



Escuela de Postgrado
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

**Programa de Doctorado en Ciencias, mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencia**

Los neutrófilos promueven la transición epiteliomesénquima de células tumorales mamarias a través de la activación de la vía NF- κ B

Alumna: Violeta Natalia Kallens Meza

Director de Tesis: Dr. Miguel Allende Connelly

Co-Directora de Tesis: Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Programa: Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencia

Lugar de Desarrollo de tesis: Laboratorio de Biología del Desarrollo y Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

ÍNDICE

Índice.....	ii
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas.....	vii
Tabla de Abreviaciones.....	viii
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
3.1. Cáncer mamario.....	5
3.2. Microambiente tumoral.....	7
3.3. Inmunidad antitumoral y evasión inmune.....	9
3.4. Neutrófilos asociados a tumor.....	13
3.5. NF- κ B, Transición epitelio mesénquima y metástasis.....	15
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	20
5.1. Objetivo General.....	20
5.2. Objetivos Específicos.....	20
5.2.1. Objetivo Específico 1.....	20
5.2.2. Objetivo Específico 2.....	20
5.2.3. Objetivo Específico 3.....	20
6. Materiales y métodos.....	21
6.1. Cultivo Celular.....	22
6.2. Transfección de ARN interferente pequeño.....	22
6.3. Citometría de flujo.....	23
6.4. Co-cultivo.....	23
6.5. Medios sobrenadantes.....	24

6.6. qPCR.....	25
6.7. CBA (Cytometric Bead Array)	26
6.8. Ensayo de herida.....	26
6.9. Ensayo de MTT.....	28
6.10. Mantenimiento de peces cebras.....	28
6.11. Morfolinos.....	29
6.12. Xenotrasplante.....	29
6.13. Análisis y procesamiento de datos.....	
7. Resultados.....	31
7.1. La presencia de neutrófilos promueve la activación de la vía NF- κ B en las células tumorales en un modelo <i>in vitro</i> de cáncer mamario.....	31
7.1.1. Diferenciación de células HL-60 a HL-60N	31
7.1.2. Análisis de la expresión y producción de citoquinas blancas transcripcionales de la vía NF- κ B en las células tumorales al ser co-cultivadas con células HL-60N.....	33
7.1.3. Identificación del activador de la vía NF- κ B de las células tumorales proveniente de las células HL-60N.....	38
7.2. Evaluación del papel de la vía NF- κ B en la Transición Epitelio-Mesénquima de las células tumorales mamarias generada por la presencia de neutrófilos en el microambiente tumoral en un modelo <i>in vitro</i>	40
7.2.1. Análisis de la expresión génica de marcadores de EMT en las células tumorales al ser co-cultivadas con células HL-60N.....	40
7.2.2. Análisis de la migración de las células tumorales al ser co-cultivadas con células HL-60N.....	42
7.2.3. Inhibición de la vía NF- κ B en células tumorales y análisis su migración al ser co-cultivadas con células HL-60N.....	46
7.3. Un modelo de tumor mamario mediante xenotrasplante en pez cebras y evaluación <i>in vivo</i> del papel de los neutrófilos en la migración de las células tumorales mamarias	51
7.3.1. Establecimiento de las células tumorales y análisis de su capacidad migratoria, en el modelo de pez cebras.....	51

7.3.2. Utilización de Morfolino contra el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos gcsfr (Mo gcsfr) para la generación de neutropenia.....	58
7.3.3. Análisis de la migración de células tumorales en peces morfantes Mo gcsfr.....	61
8. Discusión.....	64
8.1. Células HL-60N como modelo de neutrófilos.....	65
8.2. HL-60N favorecen la expresión génica y producción de blancos transcripcionales de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias.....	67
8.3. Expresión de citoquinas de HL-60N.....	70
8.4. HL-60N favorecen la EMT en las células tumorales mamarias.....	71
8.5. La EMT producida en las células tumorales mamarias por las células HL-60N es mediada por la activación de la vía NF- κ B.....	75
8.6. Neutrófilos endógenos de pez cebra favorecen la migración celular de las células tumorales mamarias MDA-MB231, pero no de las células MCF-7.....	77
8.7. MDA-MB231, células triple negativo y su interacción con los neutrófilos.....	80
9. Conclusiones.....	84
10. Referencias.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Eliminación y Escape inmunológico.....	12
Figura 2: Células HL-60 diferenciadas a neutrófilos (HL-60N) con 1,25% de DMSO por 5 días.	32
Figura 3: Co-cultivo con células HL-60N favorece la expresión de genes activados por la vía NF- κ B en las células tumorales	34
Figura 4: Co-cultivo con células HL-60N favorece la producción de citoquinas activadas por la vía NF- κ B en las células tumorales.....	36
Figura 5: Citoquinas secretadas por las células HL-60N que podrían favorecen la activación de la vía NF- κ B.....	39
Figura 6: Los neutrófilos favorecen la expresión de factores característicos de la EMT en las células tumorales.....	41
Figura 7: Proliferación celular de las células MCF-7 y MDA-MB231 en presencia de HL-60N.	43
Figura 8: Los neutrófilos favorecen la motilidad en las células tumorales MCF-7.	44
Figura 9: Los neutrófilos favorecen la motilidad en las células tumorales MDA-MB231	45
Figura 10: Proliferación celular de las células MCF-7 y MDA-MB231 transfectadas con ARN interferentes SCR (Control) y P65	47
Figura 11: Knockdown de la vía NF- κ B en las células MCF-7 disminuye el efecto provocado por las células HL-60N en la migración de las células MCF-7.....	48
Figura 12: Knockdown de la vía NF- κ B en las células MDA-MB231 disminuye el efecto provocado por las células HL-60N en la migración de las células MDA-MB231	49
Figura 13. Comparación de la proliferación celular entre las células HEK293, MCF-7 y MDA-MB231 utilizando la técnica MTT.....	52
Figura 14: Xenotrasplante en pez cebra de la línea celular HEK293.....	54
Figura 15: Xenotrasplante en pez cebra de la línea celular MCF-7	55

Figura 16: Xenotrasplante en pez cebra de la línea celular MDA-MB231.....	56
Figura 17: Comprobación de la disminución de neutrófilos producida por el morfolino contra el factor reclutante de colonias granulocíticas (Mo gcsfr).....	60
Figura 18: Cuantificación de la migración de las células MCF-7 en la cola de Peces cebra controles y peces cebra morfantes para gcsfr.....	61
Figura 19: Cuantificación de la migración de las MDA-MB231 cola de Peces cebra controles y peces cebra morfantes para gcsfr.....	62
Figura 20: Modelo propuesto.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores qPCR..... 25

Tabla 2: Morfolinos..... 29

TABLA DE ABREVIACIONES

1P-10: Proteína 10 inducida por interferón gamma

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNsi: Ácido ribonucleico interferente pequeño

BRCA1: Gen de cáncer mamario 1

BRCA2: Gen de cáncer mamario 2

CAR: Receptores de antígeno quimérico

CBA: Matriz de gránulos citométricas

CCLX: Ligando de quimioquina CC

CD11b: Cluster de diferenciación 11b

CD54: Cluster de diferenciación 54

CD95: Cluster de diferenciación 95

CD182: Cluster de diferenciación 182

CXCR X: Receptor de quimioquina CXC

DMBA: 7,12-dimetilbenz(a)antraceno

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dpf: Días post fertilización

Dpi: Días post implantación

E-box: Enhancer box

EMT: Transición epitelio mesénquima

ER: Receptor de estrógeno

ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares

FSC: Forward Scatter (Dispersión frontal)

GAPDH: Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa

Gcsf: Factor estimulante de colonias de granulocitos

Gcsfr: Receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos

GFP: Proteína fluorescente verde

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

Hpf: Horas post fertilización

Hpi: Horas post implantación

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1

iDC: Célula dendrítica inmadura

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

IL-10: Interleuquina 10

IL-12p70: Interleuquina 12p70

IL-17a: Interleuquina 17 a

IMDB: Medio de Dulbecco modificado de Iscove

JAK2/STAT3: vía de señalización Janus quinasa 2/ Transductor de señal y activador de la transcripción 3

Linfocito T CTL: Linfocito T Citotóxico

Ly6G: Antígeno linfocitario 6 complejo locus G6D

MHC I: Molécula de histocompatibilidad clase I

MDSC: Célula supresora derivada de mieloide

MMP9: Metaloproteasa 9

MMP13: Metaloproteasa 13

Mo: Morfolino

MoC: Morfolino control

Mpo: Mieloperoxidasa

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

N1: Neutrófilos tipo 1

N2: Neutrófilos tipo 2

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NK: Natural Killer

NO: Óxido Nítrico

P53: Proteína tumoral 53

PBS: Buffer fosfato salino

PI: Yoduro de Propidio

PR: Receptor de progesterona

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SFB: Suero fetal bovino

SSC: Side Scatter (Dispersión lateral)

T CD8+: Célula T con Receptor CD8 positivo

TANs: Neutrófilos asociados a tumor

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TN: Triple negativo

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

Tg: Transgénico

TReg: Linfocito T regulador

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

WHA: Wound healing assay (Ensayo de Herida)

1. RESUMEN

Los neutrófilos asociados a tumores tipo 2 (TANs N2) se han relacionado con la progresión tumoral mamaria, al promover varias características de malignidad que incluyen inflamación, modificación de la matriz extracelular, proliferación celular, inmunosupresión, migración celular, angiogénesis y metástasis.

En particular, la metástasis es la mayor causa de muerte por este tipo de cáncer. En efecto, la metástasis es el proceso a través del cual las células tumorales se movilizan a sitios alejados colonizándolos. Este fenómeno incluye pérdida de identidad epitelial y sus interacciones célula-célula, un aumento de la expresión de proteasas capaces de degradar la matriz extracelular y la vascularización del tumor. Uno de los procesos clave de la adquisición de características móviles por las células epiteliales es la Transición Epitelio Mesenquimal (EMT). En este proceso, se expresan factores de transcripción que regulan negativamente la expresión de E-Cadherina, provocando así la pérdida de polaridad celular y adhesión entre células, favoreciendo un fenotipo mesenquimal.

Investigaciones recientes han demostrado que los TANs N2 promueven la migración e invasión celular a través de la inducción de la EMT en diferentes tipos de cáncer, sin embargo, poco se sabe sobre el mecanismo subyacente por el cual estarían promoviendo la EMT. Basándonos en trabajos previos que muestran una relación entre la activación de la vía NF- κ B y EMT en diferentes

tipos de cáncer, incluido el cáncer mamario, y dado que los TANs son capaces de activar NF- κ B en células no tumorales, planteamos la hipótesis de que los TANs N2 inducen la activación de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias, provocando su EMT.

Los resultados obtenidos complementados con la literatura, nos permiten concluir que los neutrófilos son atraídos al microambiente tumoral y son capaces de activar la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias, mediante la secreción de IL-8. Al respecto, la activación de la vía NF- κ B fue evidenciada mediante el aumento de la expresión de genes y proteínas blanco de esta vía de señalización. También se verificó que los neutrófilos favorecen la EMT en las células tumorales, evidenciado por la expresión de genes característicos de un fenotipo mesenquimal y en un aumento de la migración celular *in vitro*. El aumento de la migración de las células tumorales mamarias, mediado por los neutrófilos, también fue comprobado *in vivo* mediante la técnica de xenotrasplante en pez cebra. Finalmente, observamos una reversión de la migración de células tumorales al utilizar un inhibidor de ARN interferente de la vía NF- κ B. En consecuencia, nuestros resultados comprueban la participación de los neutrófilos en la activación del eje NF- κ B /EMT en las células tumorales mamarias.

2. ABSTRACT

Tumor-associated neutrophils type 2 (TANs N2) have been linked to mammary tumor progression by promoting several hallmarks of malignancy including inflammation, extracellular matrix remodeling, cell proliferation, immunosuppression, cell migration, angiogenesis and metastasis.

Metastasis is the main cause of death in breast cancer patients. Metastasis is the process through which tumor cells move to distant sites colonizing them. This phenomenon includes loss of epithelial identity and its cell-cell interactions, increased expression of proteases capable of degrading the extracellular matrix and tumor vascularization. One of the key processes in the acquisition of mobile features by epithelial cells is the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). In this process, transcription factors that negatively regulate the expression of E-Cadherin are expressed, thus causing the loss of cell polarity and adhesion between cells, favoring a mesenchymal phenotype.

Recent research has shown that N2 TANs promote cell migration and invasion through EMT induction in different types of cancer, however, little is known about the underlying mechanism by which they promote EMT. Based on previous work showing a relationship between NF- κ B pathway activation and EMT in different types of cancer, including breast cancer, and since TANs are able to activate NF- κ B in non-tumor cells, we hypothesize that N2 TANs induce the activation of the NF- κ B pathway in mammary tumor cells, causing their EMT.

The results obtained, complemented with the literature, allow us to conclude that neutrophils are attracted to the tumor microenvironment and are capable of activating the NF- κ B pathway in mammary tumor cells, through the secretion of IL-8. Activation was observed through increased expression of genes and proteins targeted by this signaling pathway. It was also verified that neutrophils favor EMT in tumor cells, evidenced in the expression of genes characteristic of a mesenchymal phenotype and in an increase in cell migration, which was reversed when we used an interfering RNA of the NF- κ B pathway, thus verifying the participation of neutrophils in the activation of the NF- κ B /EMT axis in tumor breast cells.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Cáncer Mamario

El cáncer corresponde a una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo sólo superado por las enfermedades cardiovasculares (Ritchie y cols., 2018). Esta enfermedad tiene un origen en alteraciones genéticas, que pueden ser heredadas o adquiridas en la vida del individuo (Mbeunkui y Johann, 2009). Dichas alteraciones causan una proliferación celular exacerbada, cambios transcripcionales que provocan la producción de quimioquinas, citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, señales inmunosupresoras y mutaciones que favorecen la evasión de la vigilancia inmune (Anderson y Simon, 2020).

En particular el cáncer mamario, es la neoplasia maligna más frecuente diagnosticada en las mujeres a nivel mundial, y es curable en un ~70 a 80 % de las pacientes con esta enfermedad en etapa temprana no metastásica (Harbeck y cols., 2019). En efecto, la metástasis corresponde a la principal causa de muerte por esta enfermedad y corresponde a un fenómeno que abarca diversos cambios, los que incluyen la pérdida de la identidad epitelial, aumento en la expresión de proteasas capaces de degradar matriz extracelular, y la vascularización del tumor, que permite su irrigación y llegada de nutrientes (Bielenberg y Zetter, 2015).

Los tipos de cáncer mamarios más frecuentes son los carcinomas que se producen a partir del epitelio mamario, los que se pueden clasificar a partir de la determinación histológica, en carcinoma mamario ductal o lobular (Elenbaas y cols., 2001). Estos a su vez, pueden ser clasificados según su grado de invasividad como *in situ* o invasivos, que da cuenta si se encuentra únicamente en los conductos o lóbulos, o si ha invadido tejido mamario circundante, respectivamente (Harbeck y cols., 2019). Estos últimos tienen la potencialidad de propagarse hacia otros sitios del cuerpo y generar metástasis (Shea y cols., 2020). Aproximadamente un 80% de los carcinomas mamarios corresponden a carcinomas ductales invasivos, mientras que los lobulares invasivos se ubican entre un 10 y 15% de los casos totales.

Para las caracterizaciones clínicas, además de los análisis histológicos, se incorporaron pruebas de la expresión inmunohistoquímica de proteínas claves, entre las cuales se encuentran los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR), factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2+), y el marcador de proliferación Ki67 (Harbeck y cols., 2019).

Los tumores ER+/PR+ son llamados “receptor de hormonas-positivo”, mientras que los que no expresan ER, PR ni HER2, reciben el nombre de “triple negativos” (TN). Estas clasificaciones permiten predecir qué tumores se beneficiarán de una terapia u otra, y cuales son más agresivos que otros (Alcaide Lucena y cols., 2021).

Por otro lado, el desarrollo del cáncer mamario tiene variados orígenes tales como la predisposición genética familiar, en su mayoría por las mutaciones de los genes BRCA1(17q21) y BRCA2 (13q13), proteínas involucradas en la reparación del ADN y con un patrón de herencia dominante (Harbeck y cols., 2019). Además, los factores ambientales y los estilos de vida también tienen una predominancia importante en este tipo de cáncer, tales como la hiperglicemia, la resistencia a la insulina y la obesidad (Kallens y cols., 2017), el sedentarismo, la postergación de la maternidad, la menarquia precoz, la disminución o falta de lactancia materna, además del incremento de las mamografías y precaución respecto al tema (Harbeck y cols., 2019).

Si bien las alteraciones genéticas, tanto adquiridas como desarrolladas en la vida de los individuos, son esenciales para que ocurra el proceso de tumorigénesis en cáncer mamario, éstas no son suficientes, y, es necesario, además, que existan interacciones con las células del microambiente tumoral y evasión de la respuesta inmune por parte de las células cancerígenas, para que el tumor pueda desarrollarse.

3.2. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral está compuesto por variados tipos celulares, factores secretados y matriz extracelular (Nicole M. Anderson y M. Celeste Simon 2020). La composición del microambiente varía entre los distintos tipos

tumorales, pero parte de las características distintivas incluyen células inmunes, estromales, vasos sanguíneos y matriz extracelular.

El microambiente tumoral juega un papel importante en la iniciación y progresión tumoral, ya que las interacciones dinámicas bidireccionales entre sus componentes son esenciales para estimular la heterogeneidad de las células cancerosas y su evolución clonal. También ejerce acciones de remodelación tisular, alteraciones metabólicas y reclutamiento de células estromales (Ribatti, 2021), además de aumentar la resistencia a múltiples fármacos, lo que facilita la progresión y metástasis de las células cancerosas (Baghban y cols., 2020).

Las células estromales más abundantes en el microambiente tumoral mamario son los fibroblastos asociados a cáncer, los cuales, remodelan la matriz extracelular mediante la secreción de proteasas, permitiendo la invasión y modulando la interacción entre las células tumorales y las células vecinas (Hu y cols., 2022).

Estos tumores, además, son altamente infiltrados con diversas células inmunitarias adaptativas e innatas (Anderson y Simon, 2020), entre los cuales se encuentran los neutrófilos, células dendríticas, células Natural Killer (NK), macrófagos, linfocitos B y T (Shaul y Fridlender, 2017). Las células inmunitarias infiltradas en el tumor inicialmente son reclutadas para la eliminación de las células neoplásicas, no obstante, a medida que ejercen su acción, cambian la inmunogenicidad del tumor y actúan seleccionando clones tumorales resistentes capaces de escapar a la respuesta inmunitaria (Salemme y cols., 2021), acción

que se ve favorecida por el cambio de secreción de citoquinas hacia un perfil inmunosupresor en el microambiente tumoral (Harbeck y cols., 2019).

La comprensión de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes que rigen las interacciones presentes en el microambiente tumoral, se puede utilizar como una estrategia para interrumpir indirectamente su comunicación y desarrollar estrategias terapéuticas eficientes y seguras para combatir el cáncer. Además, las citoquinas involucradas en estas interacciones también se pueden utilizar como herramientas de diagnóstico para predecir y controlar con precisión el resultado de la terapia (Baghban y cols., 2020).

3.3. Inmunidad antitumoral y evasión inmune

Los componentes del sistema inmune adquieren particular importancia en la progresión tumoral, ya que normalmente éstos ejercen una acción de vigilancia inmunitaria que es capaz de identificar y eliminar las células con funcionamiento y/o proliferación alterada mediante respuestas específicas que contemplan tanto la respuesta inmune innata, como la adaptable (Monjazez y cols., 2013) (Figura 1).

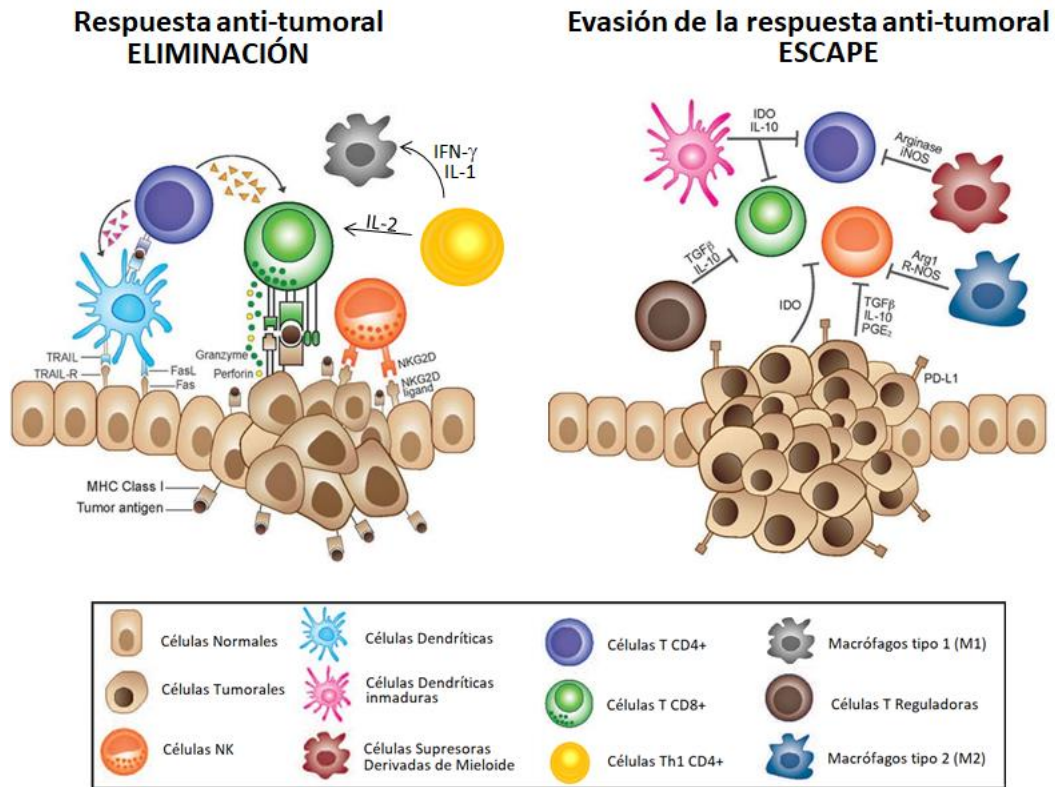
Las células innatas más importantes en la respuesta antitumoral son las células Natural Killer (NK), las que eliminan células tumorales que han reducido o perdido sus moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC I), lo que ocurre

por la selección impuesta por los linfocitos T citotóxicos (CTL). Por otra parte, los macrófagos de tipo 1 pueden reconocer patrones moleculares asociados a lesiones en las células tumorales que se encuentran apoptóticas, lo que provoca la producción de óxido nítrico (NO) que favorece la eliminación de tumores. Además recientemente se ha descubierto una población de neutrófilos (Neutrófilos asociados a tumor tipo 1), que favorece la inmunosupresión y respuestas protumorales (Fridlender y Albelda, 2012) que se detallarán más adelante en este trabajo de tesis.

