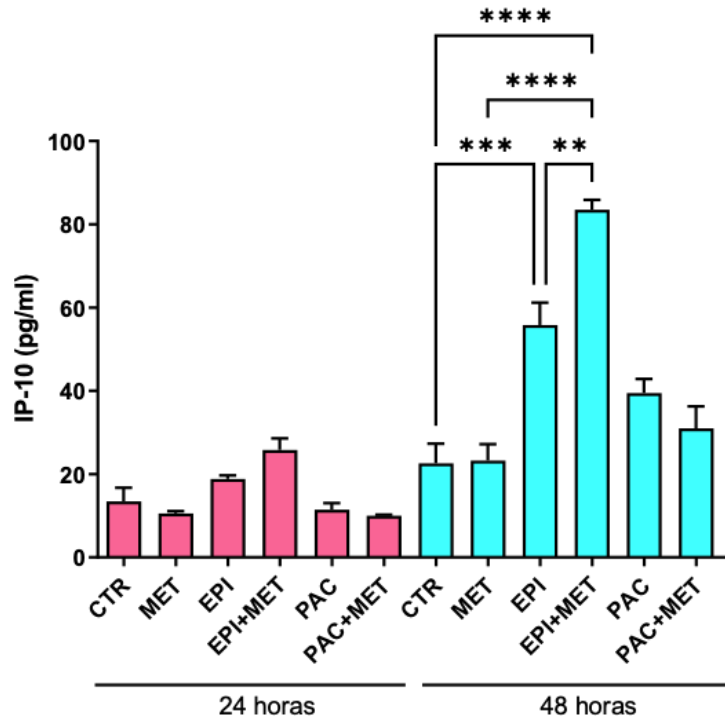
**FIGURA 7. Concentración de IL-8 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia.** La línea celular MCF-7 se estimuló con paclitaxel, epirubicina y metformina durante incubaciones de 24 y 48 horas. La concentración de IL-8 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar, n=5) Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. \*\*\*\*p<0.0001

En este caso, se puede observar que a manera de tendencia la concentración de IL-8 liberada por las células estimuladas solamente con paclitaxel es mayor en comparación con la que liberan las células al ser tratadas con la quimioterapia más metformina, esto se observa tanto a las 24 como a las 48 horas; sin embargo esta diferencia en la concentración de IL-8 se vuelve estadísticamente significativa a las 48 horas de incubación (Figura 7).



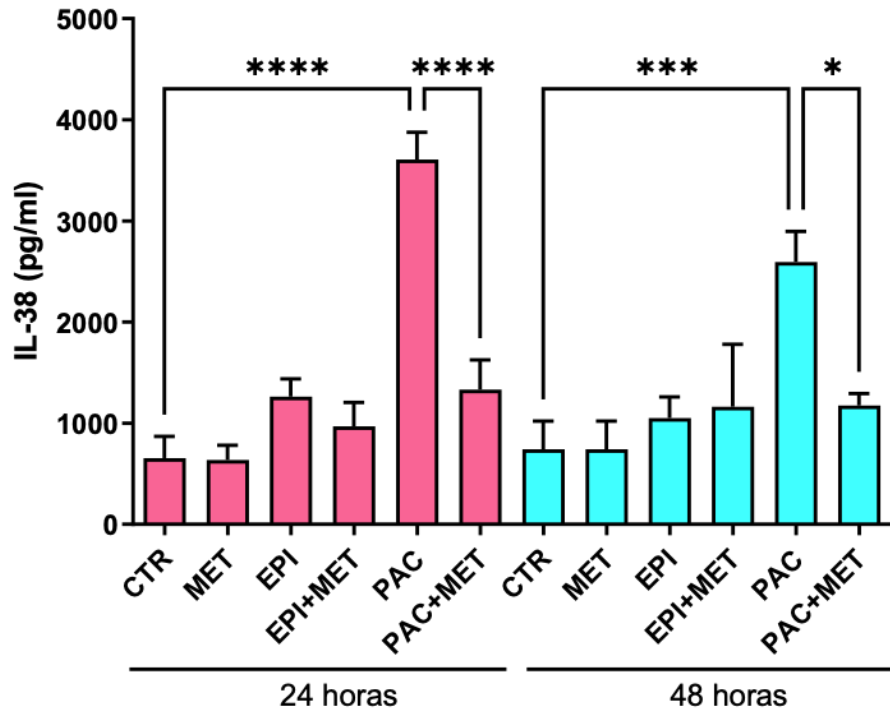
**FIGURA 8. Concentración de MCP-1 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia.** La línea celular MCF-7 se estimuló con paclitaxel, epirubicina y metformina durante incubaciones de 24 y 48 horas. La concentración de MCP-1 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar, n=5) Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

En el caso de MCP-1 se puede observar que la concentración liberada por las células estimuladas solamente con epirubicina es mayor en comparación con la que liberan las células al ser tratadas con la quimioterapia más metformina, esto es estadísticamente significativo a las 48 horas (Figura 8).



**FIGURA 9. Concentración de IP-10 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia.** La línea celular MCF-7 se estimuló con paclitaxel, epirubicina y metformina durante incubaciones de 24 y 48 horas. La concentración de IP-10 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar, n=5) Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001.

Por otro lado, se analizó la liberación de IP-10 por parte de la línea celular, en donde se observa que la concentración liberada por las células estimuladas solamente con epirubicina es menor en comparación con la que liberan las células al ser tratadas con la epirubicina más metformina. Esto se observa tanto a las 24 como a las 48 horas, no obstante, estas diferencias adquieren significancia estadística hasta después de las 48 horas del estímulo. En el caso de las células estimuladas con paclitaxel no se observan diferencias en las concentraciones de IP-10 liberadas (Figura 9).



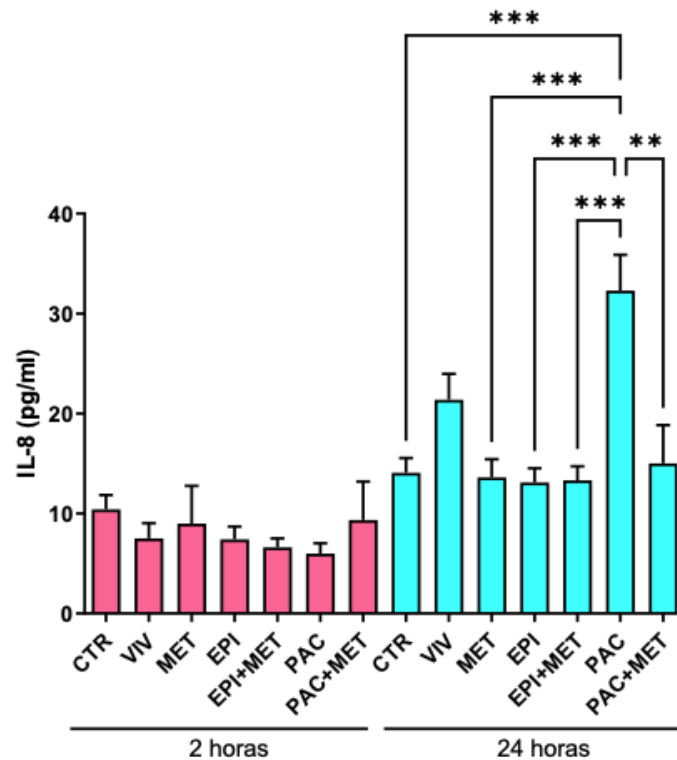
**FIGURA 10. Concentración de IL-38 liberada por las células luego de ser estimuladas con quimioterapia.** La línea celular MCF-7 se estimuló con paclitaxel, epirrubicina y metformina durante incubaciones de 24 y 48 horas. La concentración de IL-38 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar,  $n=5$ ) Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ .

Finalmente, se analizó la liberación de IL-38 por parte de la línea celular MCF 7, en donde se observa que la concentración de la interleuquina liberada por las células estimuladas solamente con paclitaxel es mayor en comparación con la liberada las células al ser tratadas con paclitaxel más metformina, esto se observa tanto a las 24 como a las 48 horas. En el caso de las células estimuladas con epirubicina no se observan diferencias en las concentraciones de IL-38 liberada (Figura 10).

## 2. Concentración de citoquinas liberada al estimular la línea celular MCF-7 con el medio condicionado durante 2 y 24 horas.

