



# **“Obesidad y cáncer de mama: Efecto de la inflamación asociada a obesidad sobre la formación de un nicho pre tumoral mamario”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Nutrición y Alimentos, mención Nutrición Humana

Tesista: María Jesús Vera Castillo

Directores de tesis: Prof. Jorge Martínez Winkler y Dr. Nicolás Tobar Bachler

Fecha: 3 marzo 2023

Santiago, Chile

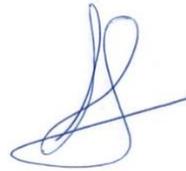
## AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la estudiante María Jesús Vera Castillo, ha sido revisado y aprobado por mí como Director de Tesis, para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora que designará el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



---

**Prof. Jorge Martínez W**



---

**Dr. Nicolás Tobar B**

Santiago de Chile, 3 Marzo de 2023



## COMISIÓN DE TESIS

- Dr. Roberto Bravo Sagua
- Dr. Juan Pablo Rodríguez Vives
- Dr. Félix Urra Faúndez



## **DEDICATORIA**

A mi familia, por su incondicional apoyo, motivación y confianza en mí.

## AGRADECIMIENTOS

A todos quienes me acompañaron y formaron parte de este proceso y que, de alguna u otra forma me enseñaron que lo importante del viaje no es llegar, sino que arriesgarse a ir.

En primer lugar, agradecer a mis tutores de tesis, por la paciencia, comprensión, tiempo y dedicación. Por compartir de manera tan generosa sus conocimientos y experiencia, motivando mi desarrollo y curiosidad en esta nueva área, la ciencia. Muchísimas gracias.

Gracias a mis compañeros de laboratorio que siempre lograron sacar una sonrisa y un buen momento a pesar de que las cosas no resultaran. Gracias especiales a Iván, que con paciencia me enseñó desde cero cuando inicié este proceso. Pame, Pauli, Aldo, Samantha y Dani gracias por todo, el apoyo, conversaciones, llantos, risas y almuerzos, los quiero. Gracias a ustedes lidiar con la frustración fue mucho más fácil.

Finalmente, agradecer a mis pilares fundamentales, a mis papás, por siempre confiar en mí y recordarme que querer es poder, por entregarme su ejemplo de empuje y resiliencia. Los amo infinito. A mi hermana Consuelo, mi cuñado Javier y mis sobrinas, no me habría aventurado a venir a Santiago si no estuvieran aquí, gracias por los almuerzos y colaciones, el soporte y motivación, por ser mi refugio, son mis personas favoritas. Gracias a mi Cristi y mi Pite, que desde lejos siempre puedo sentir su amor incondicional y apoyo. Gracias a mi Maggie, que desde siempre me hizo sentir capaz de alcanzar todo, te pienso en mis momentos más felices y éste, es uno de ellos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	4
1.-INTRODUCCION .....	6
1.1- CÁNCER DE MAMA .....	6
1.2.- MICROAMBIENTE TUMORAL Y SU ROL EN EL CÁNCER DE MAMA .....	7
1.3.- OBESIDAD, INFLAMACIÓN Y CÁNCER DE MAMA.....	9
1.4.- IL-6 Y CÁNCER DE MAMA.....	12
1.5.- TNF $\alpha$ Y CÁNCER DE MAMA.....	13
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....	16
2.1.- HIPÓTESIS .....	16
2.2.- OBJETIVO GENERAL .....	16
2.2.1.- <i>Objetivos Específicos</i> .....	16
3.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1.- CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS ESTROMALES MAMARIAS HUMANAS .....	17
3.2.- CULTIVO PRIMARIO Y ADIPOGÉNESIS .....	18
3.3.- LÍNEAS CELULARES Y REACTIVOS .....	18
3.4.- OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS .....	19
3.5.- TINCIÓN OIL RED O.....	19
3.6.- PCR CUANTITATIVO (qPCR) .....	20
3.7.- ENSAYO DE ELISA.....	21
3.8.- ENSAYO DE MIGRACIÓN.....	22
3.9.- ENSAYO DE MTT DE PROLIFERACIÓN .....	23
3.10.- ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS.....	23
4.- RESULTADOS .....	25
EFECTO DE LOS FACTORES INFLAMATORIOS ASOCIADOS A OBESIDAD, SOBRE LA DIFERENCIACIÓN ADIPOGÉNICA EN CULTIVOS PRIMARIOS ESTROMALES SANOS. ....	25
ROL DE FACTORES INFLAMATORIOS SOBRE LA FORMACIÓN DE UN NICHOS PRO INFLAMATORIO PRE TUMORAL.....	27
EFECTO DE FACTORES SOLUBLES GENERADOS POR ESTROMAS MAMARIOS TRATADOS CON TNF $\alpha$ SOBRE EL RECLUTAMIENTO DE MONOCITO THP-1 .....	31
EFECTO DE FACTORES SOLUBLES GENERADOS POR ESTROMAS MAMARIOS TRATADOS CON TNF $\alpha$ SOBRE LA ADQUISICIÓN DE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS A MALIGNIDAD EN CÉLULAS EPITELIALES MCF-7 .....	34



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos  
Doctor Fernando Monckeberg Barros

5.- DISCUSIÓN.....	38
6.- CONCLUSIÓN .....	43
7.- REFERENCIAS.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: TNF $\alpha$ bloquea la diferenciación adipogénica en células estromales adiposas mamarias	25
Figura 2: TNF $\alpha$ disminuye la expresión relativa de marcadores asociados a diferenciación adipogénica en células estromales mamarias sanas	27
Figura 3: TNF $\alpha$ aumenta la expresión relativa de transcritos de IL-1 $\beta$ y CCL2 en preadipocitos mamarios	28
Figura 4: Expresión relativa de citoquinas pro inflamatorias en adipocitos mamarios maduros.	29
Figura 5: Ensayo de ELISA para la cuantificación de CCL2 en medios condicionados de preadipocitos y adipocitos mamarios	31
Figura 6: Medios condicionados por preadipocitos mamarios tratados con TNF $\alpha$ estimulan el reclutamiento de monocitos humanos THP-1	32
Figura 7: CCL2 presente en medios condicionados de preadipocitos tratados con TNF $\alpha$ estimula el reclutamiento de monocitos	33
Figura 8: Factores solubles de medios condicionados de preadipocitos mamarios tratados con TNF $\alpha$ promueven la migración de células epiteliales MCF-7	34
Figura 9: Factores solubles de medios condicionados de preadipocitos mamarios tratados con TNF $\alpha$ promueven la migración de células epiteliales MCF-7 de manera dependiente de CCL2	35
Figura 10: Factores solubles de medios condicionados por preadipocitos tratados con TNF $\alpha$ aumentan la proliferación en células MCF-7 a las 24 h de tratamiento	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Secuencia partidores qPCR	20
------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

IL-6: Interleuquina 6

MC: Medio condicionado

MEC: Matriz extracelular

CAF: Fibroblastos asociados al cáncer

CAA: Adipocitos asociados al cáncer

CCL2/MCP-1: Proteína 1 quimioatrayente de monocitos

CCL5: Ligando 5 de quimioquina

IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 beta

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

FVE: Fracción vascular estromal

IGF-1: Factor de crecimiento tipo 1

HIF-1: Factor inducible por hipoxia 1

CLS: Estructuras de tipo corona (por sus siglas en inglés)

IMC: Índice de masa corporal

JAK: Janus kinasa

STAT3: Traductor de señal y activador transcripcional 3

ER+: Receptor de estrógenos positivo

ER-: Receptor de estrógenos negativo

## RESUMEN

Tanto el cáncer de mama como la obesidad representan patologías de alta prevalencia mundial. En la actualidad, se ha relacionado la obesidad como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama del tipo receptor de estrógenos positivo en mujeres post menopáusicas. En un estado obesogénico, el tejido adiposo sufre diversos cambios en su perfil secretorio, capacidad de expansión y mecanismos asociados al metabolismo de lípidos, que dan como resultado, un tejido adiposo hipertrófico, acompañado de un estado de inflamación crónica. En la mama, los adipocitos representan el tipo celular más abundante del estroma mamario, por lo que se hace razonable pensar que la inflamación, asociada a obesidad, es capaz de generar cambios en el estroma de la mama a través de citoquinas proinflamatorias, alterando así el microambiente mamario, en la interacción estroma epitelio.

Tanto el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) como la interleuquina 6 (IL-6), citoquinas aumentadas en obesidad, han sido relacionados con el inicio, progresión y metástasis en el cáncer de mama, por lo que resulta relevante evaluar el rol de ambas en la formación de un nicho proinflamatorio pre tumoral y la posible transformación epitelial mamaria en condición de obesidad.

En ese contexto, nos propusimos analizar el efecto de factores inflamatorios aumentados en obesidad, en la formación de un nicho pre tumoral en el estroma mamario.

En el presente trabajo se utilizaron cultivos primarios de estroma adiposo mamario de mujeres sanas, los cuales fueron estimulados con  $TNF\alpha$  o IL-6. De este modo se obtuvieron medios condicionados (MC) de preadipocitos mamarios primarios expuestos a condiciones proinflamatorias, con los cuales, posteriormente, se estimularon células epiteliales mamarias y monocitos THP-1, con la finalidad de evaluar diversas condiciones asociadas a la formación de un nicho inflamatorio y

pre tumoral. Se analizó el efecto que los factores inflamatorios tienen sobre la diferenciación de células estromales hacia un fenotipo adiposo, además del efecto de factores solubles estromales en el reclutamiento de monocitos, y la adquisición de características malignas en células epiteliales mamarias MCF-7.

Nuestros datos muestran que en presencia de  $TNF\alpha$  pero no así de IL-6, los preadipocitos mamarios primarios presentan menor capacidad de diferenciación adipogénica. MC por células estromales preinflamadas estimulan el reclutamiento de monocitos THP-1. Por su parte, células epiteliales mamarias MCF-7 expuestas a medios condicionados derivados de estromas mamarios inflamados, presentaran una mayor capacidad de migración, sin cambios en la proliferación.

En resumen, nuestros resultados muestran que células estromales mamarias expuestas a  $TNF\alpha$  generan factores proinflamatorios y promueven la adquisición de propiedades malignas por el epitelio, lo que sugiere la configuración de un nicho pro tumoral.

## ABSTRACT

Breast cancer and obesity represent pathologies of high global prevalence. At present, obesity has been associated as a risk factor for the development of estrogen receptor-positive breast cancer in postmenopausal women. In an obesogenic state, adipose tissue undergoes various changes in its secretory profile, expansion capacity, and mechanisms associated with lipid metabolism, resulting in hypertrophic adipose tissue, accompanied by a state of chronic inflammation. In the breast, adipocytes represent the most abundant cell type in the mammary stroma, so it is reasonable to think that inflammation, associated with obesity, is capable of generating changes in the breast stroma through pro-inflammatory cytokines, altering the mammary microenvironment, in the stromal epithelium interaction.

Both tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL-6), cytokines increased in obesity, have been related to the initiation, progression and metastasis in breast cancer, so it is relevant to evaluate the role of both in the formation of a pre-tumoral pro-inflammatory niche and the possible mammary epithelial transformation in obesity.

In this context, we analyze the effect of increased inflammatory factors in obesity, on the formation of a pre-tumoral niche in the mammary stroma.

In the present work, primary cultures of mammary adipose stroma from healthy women were used, which were stimulated with TNF $\alpha$  or IL-6. In this way, conditioned media (MC) of primary mammary pre-adipocytes exposed to pro-inflammatory conditions were obtained, with which, later, mammary epithelial cells and THP-1 monocytes were stimulated, in order to evaluate various conditions associated with the formation of an inflammatory and pre-tumoral niche. The effect that inflammatory factors have on the differentiation of stromal cells towards an adipose phenotype was analyzed, as well as the effect of soluble stromal factors on the recruitment of monocytes, and the acquisition of malignant characteristics in MCF-7 mammary epithelial cells.



Our data show that, in the presence of TNF $\alpha$  but not IL-6, primary mammary pre-adipocytes show lower capacity for adipogenic differentiation. MC by pre-inflamed stromal cells stimulate the recruitment of THP-1 monocytes. On the other hand, MCF-7 mammary epithelial cells, exposed to conditioned media derived from inflamed mammary stroma, will present a greater migration capacity, without changes in proliferation.