Por otro lado, las respuestas antitumorales del sistema inmune adaptable, contemplan principalmente la generación de anticuerpos específicos y la acción de los linfocitos T CTL (Lichtman y cols., 2015). Al respecto, los anticuerpos antitumorales reconocen diversos antígenos tumorales y activan el sistema del complemento para la eliminación de dichas células (Monjazez y cols., 2013). Los linfocitos T CD8+, por otro lado, corresponden a la respuesta antitumoral más eficiente, ya que pueden reconocer y eliminar células malignas que expresen péptidos derivados de antígenos tumorales acoplados a MHC I. Estos linfocitos se han utilizado ampliamente en estrategias de inmunoterapia como los receptores de antígeno quimérico (CAR) de células T (Iwahori, 2020).

Sin embargo, las células cancerígenas pueden elaborar mecanismos que les permiten evadir este tipo de respuestas antitumorales (Figura 1). Algunos de estos mecanismos de evasión son mediados por la misma célula tumoral, tales como la pérdida de antígenos de superficie que permiten que sean reconocidos

por los linfocitos CTL, además de la secreción de citoquinas y factores solubles que pueden suprimir la respuesta antitumoral. Mientras que otros mecanismos de evasión inmune son mediados por células presentes en el nicho tumoral, como las células mieloides supresoras, linfocitos T reguladores tipo 2, macrófagos tipo 2 (Monjazez y cols., 2013) (Lichtman y cols., 2015) y neutrófilos tipo 2 (MA y cols., 2019). Dichas células están involucradas en respuestas inmunitarias que pueden promover el crecimiento, supervivencia, angiogénesis y la degradan la matriz extracelular mediante la inducción de la inflamación y la secreción de factores de crecimientos (Dougan y Dranoff, 2009).



Modificado de Monjabez y cols., 2013

Figura 1: Eliminación y Escape inmunológico. Durante la fase de eliminación, las células efectoras inmunitarias, como las células CTL y NK, con la ayuda de las células dendríticas y las células T helper, pueden reconocer y eliminar las células tumorales. Sin embargo, las células tumorales pueden secretar citoquinas que reclutan células supresoras como las células T reguladoras (Treg), células mieloides inmaduras (iDC) y las células mieloides supresoras (MDSC) y macrófagos M2, células que contribuyen a generar un ambiente inmunosupresor y favorecen el escape a la vigilancia inmune.

3.4. Neutrófilos asociados a tumor

Los neutrófilos corresponden a la población de leucocitos más abundante (Powell y Huttenlocher, 2016) (Fridlender y Albelda, 2012) y forman parte de la inmunidad innata fagocitando y eliminando microorganismos. Si bien, tradicionalmente los neutrófilos son considerados promotores de inflamación en un contexto antibacterial, estudios recientes han determinado una población de neutrófilos que infiltran tumores, los han relacionado a un mal pronóstico en cáncer. A esta población de neutrófilos se les ha denominado Neutrófilos Asociados a Tumor (TANs). Dichos TANs han generado controversia, debido que existe tanto evidencia que soporta un efecto citotóxico y antitumoral, como protumoral (Powell y Huttenlocher, 2016).

Recientemente, se determinó que los TANs pueden retener cierta plasticidad funcional y pueden sufrir una "activación alternativa" cuando se exponen a señales que se encuentran en el microambiente tumoral. Estos pueden ser polarizados hacia un fenotipo tipo 1 (TANs N1), al ser estimulados por IFN de tipo I (Shaul y Fridlender, 2017) o mediante la inhibición de TGF- β (Shaul y Fridlender, 2019), o tipo 2 (TANs N2), al ser estimulados por TGF- β (Shaul y Fridlender, 2017). Los TANs N1 se han relacionado a un fenotipo proinflamatorio y antitumoral, mientras que los TANs N2, con uno protumorigénico e inmunosupresivo (Shaul y Fridlender, 2017) (Masucci y cols., 2019).

El perfil de producción de citoquinas de los TANs N1 está caracterizado por altos niveles de TNF- α , CCL3, ICAM-1 y bajos niveles de Arginasa (Masucci y cols., 2019). Estos TANs promueven el reclutamiento y activación de células T CD8+ (Sionov y cols., 2015). Por otro lado, los TANs N2 se caracterizan por un aumento en la producción de CCL2, 4, 8, 12 y 17, CXCL1, 2, 8 y 16 y altos niveles de Arginasa (Masucci y cols., 2019) (Sionov y cols., 2015) (MA y cols., 2019).

Adicionalmente, los TANs N2 se han relacionado a la metástasis tumoral, ya que son una fuente de VEGF y MMP9, factores que favorecen la creación de nuevos vasos sanguíneos y la degradación de la matriz extracelular (Tazzyman y cols., 2009), lo cual permite que las células tumorales puedan movilizarse desde su nicho, intravasarse y migrar hacia sitios de invasión secundarios. A su vez, las Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) que los neutrófilos producen, también se han asociado a un aumento en la extravasación de las células cancerosas hacia órganos secundarios (Demkow, 2021).

Recientes investigaciones han demostrado que los TANs N2 también pueden promover la migración e invasión celular a través de la EMT de células tumorales, mediante la activación de las vías ERK y JAK2/STAT3 en cáncer gástrico (W. Zhang y cols., 2017). Sin embargo, en otros modelos tumorales, aunque existe evidencia que los neutrófilos promueven la EMT (Mayer y cols., 2016) (Faget y cols., 2017) (Große-Steffen y cols., 2012), no se tiene claro el mecanismo que subyace a este fenómeno.

3.5. NF- κ B, Transición epitelio mesénquima y metástasis

La EMT es un proceso en el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal y motilidad a través de una cascada de eventos y cambios en la expresión génica (Felipe Lima y cols., 2016). Existen 3 tipos de programas de EMT, en donde el tipo 1 se relaciona a los movimientos celulares importantes que ocurren durante la embriogénesis, el tipo 2 es asociado a regeneración y reparación de heridas y el tipo 3 es asociada a malignidad, invasión y metástasis de células tumorales de origen epitelial (Kalluri y Weinberg, 2009).

Durante la tumorigénesis ocurren cambios en las vías regulatorias del fenotipo epitelial, lo que lleva a perder las adhesiones celulares, cambios en la polarización y en el citoesqueleto, migración e intravasación (Seyfried y Huysentruyt, 2013). La EMT es uno de los procesos claves de la adquisición de características mótils y en la metástasis (Heerboth y cols., 2015).

En este proceso se expresan factores de transcripción SNAIL, SLUG, TWIST y ZEB1 y 2, los cuales regulan negativamente la expresión de E-Cadherina, provocando la pérdida de la polaridad celular y de adhesión entre células. Además se genera un aumento de la expresión de N-Cadherina, Vimentina y proteasas celulares (Felipe Lima y cols., 2016) (Fedele y cols., 2017). Esto promueve la pérdida de la identidad epitelial, generando un fenotipo mesenquimal capaz de movilizarse e invadir otros tejidos (Medici y cols., 2008) (Heerboth y cols., 2015) (Jolly y cols., 2017). En el cáncer mamario se ha

reportado que la EMT es una característica que favorece su progresión (Elzamly y cols., 2018) (Fedele y cols., 2017) (Felipe Lima y cols., 2016).

La mayor causa de muerte en cáncer mamario es provocada por metástasis e invasión a otros tejidos, características relacionadas a la EMT, además, la adquisición de un fenotipo más desdiferenciado asociado a célula madre cancerígena la cual provee de una mayor resistencia a tratamientos (Fedele y cols., 2017).

La EMT puede ser producto de la activación de diversas vías de transducción de señales propias del funcionamiento defectuoso de la célula tumoral, y también por señales provenientes del microambiente tumoral. Estas señales incluyen la hipoxia, estrés oxidativo, privación de nutrientes e inflamación, favoreciendo de esta manera la expresión de los factores de transcripción propios de este proceso (Santamaria y cols., 2017). Una de las vías de señalización que se ha visto involucrada en esta transición es la vía de NF- κ B, en donde su actividad se ha visto relacionada en la promoción de la EMT en cáncer pancreático (Maier y cols., 2010), cáncer prostático (Q. Zhang y cols., 2009), cáncer renal (Pantuck y cols., 2010) y carcinoma escamoso de cabeza cuello (Chung y cols., 2006), en carcinoma hepatocelular (Qin y cols., 2016) y en cáncer mamario (Huber y cols., 2004)(Pires y cols., 2017).

En particular en cáncer mamario, existe evidencia que la actividad de NF- κ B es esencial para la EMT y metástasis (Huber y cols., 2004), que es requerido

para la mantención del fenotipo invasivo en cánceres inducidos por Ras o tratamiento carcinógeno, o en células de cáncer de mama esporádico (Min y cols., 2008). Asimismo, se ha reportado que la activación de NF- κ B facilita el desarrollo de un fenotipo tumoral independiente de hormonas, invasivo y de alto grado (W. Wang y cols., 2014) (Huber y cols., 2004) (Pires y cols., 2017).

Estudios realizados en cultivo celular, demostraron que la inhibición de la actividad de NF- κ B redujo el fenotipo invasivo de las células tumorales mamarias transformadas con el carcinógeno 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) impulsadas por la subunidad c-Rel de NF- κ B (Shin y cols., 2006). Por otro lado, utilizando modelos *in vivo*, el estudio del grupo de Wirth et al, determinó que la inhibición de NF- κ B en células epiteliales tumorales mamarias transformadas con Ras, provocó a una reducción de 10 veces en las metástasis a los pulmones y una disminución de 3 veces en el peso del tumor en un modelo murino (Huber y cols., 2004).

Estudios recientemente publicados, indicaron que los macrófagos pueden secretar citoquinas tales como IL-1b y CCL18 que son capaces de activar la vía de NF- κ B en células tumorogénicas, favoreciendo la EMT en éstas (Zhou y cols., 2018) (Ye y cols., 2018). Los neutrófilos, por su parte, también se han visto involucrados en la activación de la vía NF- κ B en células estromales (Grégoire y cols., 2015), sin embargo, no se ha estudiado sí podrían estar ejerciendo este mismo fenómeno en las células tumorales, y si esta activación podría provocar la

EMT clásica de los comportamientos de migración e invasión celular en el desarrollo tumoral.

En resumen, los antecedentes presentados indican que los neutrófilos participan en la promoción de la metástasis favoreciendo la transición epitelio-mesénquima, sin embargo, los estudios al respecto, no han investigado el eje de activación NF- κ B/EMT por parte de los neutrófilos en el modelo tumoral de cáncer mamario.

4. HIPÓTESIS

Neutrófilos asociados a tumores activan la vía NF- κ B en células tumorales mamarias provocando su transición epitelio-mesénquima.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Determinar mediante aproximaciones *in vitro* e *in vivo*, si la interacción entre neutrófilos y células tumorales activa la vía NF- κ B en las células tumorales induciendo su transición epitelio- mesénquima.

5.2. Objetivos Específicos

Objetivo Específico 1: Evaluar si las células HL-60N promueven la activación de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias *in vitro*.

Objetivo Específico 2: Evaluar el papel de la vía NF- κ B en la transición epitelio- mesénquima de las células tumorales mamarias generada por la presencia de células HL-60N en un modelo *in vitro*.

Objetivo Específico 3: Implementación de un modelo de tumor mamario mediante xenotrasplantes en pez cebra y evaluación *in vivo* del papel de los neutrófilos en la migración de las células tumorales mamarias.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cultivo Celular

Se realizó cultivo celular para estudiar la comunicación que se genera entre ambos componentes estudiados (Neutrófilos-Célula tumoral) de manera simplificada, y la direccionalidad y procedencia de las señales que favorecen las características de malignidad tumoral. Para lo anterior, se utilizaron dos líneas celulares de adenocarcinoma mamario: MCF-7 (ATCC HTB-22) y MDA-MB231 (ATCC HTB-26). Estas líneas celulares corresponden a células tumorales humanas provenientes de tejidos mamaros, con diferentes grados de invasividad. Las células MCF-7 tienen origen en un foco metastásico de tumor de glándula mamaria. Sin embargo, mantienen características de epitelio mamario diferenciado, incluyendo la habilidad para procesar estradiol vía receptores de estrógeno citoplasmático y la capacidad para formar cúpulas. Las células MDA-MB231 también son obtenidas desde focos metastásicos derivados de tumor de glándula mamaria. Estas son capaces de generar tumores en ratones nude, por lo que tienen carácter de tumorigénicas, a diferencia de las células MCF-7.

Los neutrófilos utilizados en este ensayo se obtuvieron a través de la diferenciación *in vitro* a partir de la línea HL-60 (ECACC98070106). Para esto, células HL-60 (línea celular de leucemia promielocítica) fueron tratadas por 5 días con 1,25% de DMSO en su medio correspondiente de cultivo (Iscove's Modified Dulbecco (IMDM) con 10% de Suero fetal bovino (SFB)). Estas células una vez diferenciadas se les denominó células HL-60N.

6.2. Transfección de ARN interferente pequeño

Para evaluar si la activación de la vía de señalización NF- κ B que estarían promoviendo los neutrófilos en las células tumorales mamarias, podría favorecer su transición hacia un fenotipo mesenquimal, se utilizó un ARN pequeño de interferencia de la subunidad P65 (SiP65) (Santa Cruz, SC-29410), y su correspondiente control ARN pequeño de interferencia scramble (SiSCR) (Santa Cruz, SC-37007).

La transfección se realizó utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (ThermoFischer), Optimem (Gibco) y 25 nmol de ARN interferente SiARN P65 y del control SiARN SCR. Las células MCF-7 y MDA-MB231 se incubaron por 24 horas con los reactivos de transfección y luego se sembraron en placas nuevas para generar los experimentos de MTT, qPCR y Ensayo de herida.

6.3. Citometría de Flujo

La comprobación de la diferenciación de las células HL-60 a HL-60N se realizó por citometría de flujo multiparamétrica (FACSCanto II, BD Biosciences). Se midió la expresión de una subunidad alfa de la integrina α M β 2, también llamado Cluster de diferenciación 11b (CD11b), que es expresado en la superficie de granulocitos y otras células mieloides y que se utiliza para verificar la diferenciación de este tipo celular a neutrófilos (Carrigan y cols., 2005) (W. Zhang y cols., 2017). Para la detección de moléculas de superficie mediante citometría de flujo, entre 0,1-1,0 x 10⁶ células se incubaron con un anticuerpo contra

CD11b APC y CD11b FITC (Clones ICRF44) en PBS + 2% SFB en una concentración 1:50, durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, se lavaron las células con PBS + 2% SFB y se centrifugaron a 600 x g por 5 minutos a 4°C y se resuspendieron en 300 uL de PBS. Posteriormente, las células incubaron con 1 uL de Yoduro de propidio (PI) a 1 (mg/mL) para descartar las células muertas, fueron analizadas en el citómetro y los datos se analizaron con el programa FACSDiva (BD Biosciences).

6.4. Co-cultivo

Para estudiar y determinar si los neutrófilos inducen la activación de la vía NF-κB y EMT en las células tumorales mamarias, se realizaron un co-cultivos directo por 24 horas entre las células HL-60 CD11b+ (HL60N), previamente diferenciadas y las células tumorales mamarias, MCF-7 y MDA-MB231 (en una proporción 3:1, células tumorales: neutrófilos).

6.5. Obtención de sobrenadantes

Para verificar los cambios en la producción de citoquinas por células tumorales MCF-7 y MDA-MB231 antes y después del co-cultivo con las células HL-60N, se realizó un ensayo de CBA. Para ello se realizó un co-cultivo de 24 horas, entre MCF-7/HL-60N o MDA-MB231/HL60N, luego se descartaron las células HL-60N mediante 2 lavados con PBS 1x a las células tumorales adheridas a las placas y se cambió su medio de cultivo libre de SFB.

Por otro lado, se obtuvo sobrenadante de las células HL-60N luego de ser diferenciadas para analizar su perfil de producción de citoquinas.

Después del condicionamiento del medio por 24 horas, los sobrenadantes fueron centrifugados a 1000 g por 10 minutos para eliminar posibles células en suspensión y guardados a -80°C hasta su análisis por CBA.

6.6. qPCR

Para obtener el ARN mensajero de los ensayos, 24 horas post co-cultivo las células tumorales se lavaron con PBS 1x, para eliminar las células HL60N. Por otro lado, para la obtención del ARNm de las células HL60-N, éstas se obtuvieron mediante centrifugación 24 horas post tratamiento con los medios condicionados de las células tumorales mamarias.

Las células se lisaron las células con Trizol Reagent (Ambion, Carlsbad, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cADN se generó a partir de 1 µg de ARN total, utilizando la enzima transcriptasa reversa ImpromII (Promega) y Oligo-Dt(Promega) como iniciador, según un protocolo estándar. Todas las reacciones fueron realizadas en duplicado e incluyendo un control negativo con agua. La normalización de los datos fue calculada a partir de la expresión del mensajero para la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH). Los partidores utilizados se detallan en la tabla 1. El cálculo de la expresión relativa de cada uno de los ARN mensajeros estudiados, fue determinado por delta delta Ct.

Tabla 1. Partidores qPCR.

	Secuencia del partidor	Tm	Tamaño
GAPDH F	5'-CAAAATCAAGTGGGGCGATGCTG-3	63°C	283 pb
GAPDH R	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'		
TNF- α F	5' CCTGCCCAATCCCTTTA 3'	59°C	177 pb
TNF- α R	5' TGGTTGCCAGCACTTCACT 3'		
IL-8 F	5' GCTCTGTGTGAAGGTGCATTT	60°C	144 pb
IL-8 R	5' TTCTGTGTTGGCGCAGTGT 3'		
IL-6 F	5' TCGAGCCCACCGGGAACGAA 3'	66°C	124 pb
IL-6 R	5' GTGGCTGTCTGTGTGGGGCG 3'		
E-cadherina F	5' CGCATTTGCCACATACTCT 3'	60°C	253 pb
E-cadherina R	5' TTGGCTGAGGATGGTGTAAAG 3'		
Vimentina F	5' CCAAACCTTTTCCTCCCTGAACC 3'	59°C	141 pb
Vimentina R	5' GTGATGCTGAGAAGTTTCGTTGA 3'		

6.7. CBA (Cytometric Bead Array)

Se midió la cantidad de citoquinas de TNF- α , IL-6 e IL-8 de los medios condicionados del co-cultivo entre células tumorales y neutrófilos anteriormente mencionados utilizando el KIT: BD™ Cytometric Bead Array (CBA) human Inflammation Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Esta técnica corresponde a una aplicación de citometría de flujo que permite a los usuarios cuantificar varias proteínas simultáneamente. Utiliza unas perlas de captura y anticuerpos detectores específicos para las distintas citoquinas, los que son incubados con las muestras desconocidas que contienen

analitos reconocidos; se forman complejos sándwich (perla de captura + analito + reactivo de detección). Estos complejos se pueden medir mediante citometría de flujo para identificar partículas con características de fluorescencia tanto de la perla y el detector (Medeiros y Gomes, 2019). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences).

6.8. Ensayos de herida

Para la migración de las células MCF-7 y MDA-MB231, se realizaron ensayos de herida para los cuales se sembraron 100.000 células MCF-7 o MDAMB231, según corresponda, en DMEM 10% SFB en placas de 12 pocillos.

Al realizar el ensayo se realizó una línea recta en la monocapa celular con una punta de 10 uL, y se lavó con PBS para eliminar las células en suspensión. Luego, se reincorporó el medio DMEM 2% SFB y se les agregó 35.000 células HL60N.

Se utilizó el microscopio AE2000 (Motic) para visualizar y fotografiar las monocapas con la herida realizada a las 0 horas y se permitió la migración celular de las células MDAMB231 por 16 horas y por 24 horas las células MCF-7, tiempo en el cual se fotografiaron a tiempo final.

6.9. Ensayo de MTT

Con el fin de verificar que los neutrófilos o las transfecciones con los ARN pequeños interferentes no afectan la proliferación de las células tumorales, se realizó el ensayo de actividad metabólica MTT. Este ensayo se basó en la

reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. El resultado de la reducción es un compuesto coloreado de color azul (formazán), el cual es cuantificable por absorbancia, por lo permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células. Este método permite evaluar la cantidad de células vivas (metabólicamente activas) que resulta ser proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para esto se sembraron 5.000 células MCF-7 y MDA-MB231, según corresponde, en cada pocillo de una placa de 96, en su medio correspondiente suplementado con 10% de SFB. Luego de 24 horas se lavaron con PBS y se les agregaron 1.600 células HL60N, y DMEM 2% SFB.

El ensayo se realizó después de 24 horas de la incorporación de las células HL60N, se les agregó 100 uL de medio DMEM con 1 mg/mL de MTT. Luego de una incubación de 2 horas a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂, se aspiró el medio, y se resuspendieron las sales de formazán en una solución de DMSO/isopropanol (3:2) durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente, se colectaron los productos solubilizados y se determinó la absorbancia a 570 nm utilizando el Lector de placas Infinite M200 Pro (Tecan).

Este ensayo también se utilizó para comparar la proliferación celular entre las células HEK293, MCF7 y MDAMB231 con las que se realizó el xenotrasplante de los peces cebra. Estos ensayos se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas, siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente.

6.10. Mantenimiento de peces cebra

Los peces cebra (*Danio rerio*) utilizados, fueron criados y mantenidos en nuestras instalaciones de acuerdo con los procedimientos estándar. La línea transgénica (Tg) utilizada para la visualización y cuantificación de neutrófilos fue Tg (mpo:eGFP), transgénico que produce GFP bajo el promotor de la mieloperoxidasa, es decir, tiene marcaje positivo en los neutrófilos. Para la generación de xenotrasplantes se utilizaron peces silvestres (wild type) de la línea Tab5.