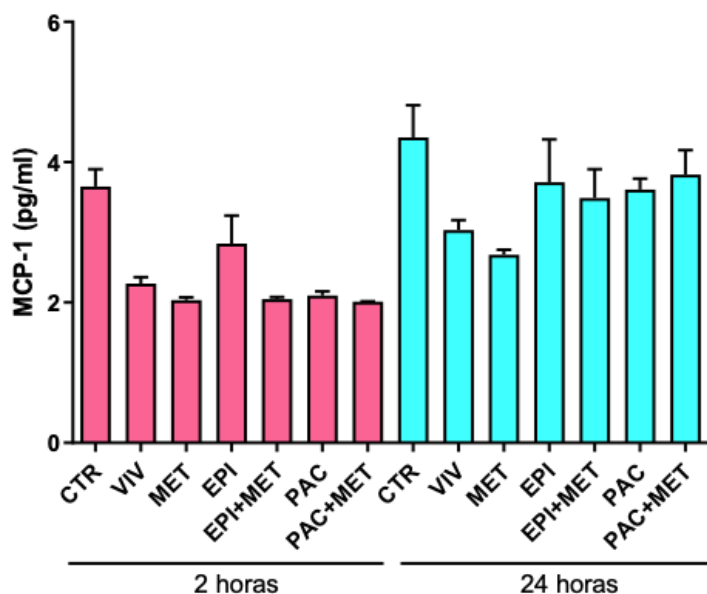
Tomando en cuenta los resultados anteriores, y debido a que las concentraciones de quimioterapias utilizadas inducen alrededor de un 50% de muerte celular (Según fue

determinado en estudios anteriores). Para cumplir con el objetivo 2 de este trabajo se determinó si la concentración de citoquinas liberadas se da por parte de las células que están en proceso de muerte celular o por parte de las células que permanecen viables en respuesta a los DAMPs liberados.



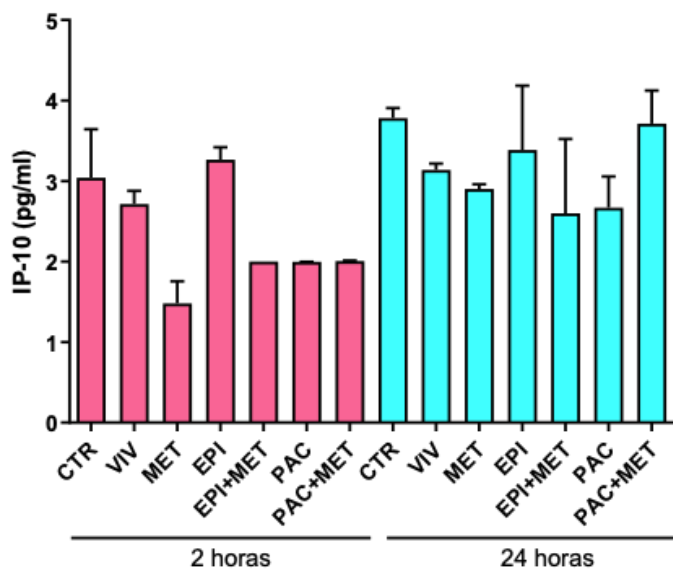
**FIGURA 11. Concentración de IL-8 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.** La línea celular MCF-7 se estimuló con el medio condicionado y se incubó durante 2 y 24 horas. La concentración de IL-8 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar,  $n=5$ ). Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

En este caso, se puede observar que la concentración de IL-8 liberada por las células tras ser estimuladas con el medio condicionado de células tratadas con paclitaxel es mayor en comparación con la que liberan células viables estimuladas con esta quimioterapia en combinación con metformina (Figura 11), con un patrón similar al observado anteriormente en la Figura 8.



**FIGURA 12. Concentración de MCP-1 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.** La línea celular MCF-7 se estimuló con el medio condicionado y se incubó durante 2 y 24 horas. La concentración de MCP-1 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar, n=5) Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey

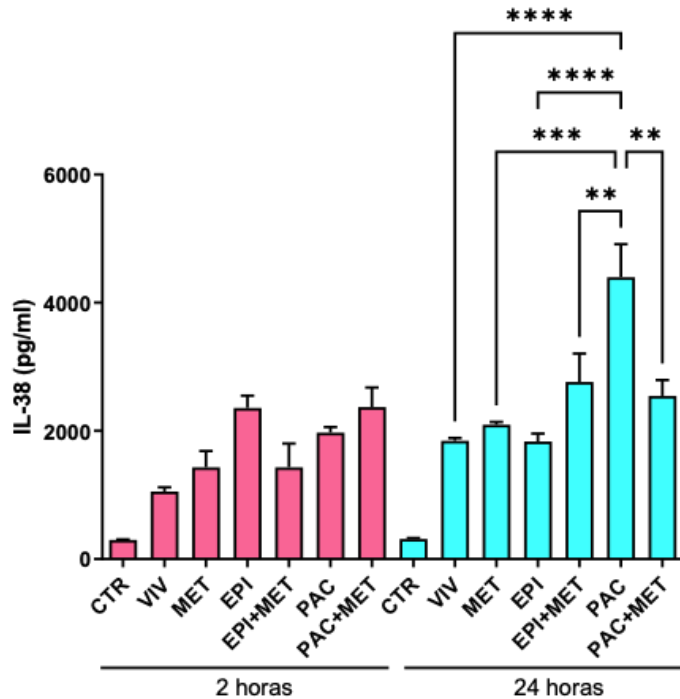
Con respecto a MCP-1 (Figura 12) no se observan diferencias en la concentración liberada por las células al ser estimuladas con el medio condicionado con los diferentes tratamientos. Adicionalmente, las concentraciones liberadas son sumamente bajas en comparación con las mostradas en la figura 8.



**FIGURA 13. Concentración de IP-10 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.** La línea celular MCF-7 se estimuló con el medio condicionado y se incubó durante 2 y 24 horas. La concentración de IP-10 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar,  $n=5$ ). Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

Con respecto a IP-10, en la figura 13 se observa un resultado similar al MCP-1, donde no se presentan diferencias entre los distintos tratamientos. Además, las concentraciones liberadas son sumamente bajas en comparación con las mostradas en la figura 9 de la parte uno.

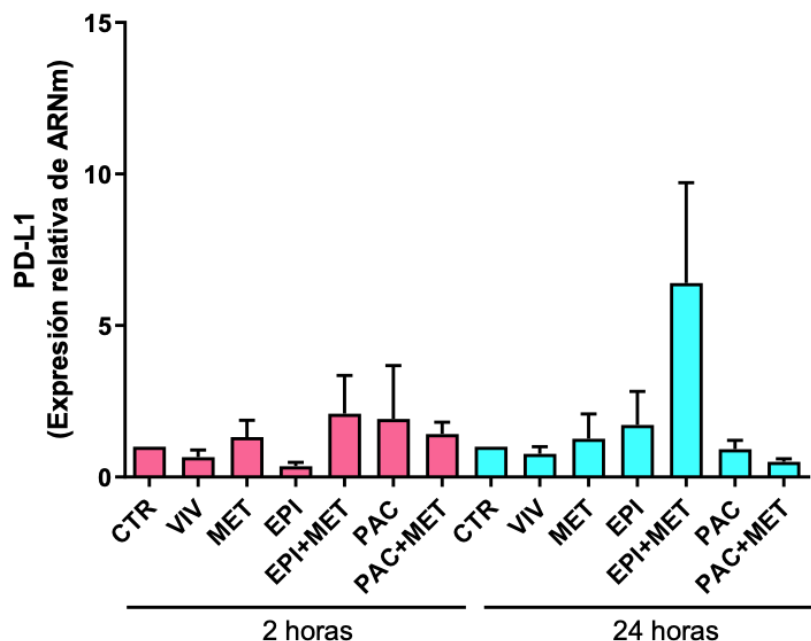




**FIGURA 14. Concentración de IL-38 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.** La línea celular MCF-7 se estimuló con el medio condicionado y se incubó durante 2 y 24 horas. La concentración de IL-38 liberada se determinó mediante citometría de flujo. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar, n=5) Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Finalmente, se observa que la concentración liberada de IL-38 por las células al ser estimuladas con el medio condicionado de células tratadas con paclitaxel es mayor a la que liberan las células estimuladas con medio condicionado de células tratadas con paclitaxel y metformina (figura 14).

### 3. Niveles de expresión de PD-L1 al estimular la línea celular MCF-7 con las distintas quimioterapias en presencia de metformina durante 24 y 48 horas.



