



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas y Centro de
Química-Instituto de Ciencias

Posgrado en Ciencias Químicas

“Papel de la secreción de MIF mediada por autofagia en la progresión tumoral”

Tesis que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Químicas
en el área de Bioquímica y Biología Molecular

PRESENTA

M. C. Israel Cotzomi Ortega

DIRECCIÓN DE TESIS

D. C. Paola Maycotte González

D. C. Patricia Aguilar Alonso

Abril 2021

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el apoyo de las becas otorgadas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 461456 y del IMSS No. 97220054. Así como de los fondos otorgados por CONACYT: CB 258123, CONACYT infraestructura 2019 300379 y del IMSS: FIS/IMSS/PRI0/15/049.



Dedicatoria

A mi familia, Dana, Sahara y Ernesto. Por su enorme cariño y consejos, siempre han hecho de mi una mejor persona.

A mis papás, Irma y Alberto. Siempre presentes en mi formación.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Arely, Alin, Guadalupe, Benito, Adrian, Johari, Andy, Adi, Dalia y Óscar. Gracias por su consejos y ayuda profesional y personal.

Mi especial reconocimiento y admiración a la Dra. Paola Maycotte y Dra. Miriam Rodríguez. De grande quiero ser como ustedes.

Un póstumo y sincero agradecimiento a la Dra. Patricia Aguilar. Me dejó valiosas lecciones.

Agradezco a mi comité académico, Dra. Rosana Pelayo, Dra. Nora Hilda Rosas, Dr. Gerardo Santos y Dr. Eduardo Brambila. Me han aconsejado, corregido y enriquecido en el presente trabajo.

Agradezco al Dr. Julio Reyes, por su ayuda en los apoyos que me fueron otorgados.

Resumen

El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por tumores en la población femenina. Debido a que se ha propuesto a la autofagia como un mecanismo de supervivencia en las células tumorales, actualmente existen estudios de inhibidores de autofagia en diversos tipos de cáncer. Al respecto, en cáncer de mama se ha reportado que el subtipo triple negativo (CMTN), es el más sensible a la inhibición de la autofagia. Recientemente, la autofagia se ha involucrado en la regulación de la secreción de diversas proteínas, específicamente, se ha observado que la inhibición de la autofagia promueve la secreción de citocinas proinflamatorias en distintos tipos celulares. En el presente trabajo, demostramos por primera vez, que la inhibición farmacológica y genética de la autofagia en las células de CMTN induce la secreción del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), una citocina protumorigénica. Este incremento en la secreción de MIF es dependiente de un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) inducida por la inhibición de la autofagia, que a su vez se relaciona con un incremento en la expresión de MIF, probablemente debido a la activación de factores de transcripción relacionados con las ERO. Además, el incremento en la secreción de MIF mediado por la inhibición de la autofagia promovió la supervivencia de las células que lo secretan e incrementó la migración de las células de cáncer de mama de manera paracrina. Al respecto, se encontraron mayores niveles de los receptores de MIF, CD74, CXCR2 y CXCR7 en líneas celulares tumorales, al compararlas con células no tumorigénicas, sugiriendo un papel importante de MIF en la señalización de las células de cáncer de mama. De manera importante, un análisis de la expresión de MIF en muestras de pacientes con cáncer de mama mostró que los subtipos asociados a una mayor proliferación son los que presentaron mayores niveles de expresión de MIF sugiriendo un papel importante de MIF en esta característica de malignidad. Finalmente, la secreción de MIF en las células de CMTN mediada por la inhibición de la autofagia provocó la polarización de macrófagos hacia el tipo M1, demostrando un papel importante de la secreción de MIF en la promoción de un microambiente inflamatorio. En conclusión, en este trabajo se demostró un papel importante de la secreción de MIF mediado por la inhibición de la autofagia en la promoción de la malignidad tanto de manera autocrina como señalizando a células vecinas. Nuestros datos sugieren que se debería evaluar el uso de una terapia de inhibición de autofagia en conjunto con algún inmunomodulador como el inhibidor de MIF como potencial blanco terapéutico en CMTN.

Abstract

Breast cancer is the main cause of cancer-related mortality in the female population. Since autophagy has been proposed as a survival pathway for cancer cells, autophagy inhibition is being investigated in various types of cancer. In this regard, triple negative breast cancer (TNBC) has been reported as the most sensitive breast cancer subtype to autophagy inhibition. Recently, autophagy has also been involved in the regulation of the secretion of several proteins, specifically, inhibition of autophagy promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines in different cell types. In this work, we showed for the first time that in TNBC cells, the pharmacological and genetic inhibition of autophagy induced the secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF), a pro-inflammatory cytokine with pro-tumorigenic functions. MIF secretion was dependent on an increase in reactive oxygen species (ROS) induced by the inhibition of autophagy, which was related to an increase in MIF expression probably due to the activation of transcription factors activated by ROS. Furthermore, MIF secretion mediated by the inhibition of autophagy promoted the survival of the cells autocrinally and increased the migration of breast cancer cells paracrinally. In this regard, higher levels of MIF receptors CD74, CXCR2 and CXCR7 were found in TNBC cell lines when compared with non-tumorigenic epithelial cells, suggesting an important role for MIF in cancer cell signaling. Importantly, MIF expression analysis of samples from breast cancer patients showed that the breast cancer subtypes associated with increased proliferation are those with the highest levels of MIF expression. Finally, the secretion of MIF from TNBC cells mediated by the inhibition of autophagy contributed to M1 macrophage polarization, indicating an important role for the secretion of MIF in the promotion of an inflammatory microenvironment. In conclusion, in this work an important role for the secretion of MIF mediated by the inhibition of autophagy and its role on the promotion of malignancy was demonstrated. Our results suggest that autophagy inhibition along an immunomodulator such as a MIF inhibitor should be evaluated as a potential therapeutic target for TNBC.

Índice

Resumen	4
Abstract.....	5
Índice.....	6
Abreviaturas.....	8
Lista de figuras.....	9
Introducción	10
<i>Cáncer de mama</i>	<i>10</i>
<i>Autofagia.....</i>	<i>11</i>
<i>Mecanismo celular de la autofagia.....</i>	<i>12</i>
<i>Papel de la autofagia en cáncer.....</i>	<i>14</i>
<i>Secreción mediada por la autofagia.....</i>	<i>16</i>
<i>Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).....</i>	<i>18</i>
<i>Papel de MIF en cáncer</i>	<i>21</i>
<i>Papel de MIF en la regulación del sistema inmune</i>	<i>23</i>
<i>Papel de la familia D-dopacromo tautomerasa de MIF en cáncer.....</i>	<i>24</i>
<i>Modelo de cáncer de mama triple negativo con diferente capacidad metastásica</i>	<i>25</i>
Justificación.....	26
Hipótesis	26
Objetivos	26
<i>Objetivo general.....</i>	<i>26</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>26</i>
Metodología	27
<i>Reactivos</i>	<i>27</i>
<i>Cultivo celular.....</i>	<i>27</i>
<i>Animales.....</i>	<i>28</i>
<i>Western Blot.....</i>	<i>28</i>

<i>Inhibición de la autofagia y muerte celular</i>	29
<i>Transducción viral de cultivos celulares</i>	29
<i>Cuantificación de la secreción de MIF</i>	30
<i>Cuantificación de la secreción de citocinas proinflamatorias</i>	31
<i>Cuantificación de ERO</i>	31
<i>Análisis del promotor de MIF</i>	31
<i>Análisis de la expresión de MIF en pacientes con cáncer de mama</i>	32
<i>Obtención de ARN y análisis por RT-PCR tiempo real</i>	32
<i>Migración celular</i>	33
<i>Niveles de los receptores de MIF</i>	33
<i>Análisis de la polarización de macrófagos</i>	34
<i>Análisis estadístico</i>	35
Resultados	35
<i>Las células de CMTN con diferente capacidad metastásica presentan diferentes niveles de sensibilidad a la cloroquina que se relaciona con su autofagia basal</i>	35
<i>La inhibición de la autofagia induce la secreción de MIF en las líneas celulares de CMTN</i>	38
<i>La inhibición de la autofagia induce la secreción de MCP1 e IL-6 en la línea celular 66cl4</i>	40
<i>La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia es mediada por las ERO</i>	41
<i>Los subtipos de cáncer de mama más proliferativos presentan mayor expresión de MIF</i>	43
<i>La inhibición de la autofagia induce la secreción y expresión de MIF mediada por las especies reactivas de oxígeno</i>	45
<i>La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia media la supervivencia celular</i>	47
<i>La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia induce la migración en las células de CMTN</i> ...	48
<i>Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo expresan los receptores para MIF a niveles más elevados que un control de células epiteliales</i>	49
<i>La secreción de MIF mediada por la inhibición de la autofagia en las células de cáncer de mama triple negativo induce la polarización de los macrófagos hacia el tipo M1</i>	53
Discusión	55
Conclusiones	65
Referencias	66