In summary, our results show that mammary stromal cells exposed to TNF $\alpha$  generate proinflammatory factors and promote the acquisition of malignant properties by the epithelium, suggesting the configuration of a pro-tumoral niche.

## 1.-INTRODUCCION

### 1.1- Cáncer de mama

En el año 2020, el cáncer de mama se convirtió en el cáncer de mayor prevalencia a nivel mundial, afectando a 2,3 millones de mujeres, sobrepasando los casos diagnosticados de cáncer de pulmón. En el sexo femenino, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por cáncer, alcanzando una tasa de mortalidad de un 15,5% (1). De acuerdo a los datos de GLOBOCAN (International Agency for Research on Cancer Project), se estima que en nuestro país, durante el año 2020 se diagnosticaron 48,1 casos de cáncer de mama por cada 100.000 habitantes, provocando un número de muertes estimada en 13,6 casos por cada 100.000 habitantes (2).

El cáncer, de forma genérica, corresponde a un conjunto de enfermedades en las cuales las células presentan un desequilibrio en vías reguladoras de crecimiento y proliferación celular. Dichas células malignas utilizan vías metabólicas alternativas, lo que permite la supervivencia celular facilitando así, la progresión del cáncer (3).

La mama corresponde a un órgano formado principalmente por tejido adiposo, el cual se encuentra inervado por una red de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios, además de estar compuesta por tejido conectivo fibroso y ligamentos. Dentro de su estructura, la mama contiene de 12 a 20 lóbulos, que se dividen en pequeños lobulillos, los cuales se encuentran conectados a través de conductos lácteos. El cáncer de mama, generalmente se desarrolla a partir de células epiteliales que recubren el interior de los conductos mamarios o lóbulos, clasificando esta patología como cáncer ductal o lobular, respectivamente. Dependiendo de su capacidad invasiva, estos tumores se clasifican en tumores in situ o invasivos (4).

Se han estudiado intensamente los aspectos moleculares que involucran el desarrollo, progresión y metástasis del cáncer de mama, dando cuenta de la complejidad de estos procesos (5). Bajo este contexto, cabe destacar que, en los últimos años, se ha demostrado que el cáncer de mama no sólo involucra a las células neoplásicas, sino que parte importante del desarrollo, progresión y respuesta al tratamiento es atribuible a alteraciones en el microambiente tumoral (6).

### **1.2.- Microambiente tumoral y su rol en el cáncer de mama**

El microambiente tumoral está compuesto por células tumorales y estroma circundante a éstas. El estroma tisular corresponde a variados tipos celulares como fibroblastos, células inmunes, células endoteliales, células inflamatorias infiltrantes, adipocitos y precursores adiposos, además de moléculas de señalización y componentes de la matriz extracelular (MEC). Este conjunto de células y componentes estromales, influyen en el comportamiento de las células epiteliales a través de la secreción de proteínas de la MEC, quimioquinas, citoquinas y factores de crecimiento (7).

Se ha descrito que la interacción entre célula epitelial y el estroma mamario resulta esencial para el desarrollo y diferenciación normal en la glándula mamaria. En condiciones fisiológicas, el estroma mamario es el encargado de mantener la polaridad de la célula epitelial y mantener el crecimiento controlado del epitelio (8). Está descrito que las células mioepiteliales de la mama han demostrado suprimir el crecimiento, invasión y angiogénesis en células de cáncer de mama (9). Por su parte, tanto miofibroblastos como fibroblastos presentes en un tumor, parecen promover la tumorigénesis y metástasis (10).

El tipo celular más abundante en el estroma mamario tumoral son los fibroblastos, denominados -en este caso- fibroblastos asociados al cáncer (CAF, por sus siglas en inglés). Se conoce que los CAF secretan una serie de factores de crecimiento, quimioquinas entre otros factores solubles, que modulan el estroma y

favorecen el crecimiento e invasión del tumor. Por su parte, estudios han demostrado que los CAF presentan diferencias en el perfil de expresión de proteínas y mRNA en comparación con fibroblastos circundantes a tejido mamario sano, tal es el caso de metaloproteinasas y caveolina-1 (6). Sumado a los fibroblastos, encontramos en el microambiente tumoral macrófagos residentes, los cuales, a su vez, son denominados macrófagos asociados a tumor (TAM, por sus siglas en inglés), cuyos cambios en sus características fenotípicas están asociadas a la promoción del crecimiento tumoral y la angiogénesis, además de facilitar la evasión del tumor frente al sistema inmune a través de supresión de la inmunidad adaptativa de éste (11).

Finalmente, los adipocitos presentes en el estroma mamario tumoral, denominados adipocitos asociados al cáncer (CAA, por sus siglas en inglés) son uno de los tipos celulares más abundantes en el microambiente tumoral. El rol de estas células en la progresión e invasión tumoral ha sido intensamente estudiado llegándose a la conclusión de que este fenotipo tiene la capacidad de entregar a las células neoplásicas, metabolitos como cuerpos cetónicos, ácidos grasos, piruvato y lactato (12, 13). Los CAA se diferencian de un adipocito normal, en que presentan un fenotipo tipo fibroblasto y son de menor tamaño. Además, muestran una dispersión de las gotas lipídicas, sobreexpresión de colágeno tipo IV y adiponectina, presentan un aumento en la secreción de CCL2, CCL5, interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y leptina (13).

Durante el desarrollo y progresión del cáncer de mama, los adipocitos asociados al cáncer (CAA), cumplen un rol relevante en otorgar características invasivas, migratorias y de resistencia a fármacos a las células cancerosas, ya que este fenotipo de adipocito, tiene la capacidad de transdiferenciarse a fibroblastos derivados de adipocito, además de suprimir la diferenciación a adipocito maduro, otorgando características fibróticas al tejido mamario. Esta característica unida a la producción alterada de metaloproteinasas, modifican la matriz extracelular y

promueven la inflamación e invasión tumoral, que facilita la motilidad de las células tumorales. Este tipo de modificaciones, que disminuyen la proporción de tejido adiposo, otorgan la característica de rigidez al tumor (14, 15).

Para destacar el rol relevante del estroma en el cáncer de mama, cabe mencionar un estudio en modelo *in vivo* de ratón, el cual presentaba como característica principal una disminución en la capacidad proteolítica de colágeno lo que hacía un tumor menos adiposo y más fibroso. En dicho estudio se demostró que, una mayor densidad de colágeno estromal en el tejido mamario de ratón, resultó en un aumento de tres veces en el número de tumores, y estos tumores presentaron un fenotipo con mayor capacidad invasiva, tanto local como en metástasis (16).

En humanos, los estudios epidemiológicos han demostrado que en un tejido mamario con densidad mamográfica del 60% o más, confiere un riesgo relativo de tres a cinco veces mayor de cáncer de mama (17). El hecho de que las lesiones desmoplásicas estén presentes en ausencia de células tumorales, sugiere que esta característica es una condición preexistente y que favorece el desarrollo del cáncer.

### **1.3.- Obesidad, inflamación y cáncer de mama**

La obesidad, definida como una acumulación excesiva de tejido adiposo a nivel corporal y diagnosticada en personas que presentan un índice de masa corporal (IMC)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, afecta a 393,5 millones de mujeres a nivel global, lo que se traduce en una prevalencia de un 15,1% (18). Esta condición patológica se ha transformado en uno de los principales problemas de salud pública en los últimos 50 años. La obesidad representa un factor de riesgo modificable para el desarrollo de enfermedades potencialmente mortales, como el cáncer de mama ya que, se ha estudiado un efecto tanto en su desarrollo como progresión y pronóstico (19). Esta correlación se ha atribuido a la función endocrina dependiente de la obesidad del tejido adiposo que es capaz de producir mediadores inflamatorios (como ciertas

citoquinas) y participar en el reclutamiento de células inflamatorias, como macrófagos (20).

En personas obesas, el tejido adiposo experimenta una serie de cambios en su perfil secretorio, modo de expansión y metabolismo de lípidos. El tejido adiposo blanco se encuentra compuesto por adipocitos maduros y la fracción vascular estromal (FVE), que incluye preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales y células inmunes (21). Se ha planteado que la interacción entre las células inmunes y los adipocitos, da lugar a procesos inflamatorios, trayendo consigo la disfunción consecuente del tejido adiposo (20).

Durante la progresión de la obesidad, el tejido adiposo blanco se expande mediante la hipertrofia e hiperplasia de adipocitos. Dicha expansión, se produce en respuesta al balance energético positivo y a la exposición crónica a nutrientes, generando un desbalance sistémico asociado a altos niveles de insulina, factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y estrógenos, además de cambios en la activación de rutas de señalización asociadas a adipoquinas desbalanceadas como leptina y adiponectina (22).

Asociado a esto, en la literatura actual, existe vasta evidencia de la asociación entre la obesidad y la carcinogénesis mamaria basada en la alteración de vías de señalización celular sensibles a nutrientes, como es el caso del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) e insulina y la vía de activación de mTOR (PI3K/Akt), lo que lleva a procesos celulares como proliferación, angiogénesis, glicólisis y procesos anti apoptóticos, dando paso a la tumorigénesis y a un aumento en la metástasis (23).

Durante la expansión del tejido adiposo obeso, la inflamación surge producto de la infiltración de células inmunes, y la restructuración del tejido, a causa de la hipertrofia y angiogénesis, además de un aumento en la presencia de los ácidos grasos libres que resultan como producto de la desregulación en la lipólisis por parte de los adipocitos. A medida que la obesidad progresa, la hipertrofia de los adipocitos ocurre de manera acelerada, al revés de los procesos angiogénicos, que resultan

insuficientes. Es así, como el tejido adiposo blanco se convierte en un tejido pobre en vascularización, con regiones en las cuales el suministro de oxígeno es deficiente, fenómeno denominado hipoxia. Este proceso genera que, en el tejido adiposo blanco hipertrófico y poco vascularizado, se secrete el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), el cual inhibe la maduración de los preadipocitos a adipocitos, otorgando de este modo características fibróticas al tejido adiposo blanco obeso (24). Además de lo anterior, los macrófagos residentes en el tejido adiposo visceral fagocitan los adipocitos necróticos presentes en el tejido adiposo obeso formando estructuras de tipo corona (CLS, por sus siglas en inglés), las cuales resultan un actor clave en el proceso inflamatorio del tejido. Dichas estructuras formadas por macrófagos y adipocitos necróticos o dañados, han sido descritas en tejido adiposo mamario, y se han correlacionado de manera positiva con el índice de masa corporal (IMC). Esta correlación, a su vez, se ha asociado a peor pronóstico en cáncer de mama y remodelamiento de la matriz extracelular en el tejido adiposo mamario a un tipo más fibrótico, entre otros efectos (25).

Sumado a lo anterior, cabe mencionar que en un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama que presentaban sobrepeso u obesidad, se observó la presencia de estructuras en forma de corona en tejido adiposo circundante al tumor. La presencia de estas estructuras era 3,2 y 6,9 veces mayor en mujeres con sobrepeso y obesidad, respectivamente, en comparación con mujeres de peso normal. A su vez, se observó que en aquellas pacientes que presentaban estructuras en forma de corona, el tamaño de los adipocitos era significativamente mayor en comparación con aquellas que no presentaban dichas estructuras. Este resultado, daría cuenta de que la inflamación podría ocurrir en etapas tempranas, durante la hipertrofia del tejido como consecuencia de la obesidad, previo al desarrollo tumoral (26).

En base a lo mencionado, el tejido adiposo, en conjunto con la hipoxia del tejido adiposo blanco, promueven la infiltración de células inmunes, convirtiéndose en un tejido productor de citoquinas y quimioquinas que, a su vez, atraen a nuevos

macrófagos con vías de activación alternativas, que en su conjunto, promueven y mantienen un estado pro inflamatorio (27).

La inflamación descrita como característica en obesidad, está mediada por citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) y la interleuquina 6 (IL-6), que corresponden a dos de los mediadores más relevantes secretados por el tejido adiposo obeso, que podrían afectar el proceso carcinogénico mamario (28).