Todos los procedimientos cumplieron con las "Pautas para el uso de la investigación sobre el uso del pescado" de la Sociedad Americana de Pesca (Pautas para el uso del pescado en la investigación. Sociedad Americana de Pesca, Bethesda, Maryland. [Www.fisheries.org](http://www.fisheries.org)).

6.11. Morfolinos

Con el fin de generar una disminución de la cantidad de neutrófilos endógenos de los peces cebra, se inyectaron Morfolinos contra el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos gcsfr (Mo gcsfr) en estadios embrionarios de 1 a 4 células.

Se inyectó el Mo gcsfr y el Morfolino control (MoC) en una concentración de 0,6 mM, en conjunto con un Morfolino contra p53 (0,6 mM), frecuentemente utilizado para disminuir la mortalidad generada por los Morfolinos, al inhibir las rutas de apoptosis dependientes de p53. Se utilizó como control un Morfolino dirigido a una mutación del intrón de la beta-globina humana que causa la beta-talasemia,

el que se utiliza ampliamente como control negativo. Las secuencias de los Morfolinos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Morfolinos.

Secuencia de Mo gcsfr	5' GAAGCACAAGCGAGACGGATGCCAT 3'
Secuencia de Moc	5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3'

6.12. Xenotrasplatación

Para la realización de los xenotrasplantes se inyectaron aproximadamente 300 células HEK293, MCF-7 y MDA-MB231 marcadas con la tinción fluorescente Mitotracker y Vibrant Dye, en el vitelo de peces cebras de 48 horas post fertilización (hpf) previamente decorionados. Se observó por 3 días el crecimiento celular en el vitelo en los tres tipos celulares y contabilizó manualmente la cantidad de células que migraron hacia la zona de la cola.

6.13. Análisis y procesamiento de datos

Para la realización de los gráficos y análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism 8, para todos ellos se realizó inicialmente la prueba de outliers Grubbs con un $\alpha = 0,05$, para eliminar posibles valores de comportamiento anormales, además se realizó inicialmente la prueba de normalidad Shapiro-Wilk test.

A los tratamientos que tuvieron distribución normal, se les aplicaron test paramétricos ANOVA Tukey's multiple comparisons test (mayor a 2 condiciones) o t student Welch's test (2 condiciones), por otro lado, a los tratamientos que no tuvieron una distribución normal, se les aplicaron los test no paramétricos ANOVA Kruskal-Wallis test (mayor a 2 condiciones) o t student Mann Whitney's test (2 condiciones), según correspondiera.

Se grafican los Errores estándar y los valores p corresponden a: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

7. RESULTADOS

7.1. **Evaluar si la presencia de neutrófilos promueve la activación de la vía NF- κ B en las células tumorales en un modelo in vitro de cáncer mamario.**

7.1.1. **Diferenciación de las células HL-60 a HL-60N (tipo Neutrófilo)**

Las investigaciones experimentales de los TANs proveen una complejidad, debido que estas células tienen una vida media circulante de ~7 a 10 horas tanto en humanos como en ratones (Shaul y Fridlender, 2019) lo que dificulta la experimentación en modelos animales. Es por esto que la mayoría de los datos hasta la fecha provienen de ensayos *in vitro* utilizando la línea celular HL-60 diferenciada a neutrófilos (HL-60N) y ensayos cortos con neutrófilos obtenidos de sangre periférica (Shaul y Fridlender, 2019).

En razón de lo anterior, para este estudio decidimos utilizar la línea HL-60 diferenciada a neutrófilos. La diferenciación se realizó tratando dichas células con DMSO al 1,25% por 5 días (Gupta y cols., 2014) y se comprobó evaluando el aumento de la expresión del marcador CD11b.

Mediante la técnica de citometría de flujo, se seleccionaron las poblaciones correspondientes a la fracción celular (mediante SSC, Side Scatter, y FSC, Forward Scatter, Figura 2A y B primera columna), la fracción de células vivas mediante el uso de Yoduro de Propidio (Figura 2A y B segunda columna) y

las células que positivas para el factor de diferenciación CD11b (Figura 2A y B tercera columna).

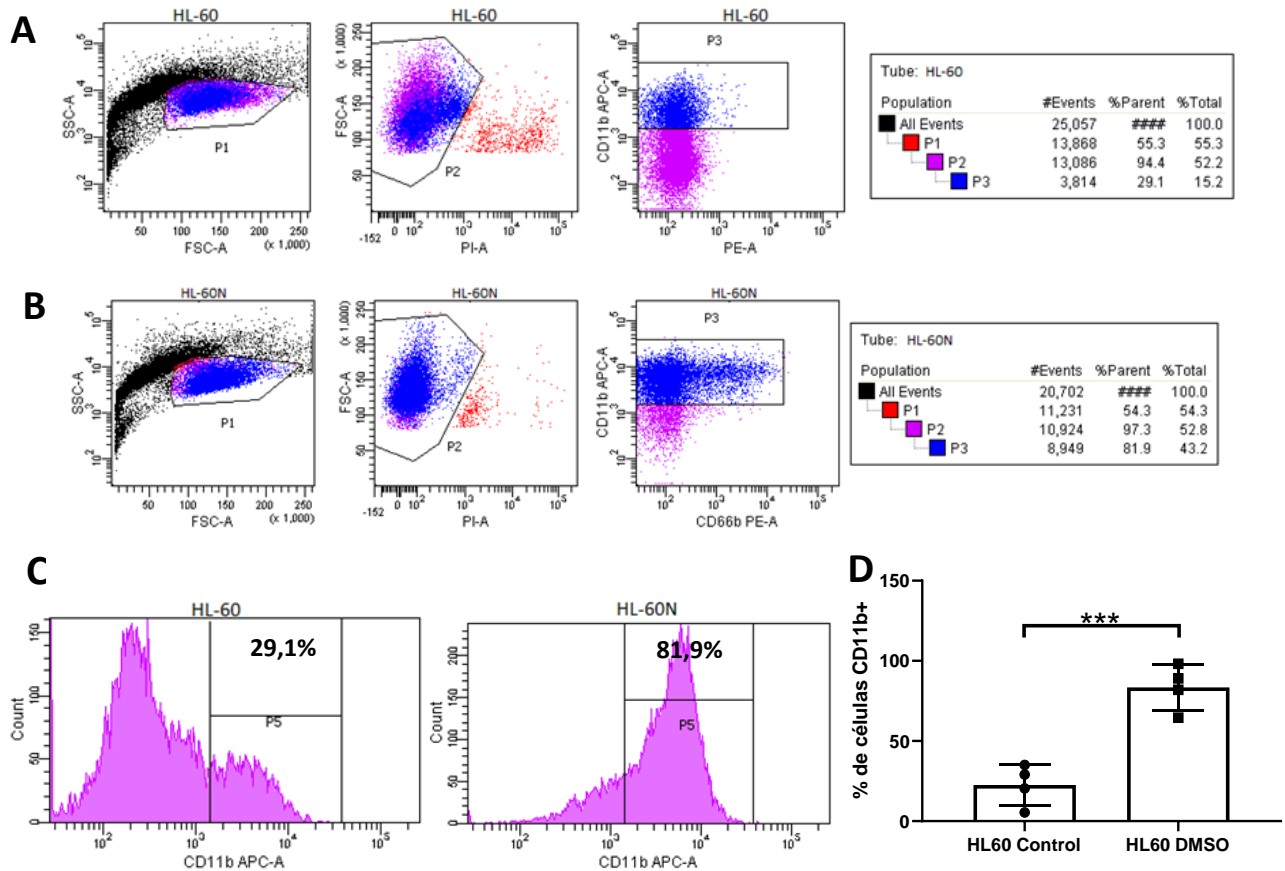


Figura 2: Células HL-60 diferenciadas a neutrófilos (HL-60N) con 1,25% de DMSO por 5 días. El aumento de la expresión de CD11b fue determinada por citometría de flujo. **A.** Estrategia de gating para estudiar las poblaciones de células HL-60 sin el tratamiento con DMSO. **B.** Estrategia de gating para estudiar las poblaciones de células HL-60 tratadas con DMSO. **C.** Histograma de expresión de CD11b de células HL-60 control y HL-60N. **D.** Cuantificación del porcentaje de células CD11b+ en las células HL-60 con y sin el tratamiento de diferenciación. Welch's t test, *** $p < 0,001$.

En este resultado se obtuvo un aumento de la cantidad de células positivas para CD11b (Figura 2C y D), de alrededor de un 20% en promedio en las células controles a un 85% en promedio en las células tratadas (Figura 2C y D). Estos porcentajes nos permiten determinar que la diferenciación de las células HL-60 a neutrófilos fue exitosa.

Además, se observó que basalmente existe un porcentaje de células HL-60 no tratadas con DMSO que tienen un marcaje positivo para CD11b, lo que podría deberse a la presencia en el medio de cultivo de trazas de DMSO, el cual es parte del medio de congelación.

7.1.2. Análisis de la expresión y producción de citoquinas blancas transcripcionales de la vía NF- κ B en las células tumorales al ser co-cultivadas con células HL-60N

Para los siguientes experimentos las células HL-60N, fueron puestas en co-cultivo directo con las células tumorales MCF-7 y MDA-MB231, y se estudió si la presencia de factores provenientes de los neutrófilos ejerce una activación de la vía NF- κ B en las células tumorales. Debido que los neutrófilos crecen en suspensión, mientras que las células tumorales lo hacen adheridas a la superficie, es posible separar ambos tipos celulares mediante lavados simples con PBS.

Posteriormente, se realizó el aislamiento de ARN de las células tumorales mediante el protocolo de Trizol. Se midieron, mediante qPCR, los genes

regulados por el factor transcripcional NF- κ B: TNF- α , IL-6 y 8 para corroborar la activación de la vía, resultados que se muestran en la Figura 3.

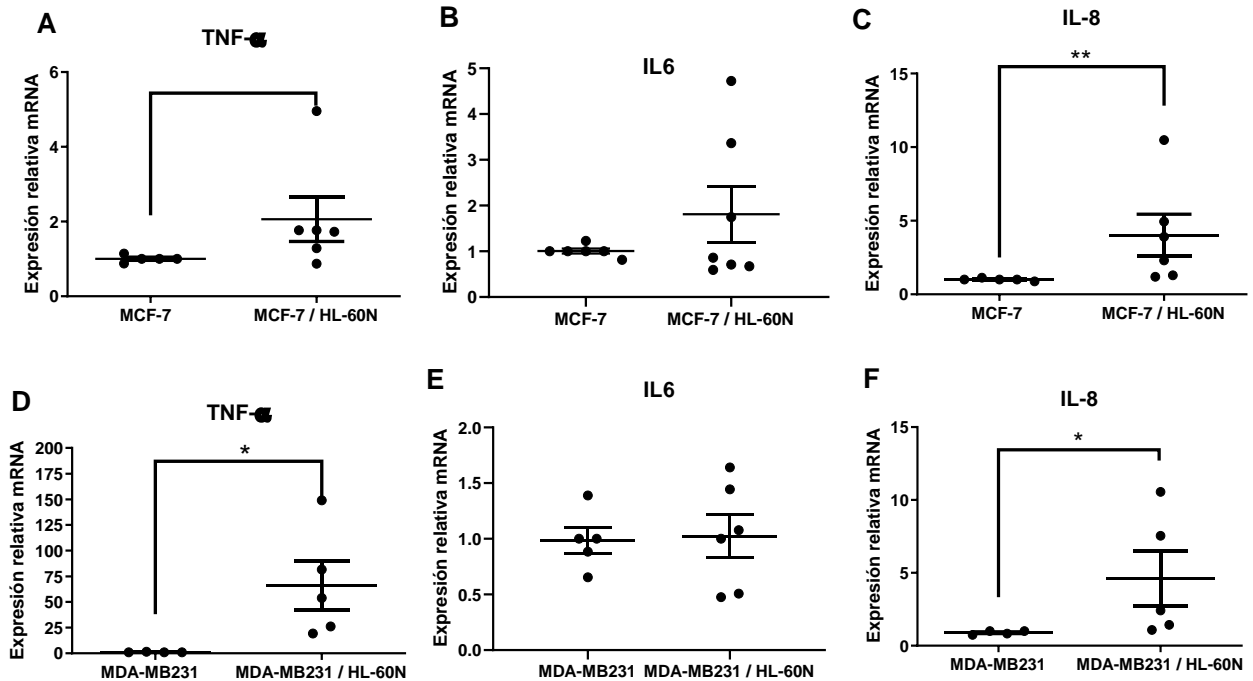


Figura 3: Co-cultivo con células HL-60N favorece la expresión de genes activados por la vía NF- κ B en las células tumorales. A. Expresión génica de TNF- α , **B.** IL-6, **C.** IL-8 de células MCF-7. **D.** Expresión génica de TNF- α , **E.** IL-6, **F.** IL-8 de células MDA-MB231. La expresión de las citoquinas fue determinada utilizando qPCR, donde se utilizó de housekeeping el gen GAPDH. El test estadístico utilizado fue t-student Mann Whitney, no paramétrico. ** p<0,01, * p<0,05, n=4-6, las barras corresponden al Error Estándar.

En la Figura 3, se puede observar que en ambas células tumorales 3 genes blanco de la vía NF- κ B, IL-6, IL-8 y TNF- α aumentan su expresión al ser co-cultivadas con células HL-60N, encontrándose una diferencia significativa en

la expresión de TNF- α de las células MDA-MB231 (Figura 3D) e IL-8 tanto en las células MCF-7 como en las MDA-MB231 (Fig 3C y 3F). IL-6, por otro lado, muestra una tendencia de aumento de expresión en ambas células tumorales en co-cultivo con las células HL-60N (Figura 3B y E), sin embargo, sus diferencias no son significativas.

Estos resultados nos permiten comprobar que las células HL-60N favorecen la expresión de IL-8 y TNF- α , genes diana de la vía NF- κ B, en las células de cáncer mamario ensayadas.

El aumento de los factores inflamatorios como resultado de la activación de la vía NF- κ B, lo quisimos medir, además, en cantidad de citoquina producida y secretada al medio, lo que llevamos a cabo mediante el ensayo de CBA human Inflammation Kit, el cual es un ensayo cuantitativo que nos entrega la concentración de citoquinas exacta generando un perfil de citoquinas inflamatorias en las que se encuentran IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8. Para este ensayo realizamos el co-cultivo de 24 horas entre las células HL-60N y las células tumorales mamarias. Luego de las 24 horas se realizó el lavado de las células tumorales para eliminar la fracción correspondiente a HL-60N, ya que estas células crecen en suspensión mientras que las tumorales mamarias, adheridas a la placa. Se les realizó cambio de medio y se mantuvieron para el condicionamiento de medio para posteriormente realizar el CBA, resultados que se muestran en la Figura 4.

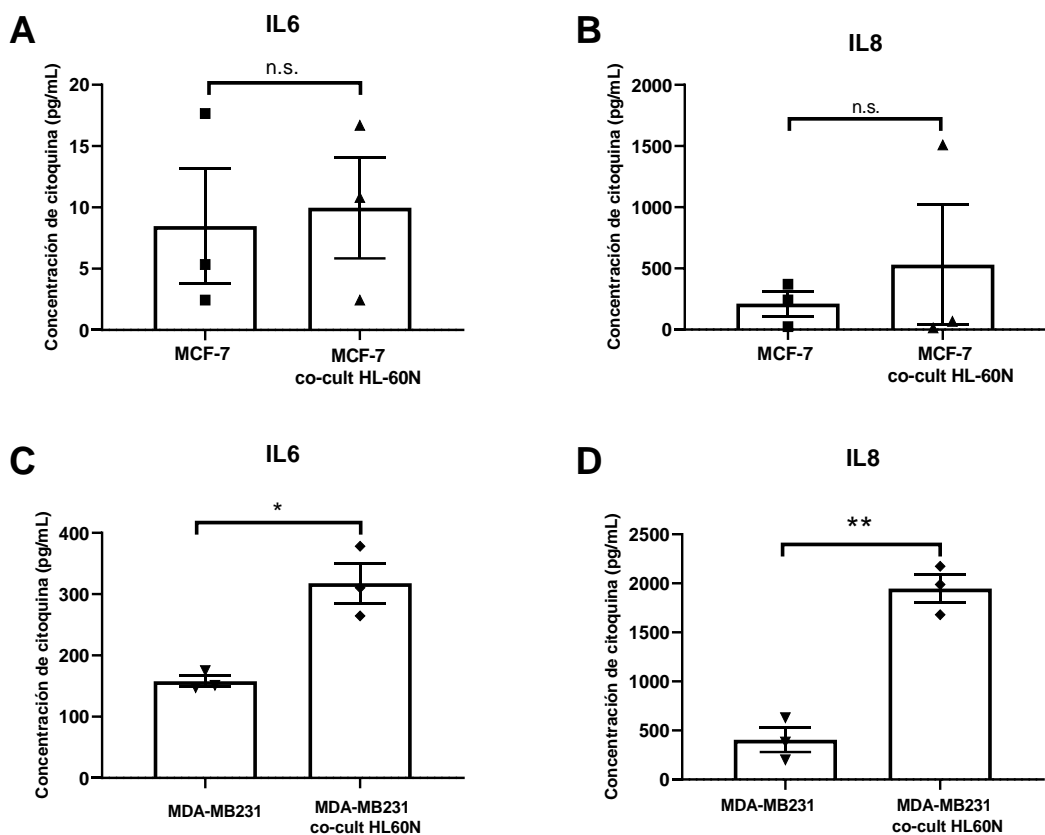


Figura 4: Co-cultivo con células HL-60N favorece la producción de citoquinas activadas por la vía NF-κB en las células tumorales. A. Cantidad de citoquina de IL-6 e **B.** IL-8 de células MCF-7 en co-cultivo con las células HL-60 N **D.** Cantidad de citoquina de IL-6 e **F.** IL-8 de células MDA-MB231. La cantidad de citoquina fue determinada utilizando CBA. El test estadístico utilizado fue t-student Welch's test. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$, $n = 3$, las barras corresponden al Error Estándar.

Cabe mencionar que, si bien se midió un set de citoquinas inflamatorias, sólo 2 (IL-6 e IL-8) de las 6 citoquinas fueron detectadas en el sobrenadante extraído de los experimentos para ambos tipos celulares. A su vez, los medios obtenidos de las células MDA-MB231 en su medición inicial estuvieron por sobre el rango de medición del kit (5000 pg/mL), por lo que tuvieron que ser diluidos en

una razón de 1:50 para su correcta medición. De manera que, considerando esta información y las magnitudes de los valores mostrados en la figura 4, podemos concluir que las células MDA-MB231 tienen una producción mucho mayor de citoquinas que las células MCF-7, que corresponden a una línea celular de menor grado de malignidad.

Los resultados obtenidos muestran que la producción de IL-6 e IL-8 en las células MDA-MB231 aumenta significativamente luego de ser co-cultivadas con las células HL-60N. Mientras que no se encontraron dichas diferencias en las células MCF-7.

Los resultados obtenidos mediante CBA concuerdan con la expresión relativa obtenida del co-cultivo directo entre las células MDA-MB231 y HL-60N para la citoquina IL-8, sin embargo, no se logran ver las mismas diferencias para el co-cultivo realizado con las células MCF-7. Del mismo modo, no se pudo comprobar mediante CBA las diferencias obtenidas mediante qPCR para TNF- α , debido a que su concentración estaba bajo el límite de detección del kit.

7.1.3. Identificación de activador de la vía NF- κ B de las células tumorales proveniente de las células HL-60N

Por otro lado, estudiamos qué factor secretado por los neutrófilos podría estar generando una activación de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias. Para ello medimos citoquinas capaces de activar la vía de señalización NF- κ B: IL-6, IL-8 y TNF- α , tres citoquinas abundantemente expresadas por TANs y encontradas en el microambiente tumoral. TNF- α se encuentra asociada mayormente a un fenotipo N1 o antitumoral, mientras que IL-6 y IL-8, a N2 un fenotipo protumorigénico.

Para esto extrajimos ARN mensajero y realizamos qPCR para las citoquinas antes mencionadas, además medimos la cantidad de citoquinas producidas por las células HL-60N en su sobrenadante condicionado por 24 horas, mediante la técnica de CBA. Los resultados se muestran en la Figura 5.

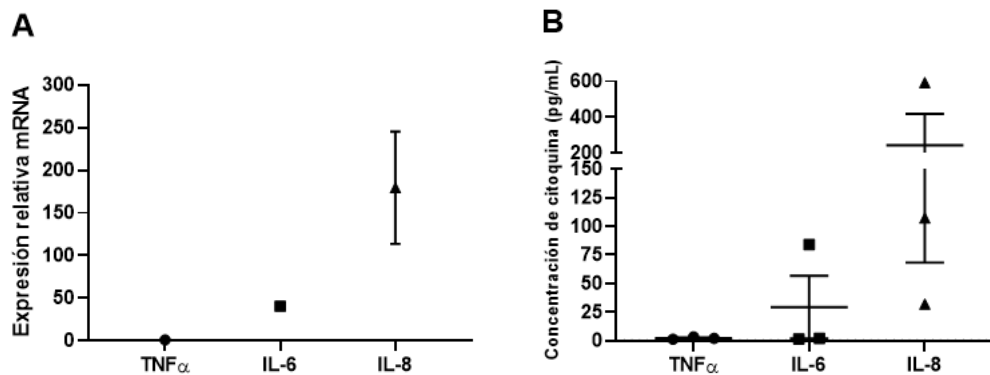


Figura 5: Citoquinas secretadas por las células HL-60N que podrían favorecer la activación de la vía NF- κ B. A. RT-qPCR de citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-8 de células HL-60N. **B.** Concentración de citoquina TNF- α , IL-6 e IL-8 de células HL-60N determinada por ensayo de CBA. n=3, las barras corresponden al Error Estándar.

Los resultados de la Figura 5 muestran que las células HL-60N expresan y producen principalmente la citoquina IL-8, mientras que la expresión y producción de las citoquinas IL-6 y TNF- α fue baja y en el caso del ensayo de CBA muy cercana al límite inferior de detección.

Este resultado nos permite inferir que la citoquina más probable producida por los neutrófilos y que estaría activando la vía NF- κ B en las células tumorales sería la IL-8. Además, daría un indicio de la naturaleza de estas células tipo-neutrófilo que estaría más cercana al fenotipo N2. Lo que si bien habría que corroborar con un panel de expresión de citoquinas más completo o marcadores de superficie de cada tipo celular (C. Y. Lin y cols., 2015).