Abreviaturas

3MA, 3 metil adenina
ABC, transportadores de casete de unión a ATP
Acb1, proteína de unión a acil coenzima A
AMP, adenosina monofosfato
AMPc, adenosina monofosfato cíclico
AMPK, proteína cinasa activada por AMP
ATCC, colección de cultivos tipo americano
ATG, proteína relacionada a autofagia
ATP, adenosina trifosfato
CXCR, receptor de quimiocinas CXC
DMEM, medio Eagle modificado de Dulbecco
ADN, ácido desoxirribonucleico
ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
h, hora
HER2, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2
IFN- γ , interferon-gamma
IL, interleucina
LC3, proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
LPS, lipopolisacárido
MAPK, proteína cinasa activada por mitógenos
MCP-1, proteína monocítica quimioatrayente 1
MHC, complejo mayor de histocompatibilidad
min, minutos
ml, mililitro
mM, milimolar
MMTV, virus del tumor mamario de ratón
mTOR, blanco de rapamicina en mamíferos
NLRP3, dominio de pirina de la familia NLR
PARP, poli ADP ribosa polimerasa
PBS, amortiguador de fosfatos salino
PE, fosfatidiletanolamina
PI3K, fosfatidilinositol 3-cinasa
PI3P, fosfatidilinositol 3-fosfato
PMA, forbol-12-miristato-13-acetato
PyMT, antígeno T medio de poliomavirus
SQSTM1, sequestosoma 1
STAT, transductor de señal y activador de transcripción
STX17, syntaxina 17
TNF, factor de necrosis tumoral
ULK 1/2, cinasa similar a UNC-51
 μ g, microgramo
WT, del inglés wild type - tipo silvestre-

Lista de figuras

Figura 1. Esquema general del proceso de autofagia y algunos de sus reguladores.....	13
Figura 2. Papel dual de la autofagia en la progresión tumoral.	15
Figura 3. Propuesta de la secreción de proteínas relacionado a la autofagia.....	17
Figura 4. Mecanismo de acción de MIF mediado por sus receptores.....	21
Figura 5. Las líneas celulares de cáncer de mama con distinta capacidad mestastásica presentan diferentes niveles de autofagia basal relacionado a la sensibilidad de su inhibición.	37
Figura 6. La inhibición de la autofagia induce la secreción de MIF en líneas celulares de cáncer de mama.....	39
Figura 7. La inhibición de la autofagia con CQ induce la secreción de MCP1 e IL-6 en la línea celular 66cl4.....	41
Figura 8. La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia fue mediada por la producción de las ERO y cambios en los niveles de la proteína p115.....	43
Figura 9. La cantidad relativa de MIF es mayor en los subtipos más proliferativos de cáncer de mama.....	44
Figura 10. La inhibición genética de la autofagia induce la expresión de MIF mediada por las ERO.	46
Figura 11. La inhibición de la autofagia incrementó la secreción de MIF, que promueve la sobrevida de manera autocrina.....	48
Figura 12. La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia incrementó la migración de las células de cáncer de mama de manera paracrina.	51
Figura 13. Las células de CMTN tienen los más altos niveles de receptores para MIF. ...	52
Figura 14. Efecto del medio condicionado (MC) de las células 66cl4 en vías de señalización activadas por MIF.....	53
Figura 15. El MIF secretado por la inhibición de la autofagia en las células de CMTN promueve la polarización de los macrófagos hacia el tipo M1.	54
Figura 16. Papel de MIF en la progresión tumoral de cáncer de mama.	66

Introducción

Cáncer de mama

En México y en el mundo, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en morbilidad y mortalidad por tumores malignos en la población femenina ^{1,2}. Para su estudio y tratamiento, se ha clasificado en tres grupos histopatológicos: 1) positivos a receptores de estrógeno y progesterona, 2) positivos al receptor HER2 y 3) triple negativo, el cual no presenta ninguno de los receptores antes mencionados ³. Actualmente, la terapia endócrina que incluye inhibidores de la aromatasa o tamoxifeno se utiliza en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama positivo a receptores hormonales ⁴. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor HER2, como el trastuzumab o el pertuzumab, se emplean en cáncer de mama positivo a este receptor ⁴. Y a pesar de que el cáncer de mama triple negativo (CMTN) representa una baja proporción de los tumores de cáncer de mama (20%), y responde al tratamiento con quimioterapia y radioterapia, son los que presentan mayor recurrencia y agresividad ^{5,6}, y no cuentan con una terapia dirigida.

Aunque, existen numerosos estudios que se están llevando a cabo para encontrar tratamientos específicos para este subtipo de cáncer de mama, los más prometedores involucran inhibidores de mecanismos involucrados en la reparación del ADN (inhibidores de PARP) ⁷, antagonistas del receptor de andrógenos ^{7,8}, inmunoterapias dirigidas contra receptores de evasión de la respuesta inmune, como antagonistas de PD-L1 ⁹, inhibidores de los sitios activos $\beta 5$ y $\beta 2$ del proteasoma ^{10,11} e inhibidores de autofagia ^{12,13}.

Con respecto a este último, se ha observado que las células de CMTN son más sensibles a la inhibición de la autofagia que los otros subtipos de la enfermedad ¹³, provocando una disminución en su proliferación y un aumento en la muerte celular ¹³. Además, en estudios *in vivo* utilizando cloroquina (CQ) como neoadyuvante, se encontró una disminución en el establecimiento metastásico por las células de CMTN ¹⁴. Los trabajos anteriores sugieren que los estudios clínicos donde utilizan CQ o hidroxiclороquina (HCQ) junto con quimioterapia para el tratamiento de cáncer de mama ¹⁵ probablemente tendrán resultados prometedores en particular para pacientes con CMTN.

Autofagia

La macroautofagia (referida en adelante como autofagia) es un proceso celular que implica la formación de estructuras de doble membrana denominadas autofagosomas^{16,17}, las cuales llevan en su interior material celular como proteínas u organelos dañados que se van a degradar mediante la unión del autofagosoma con el lisosoma, denominado autolisosoma¹⁸, los productos de esta degradación son reciclados como nutrientes¹⁹.

La autofagia ocurre en todas las células del organismo, pudiendo ser inducida por condiciones bajas de nutrientes o estrés celular, lo que le da una función importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, así como en la supervivencia ante diversos tipos de estrés²⁰. Debido a su importancia, la autofagia se ha relacionado con procesos fisiológicos como el ejercicio y el envejecimiento; y alteraciones en la autofagia se ha relacionado a eventos patológicos como la neurodegeneración, enfermedades pulmonares, cardiovasculares y cáncer²⁰⁻²².

La importancia de la autofagia en el desarrollo del organismo quedó demostrada en ratones deficientes en ATG5, la cual es una proteína importante para la formación de autofagosomas. Estos ratones mueren a las pocas horas de nacer, aún en condiciones adecuadas de alimentación²³. En un trabajo posterior, se demostró que, si se les restablece la expresión de *Atg5* en el sistema nervioso central, se evita la letalidad en estos ratones²⁴, lo que demostró una función importante de la autofagia en el desarrollo neuronal.

En cuanto a ratones adultos, se observó que la eliminación condicional de *Atg7* en el organismo completo produce anomalías benignas en el hígado, alargamiento esplénico, degeneración testicular, disminución del tejido adiposo, disminución del número de neuronas piramidales y células de Purkinje, degeneración del tejido muscular y acumulación de lípidos en pulmón y riñones²⁵. Estos ratones mueren debido a una mayor susceptibilidad a infecciones o debido a neurodegeneración, además de que son incapaces de sobrevivir a la privación de nutrientes²⁵.