**FIGURA 15. Expresión de PD-L1 liberada por las células luego de ser estimuladas con el medio condicionado.** La línea celular MCF-7 se estimuló con el medio condicionado durante incubaciones de 2 y 24 horas. La expresión de PD-L1 por parte de las células se cuantificó mediante un PCR en tiempo real. (Se muestran los valores promedio  $\pm$  error estándar, n=3). Las diferencias se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

Para la última parte de este proyecto, se cuantificó la expresión de PD-L1 por parte de la línea celular tras ser estimulada con el medio condicionado de células. Aunque no se obtuvieron valores estadísticamente significativos debido a que solamente se realizaron 3 réplicas, en esta gráfica se observa una tendencia al aumento en la expresión de PD-L1 por parte de las células tratadas con epirubicina y metformina en comparación con las tratadas solamente con la quimioterapia durante la incubación de 24 horas (figura 15). Sin embargo, es necesario realizar más réplicas para confirmar que esta tendencia se mantiene.

### Discusión

El concepto MCI se basa en la inducción de una activación inmune iniciada por la liberación de DAMPs por parte de las células en proceso de muerte debido a diferentes estrategias terapéuticas. Estas moléculas activadoras promueven la maduración y activación de CD las cuales migran a órganos linfoides secundarios y presentan antígenos activando LT

CD4+ y CD8+. En el contexto tumoral, estas poblaciones de LT activados infiltran el tumor promoviendo la eliminación de las células que permanecieron viables.

A pesar de que existe evidencia clínica demostrando que el uso de la metformina en combinación con quimioterapia mejora la respuesta patológica en pacientes con cáncer de mama, no se ha analizado previamente el papel de dicha combinación sobre la muerte celular inmunogénica. Un aspecto importante dentro del concepto de muerte celular inmunogénica radica en el hecho de que además de DAMPs las células tumorales en proceso de muerte pueden secretar citoquinas y quimioquinas que eventualmente podrían modular la infiltración de distintas subpoblaciones de células inmunes en el tumor.

Las quimioquinas son pequeñas proteínas secretadas, conocidas sobre todo por su papel como mediadoras de tráfico celular inmunitario y en el desarrollo del tejido linfoide. Dentro del microambiente tumoral, pueden ser expresadas tanto por células tumorales como inmunitarias y estromales; además, se encargan de guiar la migración de las células para regular la respuesta inmune. Estas pueden dirigirse directa e indirectamente a las células tumorales generando efectos anti o pro tumorales. (Nagarsheth et al., 2017).

La expresión de quimioquinas está regulada por mecanismos genéticos y epigenéticos intrínsecos al cáncer, así como por señales en el microambiente tumoral. Dado que las quimioquinas y sus receptores desempeñan un papel crucial en las enfermedades inflamatorias humanas, se ha intentado actuar sobre las redes de quimiocinas en pacientes con enfermedades autoinmunes e inflamación crónica. Por ejemplo, los fármacos dirigidos contra CCR5 han sido aprobados para su uso en la infección por el virus de inmunodeficiencia humano y para la movilización de células madre hematopoyéticas para trasplantes, respectivamente. Sin embargo, los fármacos antiinflamatorios viables dirigidos contra las quimiocinas y los receptores de quimiocinas no se han conseguido hasta ahora (Nagarsheth et al., 2017).

En el presente proyecto se realiza una caracterización inicial de distintos mediadores inflamatorios liberados por las células en proceso de muerte inducido por tratamientos citotóxicos en combinación con metformina. Para esto se usaron paclitaxel y epirubicina, dos de los tratamientos más comúnmente utilizados como terapia neoadyuvante, la cual se aplica antes de la remoción quirúrgica del tumor y donde se ha visto una respuesta positiva en el uso de la metformina. Como se mencionó anteriormente, para la epirubicina, así como para otras antraciclinas, se ha demostrado su papel como inductores de muerte celular inmunogénica, mientras que para el paclitaxel se desconoce aún con certeza el tipo de muerte celular inducido desde el punto de vista inmunológico.

Durante la primera fase del proyecto, se determinaron las citoquinas y quimioquinas liberadas por las células tumorales MCF 7 tratadas directamente con los distintos tratamientos quimioterapéuticos en combinación con la metformina. En el caso de la IL-8 se observó que se da un aumento después del tratamiento con paclitaxel, sin embargo, al pretratar las células con metformina el aumento inducido por esta quimioterapia es inhibido.

La IL-8 también conocida como CXCL8 es un miembro de la familia de quimiocinas inflamatorias que promueve la quimiotaxis mediante la activación de sus receptores CXCR1 o CXCR2 en las células blanco como lo son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, NK y LT CD8 + (Xiao et al., 2017).

Esta interleuquina es encargada de reclutar leucocitos (como monocitos y neutrófilos) que liberan factores de crecimiento y proteasas que favorecen la angiogénesis y la metástasis tumoral, por lo que sus concentraciones plasmáticas reflejan la carga tumoral y ayudan a determinar el pronóstico del paciente (Xiao et al., 2017). También se ha demostrado que esta citoquina retiene a las CD, por lo que estas son incapaces de cumplir su función como presentadoras de antígenos, recluta monocitos e induce su transformación en macrófagos asociados a tumores (TAM), propicia la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y estimula el crecimiento de las células endoteliales mediante el aumento del factor de crecimiento endotelial vascular (Araki et al., 2007; Alfaro et al., 2016).

Además, se ha visto que CXCL8 favorece la invasión, migración, senescencia de las células tumorales y genera resistencia a la apoptosis inducida por la hipoxia; los LT CXCL8 + no sólo median la supresión de LT, sino que también promueven la inflamación, mientras que los LT reguladores que suprimen la inmunidad antitumoral; por ejemplo, en la médula ósea sirven como "escudo" inmunitario para facilitar la metástasis y pueden expresar CXCL8 (Nagarsheth et al., 2017).

En el cáncer de mama se observa una sobreexpresión de CXCL8, y su expresión está regulada principalmente por tres factores de transcripción (i) el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), (ii) el activador de la proteína 1 (AP-1) y (iii) el CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). Sin embargo, en las células malignas, su expresión está mediada por NF- $\kappa$ B (Xiao et al., 2017).

Una de las vías que aumenta la expresión de CXCL8 es la glucólisis aeróbica, esta es una característica del metabolismo de las células cancerosas. Mediante esta vía se da la producción de ácido láctico, que activa el NF- $\kappa$ B e induce la expresión de CXCL8 en las células endoteliales vasculares, lo que provoca angiogénesis en el cáncer de mama (Nagarsheth et al., 2017). En las células tumorales CXCR 1 y 2 positivas, CXCL8 actúa de

forma autocrina promoviendo la proliferación, migración y angiogénesis, además se activan señales de transducción que potencian la actividad de NF- $\kappa$ B que promueven aún más la expresión de CXCL8, generando un ciclo que se autoperpetúa (Xiao et al., 2017).

Tomando en cuenta lo anterior, la IL-8 se considera una quimioquina pro-tumoral, que colabora con procesos angiogénicos, metastásicos e inmunosupresores. En nuestros resultados, el tratamiento con paclitaxel induce la liberación de esta quimioquina lo que podría ser potencialmente contraproducente para el tratamiento de estos tumores. Es importante mencionar que la metformina inhibe este aumento de IL-8 por lo que podría eventualmente mejorar la respuesta inmune anti-tumoral. En otros modelos, se ha demostrado que el tratamiento con metformina reduce significativamente la expresión de CXCL8 al suprimir la actividad de NF- $\kappa$ B y, en consecuencia, se considera que puede disminuir la angiogénesis y suprimir la proliferación tumoral (Bae et al., 2019). La disminución de la actividad de NF- $\kappa$ B posiblemente se logra a través de la activación de la sirtuina 1 (SIRT1), esta desacetila la subunidad NF- $\kappa$ B-p65 lo que lleva a la inhibición NF- $\kappa$ B y promueve la resolución de la inflamación. De esta forma se inhibe la construcción del microambiente tumoral mediante la supresión de la expresión de CXCL8 y se reduce la migración y proliferación celular (Xiao et al., 2017).

Tomando en cuenta que las concentraciones de quimioterapias utilizadas fueron estandarizadas en un proyecto anterior, e inducen aproximadamente un 50% de muerte celular, en la segunda fase del proyecto se analizó si la liberación de los distintos mediadores inflamatorios se daba directamente por parte de las células en proceso de muerte, o si los DAMPS liberados por estas inducían la producción de estas quimioquinas en las células que permanecían viables. Este efecto se conoce como efecto “bystander”, en el cual distintos factores liberados por células en proceso de muerte inducen una serie de señales en las células vecinas que permanecen viables.