7.2. Evaluación del papel de la vía NF- κ B en la Transición Epitelio-Mesénquima de las células tumorales mamarias generada por la presencia de neutrófilos en el microambiente tumoral en un modelo in vitro.

7.2.1. Análisis la expresión génica de marcadores de EMT en las células tumorales al ser co-cultivadas con células HL-60N

Para demostrar el papel de los neutrófilos en la EMT e invasividad de las células tumorales, quisimos medir si las células HL-60N favorecían la expresión de genes característicos a la EMT en las células MCF-7 y MDA-MB231. Para esto se realizó un co-cultivo entre los neutrófilos HL-60N y las células tumorales humanas por 24 horas, luego se realizó un lavado para desechar los neutrófilos y se realizó la extracción de ARN mensajero y qPCR para E-Cadherina y Vimentina, los resultados se muestran en la Figura 6.

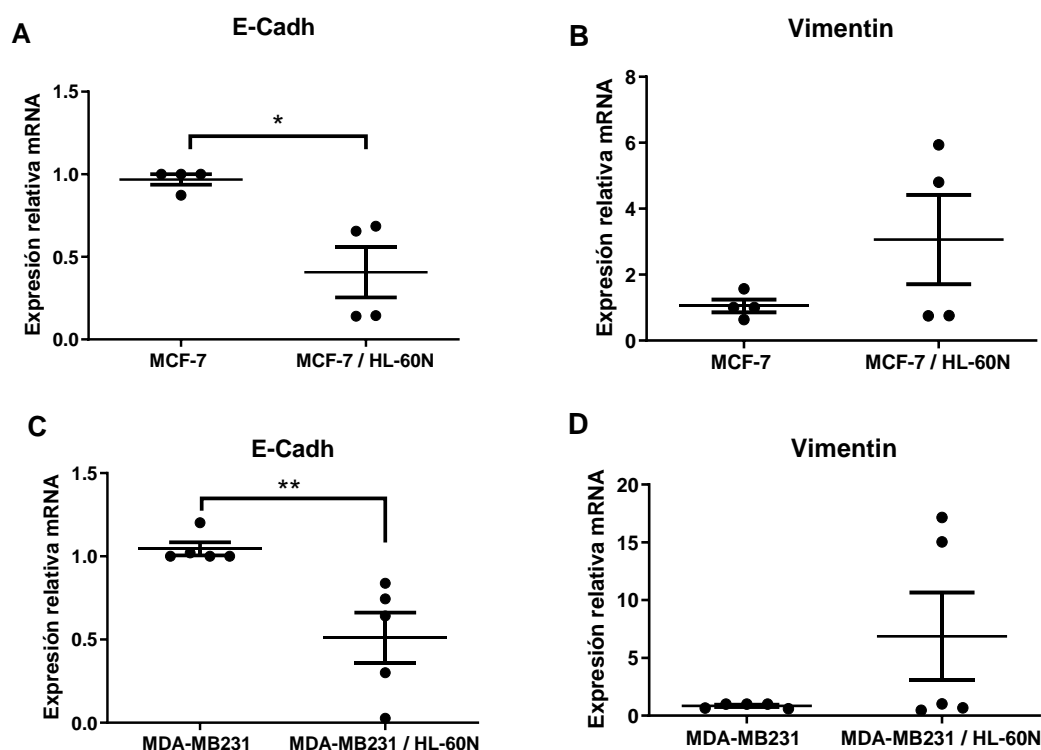


Figura 6: Los neutrófilos favorecen la expresión de factores característicos de la EMT en las células tumorales. **A.** Expresión génica de E-Cadherina en células MCF-7 en co-cultivo con células HL-60N. **B.** Expresión génica de Vimentina en células MCF-7 en co-cultivo con células HL-60N. **C.** Expresión génica de E-Cadherina en células MDA-MB231 en co-cultivo con células HL-60N. **D.** Expresión génica de Vimentina en células MDA-MB231 en co-cultivo con células HL-60N. La expresión génica se midió mediante qPCR y se utilizó de housekeeping el gen GAPDH. T-student, Mann-Whitney test. n=4-5, ** p<0,01 * p<0,05. Se muestra el error estándar.

Como se observa en la Figura 6, las células HL-60N generaron una alteración en la expresión de genes relacionados a la EMT: La disminución de E-Cadherina tanto para las células MCF-7 (Figura 6A) como MDA-MB231 (6C), además de una tendencia al aumento en la expresión de Vimentina en las células MCF-7 y MDA-MB231.

7.2.2. Análisis de la migración de las células tumorales al ser co-cultivadas con células HL-60N

Además de los experimentos de expresión génica de factores característicos de la EMT, quisimos medir si la presencia de los neutrófilos afectaba la capacidad migratoria de las células tumorales de manera funcional, a través de un ensayo de migración celular, ya que un aumento en la motilidad es una característica clave en la adquisición de un fenotipo mesenquimal. Para esto se realizó el Ensayo de Herida o también denominado Wound Healing Assay (WHA) (Liang y cols., 2007), el cual consiste en generar una interrupción en la monocapa de células y cuantificar el porcentaje de relleno de la herida.

Sin embargo, ya que está reportado que los neutrófilos favorecen la proliferación celular en contextos tumorales y eso podría sobreestimar la migración celular, previamente realizamos un ensayo de proliferación utilizando MTT, el cual mide indirectamente la viabilidad celular mediante la medición de la actividad mitocondrial, por lo tanto, al ser medido en distintos tiempos, da cuenta de la capacidad proliferativa de las células sembradas.

La proliferación se midió luego de 24 horas, que corresponde al tiempo mayor al cual se realiza el Ensayo de herida.

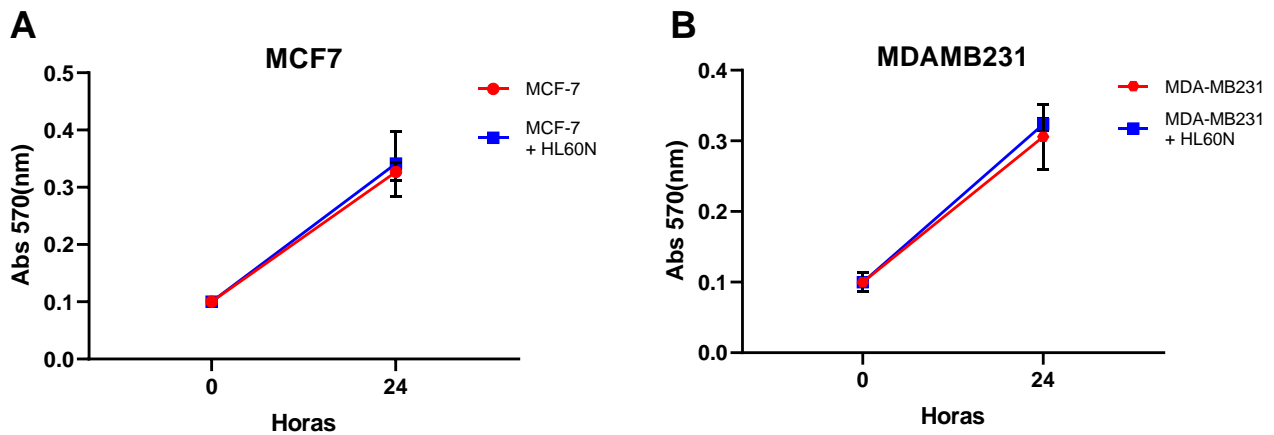


Figura 7. Proliferación celular de las células MCF-7 y MDA-MB231 en presencia de HL-60N. Se midió la proliferación celular por 24 horas de las células MCF7(A) y MDAMB231(B) en presencia de células HL-60N mediante ensayo de MTT. Se realizó un T-student, Mann-Whitney test. n=3, No significativo. Se muestra el error estándar.

Los resultados de la Figura 7 indican que no existen diferencias en la capacidad proliferativa en las células MCF-7 y MDA-MB231 en presencia y ausencia de las células HL-60N, por lo tanto, el efecto que éstos pudieran tener en el ensayo de la capacidad migratoria, corresponderán únicamente a la interacción entre ambos componentes celulares o la secreción de algún factor por parte de las células HL-60N.

Luego procedimos a realizar un co-cultivo entre las células MCF-7 y MDA-MB231 con las células HL-60N y realizar el Ensayo de Herida. Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

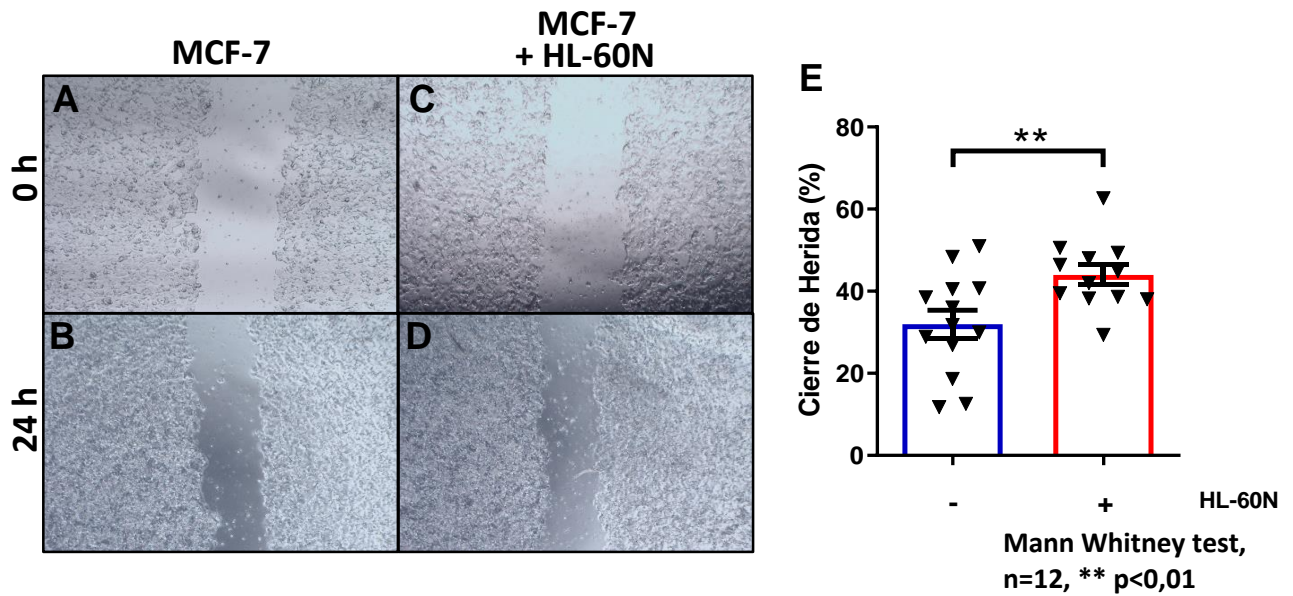


Figura 8: Los neutrófilos favorecen la motilidad en las células tumorales MCF-7. **A.** Ensayo de herida de células MCF-7 recién realizada la herida y **B.** 24 horas después de haberse realizado la herida, **C.** Ensayo de la herida de células MCF-7 en co-cultivo con células HL-60N recién realizada la herida y **D.** 24 horas después de haberse realizado la herida, **E.** Cuantificación del porcentaje del cierre de la herida de los tratamientos. Para el ensayo se utilizó un 2% de SFB. Se realizó un T-student Mann Whitney test, n=12, * p<0,05. Se muestra el error estándar.

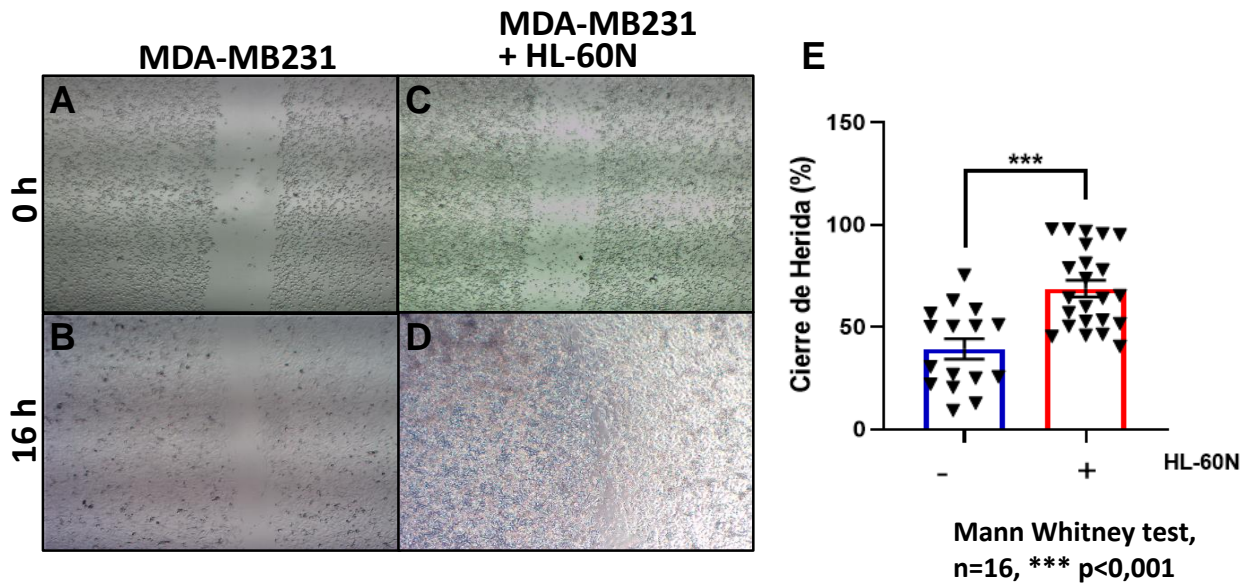


Figura 9: Los neutrófilos favorecen la motilidad en las células tumorales MDA-MB231. **A.** Ensayo de herida de células MDA-MB231 recién realizada la herida y **B.** 16 horas después de haberse realizado la herida, **C.** Ensayo de la herida de células MDA-MB231 en co-cultivo con células HL-60N recién realizada la herida y **D.** 16 horas después de haberse realizado la herida, **E.** Cuantificación del porcentaje del cierre de la herida de los tratamientos. Para el ensayo se utilizó un 2% de SFB. Se realizó un T-student Mann Whitney test, n=16, *** p<0,001, Se muestra el error estándar.

En los resultados del Ensayo de Herida, pudimos observar que las células HL-60N favorecen la capacidad migratoria de las células tumorales MCF-7 (Figura 8) y MDA-MB231 (Figura 9), siendo estadísticamente significativa en ambas células (Figura 8E y 9E).

Estos resultados en conjunto a la reducción génica de E-Cadherina provocada por las células HL-60N, indican que estas células son capaces que promover un fenotipo mesenquimal en ambas líneas celulares tumorales mamarias, característica directamente asociada a la metástasis tumoral.

7.2.3. Inhibición de la vía NF- κ B en células tumorales y análisis su migración al ser co-cultivadas con células HL-60N

Adicionalmente, evaluamos si la activación de la vía de señalización NF- κ B que estarían promoviendo las células HL-60N en las células tumorales mamarias, podría favorecer su transición hacia un fenotipo mesenquimal. Para esto utilizamos un ARN pequeño de interferencia de la subunidad P65 (SiP65) y su correspondiente control ARN pequeño de interferencia (ARNsi) Scramble (SiSCR). En forma previa, comprobamos mediante ensayo de MTT, que la proliferación celular no era alterada por inhibición de la vía NF- κ B en las células transfectadas por el ARNsi P65.

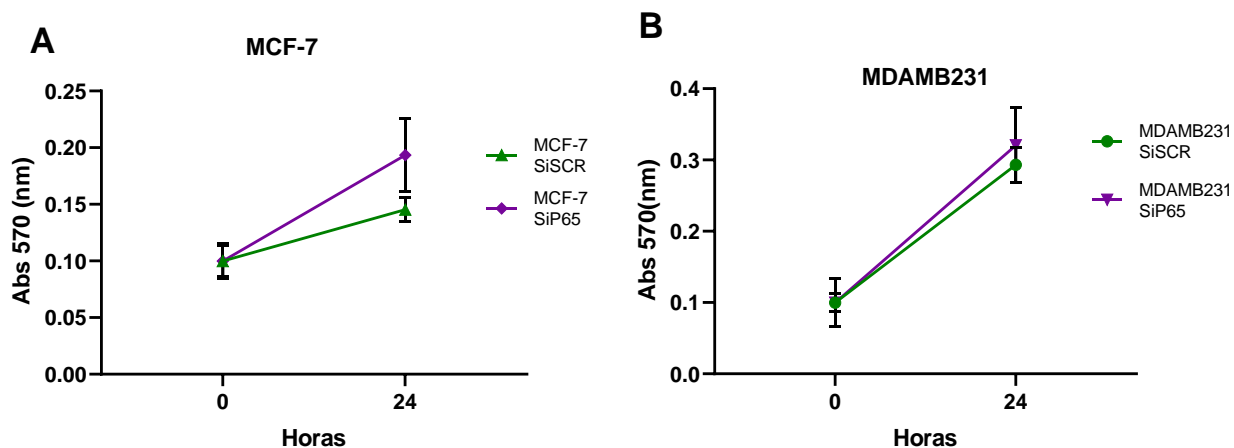


Figura 10. Proliferación celular de las células MCF-7 y MDA-MB231 transfectadas con ARN interferentes SCR (Control) y P65. Se midió la proliferación celular por 24 horas de las células MCF-7 SiSCR, MCF-7 SiP65 (A), MDAMB231 SiSCR y MDAMB231 SiP65 (B) mediante ensayo de MTT. Se realizó un T-student, Mann-Whitney test. n=3, No significativo. Se muestra el error estándar.

Los resultados en la figura 10 muestran que las células MCF-7 y MDA-MB231 transfectadas con los ARN SiSCR y ARN SiP65, no tienen diferencias significativas entre ellas en su proliferación. De manera que, procedimos a realizar los ensayos de Herida para la medición de la migración celular los que se muestran en las Figuras 11 y 12.

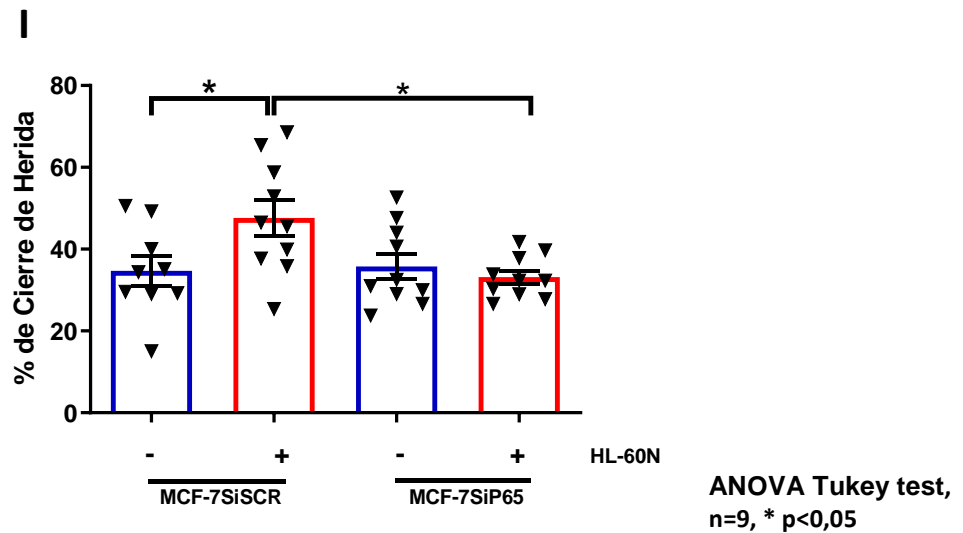
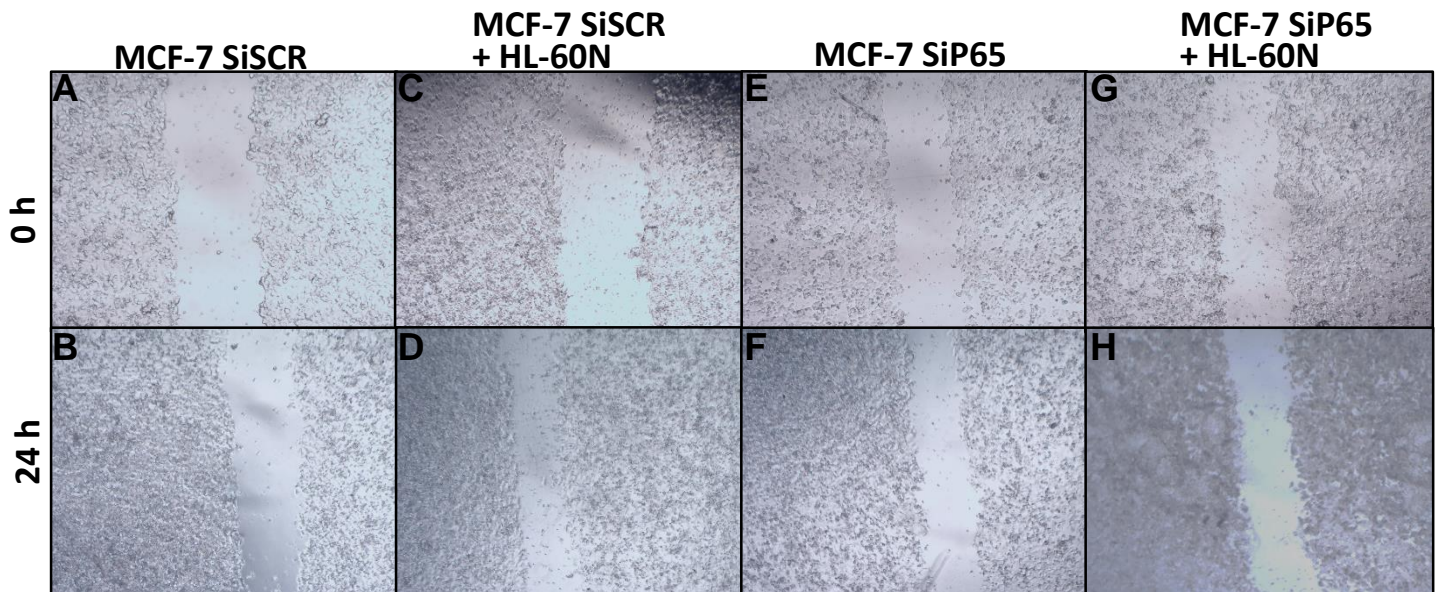


Figura 11: Knockdown de la vía NF- κ B en las células MCF-7 disminuye el efecto provocado por las células HL-60N en la migración. A. Ensayo de herida de células MCF-7 SiSCR recién realizada la herida y **B.** 24 horas después de haberse realizado la herida, **C.** Ensayo de la herida de células MCF-7 SiSCR en co-cultivo con células HL-60N recién realizada la herida y **D.** 24 horas después de haberse realizado la herida, **E.** Ensayo de la herida de células MCF-7SiP65 recién realizada la herida y **F.** 24 horas después de haberse realizado la herida, **G.** Ensayo de la herida de células MCF-7SiP65 en co-cultivo con células HL-60N recién realizada la herida y **H.** 24 horas después de haberse realizado la herida, **I.** Cuantificación del porcentaje del cierre de la herida de los tratamientos. Para el ensayo se utilizó un 2% de SFB. Se realizó un ANOVA, post hoc Tukey test entre las 4 condiciones, n=9, Se muestra el error estándar. * p<0,05.