Estos trabajos demuestran la importancia de la autofagia en el mantenimiento celular, su papel determinante en el adecuado desarrollo neuronal y en el mantenimiento de la supervivencia de las células y del organismo.

Mecanismo celular de la autofagia

El proceso de autofagia se ha dividido en una serie de pasos denominados iniciación, nucleación, expansión, fusión y degradación. Todos éstos regulados por proteínas denominadas ATG ¹⁷. La etapa de iniciación está regulada por el complejo de la cinasa ULK1/2 formado por ULK1/2, ATG13, FIP200 y ATG101. Este complejo puede ser activado por una fosforilación mediada por la actividad de AMPK, que a su vez puede ser activada por AMP, lo que permite una activación de la autofagia durante niveles bajos de energía (relación de AMP/ATP) ²⁶ e inhibida por fosforilación inactivante por el complejo mTOR, sensor intracelular de aminoácidos que a su vez puede ser inhibido por rapamicina, un inductor de la autofagia ²⁷. Una vez que se ha activado el complejo ULK1/2, el cual se localiza cerca del retículo endoplásmico, comienza la etapa de nucleación, en ésta, ULK1/2 fosforila a las proteínas del complejo de nucleación PI3K clase III activándolas y produciendo PI3P en el sitio de la formación del autofagosoma ²⁶. La producción de PI3P sirve para la unión de otras proteínas ATG importantes para la formación del autofagosoma durante la etapa de elongación (Figura 1).

Al respecto, se han caracterizado dos principales sistemas de conjugación indispensables para la expansión del autofagosoma: ATG5-ATG12 y LC3-PE, los cuales involucran sistemas proteicos similares a los sistemas de ubiquitinación siendo ATG12 y LC3 proteínas similares a la ubiquitina ^{17,28,29}. De esta manera, el corte proteolítico de LC3 por ATG4, su activación por ATG7 y su posterior conjugación a PE por ATG3, da lugar a la proteína LC3II, la cual es importante para la unión de proteínas adaptadoras como p62/SQSTM1, NBR1, NDP52, OPTN, TAX1BP1 o NIX que llevan moléculas cargo al autofagosoma para su degradación mediante sus dominios de interacción a LC3 ³⁰. Cabe mencionar que LC3II se encuentra tanto en la membrana interna como externa del autofagosoma y su localización en estructuras punteadas o su cuantificación mediante *Western Blot* pueden utilizarse para evaluar la formación de los autofagosomas ³¹. La ausencia de alguna de las proteínas ATG compromete la formación del autofagosoma y el silenciamiento genético de las mismas puede ser utilizado para inhibir este proceso ³².

Una vez que se ha formado el autofagosoma, este se puede unir al lisosoma dando lugar a una estructura denominada autolisosoma para la degradación de su contenido. En este punto, se pueden utilizar inhibidores farmacológicos que impiden la fusión y degradación de los

autofagosomas como la cloroquina (CQ). Este es un fármaco lisosomotrófico que evita la acidificación del lisosoma bloqueando la última etapa de la autofagia, evitando la degradación de los autofagosomas e induciendo su acumulación ³³.

Por otro lado, los autofagosomas se pueden unir a otros organelos o la membrana citoplasmática para la secreción de su contenido ³⁴ como se verá más adelante. Aunque el mecanismo por el que los autofagosomas se fusionan con diferentes membranas no se conoce completamente, se propone la participación de proteínas adaptadoras específicas presentes en la membrana externa del autofagosoma para unirse a su sitio blanco ³⁵. Por ejemplo, se sabe que la proteína SNARE, STX17, es importante para que el autofagosoma se pueda unir con el lisosoma y se efectúe la degradación de su contenido para su posterior reciclaje ³⁶.

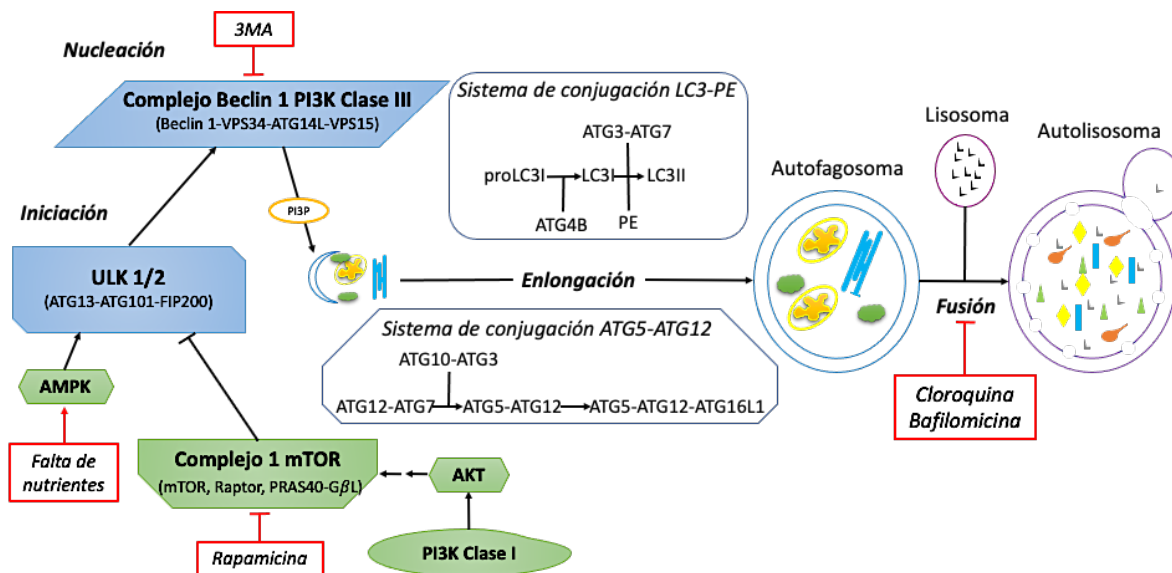


Figura 1. Esquema general del proceso de autofagia y algunos de sus reguladores.

El complejo proteico ULK 1/2 es el que regula la iniciación de la autofagia. Este complejo está a su vez regulado positivamente por la actividad de AMPK, la cual se activa por una alta relación AMP/ATP y negativamente por el complejo mTOR, que se activa por la presencia de aminoácidos o la vía de señalización de PI3K/AKT. La activación de ULK 1/2 fosforila al complejo de nucleación PI3K clase III dando inicio a la formación del autofagosoma. Posteriormente, el proceso de elongación es llevado a cabo por dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina, los que ayudan a la formación de la membrana del autofagosoma. Finalmente, el autofagosoma se une al lisosoma para llevar a cabo la etapa de degradación. La autofagia puede ser inhibida mediante cloroquina, rapamicina, bafilomicina, 3MA, entre otros. Modificado de Cotzomi-Ortega I. et al. 2018.

Papel de la autofagia en cáncer

En diversos estudios se indica que la autofagia tiene efectos dependientes de la etapa del proceso tumoral ^{37,38}. De tal manera que al ser un mecanismo que puede eliminar proteínas protumorigénicas como p62/SQSTM1 ³⁹ o mitocondrias dañadas, manteniendo niveles bajos de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células normales, se propone que la autofagia tiene un papel antitumorigénico ⁴⁰. Además, la autofagia puede promover un estado de senescencia en las células que presentan inestabilidad genómica, impidiendo su proliferación ⁴¹.

Otros estudios donde se ha demostrado el papel antitumoral de la autofagia involucran alteraciones de genes *Atg*. En un análisis de tejidos tumorales de pacientes con cáncer de mama se detectó una pérdida de heterocigocidad en el cromosoma 17q21 en el 41.1% de los cánceres de mama ⁴², que es donde se encuentra el gen *beclin 1* relacionado a tumores espontáneos ⁴³. En los ratones heterocigotos de este mismo gen se observó una mayor incidencia de tumores espontáneos en el pulmón, hígado y en el sistema linfático ⁴⁴.