Para esto se trataron las células con quimioterapia sola o en combinación con metformina. En el caso de la IL-8, se observa el mismo patrón de expresión y concentraciones observadas en la primera fase del proyecto, indicando que esta citoquina es producida principalmente por las células viables en respuesta a los DAMPs y otros factores liberados por las células en proceso de muerte celular inducido por el tratamiento con paclitaxel.

En el caso de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), también se determinaron las concentraciones liberadas por las células tumorales MCF-7 tratadas

solamente con los tratamientos quimioterapéuticos y se compararon con los liberados por las células estimuladas con la quimioterapia en combinación con la metformina.

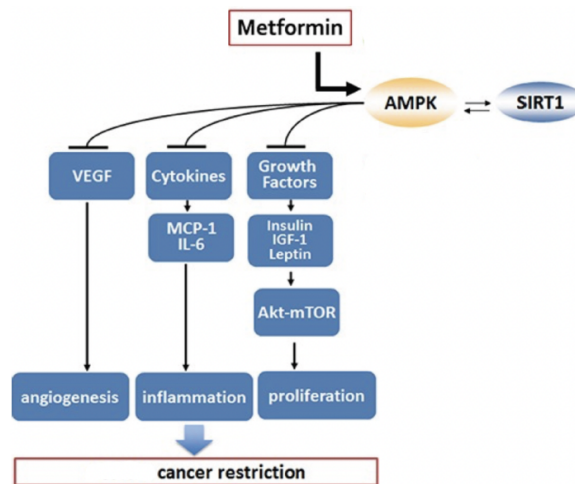
La MCP-1 también denominada ligando de quimiocina 2 con motivo C-C (CCL2) es producida por muchas células activadoras como los fibroblastos, células endoteliales, linfocitos, LB y macrófagos bajo la estimulación de lipopolisacárido, IL-1, IFN- $\gamma$  y factor de crecimiento epidérmico, entre otros. Sin embargo, estudios recientes han informado que también puede expresarse en células malignas (Wang et al., 2014). Tiene capacidad para interactuar con varios receptores de quimiocinas con motivo C-C, como CCR2, CCR5, CCR10 y CCR11; siendo CCR2 y CCR5 los principales (Wang et al., 2021).

La expresión de MCP-1 está asociada con la progresión tumoral y la agresividad clínica ya que tiene varios efectos biológicos sobre el crecimiento de tumores como (i) promover la infiltración de TAM en los tejidos tumorales, lo que puede activar NF- $\kappa$ B, y promover la secreción de interleuquinas como IL-1, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  que promueven el crecimiento, la invasión y la metástasis de las células tumorales (ii) promover la angiogénesis al dirigirse a las células endoteliales vasculares a través de las vías JAK2-STAT5 y p38 lo que fomenta la vascularización tumoral, (iii) desempeñar un papel similar al del factor de crecimiento y llevar al crecimiento y supervivencia de células tumorales, (iv) no sólo atrae TAM a los tejidos, sino que también induce la secreción de metaloproteinasas de matriz 2 y 9 por parte de los TAM. Estas enzimas están implicadas en la destrucción y reconstrucción de la matriz extracelular, para promover la invasión de las células tumorales y la metástasis (Wang et al., 2014). Además, inhibe la activación de LT a través de la expresión de miembros inhibidores de la familia B7 como PDL-1 (Nagarsheth et al., 2017).

La hiperglucemia puede activar el NF- $\kappa$ B, este se une a las regiones promotoras de varios genes relacionados con la inflamación como el de MCP-1. Por lo tanto, la supresión de la activación de NF- $\kappa$ B es un objetivo terapéutico prometedor. Es por esto que se ha probado el uso de metformina como tratamiento, debido a que esta inhibe la activación NF- $\kappa$ B y por lo tanto, reduce significativamente la expresión de ARNm de las citocinas proinflamatorias como MCP-1, entre otras (Kang et al., 2019).

Tomando en cuenta lo anterior, MCP-1 se considera una quimioquina pro-tumoral, que colabora con procesos angiogénicos, metastásicos e inmunosupresores. En nuestros resultados, el tratamiento con epirubicina promueve la liberación de esta quimioquina lo que podría ser potencialmente contraproducente para el tratamiento de estos tumores. Es importante mencionar que la metformina inhibe este aumento de MCP-1 por lo que podría eventualmente mejorar la respuesta inmune anti-tumoral.

Por se demostró por Al-Wahab que la metformina redujo significativamente los niveles de MCP-1, de factor de crecimiento endotelial vascular, y de mTOR por lo tanto, con base en esto se puede sugerir que la metformina tiene funciones antitumorales al disminuir la inflamación y el potencial angiogénico en el microambiente tumoral. Sin embargo, también se ha demostrado que la metformina tiene un papel importante en la activación de AMPK e induce un aumento en los niveles de SIRT1, que son factores protectores contra el cáncer (2015).



**FIGURA 16. Papel de la metformina en la inhibición de MCP-1.** La metformina tiene un efecto para disminuir el crecimiento del cáncer, ya que provocan la activación de AMPK y SIRT1, además de que inhibe MCP-1 y el factor de crecimiento endotelial vascular, lo que reduce la inflamación y la angiogénesis, también limita el crecimiento del tumor. Fuente: Al-Wahab, 2015.

En la segunda fase del proyecto se analizó si la liberación de los distintos mediadores inflamatorios se daba directamente por parte de las células en proceso de muerte, o si los DAMPS liberados por estas inducían la producción de estas quimioquinas en las células que permanecían viables.

Para esto se trataron las células viables con los distintos medios condicionados como fue explicado anteriormente. En el caso de MCP-1, no se observa una diferencia importante en su patrón de liberación en respuesta a los distintos tratamientos, como si se observaba en la primera parte del proyecto, además, las concentraciones liberadas son sumamente bajas de apenas 2-4 pg/ml, lo que indica que es principalmente liberado por células en proceso de muerte celular como una respuesta al tratamiento con epirubicina.

La proteína de 10 kDa inducible por interferón gamma, IP-10, o también conocida como CXCL10 es un miembro de la subfamilia CXC secretada por leucocitos, neutrófilos,

eosinófilos, monocitos, células endoteliales y estromales, así como queratinocitos en respuesta al interferón gamma en estados de inflamación. La IP-10 se une especialmente al CXCR3, que es un receptor transmembrana acoplado a proteína G y lo activa para ejercer sus efectos sobre distintos tipos de células como linfocitos Th1 activados a la zona de la inflamación; siendo una molécula multifuncional capaz de atraer células CXCR3+, inducir apoptosis, regular la proliferación celular y la angiogénesis (Ahmadzadeh & Mohit, 2023). Por lo tanto, su liberación se da en condiciones inflamatorias debido a la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B en respuesta al interferón gamma (Jin et al., 2017).

CXCL10 también funciona como inhibidor endógeno de la angiogénesis tumoral, al prevenir la angiogénesis inducida por CXCL8 y la inducida por el factor de crecimiento fibroblástico básico. Por lo tanto, el aumento en los niveles de CXCL10 se asocia a una mayor infiltración de LT CD8+, disminución en los niveles de metástasis del cáncer y mejora en la supervivencia de los pacientes (Nagarsheth et al., 2017). Además, CXCL10 desempeña un papel importante en el reclutamiento de LT activados específicos a los sitios de los tejidos tumorales y, en consecuencia, ayuda en la regresión del tumor, por esta razón es un candidato prometedor para el tratamiento del cáncer de mama ya que tiene la capacidad de servir como quimioatrayente para LT y también de promover su proliferación de estas células T reclutadas, lo que conduce a la regresión del tumor (Ahmadzadeh & Mohit, 2023; Taslimi et al., 2016).

Aunque se ha demostrado que CXCL10 es capaz de atenuar la angiogénesis y tiene efectos antitumorales; también se ha demostrado su implicación en las enfermedades infecciosas, inflamatorias, autoinmunes y el cáncer, al propiciar la afluencia de leucocitos a los tejidos inflamados, exacerbar la inflamación y causar importantes daños tisulares. Diversos estudios han asociado la expresión de CXCL10 y de su correspondiente receptor CXCR3 a estadios más avanzados del cáncer en humanos (Liu et al., 2011).