#### **1.4.- IL-6 y cáncer de mama**

La interleuquina 6, es una citoquina que cumple un importante rol en diversos procesos fisiológicos en el organismo asociados a proliferación celular, inflamación aguda, metabolismo, procesos inmunológicos y remodelamiento óseo. IL-6 se une a su receptor  $IL-6R\alpha$ , activando y reclutando la proteína janus kinasa (JAKs), la cual, a su vez, fosforila al traductor y activador de transcripción 3 (STAT3), cumpliendo su efecto en la transcripción génica. La activación constante de la ruta IL-6/JAK/STAT3 se asocia con la promoción de la proliferación e invasión celular, suprimiendo la apoptosis de células cancerosas (29). La activación de STAT3 por la vía de IL-6, regula la inflamación y transformación neoplásica (30).

La desregulación en la vía de IL-6, se relaciona con la patogénesis de enfermedades inmunes e inflamatorias. En diversos tipos de cáncer, entre ellos el de mama, una de las vías de señalización que se encuentra alterada es la de la IL-6. Se ha observado, que IL-6 y STAT3 fosforilada, se encuentran sobre expresadas en casos de carcinoma mamario primario (31).

Cabe mencionar que, en el caso del cáncer de mama, la diseminación de células metastásicas, está estrechamente relacionada con procesos inflamatorios que se llevan a cabo en el microambiente tumoral, a través de la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, que cooperan en el desarrollo y progresión del cáncer (32). Como se describió previamente, el microambiente tumoral está compuesto por una diversidad de células, entre ellas fibroblastos,

adipocitos, células inmunes como macrófagos, entre otras, las cuales son capaces de secretar IL-6 de forma autocrina o paracrina, favoreciendo procesos proliferativos (29)

### 1.5.- TNF $\alpha$ y cáncer de mama

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) corresponde a una proteína transmembrana de tipo II, además de encontrarse como citoquina de manera soluble. El rol fundamental que cumple TNF $\alpha$  radica en la iniciación de reacciones inflamatorias del sistema inmune innato. Existen dos tipos de receptores para TNF $\alpha$ , TNFR I presente en la mayoría de los tejidos humanos y TNFR II expresado en células inmunes. TNFR I es activado por la forma soluble y de transmembrana de TNF $\alpha$ , mientras que TNFR II es activado únicamente por la forma de TNF $\alpha$  integrada a nivel membrana. Se ha descrito que TNF $\alpha$  se encuentra involucrada en procesos asociados al mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune y procesos inflamatorios, además de asociarse a procesos patológicos como inflamación crónica, autoinmunidad y cáncer (33).

En cuanto a los mecanismos moleculares descritos para TNF $\alpha$  resulta importante diferenciar sus efectos de acuerdo al tipo de receptor activado. Tal como se ha descrito, TNF $\alpha$  al unirse a su receptor TNFR I, promueve la formación de diversos complejos de señalización, cada uno con diferentes respuestas biológicas, entre ellas la activación de factores nucleares de transcripción, como es el caso de NF- $\kappa$ B y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), lo que se traduce en la inducción de inflamación, degeneración de tejido, supervivencia celular y proliferación. La activación de la caspasa-8 producto de la unión de TNF $\alpha$  a su receptor tipo I, finaliza con la inducción de apoptosis (34). Por su parte, la unión ligando-receptor TNFR II, se traduce en la formación de un complejo de señalización que determina la activación de NF- $\kappa$ B, MAPKs y AKT, lo que lleva a una respuesta celular asociada a homeostasis como lo es la regeneración de tejido, proliferación

celular, supervivencia celular, así como la defensa del hospedero e inflamación (35). En resumen, TNFR1 resulta fundamental para respuestas citotóxicas y proinflamatorias a partir de  $TNF\alpha$ , mientras que TNFR2 media la activación, migración y proliferación celular (34).

Producto de lo anterior, es que  $TNF\alpha$  destaca como una importante citoquina proinflamatoria que ha sido encontrada en el microambiente tumoral en diferentes grados de cáncer de mama, asociada principalmente por su efecto en la célula tumoral en procesos proliferativos, mecanismos de supervivencia, transición epitelio mesénquima y metástasis. Debido a esto, es que  $TNF\alpha$  se considera como una molécula pro tumorigénica (36).

Las concentraciones plasmáticas de  $TNF\alpha$  han sido correlacionadas positivamente con el índice de masa corporal (IMC) (37). Como se ha mencionado anteriormente, la obesidad representa un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama, y es por esto que se han realizado estudios con la finalidad de determinar el efecto de  $TNF\alpha$  en el cáncer de mama. Dichos trabajos se han centrado en los efectos de esta molécula en proliferación, activación de vías de señalización celular y activación del ciclo celular en diferentes líneas de adenocarcinoma mamario o células epiteliales mamarias sanas (38, 39). Weichhaus y cols., observaron que  $TNF\alpha$  aumenta la proliferación y activa la vía MAPK en células SK-BR-3 y MCF-10A. En el caso de células MDA-MB-231 se determinó que la activación de la vía PI3K no presentaba cambios, mientras que la activación de MAPK y la progresión del ciclo celular disminuía con el tratamiento de 10 ng/mL de  $TNF\alpha$ , sugiriendo un aumento en la apoptosis (40).

En base a los antecedentes expuestos, el siguiente trabajo de tesis se desarrolló en base a un modelo celular *in vitro*, con la finalidad de evaluar y describir un posible efecto de los factores inflamatorios característicos del tejido adiposo obeso, como IL-6 y  $TNF\alpha$ , sobre el estroma mamario normal, el cual pueda favorecer la formación de un nicho proinflamatorio pre tumoral que, posteriormente, afecte al epitelio mamario, dando cuenta así, de un posible mecanismo celular a



través de la cual, la inflamación asociada a obesidad represente un factor de riesgo para el cáncer de mama.

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

### 2.1.- Hipótesis

Los factores inflamatorios asociados a obesidad ( $\text{TNF}\alpha$  e IL-6) promueven la generación de un nicho proinflamatorio pre tumoral en el estroma mamario, el cual favorece una transformación epitelial, en un modelo *in vitro*.

### 2.2.- Objetivo General

Analizar el efecto de factores inflamatorios asociados a obesidad ( $\text{TNF}\alpha$  e IL-6), en la formación de un nicho proinflamatorio pre tumoral en el estroma mamario, que promueva una transformación epitelial en un modelo *in vitro*.

#### 2.2.1.- Objetivos Específicos

- I. Evaluar el efecto de factores inflamatorios ( $\text{TNF}\alpha$  e IL-6) sobre la diferenciación adipogénica en cultivos primarios derivados de muestras de estroma mamarios humanos sanos.
- II. Evaluar el efecto de factores solubles generados por cultivos de estromas mamarios sanos inflamados, sobre el reclutamiento (migración), dependiente de CCL2, de monocitos THP-1 humanos.
- III. Determinar el efecto de factores solubles generados por células estromales mamarias sanas inflamadas, sobre la adquisición de propiedades de malignidad, como capacidad de migración y proliferación en células epiteliales mamarias MCF-7.

### **3.-MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.- Cultivo primario de células estromales mamarias humanas**

Se obtuvieron 9 muestras de tejido adiposo mamario de donantes sanas, sin antecedentes de obesidad, diabetes o hipertensión, quienes se sometieron a una mamoplastía electiva para reducción o aumento del volumen mamario. El grupo de donantes presentaban una edad de  $32,1 \pm 4,2$  años y un índice de masa corporal de  $22,5 \pm 2,8$  kg/m<sup>2</sup> (datos mostrados en promedio  $\pm$  DS). Al momento de la cirugía, las donantes firmaron un consentimiento informado, aprobado por el Comité Ético Científico (CEC) del INTA, de la Universidad de Chile.

El tejido recibido se lavó dos veces con buffer fosfato salino y se seccionó en pequeños explantes de 2 a 3 mm<sup>2</sup> cada uno. Una vez seccionados, se cultivaron en placas de 60 mm en medio DMEM alto en glucosa (GIBCO, Life technologies) con suero fetal bovino (SFB; Biological Industries, CT, USA) al 10% y solución antibiótica/antimicótica al 1%, a 37° C con atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días.

Brevemente, tal como se describe en el trabajo de Jing W et al, los explantes obtenidos a partir de tejido adiposo, son capaces de adherirse rápidamente a placas de cultivo. Luego de algunos días de cultivo, células estromales derivadas de tejido adiposo (ASC, por sus siglas en inglés) migran a partir de los explantes y se adhieren a la placa de cultivo. Estas células de tipo fibroblasto, presentan la capacidad de proliferar y diferenciarse a diferentes linajes celulares como condrocitos, adipocitos y osteocitos, al ser sometidas a estímulos específicos (41).

Obtenido el cultivo primario a través de este método, y una vez que las células alcanzaran una confluencia cercana al 70%, se sub cultivaron 2 a 3 veces para ser utilizados en los siguientes ensayos.

### **3.2.- Diferenciación adipogénica.**

Una vez obtenidos los cultivos primarios en las condiciones que se detallaron anteriormente, las células mamarias resultantes fueron sembradas a una densidad de  $10,5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, y fueron sometidas durante 14 días, a un cóctel de diferenciación adipogénica (DMEM alto en glucosa suplementado con SFB al 1%, 0,28 UI/mL de insulina, 0,5 mM de isobutil-metilxantina, 1 mM de dexametasona y 1  $\mu$ M de rosiglitazona) previamente definido en presencia o ausencia de factores inflamatorios (TNF $\alpha$  o IL-6) (42). El medio de diferenciación fue cambiado cada 3 días, y la caracterización del adipocito maduro fue evaluada a través de la acumulación de triglicéridos (gotas lipídicas) mediante tinción Oil Red O para la cuantificación de área teñida (píxeles<sup>2</sup>), además de la expresión de marcadores asociados a adipocitos a través de qPCR.

### **3.3.- Líneas celulares y reactivos**

Para llevar a cabo los objetivos propuestos, se utilizaron las siguientes líneas celulares y reactivos: monocitos humanos de la línea celular THP-1 (código ATCC TIB-202), obtenida a partir muestra de sangre periférica de donante de sexo masculino de 1 año con diagnóstico de leucemia monocítica aguda. Las células THP-1 se obtuvieron en American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) y fueron cultivados en medio RPMI (GIBCO, Life technologies) suplementado con SFB al 10%, solución antibiótica/antimicótica 1%, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Células epiteliales mamarias de la línea celular MCF-7 (código ATCC HTB-22), obtenidas en ATCC (Manassas, VA, USA). Esta línea celular fue obtenida a partir de tejido de glándula mamaria, de mujer de 69 años con diagnóstico de adenocarcinoma ductal y se caracteriza por ser una línea celular positiva a receptor de estrógenos y progesterona, además de ser poco agresiva y de baja capacidad invasiva, por lo que se considera con bajo potencial metastásico (43). Las células MCF-7 fueron cultivadas en medio DMEM F12 (GIBCO, Life Technologies)

suplementado con 10% de SFB, solución antibiótica/antimicótica al 1% a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para distintos ensayos se utilizaron proteínas recombinantes humanas como factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ , código 210-TA), interleuquina 6 (IL-6, código 206-IL) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1/CCL2, código 279-MC), las cuales fueron obtenidas en R&D Systems (Minneapolis, MN).

### **3.4.- Obtención de medios condicionados**

Para la obtención de medios condicionados (MC), se mantuvieron los cultivos primarios de células estromales mamarias (preadipocitos primarios) hasta una confluencia de un 90%, y se pretrataron o no, con 20 ng/mL de TNF $\alpha$  o 50 ng/mL de IL-6 durante 72 h. Transcurrido este período, las células fueron lavadas dos veces con PBS, y se agregó medio DMEM alto en glucosa sin SFB durante 24 h. Luego de esto, los medios se recolectaron y se alicuotaron en volúmenes de 1 ml y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización (MC preadipocito). Para la obtención de MC de adipocitos, los cultivos fueron sometidos al cóctel de diferenciación previamente descrito durante 14 días. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con PBS, y se trataron o no, con TNF $\alpha$  o IL-6 durante 72 h. Finalmente, se incubaron en medio libre de suero por 24 horas, procediendo como se mencionó anteriormente (MC adipocito).