Interesantemente, en un modelo tumoral por el virus de hepatitis B en los ratones sin expresión de *beclin 1* se observó un mayor desarrollo de lesiones pre-malignas en el hígado, caracterizado por displasias ⁴⁴. En otro estudio de silenciamiento de genes *Atg* en organismo completo como la eliminación sistémica en mosaico de *Atg5* en ratones provocó el desarrollo de tumores benignos en hígado debido a la acumulación de mitocondrias dañadas y daño genómico ⁴⁵.

Lo anterior indica que la presencia de la autofagia inhibe la aparición de células tumorales, y se propone que es el daño en el ADN, la inestabilidad genómica y la acumulación de proteínas oncogénicas que en condiciones normales deberían ser degradadas en el autolisosoma, los promotores de la tumorigénesis.

Interesantemente, en modelos de ratones donde existen mutaciones oncogénicas preestablecidas, como en un modelo de adenocarcinoma ductal pancreático con expresión de la proteína oncogénica KRAS, la inhibición de la autofagia produce lesiones intraepiteliales pancreáticas pre-malignas las cuales no avanzan hacia neoplasias intraepiteliales pancreáticas ⁴⁶. También, el silenciamiento de genes *Atg* en tejidos específicos, como la inactivación de *Atg5* en un modelo de cáncer de pulmón ⁴⁷ o la eliminación condicional de *Atg7* en un modelo de adenocarcinoma ductal pancreático ⁴⁶ evitó la progresión tumoral, dependiente de la proteína p53, ya que la supresión de p53 reinicia la progresión tumoral ^{46,47}. Esto indica que las células

con una transformación oncogénica, la autofagia tiene una función protumoral ^{39,48}. Al respecto, las células tumorales necesitan a la autofagia para poder sobrevivir en diversas condiciones adversas, como el estrés oxidativo ⁴⁹, la hipoxia ⁵⁰, la privación de nutrientes ⁵¹, la anoikis ⁵², el estrés al que se enfrentan durante la migración y la metástasis ⁵³ y para sobrevivir a la terapia ⁵⁴ (Figura 2).

Lo anterior ha originado que diversos estudios clínicos exploren la inhibición de este proceso como blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer ^{12,15}. Por ejemplo, se sabe que las células tumorales modificadas en la vía de RAS/MAPK son más susceptibles a la inhibición de la autofagia, aún en presencia de nutrientes ^{53,55}, como se ha observado en cáncer de pulmón ⁵⁶, páncreas ⁵⁷, cerebro ⁵⁸ o melanoma ⁵⁹. En cuanto al cáncer de mama, se ha demostrado que el subtipo triple negativo es el más sensible a la inhibición de la autofagia ¹³, sugiriendo que, en este subtipo de cáncer de mama, la inhibición de la autofagia podría ser un potencial blanco terapéutico.

En conclusión, el papel dual de la autofagia depende de la etapa tumoral y de los modelos tumorales estudiados, debido a que en una célula normal, la disminución o ausencia de la autofagia puede producir daño celular que derivaría en un evento oncogénico ^{44, 45} y por otro lado, en las células tumorales, la autofagia es necesaria para la progresión tumoral ^{46, 47}.

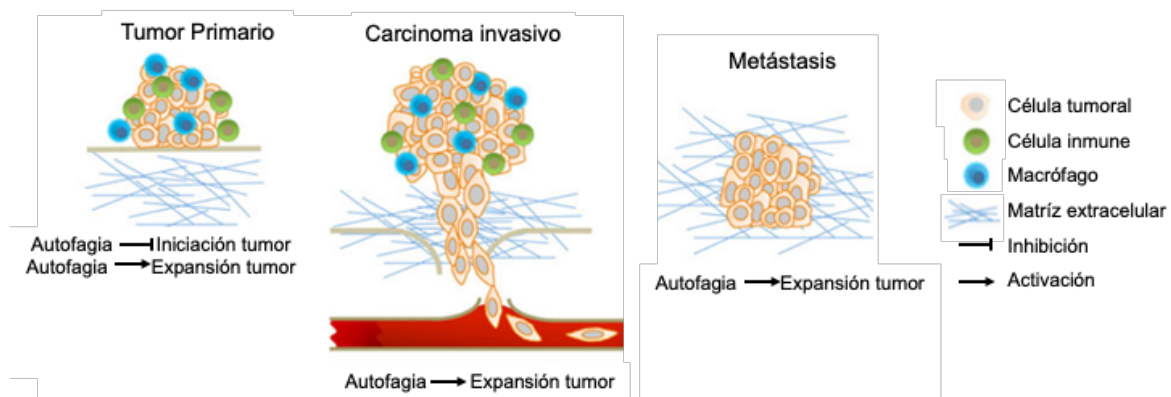


Figura 2. Papel dual de la autofagia en la progresión tumoral.

El mecanismo de la autofagia ayuda a prevenir la aparición de las células tumorales. Sin embargo, cuando la célula tumoral ya está presente, se ha visto un papel importante de la autofagia en el crecimiento tumoral, migración, invasión, resistencia a la terapia, y metástasis. Modificado de Debnath J. 2011.

Secreción mediada por la autofagia

La secreción de proteínas denominada clásica o convencional, involucra la síntesis de proteínas con secuencia de localización al retículo endoplásmico rugoso, donde la mayoría de las proteínas mientras son sintetizadas son transportadas al interior de este organelo. Posteriormente pasan al aparato de Golgi, donde sufren modificaciones post-transduccionales y finalmente son dirigidas hacia el espacio extracelular a través de vesículas o gránulos secretorios ⁶⁰. Sin embargo, existen proteínas secretadas que no tienen secuencia de localización para el retículo endoplásmico por lo que se secretan por una vía de secreción no convencional ⁶¹.

En este sentido, existen diversos reportes que proponen que el proceso de autofagia estaría implicado en la secreción de diversas proteínas, ya que la secreción de éstas se inhibe al silenciar proteínas ATG (revisado en ³⁴). Por ejemplo, en ratones sin expresión de *Atg5*, se ha observado una disminución en la secreción de lisozima en las células de Paneth, la cual se observó dentro de los autofagosomas cercanos a la cara apical de la membrana plasmática ⁶². Por otro lado, se ha observado que los autofagosomas se pueden unir al cuerpo multivesicular y posteriormente a la membrana plasmática, mediado por las proteínas relacionadas al tráfico vesicular Sec22b, Rab8A y Rab27A ⁶³, promoviendo la secreción de citocinas como la IL-1 β ⁶⁴. También, se ha reportado que esta citocina puede ser secretada por la unión directa de los autofagosomas a la membrana plasmática mediante las proteínas Sec22b, SNAP23/29 y STX3/4 ³⁶.

Otro mecanismo de secreción no convencional que involucra la inhibición de la autofagia es la acumulación de organelos dañados como mitocondrias e incremento de las ERO mitocondriales en el citoplasma ⁴⁹, un evento importante para la activación del inflamasoma y la consecuente maduración de citocinas proinflamatorias de la familia de la IL-1 como IL-1 β o IL-18 ^{65,66} (Figura 3). De igual manera, se ha reportado que las ERO son importantes para la secreción del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) inducido por la inhibición de la autofagia ⁶⁷, como quedó demostrado en los macrófagos activados con LPS ⁶⁷, aunque se desconoce el mecanismo por el cual las ERO producen un incremento de la secreción de MIF.

En resumen, el mecanismo de autofagia puede participar directamente en la secreción de diversas proteínas o, por el contrario, su inhibición puede también promover la maduración y secreción de algunas citocinas, dependiendo del contexto celular y la proteína que se vaya a secretar.

Cabe mencionar que recientemente se ha observado que la proteína LC3 localizada en la periferia de la membrana de los cuerpos multivesiculares es importante para la formación de vesículas extracelulares ⁶⁸. Este proceso es dependiente de una maquinaria de conjugación específica para la LC3 para cargar mayoritariamente proteínas de unión a el ARN en vesículas extracelulares para su posterior secreción, siendo un ruta principal de secreción no convencional dependiente de LC3 ⁶⁸. Este es un ejemplo en el cual algunos componentes de la maquinaria del proceso de autofagia, como la proteína LC3, son importantes para la secreción no convencional, independiente de autofagia.