De esta forma la acción proliferativa o antiproliferativa de CXCL10 parece depender del subtipo de receptor CXCR3. Existen tres variantes CXCR3-A, CXCR3-B y CXCR3-alt; siendo CXCR3-A la más conocida, esta induce la afluencia de calcio intracelular, la síntesis de ADN, la proliferación celular y la quimiotaxis. Por otro lado, su acción antiproliferativa está regulada por CXCR3-B que inhibe la proliferación y migración de las células endoteliales, no induce quimiotaxis y es el que se expresa en el cáncer de mama. Así mismo tiene efecto sobre la angiogénesis dependiendo de la presencia del motivo glutamina-leucina-arginina (ELR). En caso de ser CXCL10 ELR-negativa tiene una función angiostática y por lo tanto está asociada a efectos antitumorales. (Liu et al., 2011).



Tomando en cuenta lo anterior, CXCL10 se considera una quimioquina con acciones tanto pro-tumorales como antitumorales. Sin embargo, en el cáncer de mama su función es antitumoral al promover la infiltración de linfocitos T y apoptosis. De igual manera es importante su función como modulador en la angiogénesis y proliferación celular. En nuestros resultados, el tratamiento con epirubicina aumenta la liberación de esta quimioquina, lo cual confirma lo propuesto en la literatura con respecto a que la CXCL10 es un marcador de muerte celular inmunogénica, la cual es inducida por tratamientos como antraciclinas tales como la epirubicina (Fucikova et al., 2020). Interesantemente, la combinación de la quimioterapia con la metformina, aumenta la liberación de CXCL10 lo que es deseable en pacientes con cáncer de mama ya que es un indicador de mejor pronóstico para los pacientes ya que eventualmente podría mejorar la respuesta inmune anti-tumoral y aumentar la inmunogenicidad de la muerte celular.

La metformina induce una respuesta inmunitaria anticancerosa a través de la activación de AMPK, la disminución de la infiltración de LT reguladores FOXP3 +, la promoción de la actividad antitumoral a través de los LT CD8 +, a quienes además protege de la apoptosis y agotamiento. También, remodela el microambiente tumoral al inhibir el consumo de oxígeno (Yang et al., 2023).

Como se ha mencionado para las demás citoquinas, en la segunda fase del proyecto se analizó si la liberación de CXCL10 se daba directamente por parte de las células en proceso de muerte, o si los DAMPS liberados por estas inducían la producción de estas quimioquinas en las células que permanecían viables. En el caso de CXCL10, no se observan cambios en su patrón de liberación con los distintos medios condicionados (Figura 13), como sí se observaba en la primera parte del proyecto, además, sus las concentraciones liberadas son sumamente bajas ya que son de apenas 3-4 pg/ml, lo que indica que es mayoritariamente liberada por células en proceso de muerte celular como una respuesta al tratamiento con epirubicina sola o en combinación con metformina.

La interleuquina 38 (IL-38) es el miembro de la familia de la IL-1 descrito más recientemente, siendo sus receptores el IL-36R y el IL1RAPL1. Esta comparte características estructurales tanto con la IL-1Ra como con la IL-36Ra, lo que sugiere que podría actuar como un antagonista de la familia de la IL-1 (Wang et al., 2018). Uno de los primeros estudios en este campo identificó una correlación entre la expresión de IL-38 y el tamaño, extensión, metástasis y la gravedad de la invasión vascular del tumor principal. Además, los pacientes con una expresión elevada de IL-38 también mostraron una disminución de la supervivencia de la enfermedad (Boersma et al., 2021).

Sin embargo, en lo que respecta a la IL-38, sigue sin estar claro el vínculo entre su expresión y la carcinogénesis, el crecimiento del cáncer y un mal pronóstico. La IL-38 se une al receptor de la IL-36 e inhibe su efecto. La IL-36, que se expresa de forma constitutiva e inducible en macrófagos, células dendríticas, linfocitos, piel, epitelio bronquial y fibroblastos sinoviales. Se une al receptor que se expresa en CD y LT CD4+, lo que provoca la proliferación celular, la supervivencia de LT y la polarización hacia una respuesta celular tipo Th1. Por lo tanto, la diferenciación Th1 puede estar regulada a la baja en los casos con una alta expresión de IL-38, lo que resulta en una disminución de la supervivencia. También, la IL-36 está implicada en la formación de órganos linfoides terciarios en el microambiente tumoral, esto es un biomarcador de un buen pronóstico para los pacientes con cáncer. Por lo tanto, la sobreexpresión de IL-38, que inhibe el efecto de IL-36, puede afectar el microambiente tumoral y conducir a un mal pronóstico (Takada et al., 2017).

En un estudio realizado por Kinoshita et al., 2021 se demostró que una expresión elevada de IL-38 en las células tumorales contribuía a la progresión del tumor al reducir el número de LT CD8 + infiltrados y la expresión de citocinas inflamatorias intratumorales como IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ ; por lo tanto, podría promover indirectamente el crecimiento tumoral al suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral. Además, se observó una relación significativa entre la alta expresión de IL-38 y la alta densidad de LT FOXP3+, estos LT reguladores promueven la progresión tumoral al inhibir la respuesta inmune. Así mismo, se ha demostrado que la IL-38 tiene capacidad inhibitoria sobre la activación de macrófagos y células T  $\gamma\delta$ , induciendo un microambiente tumoral inmunosupresor. Por lo tanto, aunque la IL-38 puede tener un papel tanto pro tumoral como anti tumoral, en el cáncer de mama presenta funciones pro tumorales debido a su potencial antiinflamatorio y además promover el crecimiento y proliferación del tumor. En nuestros resultados, las células tratadas con paclitaxel más metformina presentan una disminución en la concentración liberada de esta interleuquina en comparación con las células tratadas solamente con la quimioterapia, esto es deseable en pacientes con cáncer de mama ya que es un indicador de mejor pronóstico.

Como se realizó para las demás citoquinas, en la segunda fase del proyecto se analizó si la liberación de IL-38 se daba directamente por parte de las células en proceso de muerte, o si más bien era por células que permanecían viables. En el caso de IL-38 se observa una disminución en la liberación por parte de las células tratadas con paclitaxel combinado con metformina en comparación con las que fueron tratadas solamente con paclitaxel (Figura 14), al igual que como se observa en la primera parte del proyecto. Además, la concentración de IL-38 es alta y muy similar a la liberada en la primera parte del experimento, lo que indica

que es mayoritariamente liberada por células viables al tener contacto con los factores liberados por las células en proceso de muerte.

A continuación, se presenta un cuadro resumen de las diferentes quimioquinas analizadas durante el proyecto, así como un resumen de sus receptores y sus funciones, ya sean pro-tumorales o antitumorales. De igual forma, se incluyen los efectos directos que presentan sobre las células tumorales.

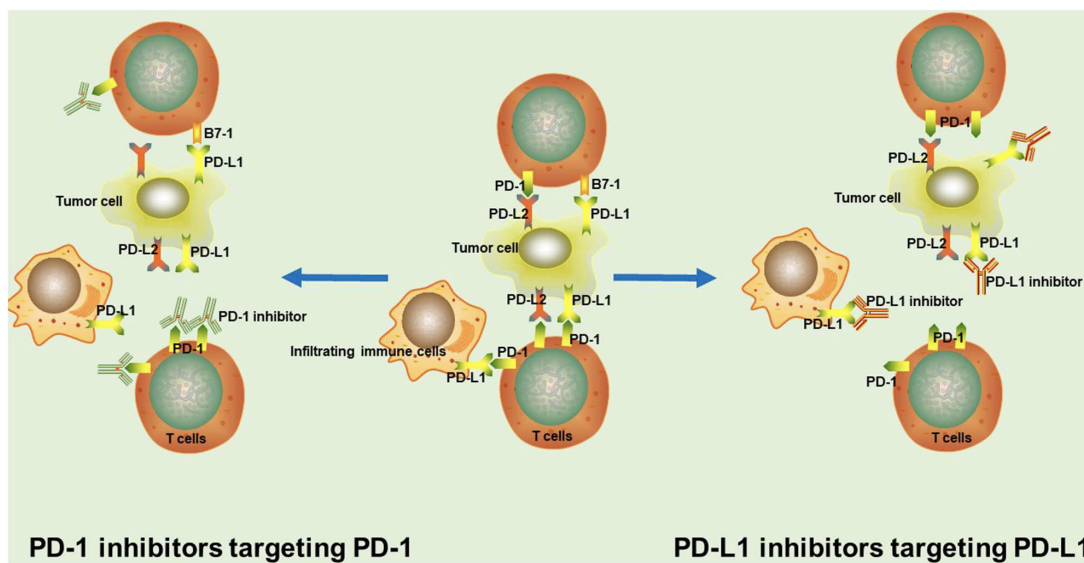
Tabla I. Funciones de las quimiocinas en el microambiente tumoral del cáncer de mama.