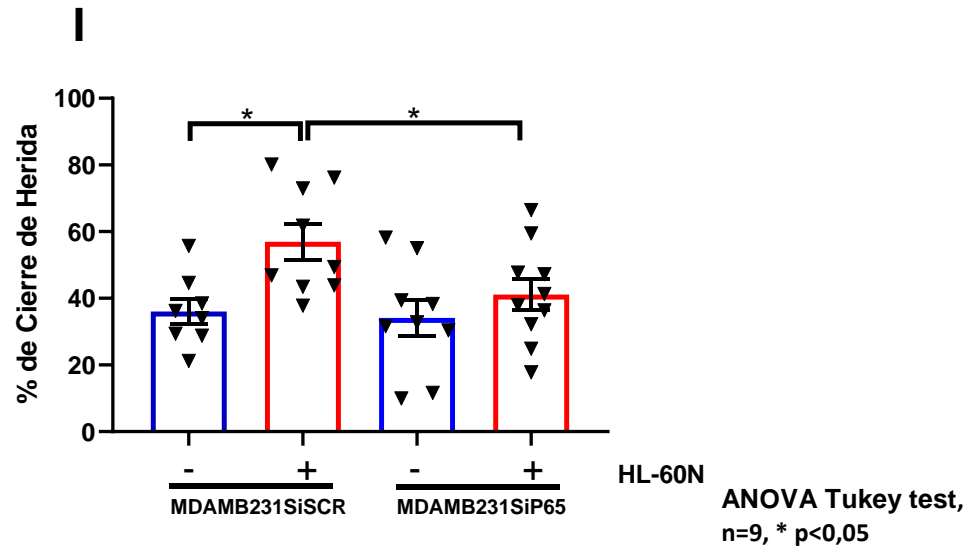
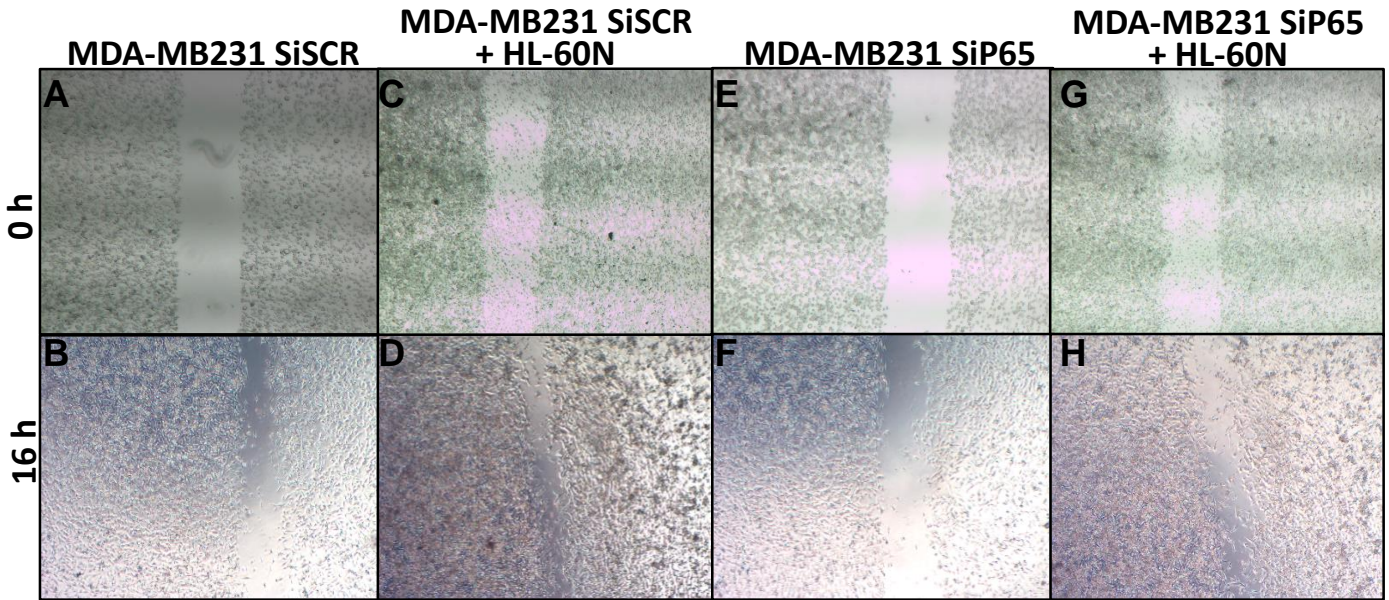


Figura 12: Knockdown de la vía NF- κ B en las células MDA-MB231 disminuye el efecto provocado por las células HL-60N en la migración. A. Ensayo de herida de células MDA-MB231SiSCR recién realizada la herida y B. 16 horas después de haberse realizado la herida, C. Ensayo de la herida de células MDA-MB231 SiSCR en co-cultivo con células HL-60N recién realizada la herida y D. 16 horas después de haberse realizado la herida, E. Ensayo de la herida de células MDAMB231SiP65 recién realizada la herida y F. 16 horas después de haberse realizado la herida, G. Ensayo de la herida de células MDAMB231 SiP65 en co-cultivo con células HL-60N recién realizada la herida y H. 16 horas después de haberse realizado la herida, I. Cuantificación del porcentaje del cierre de la herida de los tratamientos. Para el ensayo se utilizó un 2% de SFB. Se realizó un ANOVA, post hoc Tukey test entre las 4 condiciones, n=9, Se muestra el error estándar. * p<0,05.

El aumento en el porcentaje de cierre de Herida de las células controles MCF-7 y MDA (Figuras 9 y 10), fue similar al obtenido para las células transfectadas con el SiSCR (Figura 11 y 12) en presencia de HL-60N. No obstante, la inhibición de la vía NF- κ B, generada por el SiP65, disminuyó el aumento de la migración generado por las células HL-60N antes observado, tanto en las células MCF-7 (Figura 11) como MDA-MB231 (Figura 12). De manera que este resultado permitió corroborar la hipótesis que los neutrófilos favorecen la EMT en las células tumorales mediante la activación de la vía NF- κ B de éstas.

7.3. Un modelo de tumor mamario mediante xenotrasplantes en pez cebra y evaluación *in vivo* del papel de los neutrófilos en la migración de las células tumorales mamarias

7.3.1. Establecimiento de las células tumorales y análisis de su capacidad migratoria, en el modelo de pez cebra.

Finalmente se evaluó la interacción entre los neutrófilos y las células tumorales *in vivo*. Para esto, se implementó un modelo de tumor mamario mediante xenotrasplantes en pez cebra (*Danio rerio*). El modelo de pez cebra permite estudiar dicha interacción el contexto del organismo intacto y haciendo uso de todas las ventajas que este modelo brinda, principalmente lo conservado sus mecanismos y vías de señalización con los humanos (Freisinger y Huttenlocher, 2014), la disponibilidad y variedad de transgénicos estables con marcaje de diversas células y tejidos, sumado a su transparencia en estadios larvarios, permitiendo de esta manera la visualización de los diversos componentes del microambiente tumoral y su interacción de manera *in vivo* y no invasiva durante el tiempo (Feitsma y Cuppen, 2008) (Feitsma y Cuppen, 2008).

Se realizaron xenotrasplantes utilizando las mismas células tumorales mamarias anteriormente utilizadas: MCF-7 y MDA-MB231, de las que existe evidencia que logran establecerse en el pez cebra al ser inyectadas en la zona vitelina (Ren y cols., 2017b) (Ren y cols., 2017a). Esto se corroboró, además de verificar su migración a zonas distales del sitio de inyección. Como control se

utilizó la línea celular HEK293, que corresponde a una línea embrionaria de riñón humano no tumorigénica, comúnmente utilizada como control en estudios de xenotrasplantes de células tumorales en pez cebra (Varas y cols., 2020) (Zhao y cols., 2011).

Si bien, los datos de la ATCC indican que las 3 líneas utilizadas tienen tiempos de duplicación similares, aproximadamente cada 30-35 horas, esto se corroboró mediante un ensayo de proliferación contando directamente el número de células cada 24 horas por 72 horas de las 3 líneas celulares.

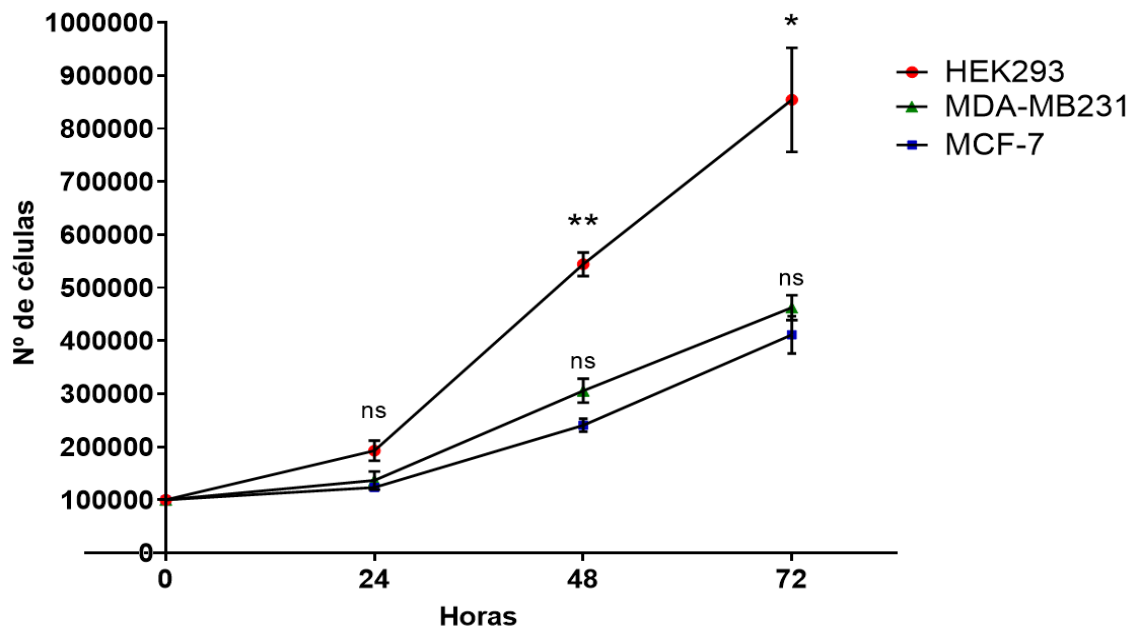


Figura 13: Comparación de la proliferación celular entre las células HEK293, MCF-7 y MDA-MB231 mediante el conteo del número de células. Se midió la proliferación celular por 24, 48, 72 y 96 horas de las células HEK293, MCF-7 y MDA-MB231 mediante el conteo de número de células cada 24 horas. Se realizó un Kruskal-Wallis test. $n=3$, Las diferencias significativas * $p<0,05$ se encontraron entre las células HEK-293 y las MCF-7 en los tiempos 48 h, 72 h y 96 h. Entre las células HEK-293 y MDA-MB231, y MDA-MB231 y MCF-7 no hubo diferencias significativas en ningún tiempo. Se muestra el error estándar.

Los datos obtenidos nos informan que la línea celular control, HEK293 tiene una tasa de duplicación significativamente mayor a la línea celular MCF-7. Mientras que no se observan diferencias significativas con la línea MDA-MB231. Por otro lado, tampoco se observan diferencias significativas entre las células MDA-MB231 y la línea celular MCF-7 (Figura 13).

Posteriormente, se realizó la inyección de aproximadamente 300 células HEK293, MCF-7 y MDA-MB231 marcadas con la tinción Mitotracker, en el vitelo de peces cebras de 48 hpf, previamente decorionados. Se observó por 3 días el crecimiento celular en el vitelo en los tres tipos celulares (Figuras 14A-C, 15A-C, 16A-C) y cuantificó la cantidad de células que migraron hacia la zona de la cola, en la zona señalada en las Figuras 14D-E, 15D-E y 16D-E.

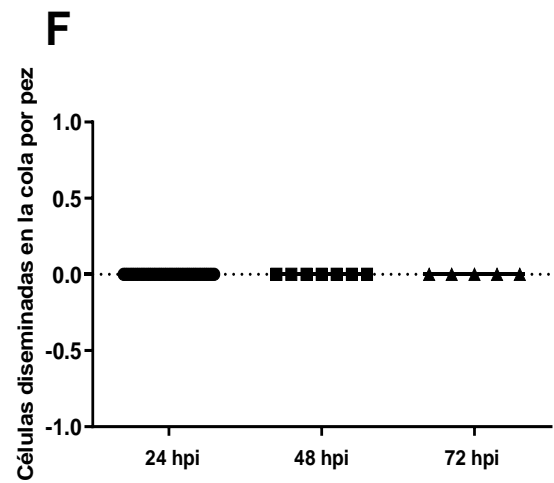
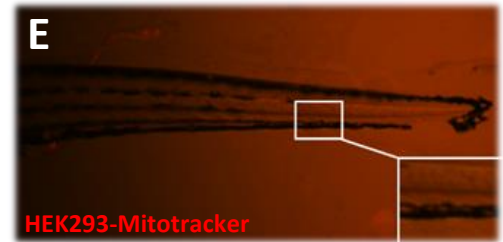
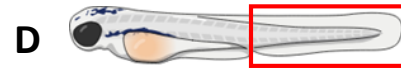
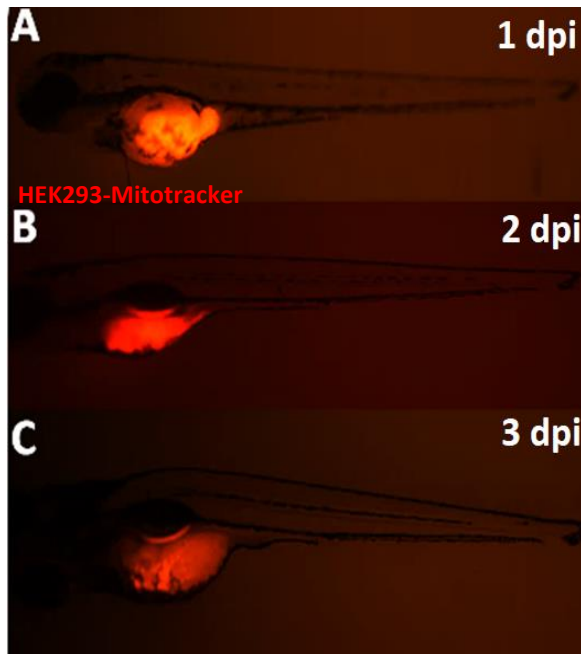


Figura 14: Xenotrasplante en pez cebra de la línea celular HEK293. Células marcadas con la tinción transitoria Mitotracker lo que permite su visualización en el canal rojo **A.** Larva Tab5 3 dpf, 1 dpi **B.** Larva Tab5 4 dpf, 2 dpi, **C.** Larva Tab5 5 dpf, 3 dpi. **D.** Promedio de las células HEK-293 diseminadas por pez. ANOVA test No paramétrico, Kruskal-Wallis test, n=6, las barras corresponden al error estándar.

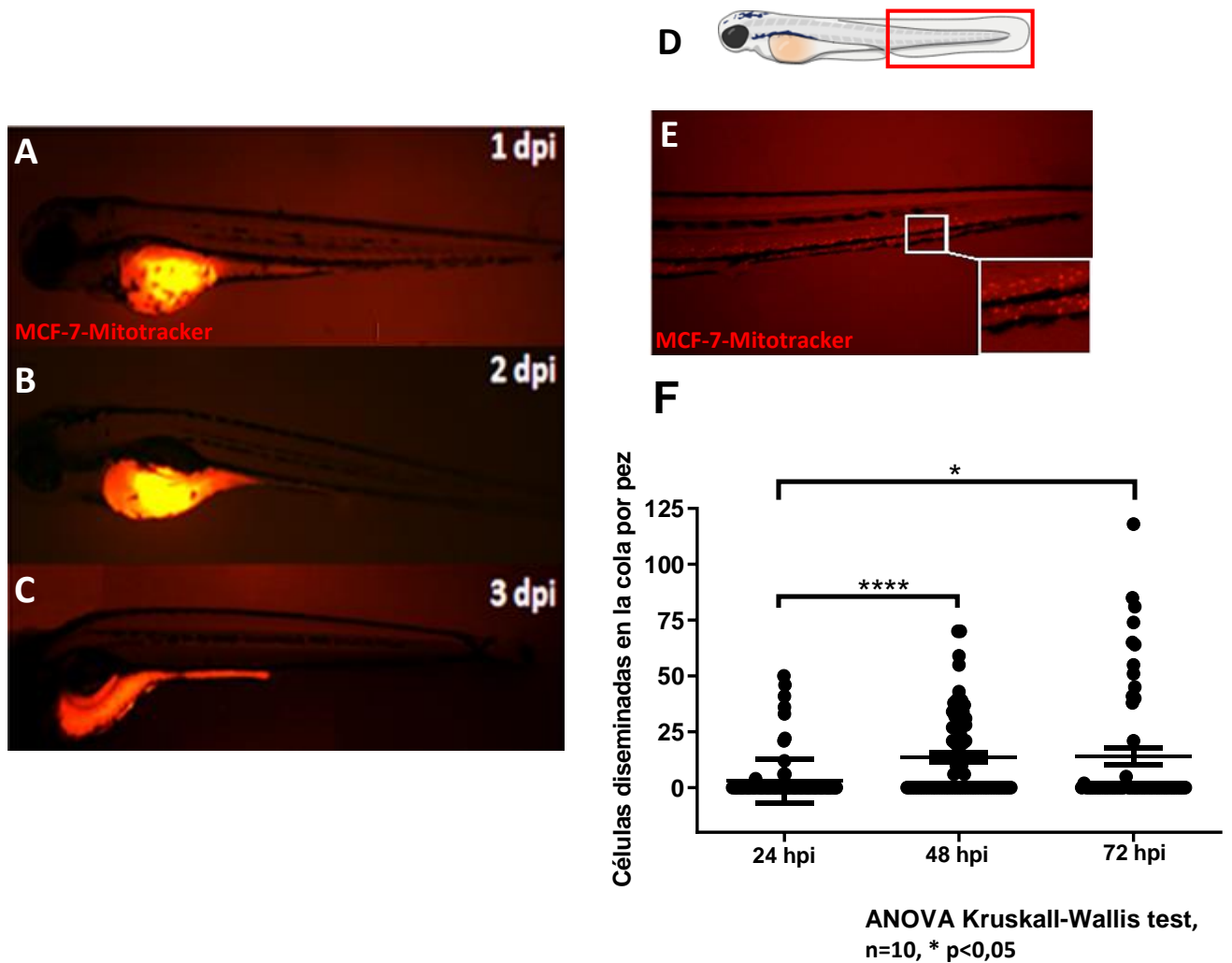


Figura 15. Xenotrasplante en pez cebra de la línea celular MCF-7. Células marcadas con la tinción transitoria Mitotracker lo que permite su visualización en el canal rojo **A**. Larva de 3 días post fertilización, 1 día post inyección (dpi). **B**. Larva de 4 dpf, 2 dpi. **C**. Larva de 5 dpf, 3 dpi **D**. Diagrama de la zona de la cola en donde se mide la migración *in vivo*. **E**. Zona de la cola con migración de células MCF-7. **F**. Promedio de las células tumorales MCF-7 diseminadas por pez. ANOVA test No paramétrico, Kruskal-Wallis test, n=10., ***P<0.005, barras de Error Estándar.

HEK293 fue reduciéndose (Figuras 14 A-C). Si bien las células HEK293 mostraron una proliferación celular significativamente mayor de manera *in vitro*, esa proliferación no se vio replicada ni en el tamaño tumoral en el vitelo de los peces cebra ni en un aumento de la migración de estas células hacia la sección de la cola.

Por otro lado, la cantidad de células tumorales mamarias que migraron a la zona de la cola mostró un aumento a medida que avanzaban los días (Figura 15F, 16F), observándose diferencias significativas entre el día 1 y 2 post inyección de las células MCF-7 (Figura 15F), y días 1 y 3 en las células MDA-MB231 (Figura 16F), mientras que en la célula control HEK293, no se observó migración en ningún pez xenotrasplantado (Figura 14 E-D).

La línea celular MDA-MB231 mostró un promedio de células que migraron por pez (promedio: ~60 células) superior a las células MCF-7 (promedio: ~16 células) (Figura 16), lo cual, es concordante con las características de las células MDA-MB231, ya que provienen de un sitio metastásico y se ha reportado como altamente invasiva en ensayos bicamerales utilizando dispositivos Transwell, a diferencia de las células MCF-7, las que son medianamente invasivas (Xie y cols., 2009) (Hooshmand y cols., 2013) (Kallens y cols., 2017). Además, se identificó que las células MDA-MB231 tienen una tasa de duplicación levemente mayor a las células MCF-7 (no significativo), lo que también podría favorecer a la cantidad de células que son capaces de migrar a la zona de la cola.