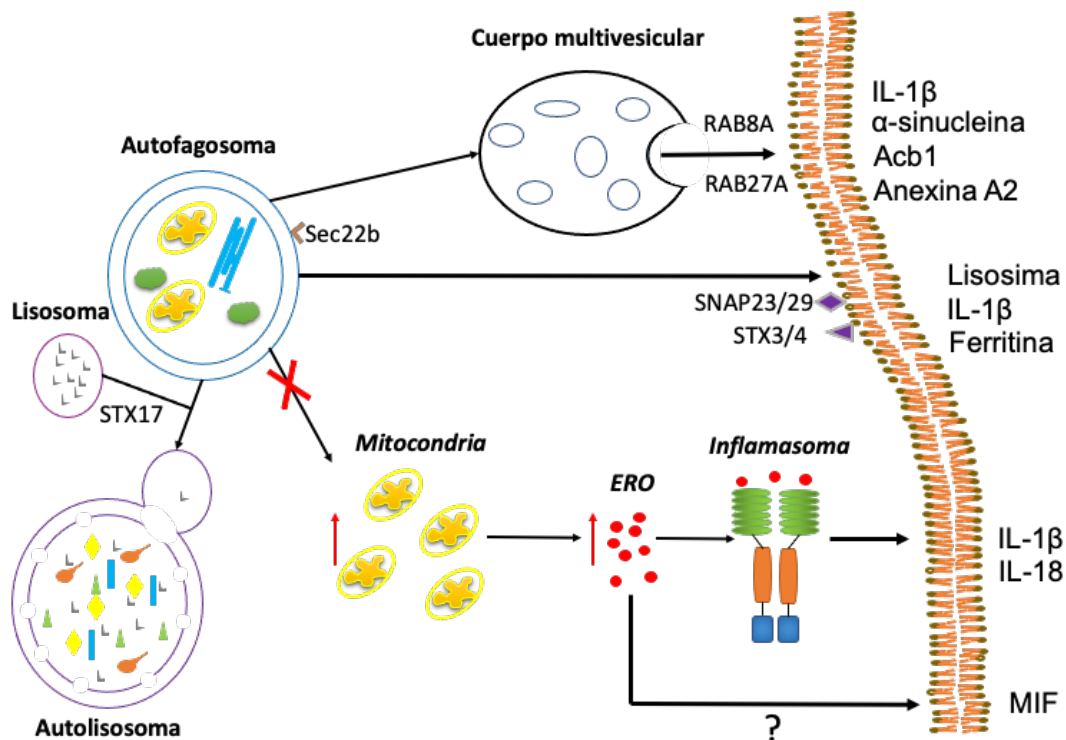


Figura 3. Propuesta de la secreción de proteínas relacionado a la autofagia.

Se han descrito tres posibles mecanismos de secreción mediada por la autofagia, una está relacionada a la unión directa del autofagosoma con la membrana plasmática y está mediada por las proteínas Sec22b presentes en los autofagosomas y las proteínas SNAP23/29 y STX 3/4 presentes en la membrana plasmática. También se ha observado que los autofagosomas se pueden unir al sistema del cuerpo multivesicular y posteriormente, a la membrana plasmática, mediado por las proteínas Sec22b, Rab8A y Rab27A. Por otro lado, la inhibición de la autofagia incrementa los niveles de las ERO los cuales pueden activar el inflammasoma e inducir la activación y secreción de citocinas pro-inflamatorias o del MIF. Modificado de Cotzomi-Ortega I. et al. 2018.

La importancia de la secreción de proteínas mediada por la autofagia en procesos tumorales ⁶⁹ ha quedado demostrada en un modelo de cáncer de mama modificado en RAS, donde la

autofagia fue necesaria para la secreción de la IL-6, así como de las metaloproteinasas de matriz extracelular 2 y 9 ⁵³, proteínas involucradas en la inflamación, en la degradación de la matriz extracelular y por tanto, en la invasión celular.

También se ha observado que la inhibición de la autofagia en las células de cáncer de mama mediante el silenciamiento de proteínas ATG disminuye la secreción de la IL-6 en las células dependientes de autofagia, pero incrementa la secreción de esta citocina en las células independientes de autofagia ⁷⁰. Lo anterior indica que la secreción mediada por autofagia depende del contexto y tipo celular, por lo menos para la IL-6.

También se ha reportado un papel importante para la secreción de citocinas mediada por la inhibición de la autofagia para la activación de células del sistema inmune ⁷¹. En este sentido, en un modelo de cáncer de mama de ratón, la inhibición de la autofagia por medio de un knockout condicional de la proteína FIP200 incremento la secreción de quimiocinas como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 ⁷¹, provocando un retardo del crecimiento tumoral debido a una disminución en la proliferación de las células tumorales ⁷¹. También se observó una reducción en la metástasis asociada a una inducción de células antitumorales, como la infiltración de las células T CD8⁺. Estos datos muestran el papel protumoral de la autofagia y su inhibición incrementó la secreción de quimiocinas que ayudan a reclutar células del sistema inmune antitumoral. Por lo que la inhibición de la autofagia podría ser un buen blanco terapéutico en cáncer de mama.

Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

MIF fue descubierto como un factor derivado de las células T capaz de inhibir la migración aleatoria de los macrófagos *in vitro* ⁷², posteriormente se demostró que esta citocina regula la activación de los macrófagos y la proliferación de las células T. Además de contra restar los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides, lo que le confiere una actividad proinflamatoria ⁷³ y recientemente se ha asociado a la progresión de diversos tumores ⁷⁴.

Se expresa en diversos tipos celulares como las células epiteliales, hematopoyéticas, endoteliales y mesenquimales ⁷⁵. En el citoplasma, es almacenada en vesículas para ser secretada por una vía no convencional que involucra a la proteína p115 asociada con Golgi ⁷⁶ y a los transportadores tipo ABC ⁷⁷.

Además, MIF es una citocina pleiotrópica que se ha relacionado a enfermedades inflamatorias crónicas o agudas, como el choque séptico, artritis reumatoide, aterosclerosis y el lupus eritematoso sistémico ⁷⁸, asociada a un incremento en suero, fluido sinovial y cerebrospinal, debido a diversos polimorfismos en el gen de *MIF* que inducen una mayor expresión de esta citocina provocando una mayor susceptibilidad a las distintas enfermedades inflamatorias (revisado en ⁷⁸).

En cuanto al mecanismo de acción de MIF se sabe que funciona como homotrímero actuando de manera autocrina o paracrina, tanto como citocina y quimiocina, y además de presentar actividad enzimática de tautomerasa ⁷⁹. Extracelularmente, MIF actúa a través de la unión con su receptor específico CD74 (cadena invariante del complejo mayor de histocompatibilidad clase II) con una K_D de 9 nM ⁸⁰, que posteriormente recluta a la proteína coactivadora CD44 ⁸¹, induciendo la activación de PI3K/AKT o bien la de ERK, estimulando la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis, la síntesis de citocinas proinflamatorias y promoviendo la migración celular ⁸².

Con respecto a este receptor de MIF, se ha reportado que CD74 presenta una mayor expresión en las células tumorales de CMTN en comparación con los otros subtipos de esta enfermedad ⁸³. MIF también puede inducir quimiotaxis a través de los receptores no específicos CXCR2, CXCR4 y CXCR7 ⁸⁴, con una K_D de 1.5, 19.8 y 5 nM respectivamente ^{75,82}. En comparación a la K_D del ligando endógeno de CXCR2, CXCL8 de 0.7 nM y para CXCR4 y CXCR7, CXCL12 de 1.5 y 1 nM, respectivamente ⁸⁴. Aunque MIF no es el ligando específico de estos receptores, puede promover la migración celular de los leucocitos, los fibroblastos y las células tumorales ⁷⁴.

Otra característica importante de estos receptores es que pueden actuar en conjunto con el CD74 en respuesta a la unión de MIF ⁸², lo que crea diversos complejos proteicos como CD74/CXCR2 y CD74/CXCR4 los cuales pueden promover la activación de vías relacionadas a proteínas G y la estimulación de vías de ERK, PI3K y PLC- β . Por su parte, los complejos CD74/CXCR7 y CD74/CXCR4/CXCR7 pueden activar a la proteína β -arrestina-2 que promueve la migración y la proliferación celular ⁸².