<b>Quimioquina</b>	<b>Receptor</b>	<b>Efecto en el sistema inmune</b>	<b>Efecto directo en las células tumorales</b>	<b>Efecto indirecto en las células tumorales</b>
<b>Quimiocinas pro-tumorales</b>				
CCL2	CCR2 CCR5	Recluta monocitos, NK y MDSCs monocíticas	Promueve la proliferación y supervivencia	Promueve la angiogénesis, extravasación y metástasis
CXCL8	CXCR1 CXCR2	Recluta neutrófilos y MDSCs granulocíticas	Promueve el crecimiento, invasión, migración, resistencia a la hipoxia y la senescencia	Promueve la angiogénesis
IL-38	IL-36 R	Inhibe la función de IL-36, actividad antiinflamatoria	Promueve su invasión, migración y proliferación	Promueve la angiogénesis
<b>Quimiocinas anti-tumorales</b>				
CXCL10	CXCR3	Recluta LT y NK	No definido	Inhibe la angiogénesis

La importancia de un sistema inmunitario eficaz en el control de la transformación y progresión neoplásicas se ha descrito desde hace mucho tiempo y se ha destacado el papel de la interacción de PD-1 con su ligando PD-L1 como una importante vía inhibidora que puede ser utilizada por los tumores para evadir la respuesta inmune y promover su proliferación. Cuando PD-1 se une a PD-L1, se inhibe la activación de los LT CD8 + y por ende la actividad antitumoral. En consecuencia, la inhibición de este sistema regulador se ha convertido en uno de los blancos terapéuticos más atractivos en la inmunoterapia contra el

cáncer durante los últimos años. (Planes-Laine et al., 2019). Por lo tanto, se ha observado que la mayoría de los tumores regulan un aumento en la expresión de PD-L1 en respuesta a IFN- $\gamma$  y a otros mediadores inflamatorios, con lo que se transmiten señales inhibitorias reforzadas a los LT, reduciendo así las tasas de supervivencia (Chen et al., 2020).

PD-1 es una molécula transmembrana que se expresa en LT activados, linfocitos B, células NK, monocitos y CD; PD-L1 es su ligando y es de suma importancia debido a que se expresa en gran medida en células tumorales, lo que se considera que contribuye al escape inmunitario del tumor. La vía PD-1/ PD-L1 lleva a un aumento en la expresión de LT reguladores (CD4 +, CD25 +) y se ha demostrado que son un inmunosupresor importante en el microambiente tumoral, por lo que contribuyen al desarrollo y la progresión del cáncer, mientras que su ausencia conduce a la erradicación del tumor. Estas inhiben la inmunidad de los LT para evitar los daños provocados por su activación extrema. De este modo, desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria y la autotolerancia (Cai et al., 2019).



**FIGURA 17. Papel de la PD-L1 como regulador de la función inmune.** En el tejido tumoral, PD-1 interactúa con PD-L1 o PD-L2 para llevar a una supresión inmunitaria. Los inhibidores de PD-1/PD-L1 se unen a la diana correspondiente, bloqueando así la vía de señalización y mejorando notablemente la función de los LT y la inmunidad antitumoral Fuente: Chen et al, 2020.

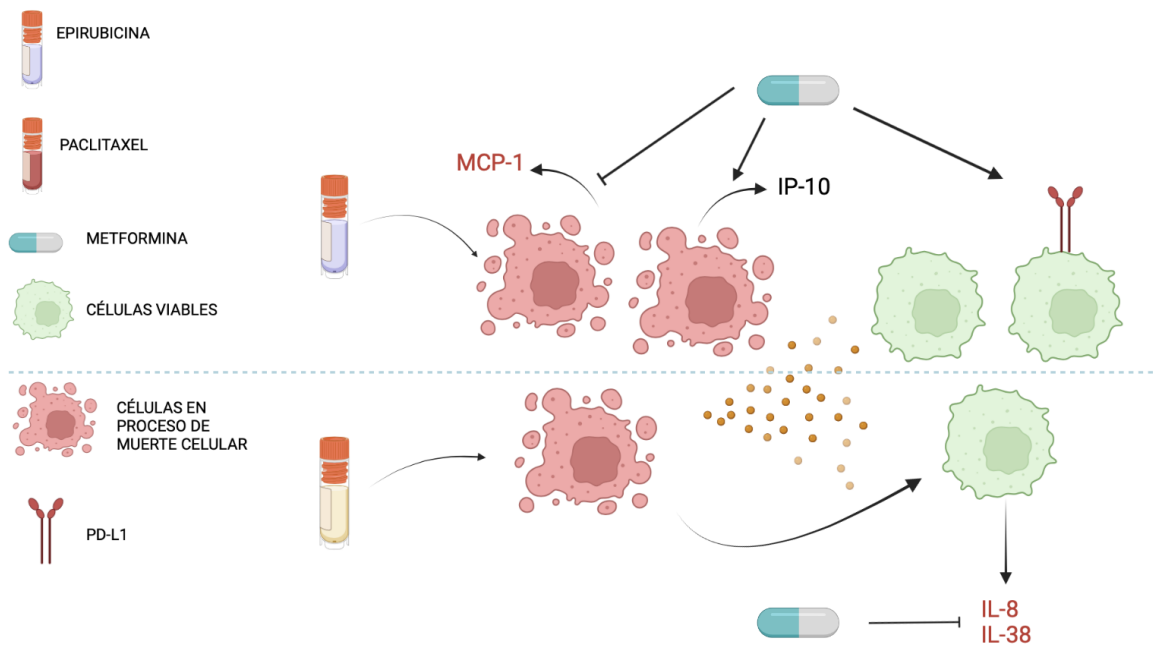
Tomando en cuenta lo anterior, en la figura 15 se presentan los niveles de expresión de PD-L1 por parte de la línea celular MCF-7 al ser tratada solamente con la quimioterapia y su expresión al ser tratadas con la quimioterapia en combinación con metformina. En esta figura se observa cómo, a pesar de no ser estadísticamente significativo, la combinación de

epirubicina más metformina conduce a un aumento de la expresión de PD-L1. Esto sería contraproducente para el paciente tomando en cuenta que llevaría a una disminución de la respuesta antitumoral y por lo tanto a la progresión del cáncer. Con respecto a la expresión de PD-L1 por parte de las células al ser estimuladas solamente con paclitaxel o en combinación con la metformina no se observan cambios significativos.

Además, es importante resaltar el el aumento en la liberación de IP-10 por parte de la línea celular al ser tratada con epirubicina más metformina (figura 9). Esto sería deseable en pacientes con cáncer debido a que esta citoquina presenta una función anti tumoral. Sin embargo, se debe considerar el hecho de que si bien es cierto que IP-10 va a reclutar células inmunes al microambiente tumoral para intentar inhibir su progresión, estas pueden ser neutralizadas por la alta expresión de PD-L1 en el microambiente, por lo tanto, sería recomendable el uso de esta terapia con algún anticuerpo monoclonal para bloquear la vía de unión PD-1/ PD-L1 y de esta manera que las células inmunes puedan llevar a cabo sus funciones.

Los inhibidores de PD-1/PD-L1 se utilizan para modificar el equilibrio hacia la activación inmunitaria, mejorando aún más la inmunovigilancia tumoral y las respuestas inmunitarias antitumorales. Entre los inhibidores aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), destacan nivolumab y pembrolizumab para PD-1, estos interactúan con PD-1 a través de regiones superficiales superpuestas, impidiendo su unión con PD-L1 o PD-L2. Por otro lado, destacan atezolizumab, avelumab y durvalumab para PD-L1, estos inhiben su unión con PD-1 y B7-1 presentes en los LT (Chen et al., 2020).

Aunque sus efectos secundarios se consideran manejables y bien tolerados en comparación con la quimio-radioterapia u otros fármacos inmunoterapéuticos, el resultado clínico del bloqueo de PD-1/PD-L1 contra las neoplasias sólidas no es totalmente satisfactorio ya que la tasa de respuesta es sólo del 20%-30% cuando se emplea como monoterapia. Por lo tanto, es de suma importancia la aplicación combinada de distintas estrategias terapéuticas para obtener una mejor respuesta en los pacientes (Cai et al., 2019).