### **3.5.- Tinción Oil Red O**

Luego de la exposición de los cultivos primarios estromales mamarios por 14 días al medio adipogénico en presencia o ausencia de los factores inflamatorios TNF $\alpha$  o IL-6, la monocapa fue lavada dos veces con PBS y fijada con formalina al 10% durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se lavó con isopropanol al 60% durante 30 segundos, y se agregó la solución de Oil Red O-isopropil alcohol al 0,2% durante 1 h a temperatura ambiente. Posterior a este tiempo, se lavó nuevamente con isopropanol al 60%, seguido de dos lavados con agua destilada (44).

Una vez terminado el proceso de tinción, se obtuvieron microfotografías (20x) de cada una de las condiciones y se cuantificó el área de tinción (píxeles) a través del software Image J versión 1.53a.

### 3.6.- Extracción de ARN y PCR cuantitativo (qPCR)

Para la obtención del ARN mensajero de las células estromales de cultivo primario, éstas fueron tratadas o no con cóctel adipogénico durante 14 días, para posteriormente ser tratadas durante 72 h con  $TNF\alpha$  o IL-6, luego fueron lisadas con Trizol Reagent (Ambion, Carlsbad, CA) para obtener luego el ARN total de preadipocitos inflamados y adipocitos inflamados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (cDNA), se generó a partir de 1  $\mu$ g de RNA total, utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y Oligo-dT como primer (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones entregadas por el proveedor. La expresión del mensajero para  $PPAR\gamma$ , aP2, IL-1 $\beta$  y CCL2 fue determinada a través de PCR cuantitativo en tiempo real usando LightCycler 96 (Roche). Para dicha reacción, se usaron aproximadamente 200 ng de cDNA y el mix de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) en un volumen total de 10  $\mu$ L. Todas las reacciones fueron realizadas en duplicados y para la normalización de datos se utilizó la expresión del mensajero de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La secuencia de los partidores utilizados para cada gen se detalla a continuación en la tabla I.

**Tabla I: Secuencia de partidores**

Numero de acceso	mRNA blanco	Partidor 1 (5' → 3')	Partidor 2 (5' → 3')
<a href="#">NM_000576.3</a>	IL1- $\beta$	AATCCCCAGCCCTTTTGTTG	AAATGTGGCCGTGGTTTCTG
<a href="#">NM_002982.4</a>	CCL2/MCP1	TGTCCCAAAGAAGCTGTGATCT	GGAATCCTGAACCCACTTCTG
<a href="#">NM_138712.5</a>	PPAR $\gamma$	TTCCCGCTGACCAAAGCAAA	ACTGGCAGCCCTGAAAGATG
<a href="#">NM_001442.3</a>	aP2	TGCAGCTTCCTTCTCACCTTGA	TCCTGGCCCAGTATGAAGGAAATC
<a href="#">NM_002046.7</a>	GAPDH	TTGCCATCAATGACCCCTTC	TGATGACAAGCTTCCCGTTC

### 3.7.- Ensayo de ELISA

Para la cuantificación proteica de CCL2/MCP1 en medios condicionados de preadipocitos y adipocitos generados como se describió anteriormente (tratados o no con  $\text{TNF}\alpha$  o IL-6), se realizó un ensayo de ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, número de catálogo DY279-05).

Previo al ensayo, los reactivos fueron preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los medios condicionados fueron diluidos 1:10 para ser usados en este ensayo. Brevemente, se preparó el anticuerpo de captura a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS, luego se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  a cada pocillo y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido este período, los pocillos fueron lavados con el buffer de lavado tres veces con un volumen de 400  $\mu\text{L}$  por vez y se bloquearon los pozos adicionando 300  $\mu\text{L}$  de solución al 1% de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en PBS, se incubó mínimo por 1 h a temperatura ambiente, seguido de tres lavados, tal como se mencionó anteriormente.

Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra de medio condicionado a los pocillos, en duplicados técnicos, al igual que cada punto del estándar. La placa fue cubierta con lámina adhesiva y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación se realizaron tres lavados y se agregó 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de detección a una concentración de 25  $\text{ng}/\text{mL}$  a cada uno de los pozos y se incubó durante 2 h. Nuevamente se lavó tres veces y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-HRP 1:40 de solución 1% BSA en PBS, incubándose por 20 minutos. Posterior a esto, se procedió a lavar los pozos tres veces y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de solución 1:1 de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y tetrametilbenzidina durante 20 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de 2 N de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) para detener la reacción. Inmediatamente se midió absorbancia en equipo TECAN infinite f50, a una longitud de onda de 450 nm corregida por 540

nm. A partir de los datos obtenidos se calculó la concentración de CCL2 (pg/mL) considerando el factor de dilución y de acuerdo con la curva estándar.

### 3.8.- Ensayo de Migración

Para llevar a cabo los ensayos de migración tanto en monocitos THP-1 como en células epiteliales MCF-7, se utilizaron dispositivos de doble cámara (Transwell) en placas de 24 pocillos, de 6,5 mm de diámetro de membrana, y con un tamaño de poro de 5  $\mu\text{m}$  y 8  $\mu\text{m}$ , respectivamente para cada tipo celular (Corning, Corning, NY).

En primer lugar, se realizó un ensayo de reclutamiento de monocitos THP-1 en el cual, se sembraron en la cámara superior 1 x 10<sup>5</sup> células THP-1 en medio sin SFB. Se utilizaron los medios condicionados de preadipocitos estimulados o no con TNF $\alpha$  al 50%. Como control positivo, se utilizó como quimioatrayente 10 ng/mL de la proteína recombinante CCL2 (R&D Systems, Minneapolis, MN). El ensayo se llevó a cabo durante 6 h.

En el caso de células MCF-7, se sembraron 1 x 10<sup>5</sup> células en la cámara superior en medio libre de SFB. Se usaron los mismos MC mencionados anteriormente, y como control positivo se utilizó como estímulo SFB al 10%. Las células MCF-7 se estimularon a migrar durante 48 horas.

Posteriormente, se realizaron los mismos ensayos de reclutamiento y migración, utilizando un anticuerpo bloqueante anti CCL2 a 10  $\mu\text{g/mL}$  (R&D Systems, Minneapolis, MN) el cual fue agregado al momento del ensayo junto con el MC en la cámara inferior del sistema Transwell.

Luego de transcurrido el período de migración, las células situadas en la cara inferior de la membrana, fueron fijadas y teñidas con solución de cristal violeta al 0,2% y etanol al 10% (45). Cada condición fue evaluada en duplicados y se fotografiaron (20X) 8 campos por cada una.

### 3.9.- Ensayo de MTT (proliferación)

Con la finalidad de determinar si los MC obtenidos a partir de preadipocitos tratados o no con  $TNF\alpha$  tenían un efecto sobre la proliferación en células MCF-7, se llevó a cabo un ensayo de actividad metabólica conocido como MTT, el cual se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La oxidación realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa da como producto formazán, un compuesto coloreado azul, el cual puede ser medido colorimétricamente en un espectrofotómetro. Este ensayo permite evaluar, de manera indirecta, la cantidad de células metabólicamente activas, lo cual es proporcional a la cantidad de formazán producido y medido a través de absorbancia.

Para esto, se sembraron  $5 \times 10^4$  células/mL en placas de 96 pozos, en un volumen de 200  $\mu$ L. Luego de 24 h, el medio fue retirado y se adicionaron los MC (50%) de preadipocitos pretratados o no con  $TNF\alpha$ . Los ensayos se realizaron por períodos de 24, 48, 72 y 96 h. Transcurrido el tiempo, el medio fue retirado cuidadosamente y se incubaron las células durante 1 h a 37°C y  $CO_2$  al 5%, con una solución de MTT (1 mg/mL de PBS). Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, y se dejó secar la placa aproximadamente durante 10 minutos a 37°C y en oscuridad. Una vez secas, se resuspendieron las sales de formazán en una solución de DMSO:Isopropanol (3:2) durante 15 minutos a 37°C, en oscuridad. Finalmente, se recolectó el producto solubilizado y se determinó la absorbancia a 570 nm en equipo TECAN infinite f50.

### 3.10.- Análisis y procesamiento de datos

Los datos obtenidos de cada ensayo fueron ordenados en planillas Excel, para su posterior análisis estadístico y realización de gráficos con el programa GraphPad Prism 9. Se llevaron a cabo pruebas estadísticas no paramétricas tales como Kruskal-Wallis, seguido por el test de comparación múltiples de Dunn, test de



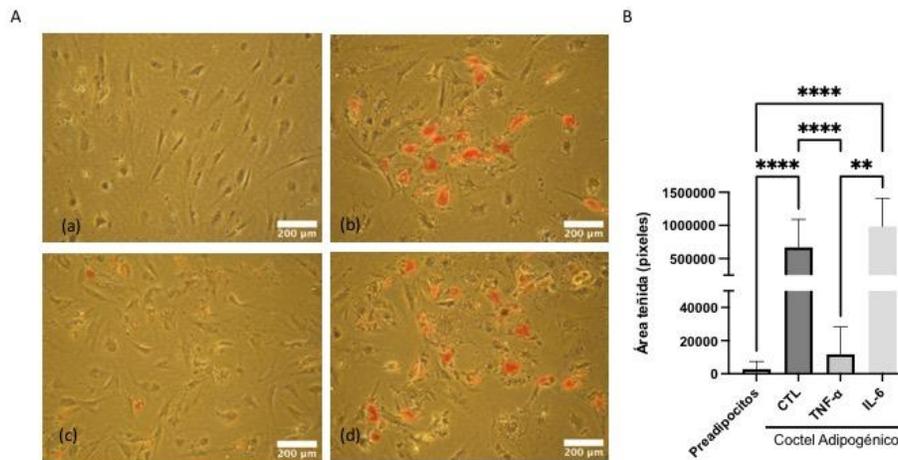
Friedman seguido de un test de Bonferroni para comparaciones múltiples y además de test de Wilcoxon. Se consideró la significancia estadística con un  $p < 0,05$ .

El cálculo de la expresión relativa de cada uno de los genes mencionados, se determinó de acuerdo al modelo matemático para la determinación de la expresión relativa de Pfaffl (46).

#### 4.- RESULTADOS

##### Efecto de los factores inflamatorios asociados a obesidad, sobre la diferenciación adipogénica en cultivos primarios estromales sanos.

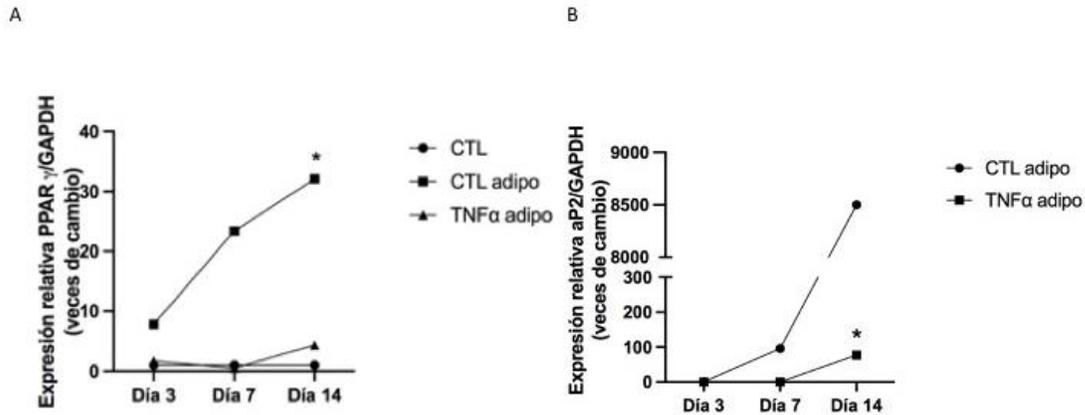
Luego de someter los cultivos primarios de estroma mamario a un estímulo de diferenciación adipogénica durante 14 días, en presencia o ausencia de factores inflamatorios ( $TNF\alpha$  o IL-6), los cultivos tratados con  $TNF\alpha$  se caracterizaron por una escasa formación de gotas lipídicas, fenotipo éste que caracteriza un adipocito maduro. La adición de IL-6 no provocó cambio fenotípico alguno (figura 1A y 1B).