Estos complejos proteicos producen una mayor variabilidad de los efectos de MIF, esto depende del tipo celular. Interesantemente, en el CMTN, se ha reportado que el CXCL12, ligando de CXCR7, incrementa la migración de las células de CMTN y la ausencia de el CXCR7 en las

células tumorales disminuye el crecimiento tumoral y la metástasis, debido a una disminución en la proliferación, la migración y la formación de vasos sanguíneos ⁸⁵. A pesar de que en este estudio no se demostró el papel de MIF en la activación del receptor CXCR7, si se pudo observar la importancia del receptor CXCR7 en la progresión tumoral.

En cuanto a la actividad enzimática de MIF, tiene homología con tres enzimas bacterianas, la oxalocrotonato tautomerasa, la 5 carboximetil-2-hidroxiuconato isomerasa y la corismato mutasa ⁸⁸ presentando actividad de D-dopacromo tautomerasa (DDT), fenilpiruvato tautomerasa y de tiol-proteína oxidoreductasa ^{86,87}.

Aunque el sustrato fisiológico para su actividad enzimática se desconoce ⁸⁹, se ha demostrado que la hormona tiroidea tiroxina puede inhibir el sitio enzimático de MIF, lo que permite la modulación fisiológica de su actividad proinflamatoria y sus efectos severos en un proceso de sepsis ⁹⁰.

Por otro lado, también se han descrito efectos intracelulares de MIF mediante la unión a la proteína JAB1, un coactivador de la transcripción de AP-1, el cual promueve la degradación del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p27 e induce la proliferación celular ^{91,92}. De importancia para el cáncer, también se ha descrito que MIF puede inhibir la acumulación de p53, evitando la detención del ciclo celular, apoptosis o senescencia mediada por ésta, además de regular a la baja su actividad transcripcional ⁹³. No obstante, los tumores de CMTN presentan una alta frecuencia de mutaciones en *TP53*, lo que produce ausencia en la actividad de p53 ⁹⁴. Por lo tanto, el efecto protumoral de MIF probablemente sea independiente de la inhibición de p53 en el CMTN.

No menos relevante es su actividad de oxido-reductasa similar a la de la familia de las tiorredoxinas ⁹⁵, lo que le proporciona una actividad redox que ha demostrado ser importante para la reducción de proteínas como la insulina, así como en la activación de macrófagos ⁹⁵. Aunque el mecanismo se desconoce, se ha reportado que MIF inhibe a p53 mediada por la ciclooxigenasa 2, importante para inhibir la apoptosis de los macrófagos durante su activación ⁹⁶.

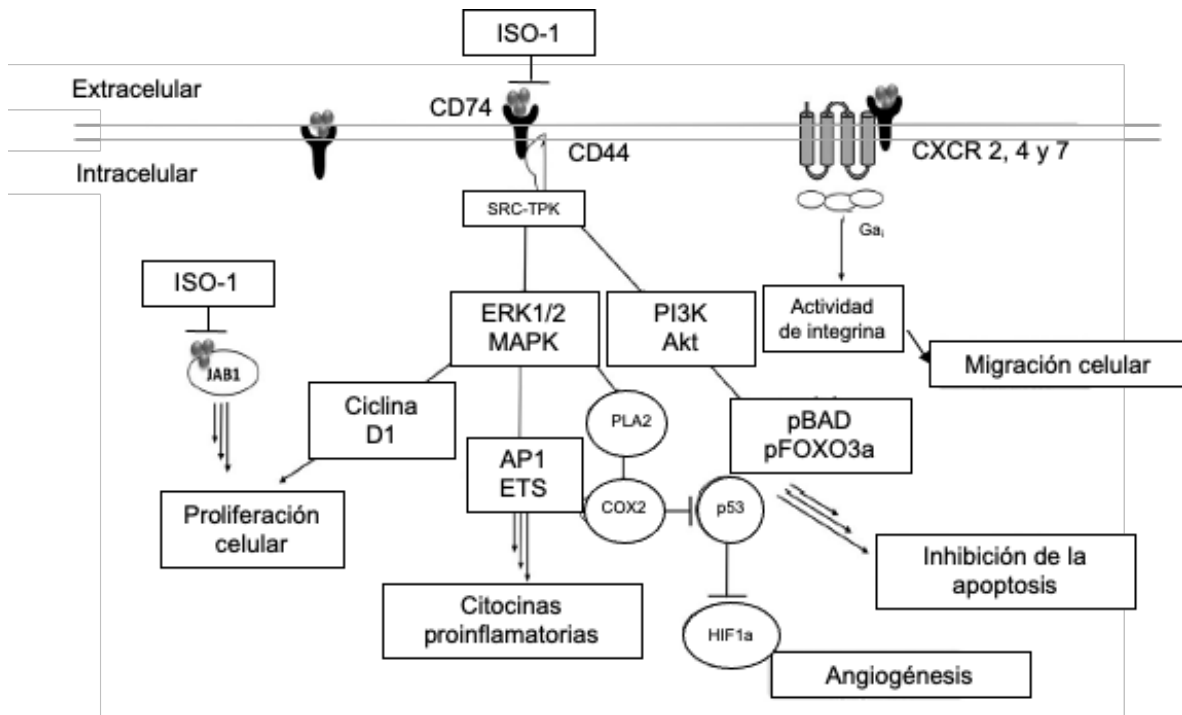


Figura 4. Mecanismo de acción de MIF mediado por sus receptores.

MIF es una citocina que actúa a través de su receptor específico CD74/CD44, promueve la proliferación celular, la producción de citocinas proinflamatorias, la angiogénesis e inhibición de la apoptosis. También puede actuar como quimiocina por la unión a los receptores CXCR2, CXCR4 y CXCR7, y promueve la migración celular. Intracelularmente, puede unirse a proteínas como JAB1. Los efectos anteriores pueden inhibirse con ISO-1, el cual es un inhibidor competitivo de MIF, que actúa intra y extracelularmente. Modificado de O'Reilly C. et al. 2016.

Papel de MIF en cáncer

Además de la actividad proinflamatoria de MIF, su expresión y señalización se han asociado a diversos eventos involucrados en el desarrollo y la progresión del cáncer ^{74,97}. En este sentido se ha encontrado una alta expresión de la proteína MIF en diversos tipos de tejido de cáncer, como el carcinoma escamoso de esófago, cervical, mama, próstata, hígado, pulmón, glioblastoma, neuroblastoma, colon, ovario, gástrico, pancreático y leucemia de células B (Revisado en ⁷⁴). Relacionado al papel de MIF en la promoción del tumor y metástasis por su actividad proinflamatoria ^{73,98}, angiogénica ⁹⁹, modulación del sistema inmune ^{100,101}, y antiapoptótica ⁹², evidenciando la importancia de MIF en la progresión tumoral.

En este sentido, se ha observado que la administración de anticuerpos neutralizantes contra MIF en ratones disminuyó el crecimiento de linfomas de células B debido a una disminución en la angiogénesis ⁹⁹. De igual importancia es la regulación de MIF en el proceso de inflamación ya

que promueve la secreción de proteínas proinflamatorias como TNF α , IL-6 e IL-1 α , y debido a que MIF ayuda a la activación del inflamasoma por la unión a NLRP3 promueve la secreción de IL-1 β e IL-18 ¹⁰². Más aún, se ha descrito que MIF puede interactuar directamente con la proteína tioredoxina, un inhibidor de NF- κ B, promoviendo su actividad transcripcional y como consecuencia inflamación, proliferación, supervivencia y angiogénesis ¹⁰³.

En cuanto al papel de MIF en el cáncer de mama, se ha reportado que MIF tiene una mayor expresión en tumores de pacientes con cáncer de mama en comparación con los tejidos normales ^{104,105}. En uno de estos trabajos, la alta expresión de MIF en tejido tumoral se asoció con un mejor pronóstico ¹⁰⁵, mientras que en el trabajo más reciente se describió una correlación entre una mayor expresión de MIF y un mal pronóstico en pacientes con CMTN y positivos a los receptores hormonales, mientras que en pacientes con expresión del receptor HER2, la expresión de MIF se asoció a un mejor pronóstico ¹⁰⁴, en ambos trabajos se evaluó el MIF proteico mediante análisis de microarreglos de tejido. Por lo tanto, los resultados anteriores sugieren una asociación entre los niveles de expresión de MIF en el tumor con el pronóstico dependiente del subtipo de cáncer de mama.