La EMT y la adquisición de fenotipos mesenquimales en cáncer mamario ha sido directamente relacionados a la capacidad migratoria de las células tumorales y a su nivel de malignidad (Savci-Heijink y cols., 2019) (Creighton y cols., 2010), por lo que a partir de estos resultados podemos concluir que las células tumorales que se encuentran en el sitio de la cola, realizaron la EMT antes de movilizarse por medio de la circulación y asentarse en dicho lugar. En consecuencia, se concluye que los xenotrasplantes de células tumorales mamarias MCF-7 y MDA-MB231 en el modelo de pez cebra permiten estudiar el fenómeno de la EMT progresivamente en el tiempo y de manera no invasiva.

7.3.2. Utilización de un Morfolino antisentido contra el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos gcsfr (Mo gcsfr) para la generación de neutropenia en pez cebra

Con el fin de evaluar el rol de los neutrófilos en la EMT en las células tumorales *in vivo*, aprovechamos la disponibilidad de un modelo de reducción de neutrófilos endógenos del pez cebra para evaluar si, en esta condición, existen cambios en la migración de las células tumorales. Reportes previos que indican que el Morfolino antisentido dirigido contra el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos gcsfr (Mo gcsfr) genera neutropenia (Liongue y cols., 2009). Para confirmar que en nuestras manos esto se obtiene, se utilizaron peces

transgénicos mpo:EGFP, que expresan GFP bajo el promotor de la mieloperoxidasa expresada abundantemente por los neutrófilos, a los que se les inyectaron los Mo gcsfr y el Morfolino control (MoC) en una concentración de 0,6 mM, en conjunto con un Morfolino contra p53 (0,6 mM), frecuentemente utilizado para disminuir la mortalidad generada por los Morfolinos (inhibe las rutas de apoptosis dependientes de p53). Se utilizó como control un Morfolino dirigido a una mutación del intrón de la beta-globina humana que causa la beta-talasemia, el que se utiliza ampliamente como control negativo. Como se observa en la Figura 17, se comprobó que el Mo gcsfr genera una reducción parcial de la cantidad de neutrófilos endógenos en el pez cebra y que esta disminución fue sostenida hasta las 96 hpf.

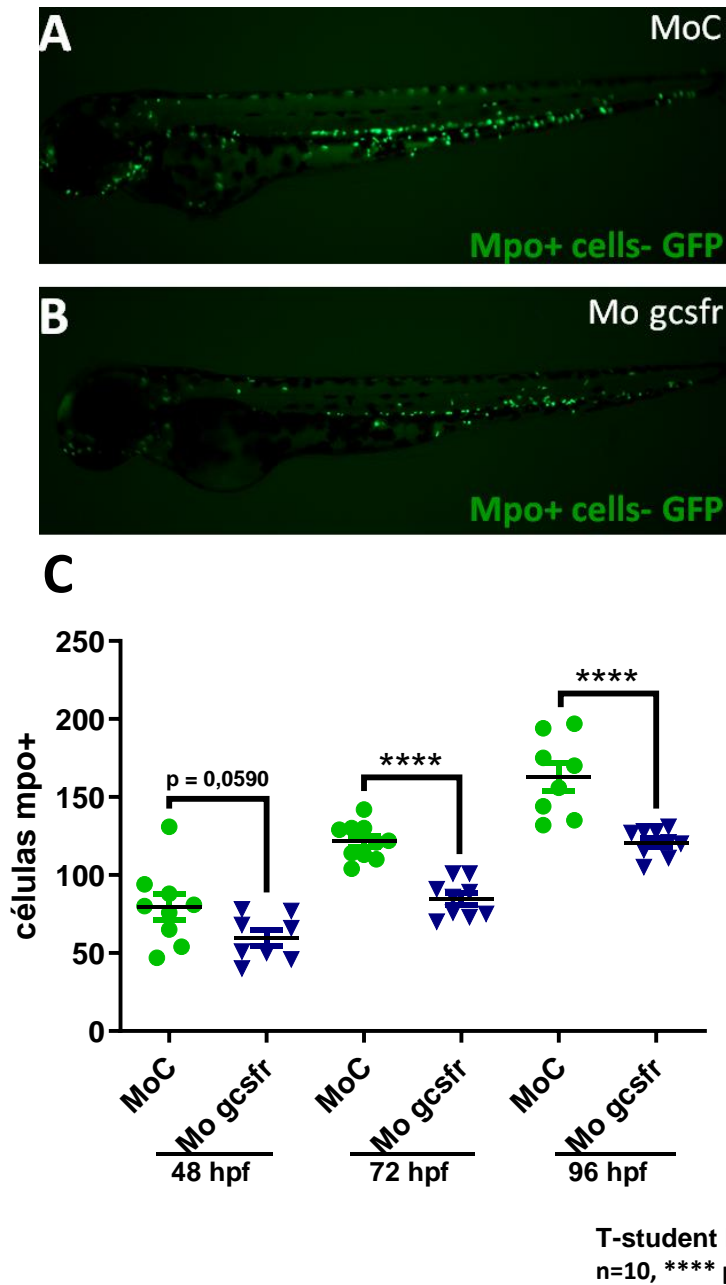


Figura 17: Comprobación de la disminución de neutrófilos producida por el Morfolino contra el factor reclutante de colonias granulocíticas (Mo gcsfr). **A.** Pez cebra transgénico de la línea mpo:eGFP inyectado con el Morfolino control (Moc) a las 72 hpf, **B.** Pez cebra transgénico de la línea mpo:eGFP inyectado con el Morfolino contra el Factor reclutante de colonias granulocíticas (Mo gcsfr) a las 72 hpf, **C.** Número total de neutrófilos por pez, inyectados con el Moc y Mo gcsfr a las 48, 72 y 96 hpf. T-student Mann Whitney test, n=10, **** p < 0.001, las barras corresponden al Error Estándar.

7.3.3. Análisis de la migración de células tumorales en peces morfantes Mo gcsfr

Luego se generaron peces xenotrasplantados con células MCF7 y MDA-MB231 en peces cebra previamente inyectados con el Mo gcsfr y peces controles, en los que les cuantificó diariamente la cantidad de células tumorales que migraron a la zona de la cola.

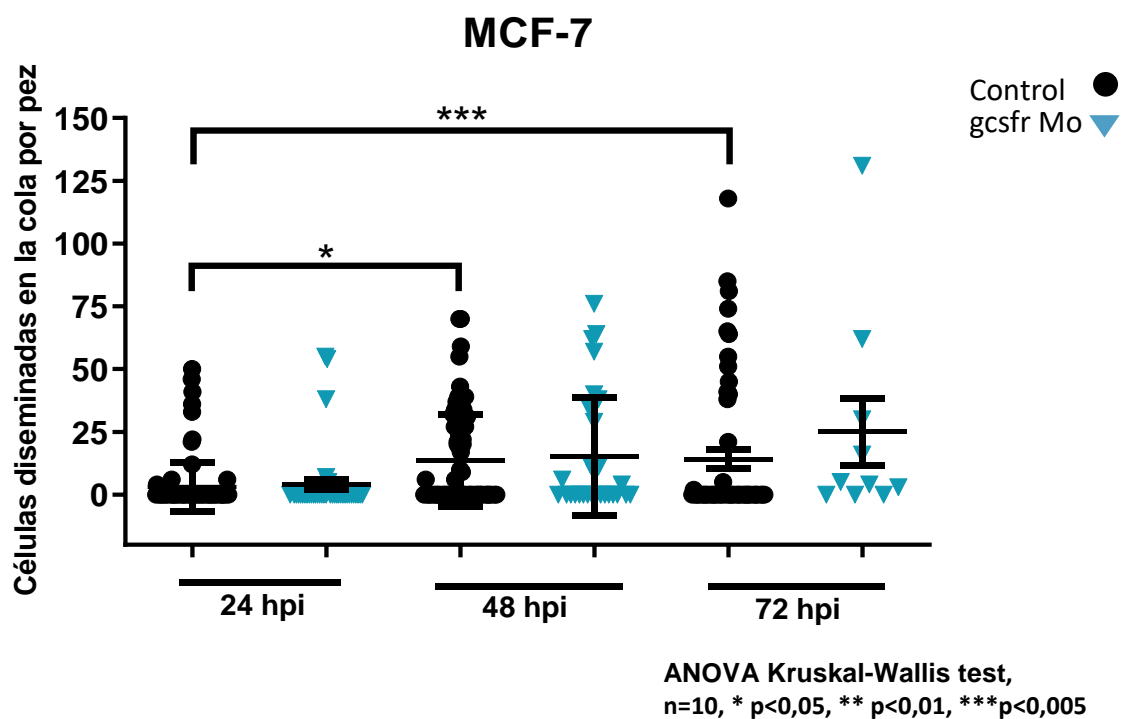


Figura 18: Cuantificación de la migración de las células MCF-7 en la cola de Peces cebras controles y peces cebras morfantes para gcsfr. A. Cuantificación de células MCF-7 diseminadas en la cola de pez cebras por pez, se comparan peces control vs peces con Mo gcsfr. Se comparan peces control vs peces con Mo gcsfr. Los peces fueron observados por 3 días después de la inyección con las células tumorales. El test estadístico utilizado fue ANOVA Kruskal-Wallis. *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,005; n=10.

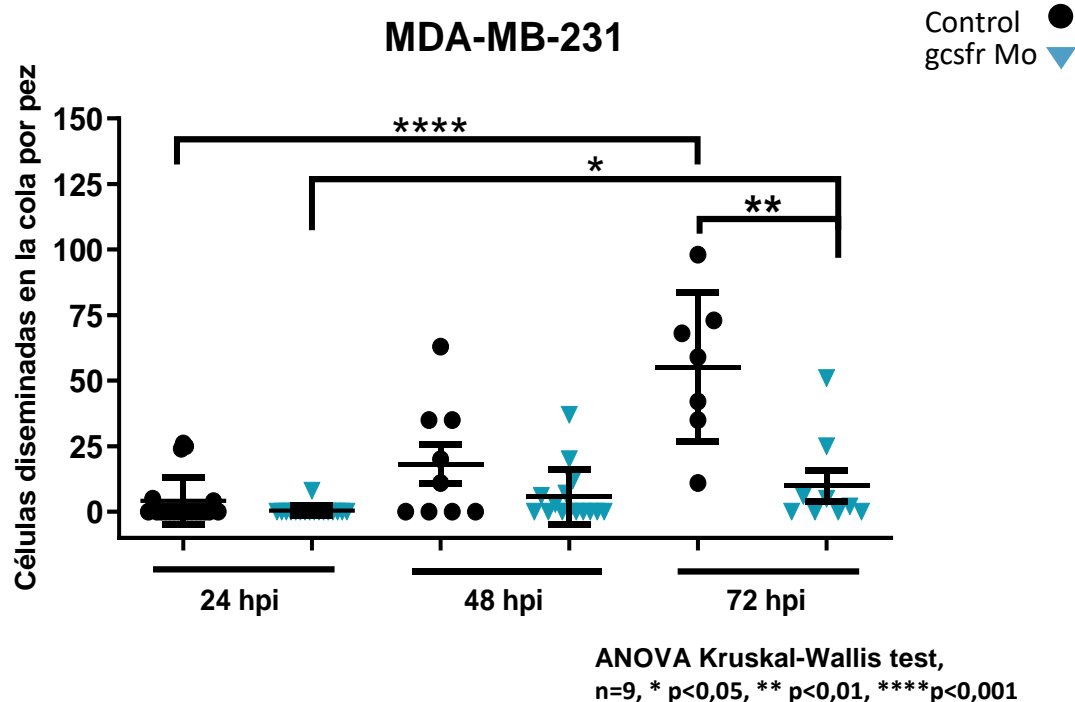


Figura 19: Cuantificación de la migración de las MDA-MB231 cola de Peces cebrá controles y peces cebrá morfantes para gcsfr. A. Cuantificación de células MDA-MB231 diseminadas en la cola de pez cebrá por pez, se comparan peces control vs peces con Mo gcsfr. Los peces fueron observados por 3 días después de la inyección con las células tumorales. El test estadístico utilizado fue ANOVA Kruskal-Wallis. *p<0,05; ** p<0,01; ****p<0,001; n=9.

Los resultados expuestos en la Figura 18, indican que la reducción en la cantidad de neutrófilos endógenos de pez cebrá no generó diferencias en la cantidad de células MCF-7 que migraron al área de la cola.

Sin embargo, la reducción de los neutrófilos sí disminuyó la migración de las células MDA-MB231 (Figura 19), ya que se encontraron diferencias

significativas en la cantidad de células que migraron en el día 3 post inyección, junto con una tendencia marcada en la misma dirección en los días previos.

Los resultados de este objetivo nos permiten corroborar que las células tumorales MCF-7 y MDA-MB231 logran establecerse en el vitelo de pez cebra y migrar a zonas distales al sitio de la implantación.

Además, permite confirmar que los neutrófilos endógenos de pez cebra promueven la migración celular de las células MDA-MB231 *in vivo*.

8. DISCUSIÓN

Los neutrófilos son ampliamente conocidos como la primera línea de defensa contra infecciones patogénicas. Sin embargo desde el descubrimiento de la población de neutrófilos infiltrantes de tumor o TANs, su importancia en el desarrollo del cáncer se ha vuelto cada vez más evidente durante la última década (Ohms y cols., 2020).

Estos neutrófilos son atraídos por señales secretadas por las células del microambiente tumoral y polarizados hacia un fenotipo N1, antitumorales, o N2, protumorales (Fridlender y cols., 2009) (Ohms y cols., 2020). La polarización hacia N1 es producto de la presencia de IFN tipo 1 presente en el microambiente tumoral, mientras que la polarización hacia N2, es consecuencia de la presencia de la citoquina TGF- β , la cual es abundantemente encontrada en ambientes tumorales avanzados (Pickup y cols., 2013). De manera que los neutrófilos son atraídos y polarizados a un fenotipo maligno por los propios componentes del microambiente, y estos a su vez, promueven características que permiten el desarrollo tumoral entre las que se encuentra la EMT (Pickup y cols., 2013).

Una de las vías de señalización responsables de la EMT que mayormente se ha descrito en cáncer mamario, es la vía NF- κ B (Min y cols., 2008) . Debido que los TANs son capaces de activar esta vía en células no tumorales, se propuso estudiar si los neutrófilos inducen la activación de la vía NF- κ B en las células tumorales y provocan su EMT.

Para estudiar esta interacción realizamos ensayos tanto *in vivo*, utilizando la herramienta de xenotrasplante en el modelo de pez cebra, como *in vitro*, mediante un co-cultivo directo entre neutrófilos y células tumorales mamarias.

8.1. Células HL-60N como modelo de neutrófilos

Para la aproximación *in vitro*, decidimos utilizar la línea celular HL-60 diferenciada a tipo-neutrófilo (HL-60N), debido a que este tipo celular diferenciado es la línea celular más utilizada en investigación de neutrófilos: es de rápida proliferación (20-45 horas), no requiere suplementos de crecimiento y permite una serie de técnicas de edición génica (Blanter y cols., 2021). Adicionalmente, se ha demostrado que las células HL-60N tienen un comportamiento similar al de los neutrófilos: forman filamentos de actina, se polarizan y migran direccionalmente en respuesta a las mismas quimioquinas que atraen a los neutrófilos de sangre periférica (Blanter y cols., 2021), tienen una actividad microbiana similar (Yaseen y cols., 2017) y actúan como neutrófilos frente a procesos tumorigénicos (W. Zhang y cols., 2017) (Song y cols., 2015) (C. Y. Lin y cols., 2015).

Este modelo permite realizar experimentos largos, a diferencia de neutrófilos obtenidos de sangre periférica, los que en circulación tienen una vida media de 7-8 horas (Blanter y cols., 2021) (Kajiume y Kobayashi, 2018), por lo que no permiten la realización de experimentos de mayor tiempo, como los que eran necesarios para esta investigación.

Sin embargo, cabe mencionar que producto del tratamiento con DMSO se obtuvo una diferenciación de las células HL-60 a HL-60N en promedio de un 85%. Considerando el alto rendimiento de la diferenciación y que la técnica de cell-sorting provoca un estrés importante y alta mortalidad en las células seleccionadas, en la mayoría de los experimentos de co-cultivo decidimos utilizar el total de las células tratadas con DMSO, las que contenían el 15% de células sin diferenciar.

Cabe mencionar que la proporción de células HL-60N que se utilizaron en los co-cultivos correspondió a la 3ra parte de la cantidad de células tumorales utilizadas (HL-60N : Células tumorales mamarias/ 1:3), por lo que el porcentaje (15%) de células HL-60N sin diferenciar (HL-60) correspondería a la 20va parte de la cantidad de células tumorales (HL-60 : Células tumorales mamarias/ 1:20). Si bien, consideramos que ese porcentaje no debiera verse reflejado en la expresión génica de los blancos transcripcionales de la vía NF- κ B ni la EMT en las células tumorales, debido que estas células corresponden a una línea celular de leucemia promielocítica, es preciso indicar que convendría realizar un co-cultivo con el porcentaje de las células no diferenciadas (15%) para verificarlo.

8.2. HL-60N favorecen la expresión génica y producción de blancos transcripcionales de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias

Luego de diferenciar las células HL-60 a HL-60N, realizamos un co-cultivo directo en conjunto con las células tumorales mamarias MCF-7 y MDA-MB231. Debido a que las células HL-60N crecen en suspensión, y las células tumorales, adheridas, fue posible separar ambos componentes con lavados con PBS con el fin de descartar las células HL-60N, y aislar ARNm sólo de las células tumorales. Al respecto, la naturaleza del crecimiento en suspensión de las células HL-60N, nos permite tener la seguridad que, aunque no fuera eliminada la totalidad de estas células, este porcentaje remanente sería muy bajo y difícilmente podría verse reflejado en los resultados de qPCR. No obstante, eventualmente convendría medir en el ARNm colectado si no existe un aporte de ARNm de células HL-60N utilizando partidores para marcadores propios de esta población como Ly6G y CD11b (Grieshaber-Bouyer y cols., 2021).

Por medio de este experimento de co-cultivo, pudimos comprobar que las células HL-60N pueden promover la expresión de genes blanco de la vía NF- κ B en células de cáncer mamario. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión génica de IL-8 en las células MCF-7 en co-cultivo con HL-60N y una marcada tendencia al alza para la citoquina TNF- α . Además, utilizando esta misma aproximación observamos un aumento de la expresión génica en los genes relacionados con la vía NF- κ B en la línea celular de mayor

malignidad, MDA-MB231, específicamente los genes IL-8 y TNF- α , siendo estadísticamente significativa en ambos. El promedio de la expresión génica de la citoquina IL-6 se encontró aumentada en ambas células tumorales al encontrarse en el co-cultivo con las células HL-60N. Sin embargo, los resultados muestran una gran dispersión, lo que impide obtener una diferencia significativa.

Estos resultados se comprobaron midiendo la producción y secreción de citoquinas a través de un ensayo de CBA, en donde se repitió el resultado obtenido en la medición realizada por qPCR. Se observó el aumento de la citoquina IL-8 en las células MDA-MB231 al encontrarse en co-cultivo con las células HL-60N. Además, se encontró el aumento de IL-6 de estas células en dicha condición. Sin embargo, no se observó el aumento de TNF- α en las células MDA-MB231 ni IL-8 en las células MCF-7.

Cabe mencionar que las tres citoquinas medidas: TNF- α , IL-6 e IL-8, corresponden a citoquinas pro-inflamatorias, y son a su vez, ligando y producto de la vía NF- κ B, por lo que, al ser favorecida su producción, éstas podrían tener regulación positiva autocrina, aumentando en mayor medida la expresión de estos genes y producción de dichas citoquinas. Es sabido que la inflamación crónica corresponde a una de las características claves y precursoras de malignidad en la enfermedad del cáncer (Colotta y cols., 2009). Existe una poderosa correlación entre enfermedades inflamatorias y desarrollo de distintos tipos de cánceres, de hecho se ha reportado la reducción en el desarrollo y disminución en la mortalidad de cáncer de mama y colon con el uso de drogas

antiinflamatorias no esteroideas (Mantovani y cols., 2008). Además estudios en pacientes han demostrado una correlación entre altos niveles particularmente de IL-6 e IL-8 y un estado clínico mayor del cáncer mamario y de metástasis en ganglios linfáticos (Ma y cols., 2017), siendo ambas citoquinas unos potenciales biomarcadores de prognosis (Ma y cols., 2017).

En particular, la expresión de IL-8 es regulada principalmente por la vía de señalización NF- κ B, la que puede ser activada por diferentes estímulos inflamatorios (Waugh y Wilson, 2008) y estreses ambientales como hipoxia (D'ignazio y Rocha, 2016). IL-8, a su vez, se une a sus receptores CXCR1 y CXCR2 en donde pueden activar múltiples vías de señalización, entre ellas la NF- κ B (Manna y Ramesh, 2005). Estas inciden en la expresión génica a través de la regulación de numerosas actividades de factores de transcripción, en la transcripción y producción de diversas proteínas y afecta la organización del citoesqueleto celular (Waugh y Wilson, 2008). De esta manera, la señalización de IL-8 promueve respuestas angiogénicas en células endoteliales, aumentando la proliferación y supervivencia de dichas células (Waugh y Wilson, 2008). Asimismo, se ha determinado que IL-8 favorece el reclutamiento y activación de los neutrófilos, atrayéndolos hacia el microambiente tumoral (Waugh y Wilson, 2008), de manera que al ser favorecida su expresión en las células tumorales al encontrarse en cercanías con células HL-60N, esta interacción promovería el reclutamiento de nuevos neutrófilos hacia el nicho tumoral.

Los resultados obtenidos nos indican que los neutrófilos pueden activar la vía NF- κ B en las células tumorales MCF-7 y MDA-MB231 *in vitro*, lo que además de potencialmente favorecer su EMT, estaría aumentando factores inflamatorios asociados a un aumento de la malignidad tumoral.

Estos experimentos de co-cultivo no nos permiten diferenciar si la comunicación que se produce entre ambos tipos celulares ocurre por contacto o por la secreción de citoquinas al medio. Esto podría corroborarse utilizando un sistema bicameral tipo Transwell el que permitiría su comunicación sin contacto.

8.3. Expresión de citoquinas de HL-60N

De manera paralela, quisimos estudiar que factor secretado por los neutrófilos podría estar generando una activación de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias.

Como las citoquinas antes medidas IL-6, IL-8 y TNF- α son activadoras de la vía, además de producto de ésta, quisimos medir su producción basal mediante CBA, pensando en una posible polarización de estas células hacia un fenotipo N2 protumorigénico como ha sido reportado anteriormente (C. Y. Lin y cols., 2015).