**Figura 1. Efecto de  $TNF\alpha$  sobre la diferenciación adipogénica en células estromales adiposas mamarias.** **A.** Microfotografías (10X) Tinción Oil Red O en células estromales adiposas mamarias control (a), expuestas a cóctel adipogénico (b), células expuestas a cóctel adipogénico con  $TNF\alpha$  (c) o IL-6 (d) durante 14 días. **B.** Cuantificación del área teñida correspondiente a gotas lipídicas. Las barras representan promedio  $\pm$  DS. Test Kruskal-Wallis, seguido de test de comparaciones múltiples de Dunn, \*\*\*\* $p < 0,0001$  y \*\* $p < 0,01$  (n=9).

Posteriormente, se estimularon cultivos primarios equivalentes bajo las mismas condiciones previamente descritas para luego ser lisados con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de los transcritos de PPAR $\gamma$  y aP2, considerando ambos genes como marcadores de diferenciación adipogénica. Tal como se observa en la figura 2A, la expresión de PPAR $\gamma$  luego de 14 días de tratamiento, aumenta significativamente en relación con el control (CTL), en aquellas células sometidas al estímulo adipogénico. En el caso de aquellas células adiposas mamarias tratadas con TNF $\alpha$  y el medio adipogénico, la expresión relativa de PPAR $\gamma$  no presenta diferencias significativas en relación al control. En comparación al control adipogénico, la expresión de PPAR $\gamma$  en células tratadas con TNF $\alpha$ , presenta una tendencia a la baja en su expresión ( $p=0,055$ ). En el caso del marcador aP2, se puede observar que existe una diferencia significativa al día 14 entre los preadipocitos sometidos a diferenciación y aquellos sometidos a diferenciación en presencia de TNF $\alpha$ .

Los resultados obtenidos en base a lo descrito, indican que al someter preadipocitos mamaros a un estímulo de diferenciación adipogénica durante 14 días en presencia de TNF $\alpha$  se inhibe la diferenciación adipogénica mientras que, en el caso de IL-6 no se presenta ningún efecto inhibitorio.



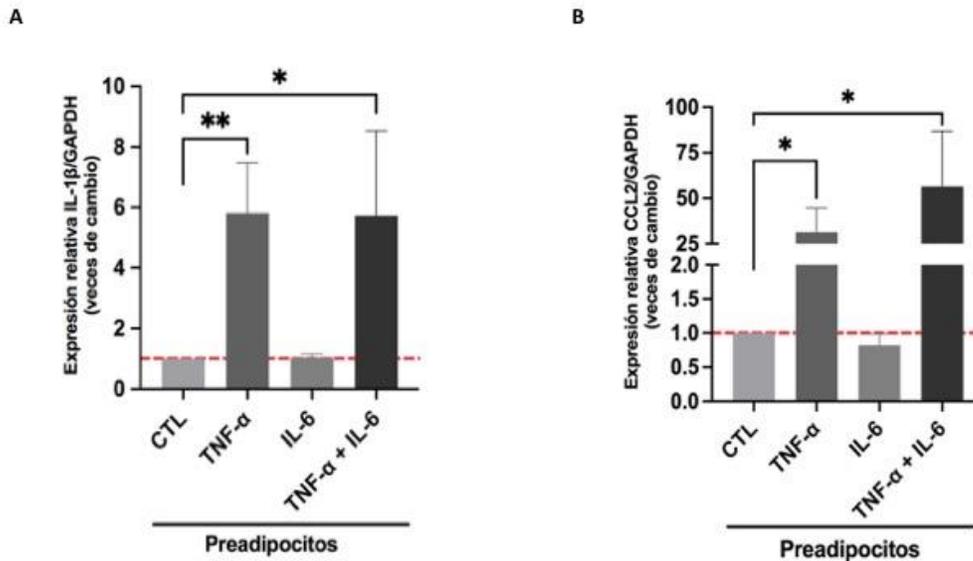
**Figura 2. Efecto de TNF $\alpha$  sobre la expresión relativa de marcadores asociados a diferenciación adipogénica en células estromales mamarias sanas. A.** Expresión relativa de los transcritos de PPAR $\gamma$  en muestras mamarias tratadas con cóctel adipogénico con y sin TNF $\alpha$  durante 14 días. Test Anova dos vías, seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey, \* $p < 0,05$  en relación a control (n=3). **B.** Expresión relativa de los transcritos para aP2, luego de tratar células estromales mamarias con cóctel adipogénico con y sin TNF $\alpha$  durante 14 días. Test Anova dos vías, seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey, \* $p < 0,05$  en relación a control adipogénico (n=3).

## Rol de factores inflamatorios sobre la formación de un nicho proinflamatorio pre tumoral

Para investigar el efecto de los factores inflamatorios asociados a obesidad (TNF $\alpha$  o IL-6) sobre la formación de un nicho proinflamatorio en el estroma mamario, se evaluó la expresión de los transcritos de IL-1 $\beta$ , interleuquina clave en procesos inflamatorios y cuya expresión en tumores primarios se ha asociado como un potencial biomarcador en la predicción del desarrollo de metástasis óseas en pacientes con cáncer de mama (47). Además, se evaluó la expresión del transcrito de CCL2, quimioquina asociada al inicio y progresión de varios tipos de cáncer, ya que presenta implicancias relevantes en procesos como angiogénesis,

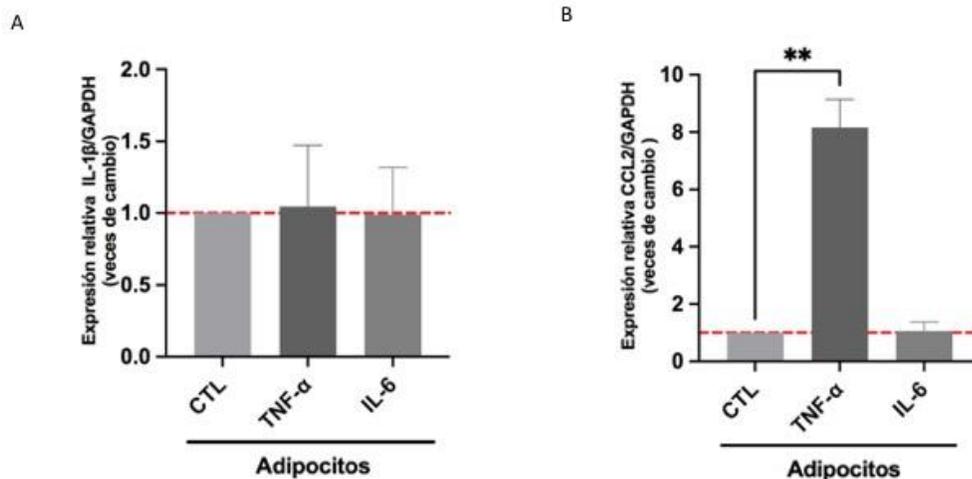
supervivencia, invasión de células tumorales y en el reclutamiento de células inmuno inhibitorias (48).

Se observó que, tanto la expresión relativa de IL-1 $\beta$  (figura 3A) y CCL2 (figura 3B), aumenta respecto al control, luego de tratar preadipocitos mamarios sanos con TNF $\alpha$  durante 72 h, lo que no se observa en aquellos preadipocitos tratados durante el mismo período con IL-6. No se observó una diferencia significativa entre TNF $\alpha$  y TNF $\alpha$  + IL-6 lo que permite sostener que la potencia del cambio es sostenida por TNF $\alpha$ .



**Figura 3. Efecto de TNF $\alpha$  sobre la expresión relativa de transcritos de IL-1 $\beta$  y CCL2 en preadipocitos mamarios.** Expresión relativa de los transcritos para IL-1 $\beta$  (A) y CCL2 (B) luego de tratar preadipocitos mamarios durante 72 h con TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) ó IL-6 (50 ng/mL). Las barras representan promedio  $\pm$  DS. Test de Kruskal - Wallis \*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,05$  (n=9).

Un experimento análogo fue realizado en adipocitos maduros, los que fueron diferenciados durante 14 días y luego tratados durante 72 h con  $TNF\alpha$  o IL-6. Se evaluó la expresión relativa de los transcritos de IL-1 $\beta$  en la que no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones (figura 4A). En cuanto a la expresión relativa de CCL2, se observó un aumento significativo en los adipocitos maduros tratados con  $TNF\alpha$  respecto de adipocitos maduros sin tratamiento (figura 4B).

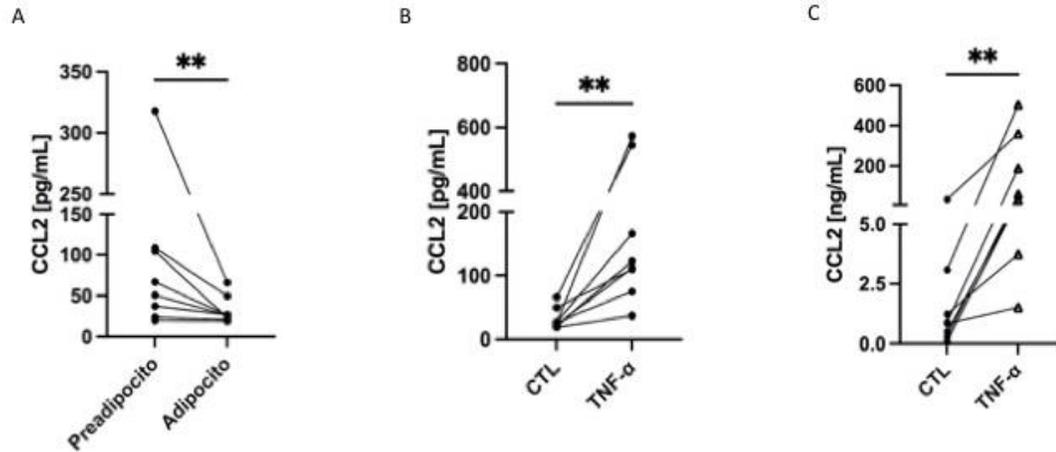


**Figura 4. Expresión relativa de citoquinas pro inflamatorias en adipocitos mamaros maduros.** **A.** Expresión relativa de IL-1 $\beta$  en adipocitos maduros mamaros al ser tratados durante 72 h con  $TNF\alpha$  ó IL-6, luego de 14 días de diferenciación. Test de Kruskal-Wallis, \* $p < 0,05$ . **B.** Expresión relativa de CCL2 en adipocitos maduros mamaros al ser tratados durante 72 h con  $TNF\alpha$  o IL-6, luego de 14 días de diferenciación. Datos corresponden a promedio  $\pm$  DS, Test de Kruskal-Wallis, \*\* $p < 0,01$  (n=5)

De acuerdo con estos resultados, se observó que el efecto de  $TNF\alpha$  sobre la diferenciación y la expresión de transcritos de moléculas proinflamatorias en el estroma mamario era significativamente relevante, pero no así el efecto de IL-6; por lo cual, continuamos analizando los efectos de la inflamación en preadipocitos mamaros, utilizando sólo  $TNF\alpha$  como factor central de inflamación.

En línea con los resultados anteriores, quisimos también cuantificar la cantidad de proteína CCL2 presente en los medios condicionados (MC). Para esto, se obtuvieron los MC de preadipocitos y adipocitos maduros tratados o no con  $TNF\alpha$  durante 72 h, luego de este tratamiento, se lavaron las células y se condicionó medio libre de SFB durante 24 h, para posteriormente realizar un ensayo de ELISA.