**FIGURA 18. Resumen de las principales citoquinas liberadas y de la expresión de PD-L1 en respuesta al tratamiento quimioterapéutico en presencia o ausencia de metformina. Fuente:Elaboración propia.**

## Conclusiones

- Se observa un bloqueo en el aumento en la liberación de las citoquinas IL-8, IL-38, y MCP-1, las cuales presentan funciones pro tumorales si la línea MCF7 es tratada con una terapia combinada de quimioterapia y metformina en comparación con las liberadas por las células que son tratadas solo con quimioterapia. Esto aplica en el caso de la IL-8 y la IL-38 para el tratamiento con paclitaxel, mientras que en el caso de MCP-1 se da para el tratamiento con epirubicina.
- La metformina en combinación con el inductor de muerte celular inmunogénica epirubicina aumenta la liberación de la quimioquina anti-tumoral IP-10.
- La liberación IL-8 y la IL-38 se da principalmente por parte de células viables al tener contacto con los factores liberados en proceso de muerte, esto debido a que se observa un patrón de expresión muy similar si se estimulan con las quimioterapias en comparación con su estimulación por parte del medio condicionado. Por otro lado, la liberación de MCP-1 e IP-10 es mediada principalmente por células en proceso de muerte celular, esto debido a que su concentración es bastante menor en células estimuladas con el medio condicionado en comparación con las células tratadas solamente con la quimioterapia.
- La expresión de PD-L1 por parte de las células MCF7 al ser estimuladas con epirubicina en combinación con metformina evidencia un aumento significativo en comparación con las células tratadas solamente con la quimioterapia tradicional; esto es un aspecto importante por considerar debido a que propicia una respuesta pro tumoral. Por lo tanto, sería recomendable la utilización de este tipo de terapias en combinación con anticuerpos monoclonales que inhiban la vía PD-1 y PD-L1 para así aumentar la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama.

## Referencias bibliográficas

- Ailles, L. E., & Weissman, I. L. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(5), 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.007>
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- Ahmadzadeh, M., & Mohit, E. (2023). Therapeutic potential of a novel IP-10-(anti-HER2 scFv) fusion protein for the treatment of HER2-positive breast cancer. *Biotechnology Letters*, 45(3), 371–385. <https://doi.org/10.1007/s10529-022-03342-y>
- Alfaro, C., Teijeira, A., Oñate, C., Perez, G., Sanmamed, M. F., Andueza, M. P., Alignani, D., Labiano, S., Azpilikueta, A., Rodriguez-Paulete, A., Garasa, S., Fusco, J. P., Aznar, A., Inoges, S., De Pizzol, M., Allegretti, M., Medina-Echeverz, J., Berraondo, P., Perez-Gracia, J. L., & Melero, I. (2016). Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3924–3936. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2463>
- Al-Wahab, Z., Mert, I., Tebbe, C., China, J., Hijaz, M., Morris, R., Ali-Fehmi, R., Giri, S., Munkarah, A., Rattan, R. (2015). Metformin prevents aggressive ovarian cancer growth driven by a high-energy diet: similarity with calorie restriction. *Oncotarget*, 6 (13), 10908-10923. doi: 10.18632/oncotarget.3434
- Anindita, D., Gowthamarajan, K. (2020). Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Current Problems in Cancer*, 44(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2019.06.003>
- Ansari, M. A., Thiruvengadam, M., Farooqui, Z., Rajakumar, G., Sajid Jamal, Q. M., Alzohairy, M. A., Almatroudi, A., Alomary, M. N., Chung, I. M., & Al-Suhaimi, E. A. (2021). Nanotechnology, in silico and endocrine-based strategy for delivering paclitaxel and miRNA: Prospects for the therapeutic management of breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 69(October), 109–128. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.12.022>
- Araki, S., Omori, Y., Lyn, D., Singh, R. K., Meinbach, D. M., Sandman, Y., Lokeshwar, V. B., &



Lokeshwar, B. L. (2007). Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. *Cancer Research*, 67(14), 6854–6862. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1162>

Bae, W. J., Ahn, J. M., Byeon, H. E., Kim, S., & Lee, D. (2019). PTPRD-inactivation-induced CXCL8 promotes angiogenesis and metastasis in gastric cancer and is inhibited by metformin. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1469-4>

Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., & Li, Y. (2018). Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 69(March), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.004>

Bao, S., Hu, R., & Hambly, B. D. (2020). IL-34, IL-36 and IL-38 in colorectal cancer—key immunoregulators of carcinogenesis. *Biophysical Reviews*, 12(4), 925–930. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00726-0>

Basse, C., & Arock, M. (2015). The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *International Journal of Cancer*, 137(12), 2785–2794. <https://doi.org/10.1002/ijc.29347>

Beatty, G. L., & Gladney, W. L. (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21(4), 687–692. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1860>

Boersma, B., Jiskoot, W., Lowe, P., & Bourquin, C. (2021). The interleukin-1 cytokine family members: Role in cancer pathogenesis and potential therapeutic applications in cancer immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 62, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.09.004>

Cai, J., Wang, D., Zhang, G., & Guo, X. (2019). The role of PD-1/PD-L1 axis in treg development and function: Implications for cancer immunotherapy. *OncoTargets and Therapy*, 12, 8437–8445. <https://doi.org/10.2147/OTT.S221340>

- Comsa, S., Cîmpean, A., Raica, C. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35: 3147-3154.
- Chen, Y., Pei, Y., Luo, J., Huang, Z., Yu, J., & Meng, X. (2020). Looking for the Optimal PD-1/PD-L1 Inhibitor in Cancer Treatment: A Comparison in Basic Structure, Function, and Clinical Practice. *Frontiers in Immunology*, 11(May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01088>
- Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(12), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>
- De, A., & Kuppusamy, G. (2020). Metformin in breast cancer: preclinical and clinical evidence. *Current Problems in Cancer*, 44(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2019.06.003>
- Dumars, C., Ngyuen, J. M., Gaultier, A., Lanel, R., Corradini, N., Gouin, F., Heymann, D., & Heymann, M. F. (2016). Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget*, 7(48), 78343–78354. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13055>
- Dworkin, A. M., Huang, T. H. M., & Toland, A. E. (2009). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 19(3), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.02.007>
- Fathian, F., Derakhshandeh, K., Khaleseh, F., Azandaryani, A. H., Mansouri, K., & Khazaei, M. (2019). Active targeting carrier for breast cancer treatment: Monoclonal antibody conjugated epirubicin loaded nanoparticle. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(December 2017), 101136. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101136>
- Faria, J., Negalha, G., Azevedo, A., & Martel, F. (2019). Metformin and Breast Cancer: Molecular Targets. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 24(2), 111–123. <https://doi.org/10.1007/s10911-019-09429-z>
- Foretz, M., Guigas, B., & Viollet, B. (2019). Understanding the glucoregulatory mechanisms of

metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(10), 569–589. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0242-2>

Fucikova, J., Kepp, O., Kasikova, L., Petroni, G., Yamazaki, T., Liu, P., Zhao, L., Spisek, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2020). Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death and Disease*, 11(11). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03221-2>

García-Aranda, M., & Redondo, M. (2019). Immunotherapy: A challenge of breast cancer treatment. *Cancers*, 11(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cancers11121822>

Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 353–363. <https://doi.org/10.1038/nri2545>

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer : New Dimensions & Significance. *Cancer discovery* 12 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1101/2021.01.22.427865>

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

Ho, P. C., & Liu, P. S. (2016). Metabolic communication in tumors: A new layer of immunoregulation for immune evasion. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0109-1>

Hirsh, HA., Iliopoulos, D., Tsihchlis, PN., Struhl, K. (2009). Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res*, 69, 7507-7511. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2994

Jacobo-Velásquez., Huerta-López., Cravioto-Quintana.(2018). Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Artículo de Revisión*, 26(2), 1–15. <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2017/al172e.pdf>