Los resultados obtenidos mostraron que de las 3 citoquinas medidas, IL-8 es la más abundantemente producida por este tipo celular, mientras que la cantidad de citoquina IL-6 y TNF- α , fue muy cercana al límite inferior del kit (Figura 5).

Debido que la citoquina TNF- α se relaciona a un fenotipo N1 (Uribe-Querol y Rosales, 2015), mientras que IL-8 a un fenotipo N2 (Masucci y cols., 2019) (Ohms y cols., 2020), estos resultados podrían sugerir que las células con las que estamos trabajando tendrían un perfil inmune de un TANS N2, que corresponde a un fenotipo protumorigénico (Uribe-Querol y Rosales, 2015) (Masucci y cols., 2019). Por otro lado, aunque TNF- α se asocie a un fenotipo N1, se ha demostrado que es capaz de promover la invasión y metástasis vía NF- κ B en células tumorales (Tang y cols., 2017) (Y. Wu y Zhou, 2010), además de originar inflamación crónica, generando un ambiente inmunosuprimido (Uribe-Querol y Rosales, 2015). La presencia de esta citoquina en particular es sujeto de controversia en estudios de procesos tumorigénicos y depende principalmente de la temporalidad y del tipo de cáncer (Y. Lin y Wang, 2008).

Si bien, para confirmar el fenotipo N2 de las células HL-60N se tendrían que medir otras citoquinas y marcadores de superficie para generar un perfil más completo, tales como TGF- β y CCL2, CD54, CD95, CD182, IP-10 (Ohms y cols., 2020). La IL-8 da un indicio de la naturaleza de estas células, además de ser un fuerte candidato de factor activador de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias.

8.4. HL-60N favorecen la EMT en las células tumorales mamarias

Se midieron factores de EMT en las células tumorales, posterior al cocultivo con las células HL-60N, se observó que las células HL-60N generaron un

aumento en la expresión génica de Vimentina y una disminución de E-Cadherina en las células MCF-7 y MDA-MB231, en donde la disminución de E-Cadherina tuvo una diferencia significativa en ambos tipos celulares.

E-Cadherina y Vimentina, al igual que los factores transcripcionales Snail1/2/3, Zeb1/2 y Twist1, corresponden a marcadores de la EMT. E-Cadherina corresponde a una glicoproteína de la superficie celular que media la adhesión intercelular a través de las interacciones de sus dominios extracelulares y citoplasmáticos con la β -catenina (Gheldof y Berx, 2013). La desestabilización este complejo resulta en una disminución de expresión de E-Cadherina, promoviendo la invasión tumoral y la metástasis (Zhu y cols., 2018). La expresión de E-Cadherina está comandada por diversos factores transcripcionales que la regulan negativamente, entre los que se encuentran Snail1 (Snail), Snail2 (o Slug), Snail3 (o Smuc) Zeb1, Zeb2 y Twist1 (Tania y cols., 2014). Estos factores reconocen la secuencia de la E-box ubicada en la región promotora de E-Cadherina y reclutan cofactores e histonas desacetiladas, reprimiendo la expresión de esta proteína (Garg, 2013) (Tania y cols., 2014).

Vimentina, por otro lado, es un tipo de filamento intermedio que mantiene la integridad celular y se encuentra en las células mesenquimales de diversos tipos de tejidos (S. Wu y cols., 2018). En cánceres sólidos se ha reportado que al estar sobreexpresada, promueve la EMT y la metástasis (C. Y. Liu y cols., 2015).

En conclusión, un descenso de la expresión de E-Cadherina acompañado por un aumento de la de Vimentina, nos indica que el programa de EMT está siendo favorecido por la presencia de las células diferenciadas a neutrófilos.

Para evaluar la EMT funcionalmente se realizó un Ensayo de Herida, que corresponde a un método que permite estudiar la migración celular *in vitro*, en donde se mide la capacidad de “cerrar” una herida en la monocapa celular y se utiliza para cuantificar la tasa de migración (Rodríguez y cols., 2005). Mediante este test, se observó que las células HL-60N favorecen la capacidad migratoria de las células tumorales MCF-7 y MDA-MB231, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Ambos resultados, de expresión de genes asociados a la EMT y el Ensayo de Herida, estarían indicando que las células HL-60N son capaces que promover un fenotipo mesenquimal en las células tumorales mamarias, a través de la expresión de genes asociados a la EMT, y que esto a su vez, se ve reflejado de manera funcional en un aumento de la migración, característica directamente asociada a la metástasis tumoral.

La contribución de los neutrófilos en la invasión y metástasis se ha asociado mayoritariamente al favorecimiento de la angiogénesis, mediante la secreción de VEGF y MMP9 (Tazzyman y cols., 2009), metaloproteasa que, además de favorecer la degradación de la matriz extracelular, contribuye a la angiogénesis (Masucci y cols., 2019). Por otro lado, las NETs, que corresponden a andamios extracelulares derivados de neutrófilos (Yang y Liu, 2021), también presentan un papel clave en la regulación del microambiente tumoral y

favorecimiento de la metástasis induciendo la EMT (Demkow, 2021) (Yang y Liu, 2021). Estas promueven la extravasación de células cancerosas (Demkow, 2021) y permiten el establecimiento de un nicho de evasión inmune y protección ante el ataque de células inmunitarias (Yang y Liu, 2021).

Además, se han determinado diversas moléculas secretadas por los neutrófilos y señalizaciones específicas en distintos tipos celulares, que los han asociado con la EMT, tales como el cáncer de vejiga, en el que los neutrófilos actúan sobrerregulando los receptores androgénicos los que aumentan la expresión de la metaloproteasa MMP13, favoreciendo la migración e invasión de dichas células tumorales (C. Y. Lin y cols., 2015). En cáncer gástrico se comprobó que los neutrófilos inducen la activación de la vía ERK y su EMT en dichas células tumorales (W. Zhang y cols., 2017), además de producir IL-17a, citoquina que promueve la EMT a través de la vía JAK2/STAT3 (Ma y cols., 2017). Por otro lado, la secreción de elastasa por parte de los neutrófilos demostró causar la EMT en cáncer pancreático (Große-Steffen y cols., 2012) y en cáncer ovárico (Mayer y cols., 2016).

Existen diversos mecanismos por lo que los neutrófilos podrían favorecer la EMT en las células tumorales mamarias, sin embargo, debido a la abundante evidencia que relaciona la EMT con la vía NF- κ B en un gran número de cánceres (Maier y cols., 2010) (Q. Zhang y cols., 2009), (Pantuck y cols., 2010) (Qin y cols., 2016) y en cáncer mamario en particular (Huber y cols., 2004) (Pires y cols.,

2017) (W. Wang y cols., 2014), se decidió apostar por esta vía de señalización candidata.

8.5. La EMT producida en las células tumorales mamarias por las células HL-60N es mediada por la activación de la vía NF- κ B

Para determinar si la inducción de la EMT en las células tumorales mamarias causada por las células HL-60N, era producto de la activación de la vía de señalización NF- κ B, se inhibió esta vía en las células tumorales mamarias y ensayó el co-cultivo con las células HL-60N.

Para ello, se realizó la transfección de las células MCF-7 y MDA-MB231 con los ARN pequeño de interferencia (ARNsi) contra P65 (SiP65), que realiza un *knock down* del dímero P65, quien en conjunto con el dímero P50 generan el heterodímero que trasloca al núcleo y genera la transcripción de sus genes diana (T. Liu y cols., 2017), además de la transfección con su control ARNSi Scramble (SiSCR).

Se observó también, que en células MCF-7 y MDA-MB231 transfectadas con el ARNSi P65, el aumento de migración que generan las células HL-60N en las células control y en las transfectadas con el SiSCR, no fue replicado, sino que este fue significativamente menor en ambos tipos celulares.

Debido a que se comprobó que la reducción de P65 no afectó la viabilidad y proliferación celular de las células transfectadas, en comparación con la

transfección con su control (SiSCR), este resultado nos permite corroborar que la activación de la vía NF- κ B de las células tumorales generada por las células HL-60N, es un proceso clave para que estas adquieran el fenotipo mesenquimal que genera la interacción Neutrófilo/célula tumoral, que se ve reflejado en un aumento de la migración.

En particular en cáncer mamario, existe basta evidencia que relaciona la EMT con la vía de señalización NF- κ B. El grupo de Wirth (Huber y cols., 2004) demostró que la inhibición de NF- κ B impidió la EMT en células epiteliales transformadas con un oncogen, que la activación de esta vía promovió la transición a un fenotipo mesenquimal y que al inhibir esta vía de señalización en células mesenquimales, se produce su reversión (Huber y cols., 2004). Se determinó que al inhibir esta vía de señalización se provoca una regulación a la baja de diversos marcadores de la EMT, entre los que se encuentran SLUG, SIP1, TWIST1, MMP11 y N-Cadherina y una regulación al alza de E-Cadherina (Pires y cols., 2017) (Felipe Lima y cols., 2016). También, se estudió la sobreexpresión de p65 de la vía NF- κ B en células normales de epitelio mamario, MCF-10a, las cuales al ser transformadas experimentaron EMT, proceso que ocurre a través de los reguladores transcripcionales ZEB1 y ZEB2, represores de la E-Cadherina (Chua y cols., 2007) (Shostak y Chariot, 2011).

Por otro lado, los resultados de puntos anteriores apuntan que la principal citoquina secretada por las células HL-60N es IL-8, la que además se

sobreproduce en las células tumorales mamarias en contacto con dichas células. Estudios recientes han demostrado que IL-8 favorece la EMT en las células tumorales, características de troncalidad y resistencia a tratamientos (David y cols., 2016), en particular en cáncer mamario (L. Wang y cols., 2015). Además luego de ser activado este programa de diferenciación mesenquimal, se genera la señalización autocrina de TGF- β , IL-6, VEGF e IL-8, que corresponden a factores inductores de la EMT, de manera que la señal se perpetua y es capaz de activar a las células de sus alrededores (David J M y cols., 2016).

La identificación de IL-8 como factor que promueve la EMT y procesos de migración y metástasis, puede ser útil para generar tratamientos que inhiban dichas vías de señalización (Browning y cols., 2000) (Waugh y Wilson, 2008). Sin embargo, debido a la promiscuidad de sus receptores CXCR1 y 2 (Browning y cols., 2000), se ha demostrado que el uso de ARN interferentes y de bloqueadores específicos contra la citoquina no son eficaces en la reducción de los fenómenos observados, ya que no amortiguan el efecto de otras citoquinas que también son capaces de activar su eje de señalización. Por esta razón se recomienda la inhibición de los receptores para obtener los efectos deseados (Waugh y Wilson, 2008).

8.6. Neutrófilos endógenos de pez cebra favorecen la migración celular de las células tumorales mamarias MDA-MB231, pero no de las células MCF-7

Finalmente, se estudió la interacción Neutrófilo/Célula tumoral en un modelo *in vivo*. Para ello se realizaron xenotrasplantes en pez cebra, con las células tumorales anteriormente ensayadas. En primer lugar, hubo que corroborar la correcta implantación de las células tumorales en la zona vitelina, y su migración, la que fue medida en la zona de la cola del pez, un territorio alejado al de la implantación.

Se inyectaron en la zona vitelina alrededor de 300 células por individuo y se observó el tumor primario y la diseminación de las células tumorales por los siguientes 3 días post-inyección. Ambas líneas celulares, MCF-7 y MDA-MB231, se lograron establecer en la zona del vitelo y migrar hacia la cola, cuyo número de células diseminadas fue aumentando a medida que avanzaron los días (Figuras 14 y 15), a diferencia de lo ocurrido con las células control, la línea celular no tumorigénica HEK293. Estas células no fueron detectadas en la zona de la cola (Figura 13), y además fueron disminuyendo en número en la zona vitelina a medida que avanzaron los días. Las diferencias obtenidas entre ambas líneas celulares tumorales, MCF-7 y MDA-MB231, eran esperables, conforme a sus capacidades migratorias e invasivas reportadas con anterioridad y su tejido de origen.

Para realizar este estudio, un buen candidato de línea celular control hubiera sido una línea celular mamaria no tumorigénica, como la línea MCF-10A, comúnmente utilizada en estudios de xenotrasplante de células tumorales mamarias. Sin embargo, ya que la línea HEK293 ha sido utilizada previamente como célula control para este tipo de experimentos (Varas y cols., 2020) (Zhao y cols., 2011), la consideramos un buen control para medir la migración de las células tumorales.

Debido que el cáncer mamario es principalmente de origen epitelial y uno de los procesos que en mayor medida favorece la migración a otros tejidos es la EMT (Y. Wang y Zhou, 2011), se validaron ambas líneas celulares para el estudio de EMT en el modelo de xenotrasplante en pez cebra.

Luego, para estudiar la interacción entre las células tumorales humanas y los neutrófilos endógenos de pez cebra, se recurrió a una estrategia que permite disminuir la cantidad de neutrófilos. Se realizó un *knockdown* contra *gcsfr* utilizando un Morfolino que se ha reportado previamente que genera neutropenia (Liongue y cols., 2009). *Gcsfr* es el receptor de la citoquina *gcsf*, factor estimulante de colonias granulocíticas, esta citoquina está involucrada en la proliferación y es esencial para la diferenciación del progenitor mieloide que conduce al desarrollo y maduración de neutrófilos (Pankaj Dwivedi y Greis, 2016) (Roberts, 2005). Como se esperaba, se comprobó una disminución de la cantidad de neutrófilos endógenos en los peces cebra morfantes para este factor, al compararlo con los morfantes control.

Por último, se realizaron los xenotrasplantes de las líneas MCF-7 y MDA-MB231 en los peces inyectados con el Morfolino contra *gcsfr* (Figura 17 y 18). Y se obtuvo que en los peces morfantes xenotrasplantados con las células MDA-MB231 hubo una disminución de la migración de dichas células en el área de la cola, reducción que fue significativa en el día 3 post inyección. Sin embargo, estos resultados no se replicaron en las células MCF-7.

De estos resultados se concluye que la presencia de neutrófilos endógenos favorece la migración de las células MDA-MB231, por lo que entre ambos tipos celulares debe existir algún tipo de interacción que favorece dicha diseminación.

8.7. MDA-MB231 células triple negativo y su interacción con los neutrófilos

Los tipos celulares MCF-7 y MDA-MB231 presentan diferencias que pueden explicar sus comportamientos frente los neutrófilos. Si bien, ambas líneas corresponden a carcinomas ductales invasivos, provienen de distintos tejidos y estados de progresión tumoral, MCF-7 corresponde a un tumor primario, mientras que MDA-MB231 proviene de un sitio metastásico.

MCF-7 presenta receptores de estrógeno (ER+), siendo un excelente modelo de un cáncer en etapas tempranas y posible de tratar sin quimioterapia,

sólo con inhibidores de estrógeno como el tamoxifeno, a diferencia de las células MDA-MB231 que no presentan receptores de estrógeno (ER-), de progesterona (PR-) ni del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-) (Huang y cols., 2020) por lo que son llamados Triple negativos (TN), y representan un mejor modelo de un cáncer candidato para la quimioterapia (Flodrova y cols., 2016).

Las diferencias que brindan la presencia de los receptores hormonales entre los distintos tipos de tumores han sido de mucha utilidad para el diagnóstico clínico y tratamiento del cáncer (Harbeck y cols., 2019), no obstante, su relación con los TANs está recientemente comenzando a estudiarse. Un estudio del grupo de Gamboa-Dominguez, realizó una búsqueda de la presencia de TANs en tumores mamarios de distintas naturalezas, concluyendo que en los cánceres mamarios TN son más abundantes los neutrófilos asociados a tumor. En particular, la ausencia de la expresión de HR fue un fuerte predictor de positividad de TANs (Soto-Perez-de-Celis y cols., 2017).

Las células que componen tumores mamarios TN son grandes productores de TGF- β (Soto-Perez-de-Celis y cols., 2017), citoquina responsable de la polarización de los neutrófilos hacia un fenotipo N2 (Sionov y cols., 2015). Se determinó que el medio condicionado por células mamarias TN contenía grandes cantidades de citoquinas CXCL1/2/3 y TGF- β , en comparación con medio condicionado por células ER+ y que al inhibir dichos factores, se reducía la migración de neutrófilos y su atracción hacia el tumor (SenGupta y cols., 2021).

Si bien, la evidencia que relaciona los TANs y tumores TN es poca y reciente, es concordante con los resultados obtenidos en esta tesis, en donde queda en evidencia como la interacción entre ambos tipos celulares favorece la migración celular. La presencia de TANs en los tumores triples negativos los podría proveer de factores pro-angiogénicos y proteasas que favorecen la creación de nuevos vasos sanguíneos y el escape de las células tumorales por la degradación de la matriz extracelular (Y. Wang y cols., 2019), facilitando su migración y metástasis.

El reclutamiento de los neutrófilos hacia el tumor no fue estudiado durante esta tesis, sin embargo, el modelo de pez cebra nos ofrecería una buena alternativa para ello, utilizando la línea transgénica que marca neutrófilos (mpo:GFP - expresión de GFP bajo el promotor de la mieloperoxidasa), se podría realizar el seguimiento de estas células al sitio de inyección y la comprobación de la atracción de los neutrófilos por las células MDA-MB231 hacia las cercanías del tumor.

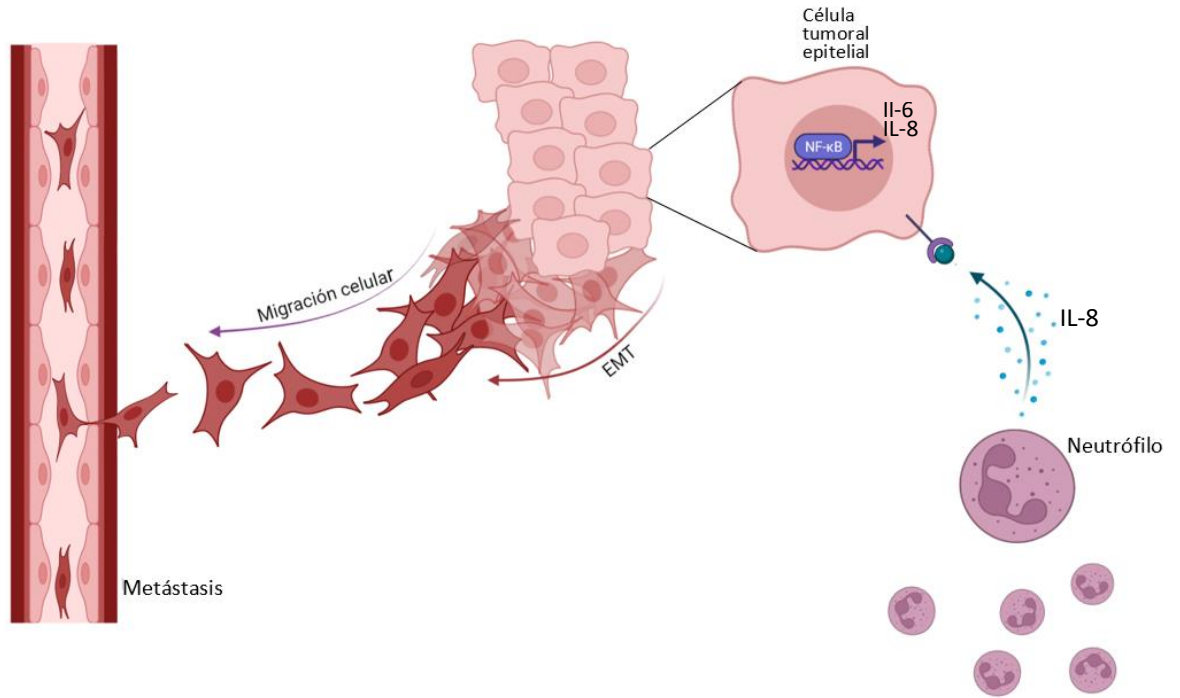


Figura 20: Modelo propuesto. Los neutrófilos son atraídos al microambiente tumoral por quimioquinas secretadas por las células tumorales, los neutrófilos secretan IL-8 que activa la vía de señalización NF-κB en las células tumorales lo que provoca su EMT y migración celular, procesos claves para la metástasis.

9. CONCLUSION

Mediante los ensayos *in vitro*, determinamos que las células HL-60N promueven características malignas en las células tumorales mamarias tales como aumento de la expresión de factores inflamatorios que corresponden a genes blanco de la vía NF- κ B, cambio de expresión de factores característicos de un fenotipo mesenquimal: disminución de E-Cadherina y un aumento en las propiedades migratorias.

Al inhibir en las células tumorales la vía NF- κ B mediante un ARN pequeño de interferencia contra P65, el aumento en la migración mediado por las células HL-60N dejó de observarse. Esto nos permite corroborar que estas células activan esta vía de señalización en las células tumorales y que esta activación genera su EMT, característica clave para la metástasis.

Además, al medir la secreción de proteínas de las células HL-60N, para encontrar un posible factor activador de la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias, obtuvimos que la citoquina IL-8 es la señal candidata activadora más fuerte. IL-8 además de activar la vía NF- κ B, se ha visto relacionado a inflamación crónica y a un aumento de la EMT en las células tumorales. Por lo que la identificación de este factor puede ser útil para generar tratamientos que inhiban dichas vías de señalización (Browning y cols., 2000) (Waugh y Wilson, 2008).

Por otro lado, en los ensayos *in vivo* se determinó que los neutrófilos endógenos de pez cebra favorecen la migración de las células tumorales

mamarias MDA-MB231 (células TN) y no de las células MCF-7 (células ER+). Este resultado es concordante con la literatura que confirma que existe reclutamiento de los neutrófilos hacia tumores TN mediante la secreción de citoquinas CXCL1-3 y TGF- β (SenGupta y cols., 2021), por lo que dichos tumores tienen una mayor cantidad de TANs que los tumores ER+ como las células MCF-7 (Soto-Perez-de-Celis y cols., 2017) y, por lo tanto, la interacción y promoción de características malignas en los tumores TN es mayor.

Las diferencias obtenidas entre los resultados *in vitro* e *in vivo*, se explican debido que en los experimentos de cultivo celular ambos componentes estuvieron en contacto directo obligado, mientras que en los experimentos en pez cebra, debió existir un reclutamiento de los neutrófilos hacia el vitelo provocado por las células MDA-MB231, mientras que esto, posiblemente, no ocurre en las células MCF-7.