De acuerdo a los datos obtenidos, la cantidad de proteína CCL2 contenida en el MC de preadipocitos fue significativamente mayor que en adipocitos (figura 5A), y a su vez, al comparar la abundancia de CCL2 en MC de adipocitos sin estímulo inflamatorio (MC CTL) y MC de adipocitos tratados con  $TNF\alpha$  (MC  $TNF\alpha$ ), identificamos que la cantidad de CCL2 fue significativamente mayor en MC  $TNF\alpha$  versus MC CTL (figura 5B). Por su parte, se realizó la misma comparación en MC de preadipocitos tratados o no con  $TNF\alpha$ , donde se observó un efecto significativamente mayor en MC  $TNF\alpha$  (figura 5C). En base a lo anterior, cabe mencionar que los MC de preadipocitos (MC CTL) presentan basalmente una cantidad significativamente mayor de CCL2 (aproximadamente 500 veces) en comparación con adipocitos y que, si bien ambos fenotipos celulares responden al estímulo de  $TNF\alpha$  durante 72 h en la producción de CCL2, los MC de preadipocitos presentan una mayor concentración de CCL2 en comparación con el efecto generado en adipocitos expuestos al estímulo inflamatorio de  $TNF\alpha$ .

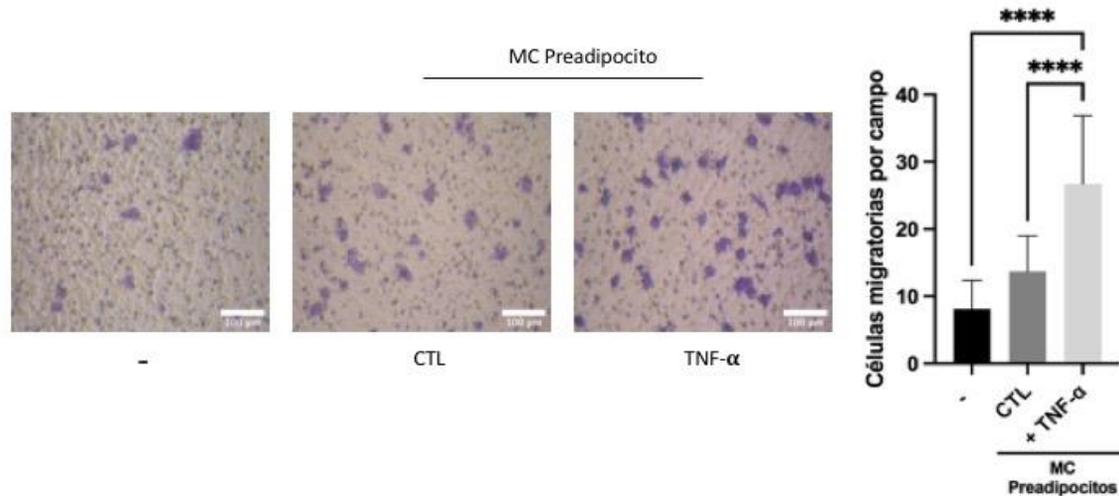


**Figura 5. Ensayo de ELISA para la cuantificación de CCL2 en medios condicionados de preadipocitos y adipocitos mamarios.** Se realizó el ensayo de ELISA luego de 14 días con (MC adipocito) o sin (MC preadipocito) cóctel adipogénico **(A)**. Se realizó el mismo ensayo ELISA, en MC de adipocitos **(B)** y preadipocitos inflamados **(C)** con TNF $\alpha$  durante 72 h. Los datos representan promedio  $\pm$  DS, Test de Wilcoxon pareado \*\* $p < 0,01$  (n=8)

### **Efecto de factores solubles generados por estromas mamarios tratados con TNF $\alpha$ sobre el reclutamiento de monocitos THP-1**

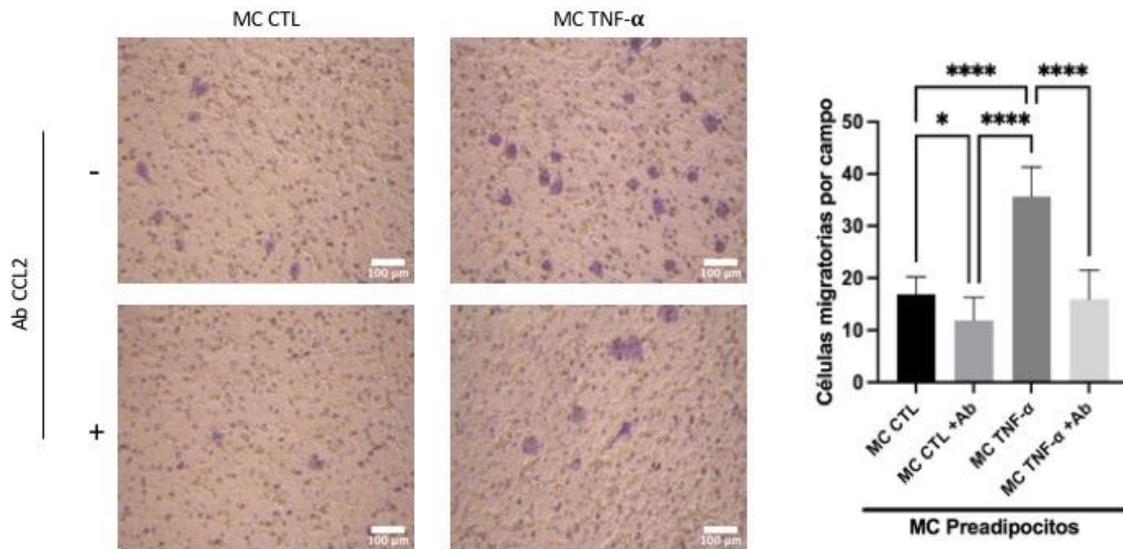
Para determinar si los factores solubles generados por estromas mamarios inflamados colaboran en la formación de un nicho proinflamatorio promoviendo el reclutamiento de monocitos THP- 1, realizamos experimentos de migración (reclutamiento) de monocitos utilizando los MC estromales generados como se comentó anteriormente.

Este experimento se llevó a cabo utilizando sistemas de doble cámaras (Transwell) con filtros de 5  $\mu$ m de poro. Se observó que, aquellos MC generados a partir de preadipocitos mamarios tratados con TNF $\alpha$  representan, de manera significativa, un mayor estímulo quimioatrayente para el reclutamiento de monocitos THP-1 en comparación al MC control de preadipocitos (figura 6).



**Figura 6. Medios condicionados por preadipocitos mamarios tratados con  $TNF\alpha$  estimulan el reclutamiento de monocitos humanos THP-1. (A)** Microfotografías (20X) de monocitos THP-1 estimulados con MC de preadipocitos tratados o no con  $TNF\alpha$  en ensayo de Transwell durante 6 h (5  $\mu m$  de poro). **(B)** Cuantificación de células THP-1 que migran por campo. Las barras representan promedio  $\pm$  DS, Test de Friedman, seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn \*\*\*\* $p < 0.0001$  (n=24, N=3).

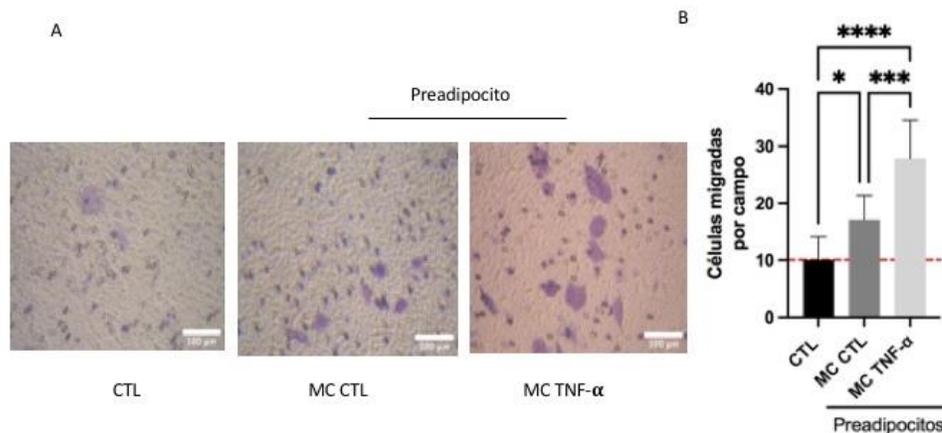
En concordancia con el resultado obtenido en la expresión (mRNA y proteína) de CCL2 en preadipocitos tratados con  $TNF\alpha$ , también investigamos si este estímulo quimioatrayente es el responsable del reclutamiento de monocitos estimulado por los MC. Al realizar el mismo ensayo de Transwell, pero en esta oportunidad, adicionando un anticuerpo bloqueante para CCL2, pudimos observar que existía una diferencia significativa en la disminución del estímulo en el reclutamiento de monocitos THP-1 (figura 7). Sobre la base de lo expuesto anteriormente, podemos afirmar que el aumento en el reclutamiento de monocitos por el MC de preadipocitos tratados con  $TNF\alpha$  (MC TNF) es un fenómeno dependiente de CCL2.



**Figura 7. CCL2 presente en medios condicionados de preadipocitos tratados con  $TNF\alpha$  estimula el reclutamiento de monocitos.** Monocitos THP-1 fueron expuestos a las mismas condiciones experimentales que en la figura 6. Un grupo de estas células fueron puestas a migrar en presencia de MC (50%) y en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueante anti-CCL2 a 10 ug/mL. **(A)** Microfotografías representativas (20X) de células migradas en cada condición y **(B)** cuantificación representada en promedio  $\pm$  DS. Test de Friedman, seguido de test de Bonferroni para comparaciones múltiples \* $p < 0.05$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Los datos corresponden a tres experimentos independientes con MC de tres muestras mamarias diferentes.

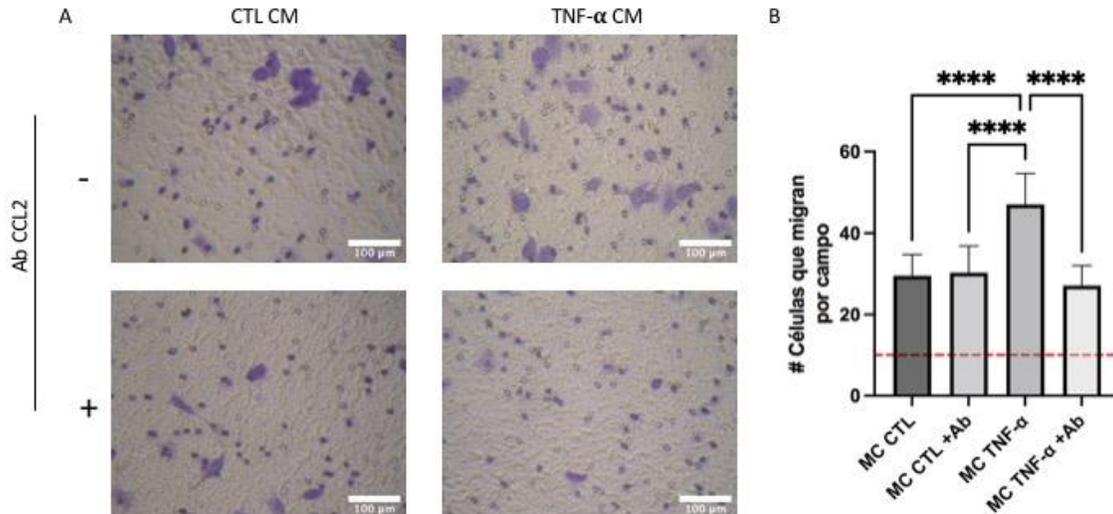
## Efecto de factores solubles generados por estromas mamarios tratados con $TNF\alpha$ sobre la adquisición de características asociadas a malignidad en células epiteliales MCF-7

Con el propósito de poner a prueba el efecto de los MC por células estromales mamarias, sobre características de la malignidad epitelial, se realizó un ensayo de migración en Transwell (8  $\mu m$  de poro) con células MCF-7, utilizando los MC de preadipocitos tratados o no con  $TNF\alpha$  como estímulo migratorio durante 48 h. Luego del tiempo señalado, se observó un aumento significativo en el número de células que migran por campo bajo el estímulo del MC por preadipocitos previamente inflamados con  $TNF\alpha$  (figura 8).



**Figura 8. Efecto de factores solubles de medios condicionados de preadipocitos mamarios tratados con  $TNF\alpha$  sobre la migración de células epiteliales MCF-7.** Se realizó un ensayo de migración de Transwell (8  $\mu m$  de poro) con células MCF-7 durante 48 h. **(A)** Microfotografías (20X) de células MCF-7 expuestas a MC (50%) en cada una de las condiciones descritas. **(B)** Cuatificación de células MCF-7 migradas por campo. Los datos son mostrados en promedio  $\pm$  DS. Test de Kruskal-Wallis seguido de Dunn test para comparaciones múltiples \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,05$  ( $n=24$ ,  $N=3$ ).