Por otro lado, se ha reportado una relación entre los niveles de MIF en suero y el pronóstico de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama. En este sentido, se ha reportado un incremento de los niveles séricos de MIF en pacientes (promedio 1500 pg/ml) comparados con individuos sanos (387 pg/ml) ¹⁰⁶. Mientras que en otro estudio, también se observó una mayor concentración de MIF en suero en pacientes con cáncer de mama en comparación con personas sanas, asociado a un mayor riesgo en los subtipos luminal B, HER2 y el CMTN y a las etapas más avanzadas de la enfermedad ¹⁰⁷. Estas observaciones son de importancia ya que se buscan biomarcadores clínicos que pudieran ayudar al diagnóstico, pronóstico o tratamiento del cáncer de mama, pudiéndose relacionar a las concentraciones de MIF sérico en la progresión de la enfermedad.

Además, estudios *in vitro*, han propuesto una función protumoral para el MIF extracelular. Al respecto, se ha descrito una mayor secreción de MIF en las líneas celulares de cáncer de mama no invasivas en comparación a las células invasivas y no tumorales. De manera importante, cuando estas células se estimularon con MIF recombinante (MIFr) se presentó un mayor incremento de la secreción de MIF en las células invasivas comparadas con las no invasivas ¹⁰⁵. Asimismo, el tratamiento con MIFr indujo la secreción de el VEGF e IL-8, importantes para el

proceso angiogénico ¹⁰⁸. Los trabajos anteriores sugieren que la secreción de MIF puede ser estimulada de manera autócrina o parácrina y que las células invasivas presentaron una mayor secreción al ser estimuladas con MIFr.

Finalmente, la importancia de MIF en la progresión tumoral de el cáncer de mama se ha demostrado en las células 4T1 de CMTN, en las cuales se observó un menor tamaño del tumor al inhibir la expresión de esta citocina, así como una disminución en la metástasis hacia el pulmón ¹⁰¹.

En resumen, MIF presenta múltiples mecanismos de acción que involucran la activación de vías de señalización, actividades intracelulares de quimiocina, enzimática y de inmunomodulación, y muchas de ellas están directamente relacionadas a la progresión tumoral.

Papel de MIF en la regulación del sistema inmune

El sistema inmune puede identificar y eliminar a las células tumorales en un proceso denominado inmunovigilancia ¹⁰⁹, en la que se controlan infecciones virales prooncogénicas, se resuelven procesos inflamatorios que puede beneficiar a las células tumorales y se eliminan las células tumorales que expresan antígenos específicos de tumor ¹¹⁰. Sin embargo, las células tumorales pueden evadir al sistema inmune, por un proceso conocido como inmunoedición, el cual es muy importante en la progresión tumoral ¹⁰⁹. Por ejemplo, las células tumorales pueden evadir al sistema inmune mediante defectos en la presentación de antígenos o reclutamiento de células inmunosupresoras ¹¹¹.

Al respecto, se ha observado que el knockdown de MIF en las células 4T1 de CMTN provoca una disminución en el número de células supresoras derivadas del tejido mieloide (MDSC) en ratones BALB/c, lo cual se refleja en un menor tamaño del tumor, así como una disminución de la metástasis hacia el pulmón, en comparación a las células tumorales con una expresión normal de MIF ¹⁰¹. El efecto sobre el tumor y la metástasis no se observó al implantar células que contenían un shRNA contra MIF en ratones inmunocomprometidos, indicando que el efecto protumoral de MIF se debe a la activación de células inmunes protumorales ¹⁰¹. También, se ha observado que MIF promueve la progresión de glioblastomas debido a la activación de MDSC, las cuales suprimen la actividad de las células T citotóxicas y natural killer ¹¹². Por lo tanto,

además de promover la supervivencia y crecimiento tumoral, MIF es importante como regulador de células del sistema inmune.

En un tumor puede haber infiltración de diferentes células del sistema inmune tanto innato como adaptativo ¹⁰⁹, en este sentido, los macrófagos asociados a tumor (TAMs) se han clasificado en M1 o activación clásica, caracterizados por la producción de citocinas proinflamatorias, ERO y óxido nítrico ¹¹³ y M2 o activación alternativa, caracterizados por la producción de citocinas antiinflamatorias, síntesis de prostaglandina E2 y factores proangiogénicos, comúnmente denominados antitumorales y protumorales respectivamente ^{113,114}. Sin embargo, esta clasificación es muy reductiva en el contexto tumoral. Dado que la regulación de la actividad de estos macrófagos es importante para la progresión tumoral. Se ha observado que MIF promueve una activación de tipo proinflamatorio en macrófagos asociados a tejido adiposo ¹¹⁵, y en experimentos de polarización de macrófagos derivados de la médula ósea, se observó que MIF produce una polarización hacia el fenotipo M1 que es dependiente de la dosis ¹¹⁶. Sin embargo, se desconoce el papel de la secreción de MIF por las células tumorales en la polarización de macrófagos.

Papel de la familia D-dopacromo tautomerasa de MIF en cáncer

La actividad de DDT también está presente en otras proteínas llamadas MIF-2 y la proteína similar a DDT (DDTL), las cuales son miembros de la familia de MIF ⁸⁷. La importancia de la actividad DDT se reportó en las células de cáncer cervical a las cuales se les inhibió el dominio de la actividad tautomerasa de MIF y MIF-2 mediante shRNAs, pero hay que tomar en cuenta que este dominio se localiza en el centro catalítico de MIF ⁸⁷. Estas células presentaron una menor proliferación, migración e invasión y en ensayos *in vivo*, en ratones inmunocomprometidos, se observó una disminución del tamaño del tumor con el shRNA contra MIF y MIF-2 ¹¹⁷. De esta manera, quedó demostrado que también la actividad enzimática de MIF es importante en la progresión tumoral.

Finalmente, tanto MIF como MIF-2 se pueden unir al receptor CD74, activando las vías de señalización de PI3K y ERK ¹¹⁸. No obstante, MIF-2 carece del motivo CXXC por lo que no puede unirse a los receptores de quimiocinas ⁸². Otro mecanismo en común de MIF y MIF-2 es que ambas son inducidas por hipoxia ¹¹⁹. En cuanto a la relación de MIF-2 con cáncer, se sabe

que está sobre-expresada en cáncer cervical, se encuentra predominantemente en el citoplasma celular, además de que se ha observado que su nivel de expresión se correlaciona con metástasis hacia nódulos linfáticos y su inhibición disminuye la proliferación, migración e invasión de las líneas celulares de cáncer cervical ¹²⁰.

Modelo de cáncer de mama triple negativo con diferente capacidad metastásica

En el presente trabajo se utilizaron células derivadas del modelo 4T1 de cáncer de mama. Su relevancia radica en que las líneas celulares 67NR, 66cl4 y 4T1 provienen del mismo tumor el cual se generó espontáneamente en una ratona BALB/cfC3H ¹²¹. Estas líneas celulares pertenecen al subtipo de cáncer de mama triple negativo, sin embargo, presentan diferente capacidad metastásica ¹²². En el trabajo donde se caracterizaron estas líneas celulares, se identificaron dos líneas celulares metastásicas, 4T1 y 66cl4, y tres líneas celulares no metastásicas 67NR, 168FARN y 4TO7. Las células 67NR no se encontraron ni en nodos linfáticos, sangre o pulmones 7 semanas después del inicio del tumor primario y las células 168FARN se encontraron únicamente en nódulos linfáticos. Las células 66cl4 se localizaron únicamente en tejido pulmonar y las células 4T1 se pudieron encontrar en hígado, riñón, bazo, cerebro, corazón, nodos linfáticos, hueso, y pulmón ¹²¹, lo que demuestra su alto potencial metastásico.

En otro trabajo se caracterizó su capacidad de migración e invasión, siendo las células 4T1 las que presentaron mayor migración e invasión, seguidas de las células 67NR y finalmente de las células 66cl4 que son las que menos migran e invaden ¹²³.

En resumen, las células 67NR no producen metástasis, las células 66cl4 hacen metástasis a pulmón y las células 4T1 son metastásicas a diferentes órganos, a pesar de ser aisladas del mismo tumor y ser todas del CMTN.