Finalmente, a partir de este trabajo se concluye que los neutrófilos son atraídos hacia el microambiente tumoral en donde secretan IL-8, citoquina que activa la vía NF- κ B en las células tumorales mamarias. Esto provoca la expresión de factores inflamatorios y la reducción de E-Cadherina, estimulando una transición hacia un fenotipo mesenquimal caracterizado por un aumento en la migración celular, característica clave para la metástasis.

10. REFERENCIAS

- Alcaide Lucena, M., Rodríguez González, C., de Reyes Lartategui, S., Gallart Aragón, R., Sánchez Barrón, M., García Rubio, J., & Torné Poyatos, P. (2021). Molecular classification of breast cancer. Treatment and prognosis implications. *Cirugía Andaluza*, 32(2), 155–159. <https://doi.org/10.37351/2021322.9>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling 2020* 18:1, 18(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12964-020-0530-4>
- Bielenberg, D. R., & Zetter, B. R. (2015). The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer Journal (United States)*, 21(4), 267–273. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000138>
- Blanter, M., Gouwy, M., & Struyf, S. (2021). Studying neutrophil function in vitro: Cell models and environmental factors. En *Journal of Inflammation Research* (Vol. 14, pp. 141–162). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/JIR.S284941>
- Browning, D. D., Diehl, W. C., Hsu, M. H., Schraufstatter, I. U., & Ye, R. D. (2000). Autocrine regulation of interleukin-8 production in human monocytes. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6 23-6). <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.l1129>
- Carrigan, S. O., Wepler, A. L., Issekutz, A. C., & Stadnyk, A. W. (2005). Neutrophil differentiated HL-60 cells model Mac-1 (CD11b/CD18)-independent neutrophil transepithelial migration. *Immunology*, 115(1), 108–117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02131.x>
- Chua, H. L., Bhat-Nakshatri, P., Clare, S. E., Morimiya, A., Badve, S., & Nakshatri, H. (2007). NF-κB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: Potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*, 26(5), 711–724. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209808>
- Chung, C. H., Parker, J. S., Ely, K., Carter, J., Yi, Y., Murphy, B. A., Ang, K. K., El-Naggar, A. K., Zanation, A. M., Cmelak, A. J., Levy, S., Slebos, R. J., & Yarbrough, W. G. (2006). Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-κB Signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 66(16), 8210–8218. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1213>
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic

- instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073–1081.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
- Creighton, C. J., Chang, J. C., & Rosen, J. M. (2010). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), 253–260.
<https://doi.org/10.1007/s10911-010-9173-1>
- D'ignazio, L., & Rocha, S. (2016). Hypoxia induced NF-kB. *Cells*, 5(1).
<https://doi.org/10.3390/cells5010010>
- David, J. M., Dominguez, C., Hamilton, D. H., & Palena, C. (2016). The IL-8/IL-8R axis: A double agent in tumor immune resistance. *Vaccines*, 4(3).
<https://doi.org/10.3390/vaccines4030022>
- Demkow, U. (2021). Neutrophil extracellular traps (Nets) in cancer metastasis. *Cancers*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/cancers13236131>
- Dougan, M., & Dranoff, G. (2009). The immune response to tumors. *Current Protocols in Immunology*, SUPPL. 85, 1–4.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im2011s85>
- Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M. D., Zimonjic, D. B., Donaher, J. L., Popescu, N. C., Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2001). *Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells*. <https://doi.org/10.1101/gad.828901>
- Elzamy, S., Badri, N., Padilla, O., Dwivedi, A. K., Alvarado, L. A., Hamilton, M., Diab, N., Rock, C., Elfar, A., Teleb, M., Sanchez, L., & Nahleh, Z. (2018). Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Breast Cancer and Pathological Response after Neoadjuvant Chemotherapy. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 12.
<https://doi.org/10.1177/1178223418788074>
- Faget, J., Groeneveld, S., Boivin, G., Sankar, M., Zangger, N., Garcia, M., Guex, N., Zlobec, I., Steiner, L., Piersigilli, A., Xenarios, I., & Meylan, E. (2017). Neutrophils and Snail Orchestrate the Establishment of a Pro-tumor Microenvironment in Lung Cancer. *Cell Reports*, 21(11), 3190–3204.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.052>
- Fedele, M., Cerchia, L., & Chiappetta, G. (2017). The epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: Focus on basal-like carcinomas. En *Cancers* (Vol. 9, Número 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers9100134>
- Feitsma, H., & Cuppen, E. (2008). Zebrafish as a cancer model. En *Molecular Cancer Research* (Vol. 6, Número 5, pp. 685–694). American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2167>
- Felipe Lima, J., Nofech-Mozes, S., Bayani, J., & Bartlett, J. (2016). EMT in Breast Carcinoma—A Review. *Journal of Clinical Medicine*, 5(7), 65.
<https://doi.org/10.3390/jcm5070065>
- Flodrova, D., Toporova, L., MacEjova, D., Lastovickova, M., Brtko, J., & Bobalova, J. (2016). A comparative study of protein patterns of human estrogen receptor positive (MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. *General Physiology and Biophysics*, 35(3), 387–392.
https://doi.org/10.4149/gpb_2016009

- Freisinger, C. M., & Huttenlocher, A. (2014). Live imaging and gene expression analysis in zebrafish identifies a link between neutrophils and epithelial to mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 9(11), 15–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112183>
- Fridlender, Z. G., & Albelda, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: Friend or foe? *Carcinogenesis*, 33(5), 949–955. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs123>
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183–194. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.06.017>
- Garg, M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World Journal of Stem Cells*, 5(4), 188. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v5.i4.188>
- Gheldof, A., & Berx, G. (2013). Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. En *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 116). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5>
- Grégoire, M., Guilloton, F., Pangault, C., Mourcin, F., Sok, P., Latour, M., Amé-Thomas, P., Flecher, E., Fest, T., & Tarte, K. (2015). Neutrophils trigger a NF-KB dependent polarization of tumorsupportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget*, 6(18), 16471–16487. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4106>
- Grieshaber-Bouyer, R., Radtke, F. A., Cunin, P., Stifano, G., Levescot, A., Vijaykumar, B., Nelson-Maney, N., Blaustein, R. B., Monach, P. A., Nigrovic, P. A., Aguilar, O., Allan, R., Astarita, J., Austen, K. F., Barrett, N., Baysoy, A., Benoist, C., Brown, B. D., Buechler, M., ... Yoshida, H. (2021). The neutrotime transcriptional signature defines a single continuum of neutrophils across biological compartments. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22973-9>
- Große-Steffen, T., Giese, T., Giese, N., Longerich, T., Schirmacher, P., Hänsch, G. M., & Gaida, M. M. (2012). Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic tumor cell lines: The role of neutrophils and neutrophil-derived elastase. En *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2012). Clin Dev Immunol. <https://doi.org/10.1155/2012/720768>
- Gupta, D., Shah, H. P., Malu, K., Berliner, N., & Gaines, P. (2014). Differentiation and characterization of myeloid cells. *Current Protocols in Immunology*, 104(SUPPL.104). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im22f05s104>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. En *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Número 1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K.,

- Willbanks, A., & Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0048-3>
- Hooshmand, S., Ghaderi, A., Yusoff, K., Karrupiah, T., Rosli, R., & Mojtahedi, Z. (2013). Downregulation of RhoGDI α increased migration and invasion of ER + MCF7 and ER- MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Adhesion and Migration*, 7(3), 297–303. <https://doi.org/10.4161/cam.24204>
- Hu, D., Li, Z., Zheng, B., Lin, X., Pan, Y., Gong, P., Zhuo, W., Hu, Y., Chen, C., Chen, L., Zhou, J., & Wang, L. (2022). *Cancer-associated fibroblasts in breast cancer: Challenges and opportunities*. <https://doi.org/10.1002/cac2.12291>
- Huang, Z., Yu, P., & Tang, J. (2020). Characterization of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell spheroid model. *OncoTargets and Therapy*, 13, 5395–5405. <https://doi.org/10.2147/OTT.S249756>
- Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., & Wirth, T. (2004). NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 569–581. <https://doi.org/10.1172/JCI200421358>
- Iwahori, K. (2020). Cytotoxic CD8+ Lymphocytes in the Tumor Microenvironment. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1224, pp. 53–62). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35723-8_4
- Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A., & Levine, H. (2017). EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Molecular Oncology*, 11(7), 755–769. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12083>
- Kajiume, T., & Kobayashi, M. (2018). Human granulocytes undergo cell death via autophagy. *Cell Death Discovery*, 4(1), 111. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0131-9>
- Kallens, V., Tobar, N., Molina, J., Bidegain, A., Smith, P. C., Porras, O., & Martínez, J. (2017). Glucose Promotes a Pro-Oxidant and Pro-Inflammatory Stromal Microenvironment Which Favors Motile Properties in Breast Tumor Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(5), 994–1002. <https://doi.org/10.1002/jcb.25650>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Lichtman, A. H., Abbas, A. K., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular* (E. CASTELLANO (ed.); 8^o Edición).
- Lin, C. Y., Lin, W. Y., Yeh, S., Li, L., & Chang, C. (2015). Infiltrating neutrophils increase bladder cancer cell invasion via modulation of androgen receptor (AR)/MMP13 signals. *Oncotarget*, 6(40), 43081–43089. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5638>

- Lin, Y., & Wang, X. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? 1. *Acta Pharmacol Sin*, 29(11), 1275–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00889.x>
- Liongue, C., Hall, C. J., O'connell, B. A., Crosier, P., & Ward, A. C. (2009). *Zebrafish granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling promotes myelopoiesis and myeloid cell migration*. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171967>
- Liu, C. Y., Lin, H. H., Tang, M. J., & Wang, Y. K. (2015). Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), 15966–15983. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3862>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Nature Publishing Group*, 2. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- MA, G., LE, H., & A, H. (2019). Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*, 133(20), 2159–2167. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-11-844548>
- Ma, Y., Ren, Y., Dai, Z. J., Wu, C. J., Ji, Y. H., & Xu, J. (2017). IL-6, IL-8 and TNF-α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(3), 421–426. <https://doi.org/10.17219/acem/62120>
- Maier, H. J., Schmidt-Straßburger, U., Huber, M. A., Wiedemann, E. M., Beug, H., & Wirth, T. (2010). NF-κB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Letters*, 295(2), 214–228. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.03.003>
- Manna, S. K., & Ramesh, G. T. (2005). Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-κB through a TRAF6-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 7010–7021. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410994200>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. En *Nature* (Vol. 454, Número 7203, pp. 436–444). <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Masucci, M. T., Minopoli, M., & Carriero, M. V. (2019). Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. En *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, p. 1146). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01146>
- Mayer, C., Darb-Esfahani, S., Meyer, A. S., Hübner, K., Rom, J., Sohn, C., Braicu, I., Sehoul, J., Hänsch, G. M., & Gaida, M. M. (2016). Neutrophil granulocytes in ovarian cancer - induction of epithelial-to-mesenchymal-transition and tumor cell migration. *Journal of Cancer*, 7(5), 546–554. <https://doi.org/10.7150/jca.14169>
- Mbeunkui, F., & Johann, D. J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: A review of an essential relationship. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(4), 571–582. <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0881-9>
- Medeiros, N. I., & Gomes, J. A. S. (2019). Cytometric bead array (CBA) for measuring cytokine levels in chagas disease patients. *Methods in Molecular*

- Biology*, 1955, 309–314. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_23
- Medici, D., Hay, E. D., & Olsen, B. R. (2008). Snail and slug promote epithelial-mesenchymal transition through β -catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor- β 3. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), 4875–4887. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-05-0506>
- Min, C., Eddy, S. F., Sherr, D. H., & Sonenshein, G. E. (2008). NF- κ B and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(3), 733–744. <https://doi.org/10.1002/jcb.21695>
- Monjazeb, A. M., Zamora, A. E., Grossenbacher, S. K., Mirsoian, A., Sckisel, G. D., & Murphy, W. J. (2013). Immunoediting and antigen loss: Overcoming the Achilles heel of immunotherapy with antigen non-specific therapies. *Frontiers in Oncology*, 3 JUL. <https://doi.org/10.3389/FONC.2013.00197/ABSTRACT>
- Ohms, M., Möller, S., & Laskay, T. (2020). An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00532>
- Pankaj Dwivedi, & Greis, K. D. (2016). Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor (G-CSFR) signaling in severe congenital neutropenia, chronic neutrophilic leukemia and related malignancies. *Experimental Hematology*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/doi:10.1016/j.exphem.2016.10.008>
- Pantuck, A. J., An, J., Liu, H., & Rettig, M. B. (2010). NF- κ B-dependent plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by Von Hippel-Lindau inactivation in renal cell carcinomas. *Cancer Research*, 70(2), 752–761. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2211>
- Pickup, M., Novitskiy, S., & Moses, H. L. (2013). *The roles of TGF β in the tumour microenvironment*. <https://doi.org/10.1038/nrc3603>
- Pires, B. R. B., Mencialha, A. L., Ferreira, G. M., De Souza, W. F., Morgado-Díaz, J. A., Maia, A. M., Corrêa, S., & Abdelhay, E. S. F. W. (2017). NF-kappaB is involved in the regulation of EMT genes in breast cancer cells. *PLoS ONE*, 12(1), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169622>
- Powell, D. R., & Huttenlocher, A. (2016). Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, 37(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.11.008>
- Qin, Y., Zhao, D., Zhou, H. G., Wang, X. H., Zhong, W. L., Chen, S., Gu, W. G., Wang, W., Zhang, C. H., Liu, Y. R., Liu, H. J., Zhang, Q., Guo, Y. Q., Sun, T., & Yang, C. (2016). Apigenin inhibits NF- κ B and Snail signaling, EMT and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(27), 41421–41431. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9404>
- Ren, J., Liu, S., Cui, C., & Ten Dijke, P. (2017a). Invasive behavior of human breast cancer cells in embryonic zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(122), 1–9. <https://doi.org/10.3791/55459>
- Ren, J., Liu, S., Cui, C., & Ten Dijke, P. (2017b). Invasive Behavior of Human Breast Cancer Cells in Embryonic Zebrafish. *J. Vis. Exp*, 122, 55459. <https://doi.org/10.3791/55459>
- Ribatti, D. (2021). Tumor microenvironment. *Tumor Microenvironment*

- Regulation of Tumor Expansion*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822803-6.00008-9>
- Ritchie, H., Spooner, F., & Roser, M. (2018). *Causes of death*. <https://ourworldindata.org/causes-of-death>
- Roberts, A. W. (2005). G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, 23(1), 33–41. <https://doi.org/10.1080/08977190500055836>
- Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 294, 23–29. <https://doi.org/10.1385/1-59259-860-9:023>
- Salemme, V., Centonze, G., Cavallo, F., Defilippi, P., Conti, L., Albini, A., Ferrone, S., Bruno, A., & Lollini, P.-L. (2021). *The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy*. 11, 1. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.610303>
- Santamaria, P. G., Moreno-Bueno, G., Portillo, F., & Cano, A. (2017). EMT: Present and future in clinical oncology. *Molecular Oncology*, 11(7), 718–738. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12091>
- Savci-Heijink, C. D., Halfwerk, H., J Hooijer, G. K., Koster, J., Horlings, H. M., Meijer, S. L., van de Vijver, M. J., & Meijer slmeijer, S. L. (2019). Epithelial-to-mesenchymal transition status of primary breast carcinomas and its correlation with metastatic behavior. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174, 649–659. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05089-5>
- SenGupta, S., Hein, L. E., Xu, Y., Zhang, J., Konwerski, J. R., Li, Y., Johnson, C., Cai, D., Smith, J. L., & Parent, C. A. (2021). Triple-Negative Breast Cancer Cells Recruit Neutrophils by Secreting TGF- β and CXCR2 Ligands. *Frontiers in Immunology*, 12(April), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.659996>
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2013). On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical reviews in oncogenesis*, 18(1–2), 43. [/pmc/articles/PMC3597235/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597235/)
- Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2017). Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(2), 343–349. <https://doi.org/10.1189/jlb.5mr1216-508r>
- Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(10), 601–620. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0222-4>
- Shea, E. K. H., Koh, V. C. Y., & Tan, P. H. (2020). Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathology International*, 70(5), 242–252. <https://doi.org/10.1111/pin.12910>
- Shin, S. R., Sánchez-Velaz, N., Sherr, D. H., & Sonenshein, G. E. (2006). 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene treatment of a c-rel mouse mammary tumor cell line induces epithelial to mesenchymal transition via activation of nuclear factor- κ B. *Cancer Research*, 66(5), 2570–2575. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3056>
- Shostak, K., & Chariot, A. (2011). NF- κ B, stem cells and breast cancer: The

- links get stronger. *Breast Cancer Research*, 13(4), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/BCR2886/FIGURES/2>
- Sionov, R. V., Fridlender, Z. G., & Granot, Z. (2015). The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 8(3), 125–158. <https://doi.org/10.1007/s12307-014-0147-5>
- Song, W., Yeh, C. R., He, D., Wang, Y., Xie, H., Pang, S. T., Chang, L. S. S., Li, L., & Yeh, S. (2015). Infiltrating neutrophils promote renal cell carcinoma progression via VEGFa/HIF2 α and estrogen receptor β signals. *Oncotarget*, 6(22), 19290–19304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4478>
- Soto-Perez-de-Celis, E., Chavarri-Guerra, Y., Leon-Rodriguez, E., & Gamboa-Dominguez, A. (2017). Tumor-associated neutrophils in breast cancer subtypes. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(10), 2689–2693. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.10.2689>
- Tang, D. E., Tao, D. E., Fang, Y. E., Deng, C. E., Xu AFG, Q., Zhou Corresponding Author, J., & Zhou, J. (2017). *TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma IN VITRO STUDIES*. 23, 141–149.
<https://doi.org/10.12659/MSMBR.903910>
- Tania, M., Khan, M. A., & Fu, J. (2014). Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumor Biology*, 35(8), 7335–7342. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2163-y>
- Tazzyman, S., Lewis, C. E., & Murdoch, C. (2009). Neutrophils: Key mediators of tumour angiogenesis. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 222–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00641.x>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of immunology research*.
<https://doi.org/10.1155/2015/983698>
- Varas, M. A., Muñoz-Montecinos, C., Kallens, V., Simon, V., Allende, M. L., Marcoleta, A. E., & Lagos, R. (2020). Exploiting Zebrafish Xenografts for Testing the in vivo Antitumorigenic Activity of Microcin E492 Against Human Colorectal Cancer Cells. *Frontiers in Microbiology*, 11, 405.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00405>
- Wang, L., Tang, C., Cao, H., Li, K., Pang, X., Zhong, L., Dang, W., Tang, H., Huang, Y., Wei, L., Su, M., & Chen, T. (2015). Activation of IL-8 via PI3K/AKT-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 16(8), 1220–1230.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1056409>
- Wang, W., Nag, S., & Zhang, R. (2014). Targeting the NF- κ B Signaling Pathways for Breast Cancer Prevention and Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 22(2), 264–289.
<https://doi.org/10.2174/0929867321666141106124315>
- Wang, Y., Chen, J., Yang, L., Li, J., Wu, W., Huang, M., Lin, L., & Su, S. (2019). Tumor-contacted neutrophils promote metastasis by a CD90-TIMP-1

- juxtacrine–paracrine loop. *Clinical Cancer Research*, 25(6), 1957–1969. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2544>
- Wang, Y., & Zhou, B. P. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chinese Journal of Cancer*, 30(9), 603–611. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10226>
- Waugh, D. J. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. En *Clinical Cancer Research* (Vol. 14, Número 21, pp. 6735–6741). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
- Wu, S., Du, Y., Beckford, J., & Alachkar, H. (2018). Upregulation of the EMT marker vimentin is associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1539-y>
- Wu, Y., & Zhou, B. P. (2010). TNF- α ;NF- κ B;Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, 102, 639–644. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605530>
- Xie, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, H., Wang, J., & Hu, Z. (2009). Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF- κ B in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(4), 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.009>
- Yang, D., & Liu, J. (2021). Neutrophil Extracellular Traps: A New Player in Cancer Metastasis and Therapeutic Target. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02013-6>
- Yaseen, R., Blodkamp, S., Lüthje, P., Reuner, F., Völlger, L., Naim, H. Y., & Von Köckritz-Blickwede, M. (2017). Antimicrobial activity of HL-60 cells compared to primary blood-derived neutrophils against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Negative Results in Biomedicine*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12952-017-0067-2>
- Ye, H., Zhou, Q., Zheng, S., Li, G., Lin, Q., Wei, L., Fu, Z., Zhang, B., Liu, Y., Li, Z., & Chen, R. (2018). Tumor-associated macrophages promote progression and the Warburg effect via CCL18/NF- κ B/VCAM-1 pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death and Disease*, 9(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0486-0>
- Zhang, Q., Helfand, B. T., Jang, T. L., Zhu, L. J., Chen, L., Yang, X. J., Kozlowski, J., Smith, N., Kundu, S. D., Yang, G., Raji, A. A., Javonovic, B., Pins, M., Lindholm, P., Guo, Y., Catalona, W. J., & Lee, C. (2009). Nuclear factor- κ B-mediated transforming growth factor- β -induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clinical Cancer Research*, 15(10), 3557–3567. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1656>
- Zhang, W., Gu, J., Chen, J., Zhang, P., Ji, R., Qian, H., Xu, W., & Zhang, X. (2017). Interaction with neutrophils promotes gastric cancer cell migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Reports*, 38(5), 2959–2966. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5942>
- Zhao, C., Wang, X., Zhao, Y., Li, Z., Lin, S., Wei, Y., & Yang, H. (2011). A novel

xenograft model in zebrafish for high-resolution investigating dynamics of neovascularization in tumors. *PLoS ONE*, 6(7), 21768.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021768>

Zhou, J., Zheng, S., Liu, T., Liu, Q., Chen, Y., Tan, D., Ma, R., & Lu, X. (2018). IL-1 β from M2 macrophages promotes migration and invasion of ESCC cells enhancing epithelial-mesenchymal transition and activating NF- κ B signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(8), 7040–7052. <https://doi.org/10.1002/jcb.26918>

Zhu, G. J., Song, P. P., Zhou, H., Shen, X. H., Wang, J. G., Ma, X. F., Gu, Y. J., Liu, D. D., Feng, A. N., Qian, X. Y., & Gao, X. (2018). Role of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin, β -catenin and ZEB2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 15(3), 3472–3481. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7751>