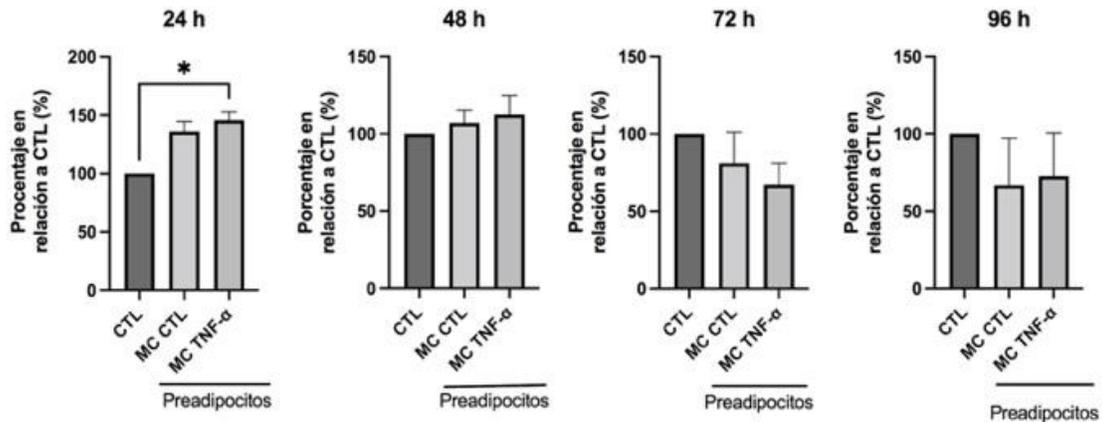
Del mismo modo que en el experimento con células THP-1, y con el propósito de confirmar el papel de CCL2 en el fenómeno migratorio, se realizó el ensayo de migración de Transwell, utilizando el anticuerpo bloqueante para CCL2. Al igual que en el ensayo anterior, las células MCF-7 migraron, a través de membranas con poros de 8  $\mu\text{m}$  durante 48 h, al estímulo de MC al 50%, en presencia del anticuerpo bloqueante anti-CCL2 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que el aumento en la capacidad migratoria de las células MCF-7 es dependiente de CCL2, debido a que, en aquellas células que se expusieron a estímulo quimioatrayente de MC TNF $\alpha$  más el anticuerpo bloqueante durante el ensayo (MC TNF + AB), el estímulo migratorio disminuyó significativamente, no así en el caso de aquellas células estimuladas con MC control de preadipocitos mamarios más el anticuerpo bloqueante (figura 9).



**Figura 9. Efecto de CCL2 presentes en medios condicionados de preadipocitos mamarios tratados con TNF $\alpha$  sobre la migración de células epiteliales MCF-7. (A)** Microfotografías (20X) de ensayo de Transwell (8  $\mu\text{m}$  de poro) en células MCF-7 al ser expuestas 48 h al estímulo de MC de preadipocitos mamarios tratados o no con TNF $\alpha$  (50%) y la adición o no de anticuerpo bloqueante anti-CCL2 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **(B)** Cuantificación de células migradas por campo. Las barras representan promedio  $\pm$  DS. Test de Kruskal-Wallis, seguido de test de comparaciones múltiples de Dunn \*\*\*\* $p < 0,0001$  (n=24, N=3).

Tal como se mencionó previamente, se ha visto que  $\text{TNF}\alpha$  presenta un efecto proliferativo al tratar directamente células epiteliales sanas MCF-10 y cancerosas SK-BR-3 durante 24 y 48h con 10 ng/mL de este factor inflamatorio (40). Sumado a esto y en concordancia con los resultados obtenidos en relación a un aumento en la capacidad migratoria en células MCF-7 a partir de los factores solubles presentes en los MC de preadipocitos tratados con  $\text{TNF}\alpha$ , evaluamos si estos factores solubles contenidos en los MC presentaban algún efecto sobre la proliferación de células epiteliales MCF-7, demostrando así el rol del estroma mamario inflamado sobre la adquisición de características potencialmente malignas en el epitelio.

Para esto se realizó un ensayo de MTT, en el cual se cultivó durante 24, 48, 72 y 96 h células MCF-7 en presencia de distintos MC al 50%. Tal como se observa en la figura 10, se logra apreciar un aumento significativo en la proliferación a las 24 h, en aquellas células MCF-7 tratadas con MC  $\text{TNF}\alpha$  en comparación con el control. Adicionalmente, a las 48 h no se observa una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los casos de tratamientos con MC. Finalmente, y contrario a lo esperado, las células tratadas durante 72 y 96 h con MC de preadipocitos previamente cultivados con y sin  $\text{TNF}\alpha$ , presentaron una tendencia a la baja en la cantidad de células metabólicamente activas, pero sin diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 10. Efecto de factores solubles de medios condicionados por preadipocitos tratados con TNF $\alpha$  sobre la proliferación en células MCF-7 a las 24 h de tratamiento.** Se realizó un ensayo de MTT para medir proliferación celular en células MCF-7. Se cultivaron durante 24, 48, 72 y 96 h con MC de preadipocitos tratados o no previamente con TNF $\alpha$  (20 ng/mL) al 50%. Las barras representan porcentaje (%) considerando 100 al CTL de cada tiempo. Se realizó test de Friedman para determinar el valor de p en cada caso, seguido de un test de comparaciones múltiples de Dunn. \* p<0,05. Los datos corresponden a tres experimentos independientes realizados con MC de tres muestras mamarias diferentes.

## 5.- DISCUSIÓN

El desarrollo de un proceso tumorigénico ocurre producto de la interacción entre componentes epiteliales y estromales (49). Existen tumores, como es el caso del tumor mamario, en el que el componente estromal cumple un papel tan relevante que otorga características asociadas a rigidez del tejido, lo que se denomina como desmoplasia (50). En base a esto, es que el estudio del rol del estroma en el cáncer de mama plantea un desafío de real interés y relevancia.

En el cáncer de mama, el componente estromal más abundante corresponde a células adiposas, que participan en el desarrollo de un ambiente inflamatorio que promueve la tumorigénesis (13). Se ha observado que un exceso de tejido adiposo, característico de mujeres con obesidad, se asocia con mayor riesgo de desarrollo de cáncer de mama, tumores más agresivos y con peor pronóstico (51, 52). En el presente trabajo mostramos que  $TNF\alpha$  inhibe la diferenciación adipogénica en cultivos primarios mamarios sanos y fomenta el desarrollo de un nicho proinflamatorio, además de promover, a través del estroma, la adquisición de características asociadas a malignidad en células epiteliales mamarias.

$TNF\alpha$  corresponde a una citoquina proinflamatoria, cuya función está claramente descrita y que se encuentra elevada a nivel plasmático en personas con obesidad, debido a que es secretada por células inmunes, como macrófagos, presentes en abundancia en el tejido adiposo (53). Si bien existen estudios sobre el rol de  $TNF\alpha$  en células epiteliales mamarias, en los que se ha descrito que el tratamiento de este tipo celular con  $TNF\alpha$  aumenta la proliferación en líneas celulares como MCF-10 y SK-BR-3, también se ha identificado su participación en procesos que promueven la supervivencia celular y una transformación epitelio – mesénquima (36, 40). Cabe destacar que, en el trabajo presentado, se analizó el rol de la obesidad sobre el estroma adiposo mamario y su posible consecuencia en el

epitelio, destacando así la relevancia de la inflamación asociada a la obesidad, sobre estromas mamarios sanos.

En base a lo anterior y en primer lugar, hay que mencionar la capacidad de  $TNF\alpha$  de inhibir la diferenciación adipogénica de cultivos primarios mamarios sanos. Este efecto, en la diferenciación adipogénica se observó inhibición únicamente en el caso de  $TNF\alpha$ , no así de IL-6, lo que da cuenta de que en un contexto obesogénico, en el cual, ambas citoquinas proinflamatorias se encuentran elevadas, el proceso de inhibición en la diferenciación ocurre de manera específica, en este caso con la participación de  $TNF\alpha$ . Este hallazgo es relevante, pues nos indica que  $TNF\alpha$ , tal como ocurre en el tejido adiposo visceral de sujetos obesos, es capaz de inhibir también la diferenciación de preadipocitos mamarios, en un contexto pre tumoral. Esto nos permite suponer que se favorece la hipertrofia del adipocito y la secreción de diversos factores proinflamatorios, lo que puede promover que el tejido mamario se torne más fibrótico, una característica de los tumores mamarios (24). Este mismo mecanismo, consecuente a la obesidad, podría ocurrir en la mama al exponer las células adiposas a factores inflamatorios como  $TNF\alpha$ .

Si bien la remodelación del tejido adiposo a un fenotipo más fibrótico en la mama depende de diversos factores, la incapacidad de los preadipocitos expuestos a  $TNF\alpha$  de diferenciarse, podría favorecer procesos desmoplásicos asociados al desarrollo tumoral. Conjuntamente, se ha establecido que mujeres que presentan una mayor densidad mamaria presentan un mayor de riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con mujeres que presentan menores densidades mamográficas (54). Se sabe además, que los fibroblastos asociados al cáncer presentan un rol importante en la resistencia a drogas a través de un aumento en procesos desmoplásico y mecanismos favorables para el desarrollo tumoral. Sobre la base de esta información, un estudio realizado por Saini y colaboradores en 2018, demostraron en un modelo tumoral 3D, que doxorubicina (fármaco citoestático) y tranilast (fármaco anti alérgico, que presenta propiedades asociadas disminución en la proliferación y migración celular), lograban tener un efecto sinérgico en la

disminución en la rigidez de la matriz extracelular tumoral, lo que se traduciría en una disminución del crecimiento tumoral y una menor invasión (55).

Por otra parte, se sabe que la inflamación representa un punto relevante para el desarrollo tumoral (56). En relación con esto, es posible postular que la obesidad, caracterizada como un proceso inflamatorio -representado por  $TNF\alpha$  en este trabajo- potencia la formación de un nicho proinflamatorio en estromas mamarios sanos. De acuerdo con nuestros datos, la expresión al alza de factores inflamatorios como  $IL-1\beta$  y  $CCL2$  por parte de células preadiposas mamarias tratadas con  $TNF\alpha$ , da cuenta del hecho de la formación de un microambiente proinflamatorio que favorecería procesos pro tumorales, como consecuencia de la exposición de estas células a factores alterados en obesidad.

En relación a un aumento en la expresión de  $IL-1\beta$  y procesos inflamatorios asociados al estroma mamario, cabe mencionar un estudio realizado por Ershaid y cols, en el cual, en un modelo murino, lograron describir que los fibroblastos representan un elemento clave en el desarrollo tumoral a través de procesos inflamatorios, ya que actuarían como sensores de patrones moleculares asociados al daño, y en respuesta, activarían la vía del inflamasoma  $NLRP3$ , lo que promovería una respuesta proinflamatoria y un aumento en la secreción de  $IL-1\beta$ . Cabe destacar que la abolición genética del inflamasoma  $NLRP3$  o de  $IL-1\beta$  por parte de los CAFs, se asociaron con una disminución en el crecimiento tumoral y una mitigación en metástasis pulmonar (57).

Sumado a lo dicho anteriormente, es importante destacar los datos obtenidos en relación al aumento en la expresión y secreción de  $CCL2$  por parte de preadipocitos mamarios sanos tratados con  $TNF\alpha$ .  $CCL2$  es la proteína 1 quimioatrayente de monocitos, por su rol en el reclutamiento de monocitos y otras células inmunes a zonas de injuria o infección, asociados a procesos inflamatorios.