- Jin, W. J., Kim, B., Kim, D., Choo, H. Y. P., Kim, H. H., Ha, H., & Lee, Z. H. (2017). NF- $\kappa$ B signaling regulates cell-autonomous regulation of CXCL10 in breast cancer 4T1 cells. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(2). <https://doi.org/10.1038/emm.2016.148>
- Kang, Z., Zeng, J., Zhang, T., Lin, S., Gao, J., Jiang, C., Fan, R., & Yin, D. (2019). Hyperglycemia induces NF- $\kappa$ B activation and MCP-1 expression via downregulating GLP-1R expression in rat mesangial cells: inhibition by metformin. *Cell Biology International*, 43(8), 940–953. <https://doi.org/10.1002/cbin.11184>
- Khasraw, M., Bell, R., & Dang, C. (2012). Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast*, 21(2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.12.012>
- Kashyap, D., Pal, D., Sharma, R., Garg, V. K., Goel, N., Koundal, D., Zaguia, A., Koundal, S., & Belay, A. (2022). Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>
- Kinoshita, F., Tagawa, T., Akamine, T., Takada, K., Yamada, Y., Oku, Y., Kosai, K., Ono, Y., Tanaka, K., Wakasu, S., Oba, T., Osoegawa, A., Shimokawa, M., Oda, Y., Hoshino, T., & Mori, M. (2021). Interleukin-38 promotes tumor growth through regulation of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70(1), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02659-9>
- Koren, E., Yaron, F. (2021). Modes of regulated Cell Death in Cancer. In *Cancer Discovery* 11 (2), pp. 245–265. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0789>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). Immunogenic cell death in cancer therapy. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 31, pp. 51–72). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>
- Liberti, M., Locasale, J. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Liu, X., Yang, W., Guan, Z., Yu, W., Fan, B., Xu, N., & Liao, D. J. (2018). There are only four

basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. *Cell and Bioscience*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0206-6>

Liu, M., Guo, S., & Stiles, J. K. (2011). The emerging role of CXCL10 in cancer. *Oncology Letters*, 2(4), 583–589. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.300>

Lu, B., & Finn, O. J. (2008). T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death and Differentiation*, 15(1), 70–79. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402274>

Marinello, P. C., Panis, C., Silva, T. N. X., Binato, R., Abdelhay, E., Rodrigues, J. A., Mencialha, A. L., Lopes, N. M. D., Luiz, R. C., Cecchini, R., & Cecchini, A. L. (2019). Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42357-w>

Momenimovahed, Z. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer - Targets and Therapy*, 11, 151–164.

Mora, J., Schlemmer, A., Wittig, I., Richter, F., Frank, A., Han, Y., Jung, M., Ernst, A., Weigert, A., & Brüne, B. (2016). *responses* © The Author ( 2016 ). Published by Oxford University Press on behalf of Journal of Molecular Cell Biology , IBCB , SIBS , CAS . All rights reserved . 1–39.

Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022). The Apoptosis Paradox in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031328>

Menéndez, J., Oliveras-Ferraros, C., Cufi, S., Corominas-Faja, B., Joven, J., Martin-Castillo, B. & Vasquez-Martin, A (2012). *Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells*. *Cell Cycle*, 11(15), 2782-2792. doi: 10.4161/cc.20948.

Nagarsheth, N., Wicha, M. S., & Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 559–572. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>

- Parrella, P. (2010). Epigenetic signatures in breast cancer: Clinical perspective. *Breast Care*, 5(2), 66–73. <https://doi.org/10.1159/000309138>
- Pitt, J. M., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2017). Immunogenic and non-immunogenic cell death in the tumor microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1036, 65–79. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_5)
- Planes-Laine, G., Rochigneux, P., Bertucci, F., Chrétien, A. S., Viens, P., Sabatier, R., & Gonçalves, A. (2019). PD-1/PD-11 targeting in breast cancer: The first clinical evidences are emerging. a literature review. *Cancers*, 11(7), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers11071033>
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Ramírez-Torres, N., Pérez-Puentes, A., Rivas-Ruiz, R., Talavera, J. O., & Astudillo-de la Vega, H. (2016). Impacto pronóstico de la respuesta patológica completa y del estado ganglionar en pacientes con cáncer de mama avanzado tratadas con dosis alta de epirrubicina neoadyuvante. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 15(3), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2016.05.005>
- Rocha, G., Dias, M, Ropelle, E., Osorio-Costa, F., Rossato F., Vercesi, A, Saad, M., Carvalheira. (2011). *Metformin Amplifies Chemotherapy-Induced AMPK Activation and Antitumoral Growth*. *Clinical Cancer Research*, 17(12), 3993–4005. doi:10.1158/1078-0432.ccr-10-2243
- Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 651–672. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>
- Sáenz, R., Miranda, M. G., Alvarado, R., Sandoval, A. B., Navarro, A. C., & Morgan, L. (2015). Navegación y cáncer de mama: una intervención basada en las pacientes. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 24(2), 126–136.

- Saleh, R., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2020). Role of Epigenetic Modifications in Inhibitory Immune Checkpoints in Cancer Development and Progression. *Frontiers in Immunology*, *11*(July), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01469>
- Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: A focus on T-regulatory cells: A. *Immunology and Cell Biology*, *96*(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/imcb.1003>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, *331*(6024), 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Showalter, A., Limaye, A., Oyer, J. L., Igarashi, R., Kittipatarin, C., Copik, A. J., & Khaled, A. R. (2017). Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine*, *97*(March), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.024>
- Smolarz, B., Zadrozna Nowak, A., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, *14*(10), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., & Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *13*(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Takada, K., Okamoto, T., Tominaga, M., Teraishi, K., Akamine, T., Takamori, S., Katsura, M., Toyokawa, G., Shoji, F., Okamoto, M., Oda, Y., Hoshino, T., & Maehara, Y. (2017). Clinical implications of the novel cytokine IL-38 expressed in lung adenocarcinoma: Possible association with PD-L1 expression. *PLoS ONE*, *12*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181598>
- Taslimi, Y., Zahedifard, F., Habibzadeh, S., Taheri, T., Abbaspour, H., Sadeghipour, A., Mohit, E., & Rafati, S. (2016). Antitumor effect of IP-10 by using two different approaches: Live delivery system and gene therapy. *Journal of Breast Cancer*, *19*(1), 34–44. <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.1.34>
- Tokumar, Y., Joyce, D., & Takabe, K. (2020). Current status and limitations of immunotherapy

for breast cancer. *Surgery (United States)*, 167(3), 628–630.  
<https://doi.org/10.1016/j.surg.2019.09.018>

Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., Decock, J., & Elkord, E. (2020). Immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 65(June), 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.021>

Velasco-Velázquez, M. A., Homsí, N., De La Fuente, M., & Pestell, R. G. (2012). Breast cancer stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(4), 573–577.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.020>

Verdura, S., Cuyàs, E., Martín-Castillo, B., & Menéndez, J. A. (2019). Metformin as an archetype immuno-metabolic adjuvant for cancer immunotherapy. *Oncology*, 8(10), 1–10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1633235>

Vishnu, P., & Roy, V. (2011). Safety and efficacy of nab paclitaxel in the treatment of patients with breast cancer. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 5(1), 53–65.  
<https://doi.org/10.4137/BCBCR.S5857>

Wang, F., Zhang, W., Wu, T., & Chu, H. (2018). Reduced interleukin-38 in non-small cell lung cancer is associated with tumor progression. *Open biology*. 8:180132.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.180132>

Wang, L., Lan J., Tang, J., Luo, N., Hao, M., Yu, T. (2021). MCP-1 targeting: Shutting off an engine for tumor development. *Oncology letters* 23(1).  
<https://doi.org/10.3892/ol.2021.13144>.

Wang, H., Zhang, Q., Kong, H., Zeng, Y., Hao, M., Yu, T., . . . Shi, H. (2014). Monocyte Chemotactic protein-1 expression as a prognostic biomarker in patients with solid tumor: a meta analysis. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(7), 3876-3886.

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 321(3), 288–300.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

Xiao, Z., Wu, W., & Poltoratsky, V. (2017). Metformin Suppressed CXCL8 Expression and Cell Migration in HEK293/TLR4 Cell Line. *Mediators of Inflammation*, 2017.



<https://doi.org/10.1155/2017/6589423>

Yang, J., Kim, S. H., Jung, E. H., Kim, S. A., Suh, K. J., Lee, J. Y., Kim, J. W., Kim, J. W., Lee, J. O., Kim, Y. J., Lee, K. W., Kim, J. H., Bang, S. M., & Lee, J. S. (2023). The effect of metformin or dipeptidyl peptidase 4 inhibitors on clinical outcomes in metastatic non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Thoracic Cancer*, *14*(1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14711>

Zhao, B., Luo, J., Yu, T., Zhou, L., Lv, H., & Shang, P. (2020). Anticancer mechanisms of metformin: A review of the current evidence. *Life Sciences*, *254*(April), 117717. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117717>