Nuestros datos muestran que los preadipocitos presentan una capacidad significativamente mayor para producir  $CCL2$  en comparación con un adipocito maduro. El hecho que esta molécula contenida en los MC de preadipocitos pueda

promover el reclutamiento de monocitos THP-1 refuerza la capacidad de estos estromas tratados con  $TNF\alpha$  sobre la formación de nicho proinflamatorio pre tumoral. Esta condición, potencialmente podría otorgar características al microambiente tumoral que favorezcan la tumorigénesis, dado que está descrito que, el componente inflamatorio promovido por células inmunes infiltradas en el microambiente tumoral, principalmente macrófagos asociados al tumor (TAMs) otorgan soporte y potencian el avance del tumor (58)

Sumado a esto, y considerando el papel de CCL2 en la carcinogénesis mamaria, resulta fundamental destacar el rol de esta molécula contenida en los MC de preadipocitos y la capacidad de promover la migración de células epiteliales MCF-7. Estos datos dan cuenta de que, preadipocitos mamarios sanos tratados con  $TNF\alpha$  tienen la capacidad de secretar mayor cantidad de CCL2, y que éste podría promover cambios en el epitelio mamario asociados a migración celular. Se ha reportado que CCL2 juega un rol importante en la metástasis del cáncer y que, parte de esta acción se debería a un posible efecto modulador de la transición epitelio mesénquima (TEM) en el cáncer de mama. La TEM es un proceso regulado y caracterizado por la pérdida de característica epiteliales y de la interacción célula-célula, dando propiedades migratorias e invasivas a la célula epitelial, siendo estas características más propias de las células mesenquimales (59).

Los datos obtenidos en este trabajo se ven reforzados por los resultados mostrados en el trabajo de Shun Li y cols, en el cual trataron células MCF-7 con 50 ng/mL de CCL2 y pudieron observar que luego de 24 h de tratamiento, las células epiteliales MCF-7 cambiaban su morfología hacia una forma más bien alargada, a las 48 h analizaron la expresión de marcadores de transición epitelio mesénquima, fibronectina y vimentina, los que se encontraban al alza, mientras que E-cadherina disminuía. Además, observaron que CCL2 promueve la migración e invasión de las MCF-7, y finalmente, determinaron que la inducción de la TEM y la invasión era promovida por CCL2 a través de la vía de señalización ERK/GSK-3 $\beta$ /Snail (60).

En relación a los ensayos de MTT que se realizaron con la finalidad de determinar algún efecto de los MC de preadipocitos previamente tratados sobre la proliferación de células epiteliales MCF-7, resulta interesante destacar que solo se observó un cambio significativo a las 24 h y tanto a las 72 como 96 h se observaba más bien un efecto a la baja en relación a proliferación celular. Diferentes estudios han analizado el rol de  $TNF\alpha$  de manera directa sobre diversas líneas celulares, con resultados controversiales. En el caso de líneas celulares positivas a receptor de estrógenos (ER+), tales como MCF-7,  $TNF\alpha$  tendría efectos pro apoptóticos y anti mitogénicos. En el caso de T47D,  $TNF\alpha$  estimularía su proliferación. Los mismos resultados controversiales ocurren en líneas celulares negativas para receptor de estrógenos (ER-) (36). Si bien, existe evidencia de los potenciales efectos que  $TNF\alpha$  puede tener sobre el epitelio mamario, es necesario destacar que los datos presentados en esta tesis representan otra arista acerca del efecto de  $TNF\alpha$  sobre el estroma mamario, que consecuentemente podría potencialmente generar algún efecto en la carcinogénesis.

El desarrollo de un microambiente proinflamatorio, dado en este caso por la expresión de citoquinas pro inflamatorias y la capacidad de los MC de preadipocitos en el reclutamiento de monocitos y la promoción en la migración de células epiteliales MCF-7 de manera dependiente de CCL2 en ambos casos, se relacionan con otros trabajos mencionados, en donde la formación de un nicho pro tumoral cumple un rol fundamental en la carcinogénesis mamaria y permite obtener nuevos detalles sobre la direccionalidad en la relación entre el estroma y epitelio mamario. La obesidad representada por  $TNF\alpha$ , tiene la capacidad de promover procesos inflamatorios en células preadiposas del estroma mamario además de inhibir su diferenciación, de manera tal, de alterar la homeostásis del tejido.

Finalmente, los datos presentados en este trabajo dan cuenta y refuerzan el papel del estroma en el desarrollo y progresión de la carcinogénesis asociado a procesos inflamatorios y la relación estroma-epitelio.

## 6.- CONCLUSIÓN

En el presente estudio, mostramos que células estromales mamarias sanas, tratadas con  $TNF\alpha$  (inflamadas), pierden la capacidad de diferenciarse a adipocitos maduros, lo que otorgaría un fenotipo más fibrótico al estroma mamario sano. Por otra parte, estas células estromales preadiposas inflamadas, aumentan la expresión de citoquinas proinflamatorias como  $IL-1\beta$  y  $CCL2$ . Además, los medios condicionados de estas células estromales preadiposas, presentan mayor contenido de  $CCL2$ , el cual es capaz de promover el reclutamiento de monocitos THP-1 y la migración de células epiteliales MCF-7.

Todos los antecedentes expuestos, dan cuenta del rol del estroma sobre la formación de un nicho proinflamatorio que antecede al tumor y que potencialmente puede favorecer el desarrollo de éste, entregando direccionalidad en este fenómeno. El fenómeno estudiado, tendría como estímulo un elemento característico de la obesidad, como es  $TNF\alpha$ .

Si bien hay mucho más por explorar en cuanto a esta relación entre inflamación y estroma-epitelio, esperamos que este trabajo pueda proporcionar futuras estrategias que permitan entender el curso y desarrollo de esta enfermedad, en un contexto en que la obesidad constituye un factor de riesgo para el cáncer de mama, que cada vez resulta más prevalente en la población nacional y mundial.

## 7.- REFERENCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021.
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 2021.
3. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012;21(3):297-308.
4. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50(1):33.
5. Hong R, Xu B. Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. *Cancer Commun (Lond).* 2022;42(10):913-36.
6. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015;82(3-4):142-52.
7. Mittal S, Brown NJ, Holen I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18(3):227-43.
8. Folgueira MA, Maistro S, Katayama ML, Roela RA, Mundim FG, Nanogaki S, et al. Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series. *Biosci Rep.* 2013;33(6).
9. Barsky SH, Karlin NJ. Myoepithelial cells: autocrine and paracrine suppressors of breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005;10(3):249-60.
10. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18(1):27-34.
11. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood.* 2006;107(5):2112-22.
12. Wang YY, Attané C, Milhas D, Dirat B, Dauvillier S, Guerard A, et al. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight.* 2017;2(4):e87489.
13. Wu Q, Li B, Li Z, Li J, Sun S. Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):95.
14. Bochet L, Lehuédé C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(18):5657-68.

15. Zhu Q, Zhu Y, Hepler C, Zhang Q, Park J, Gliniak C, et al. Adipocyte mesenchymal transition contributes to mammary tumor progression. *Cell Rep.* 2022;40(11):111362.
16. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* 2008;6:11.
17. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(3):227-36.
18. 2020 Global Nutrición Report: Action on equity to end malnutrition. Bristol, UK: Development Initiatives; 2020.
19. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:1-17.
20. Pérez-Hernández AI, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Frühbeck G. Mechanisms linking excess adiposity and carcinogenesis promotion. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:65.
21. Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol.* 2021;192:114723.
22. Hopkins BD, Goncalves MD, Cantley LC. Obesity and Cancer Mechanisms: Cancer Metabolism. *J Clin Oncol.* 2016;34(35):4277-83.
23. Sundaram S, Johnson AR, Makowski L. Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. *J Carcinog.* 2013;12:19.
24. Engin A. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:305-26.
25. Faria SS, Corrêa LH, Heyn GS, de Sant'Ana LP, Almeida RDN, Magalhães KG. Obesity and Breast Cancer: The Role of Crown-Like Structures in Breast Adipose Tissue in Tumor Progression, Prognosis, and Therapy. *J Breast Cancer.* 2020;23(3):233-45.
26. Vaysse C, Lømo J, Garred Ø, Fjeldheim F, Lofteroed T, Schlichting E, et al. Inflammation of mammary adipose tissue occurs in overweight and obese patients exhibiting early-stage breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2017;3:19.
27. Devericks EN, Carson MS, McCullough LE, Coleman MF, Hursting SD. The obesity-breast cancer link: a multidisciplinary perspective. *Cancer Metastasis Rev.* 2022;41(3):607-25.
28. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:149185.
29. Manore SG, Doheny DL, Wong GL, Lo HW. IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment. *Front Oncol.* 2022;12:866014.
30. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):798-809.
31. Berishaj M, Gao SP, Ahmed S, Leslie K, Al-Ahmadie H, Gerald WL, et al. Stat3 is tyrosine-phosphorylated through the interleukin-6/glycoprotein 130/Janus kinase pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R32.

32. Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, Dasari VR, S N, Rao DN, et al. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol Res.* 2020;153:104683.
33. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):409-16.
34. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
35. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience.* 2015;302:2-22.
36. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol (Dordr).* 2020;43(1):1-18.
37. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Zurakowski A. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism.* 2004;53(10):1268-73.
38. Rivas MA, Carnevale RP, Proietti CJ, Rosemblyt C, Beguelin W, Salatino M, et al. TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. *Exp Cell Res.* 2008;314(3):509-29.
39. Lee SH, Nam HS. TNF alpha-induced down-regulation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cells.* 2008;26(3):285-90.
40. Weichhaus M, Broom I, Bermano G. The molecular contribution of TNF- $\alpha$  in the link between obesity and breast cancer. *Oncol Rep.* 2011;25(2):477-83.
41. Jing W, Xiao J, Xiong Z, Yang X, Huang Y, Zhou M, et al. Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering. *Artif Organs.* 2011;35(2):105-12.
42. Rimpila V. Human liposarcoma cell line SW872 as a research tool for differentiation, adipocytokine secretion and pharmacological regulation [Master Thesis]: University of Tampere; 2011.
43. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 2015;35(6):3147-54.
44. Patel YM, Lane MD. Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J Biol Chem.* 2000;275(23):17653-60.
45. Tobar N, Guerrero J, Smith PC, Martínez J. NOX4-dependent ROS production by stromal mammary cells modulates epithelial MCF-7 cell migration. *Br J Cancer.* 2010;103(7):1040-7.
46. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
47. Tulotta C, Ottewell P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(7):R421-r34.

48. Xu M, Wang Y, Xia R, Wei Y, Wei X. Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting. *Cell Prolif.* 2021;54(10):e13115.
49. Lacina L, Plzak J, Kodet O, Szabo P, Chovanec M, Dvorankova B, et al. Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24094-110.
50. Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5):329-41.
51. Dirat BA, Bochet L, Escourrou G, Valet P, Muller C. Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes? *Endocr Dev.* 2010;19:45-52.
52. Rybinska I, Agresti R, Trapani A, Tagliabue E, Triulzi T. Adipocytes in Breast Cancer, the Thick and the Thin. *Cells.* 2020;9(3).
53. Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;44:38-50.
54. Román M, Louro J, Posso M, Alcántara R, Peñalva L, Sala M, et al. Breast density, benign breast disease, and risk of breast cancer over time. *Eur Radiol.* 2021;31(7):4839-47.
55. Saini H, Rahmani Eliato K, Silva C, Allam M, Mouneimne G, Ros R, et al. The Role of Desmoplasia and Stromal Fibroblasts on Anti-cancer Drug Resistance in a Microengineered Tumor Model. *Cell Mol Bioeng.* 2018;11(5):419-33.
56. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.
57. Ershaid N, Sharon Y, Doron H, Raz Y, Shani O, Cohen N, et al. NLRP3 inflammasome in fibroblasts links tissue damage with inflammation in breast cancer progression and metastasis. *Nat Commun.* 2019;10(1):4375.
58. Mehta AK, Kadel S, Townsend MG, Oliwa M, Guerriero JL. Macrophage Biology and Mechanisms of Immune Suppression in Breast Cancer. *Front Immunol.* 2021;12:643771.
59. Chen X, Yang M, Yin J, Li P, Zeng S, Zheng G, et al. Tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/ $\beta$ -catenin signaling. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1):92.
60. Li S, Lu J, Chen Y, Xiong N, Li L, Zhang J, et al. MCP-1-induced ERK/GSK-3 $\beta$ /Snail signaling facilitates the epithelial-mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(7):621-30.