Justificación

La autofagia es un mecanismo importante para la supervivencia de las células tumorales, por lo que su inhibición está siendo analizado en la clínica como blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer. Particularmente, el cáncer de mama triple negativo (CMTN), el cual tiene la mayor recurrencia y agresividad entre los diferentes subtipos de cáncer de mama, es el más sensible a la inhibición de la autofagia. Sin embargo, en macrófagos activados, la inhibición de la autofagia produce un incremento en la secreción de la citocina factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), la cual se ha relacionado a eventos proinflamatorios y protumorales en diversos tipos de cáncer. Por lo tanto, es importante estudiar el efecto de la inhibición de la autofagia en las células de CMTN y su efecto en la secreción de MIF, así como evaluar su papel protumoral.

Hipótesis

La inhibición de la autofagia incrementará la secreción de MIF en las células tumorales. La inhibición de MIF en conjunto con una inhibición de la autofagia provocará un decremento en la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

Objetivos

Objetivo general

Analizar la función de la secreción de MIF mediada por la inhibición de la autofagia en la progresión tumoral en las líneas celulares de cáncer de mama.

Objetivos específicos

1. Inhibir la autofagia en las células de cáncer de mama triple negativo: 67NR, 66cl4 y 4T1.

2. Cuantificar la secreción de MIF mediada por la inhibición de la autofagia en las células 67NR, 66cl4 y 4T1.
3. Cuantificar la producción de las ERO inducida por la inhibición de la autofagia y evaluar su papel en la expresión y secreción de MIF.
4. Analizar la proliferación y muerte celular de las células 67NR, 66cl4 y 4T1 utilizando los inhibidores de autofagia y/o de MIF.
5. Analizar el papel de la secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia en la migración de las células 67NR y 4T1.
6. Analizar los niveles de los receptores de MIF: CD74, CXCR2, CXCR4 y CXCR7 en las células 67NR, 66cl4 y 4T1.
7. Evaluar el papel de la secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia en la polarización de macrófagos.

Metodología

Reactivos

Cloroquina (CQ, C6628, Sigma,), N-acetilcisteína (NAC, A7250, Sigma), ISO-1 (4288, TOCRIS), dihidroetidio (DHE, 37291, Sigma), bromuro de hexadimetrina (HB, 107690, Sigma), Puromicina (P8833, Sigma).

Cultivo celular

En el presente trabajo se utilizaron las líneas celulares epiteliales de mama de ratón Eph4-Ev (ATCC, CRL-3063), las líneas celulares de cáncer de mama B-MEKDD 116 (ATCC, CRL-3069), la cual expresa constitutivamente a MEK1, las cuales se cultivaron en medio DMEM (DMP15, Caisson) con suero fetal de ternera (S075R-500, Biowest) al 10%, y antibiótico al 1% (P5L01, Caisson).

Las líneas celulares de CMTN de origen murino: 67NR (no metastásica), 66C14 (metástasis sólo a pulmón) y 4T1 (metástasis a diferentes órganos), que se cultivaron en medio DMEM con suero fetal bovino (FBS, S1560-500, Biowest) al 10%, con 1% de penicilina 100X. Todas las células se mantuvieron a una atmosfera húmeda de 5% de CO₂ a 37 °C.

Animales

Se utilizaron 4 ratonas BALB/c (WT) adquiridos de los laboratorios Harlan y 6 KO para MIF (MIF^{-/-}), donados por el Dr. John David, los cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, UNAM, de acuerdo con la norma Mexicana NOM-062-Z00-1999. Los procedimientos propuestos en este trabajo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes y ha sido autorizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, con número de registro R-2015-785-069.

Western Blot

Las células se tripsinizaron y lisaron por sonicación en solución amortiguadora de pH RIPA (NaCl 150 mM, EDTA pH 8 5 mM, Tris pH 8 50 mM, Triton X-100 1%, C₂₄H₃₉NaO₄ 0.5% y SDS 0.1%) a 4 °C, suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, 11697498001, Roche) e inhibidor de fosfatasa (PhosphoStop, 4906845001, Roche) cuando se evaluaron proteínas fosforiladas. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 12000 r.p.m. a 4 °C por 10 min.

Se recuperó el sobrenadante y se utilizó para la cuantificación de proteínas mediante el reactivo de Bradford. Se cargaron 30 µg de proteína por muestra en geles de poliacrilamida al 12% y posteriormente se transfirieron a las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF, IPVH00010, Merck Millipore). Se bloquearon las membranas con leche al 5 % en PBS-Tween 20 (Sigma, p1379) por una hora a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-LC3 (NB100-2220, 1:1000, Novus Biologicals), anti-ATG7 (8558, 1:500, Cell signaling,), anti-beclin 1 (3738, 1:1000, Cell

signaling), anti-actina (A5441, 1:10,000, Sigma), anti-VDP/P115 (PA5-30281, 1:1,000, ThermoFisher), anti-Erk p44/42 MAPK (4695, 1:1000, Cell signaling), anti-P-p44/42 MAPK (4370, 1:1000, Cell signaling), anti-Akt (C67E7, 1:1000, Cell signaling) y P-Akt(Thr308) (C31E5E, 1:1000, Cell signaling).

Se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano (HRP): anti-IgG de conejo (7074, 1:20000, Cell signaling) o anti-IgG de ratón (A2304, 1:20000, Sigma), los cuales se incubaron durante una hora en leche al 5 % en PBS-Tween 20. Para evaluar el peso molecular de las proteínas, se empleó el marcador de peso molecular de 10 a 180 kDa (26616, ThermoFisher). Para la detección se utilizó el reactivo Immobilon™ Western (WBKLS0500, Millipore) en conjunto con el sistema C-Digit Blot Scanner (LI-COR Biosciences) para la visualización y digitalización de las imágenes. El análisis densitométrico se llevó a cabo con el programa Image Studio Lite 5.3.

Inhibición de la autofagia y muerte celular

Se inhibió el proceso de autofagia farmacológicamente usando CQ a una concentración de 10, 20 y 40 μM . Para evaluar la muerte celular a las 24 horas se empleó yoduro de propidio (IP, P4170, Sigma) 10 μM por 10 min, el cual se incorpora en el ADN de las células que han perdido la permeabilidad de su membrana plasmática y se puede observar mediante el sistema IncuCyte®ZOOM (Essen BioScience), el cual permite cuantificar procesos biológicos en tiempo real de manera automatizada. También se evaluó el efecto del inhibidor de MIF, ISO-1 a las concentraciones de 10, 50 y 100 μM . La proliferación se evaluó como el porcentaje de confluencia celular con respecto al tiempo y la muerte celular se evaluó como el porcentaje de confluencia de la fluorescencia roja normalizada con respecto a la confluencia celular total. Estos ensayos se realizaron en placas de 96 pozos a un número inicial de 3×10^3 células.

Transducción viral de cultivos celulares

Para la producción de los lentivirus, se sembraron 5×10^5 células 293T (Clontech) en placas de 100 mm por cada shRNA a producir. Al día siguiente primero se realizó una solución con 400

μl de medio DMEM sin suero, plásmidos de empaquetamiento con las siguientes cantidades 0.2 μg de pVSV-G, 1.8 μg de pRRE, 1.8 μg de pRSV, y 2 μg del plásmido pLKO.1 que contiene la secuencia de el shRNA (*short hairpin RNA*, horquilla corta de ARN) no silenciante (NS), ATG7 TRCN0000007587 (ATG7) o beclin 1 TRCN 0000087288 (B1). Se mezclaron en vórtex y se añadió 1 mg/ml de polietilenimina (PEI, 23966, Polysciences) en una proporción ADN:PEI de 1:3. Se volvió a mezclar y se dejaron incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.

Antes de agregar la mezcla de cada shRNA a emplear, se les cambió el medio a cada una de las cajas con las células 293T por 6 ml de DMEM con suero y se les añadió su respectiva solución para transfectar. Se incubaron toda la noche y posteriormente se les reemplazó con 6 ml de medio fresco, 24 horas después se recuperó el medio de las células 293T y nuevamente se les reemplazó el medio, y a las siguientes 24 horas de cultivo se volvió a recuperar el medio en el mismo tubo de recolección al cual se le agregó HB a una concentración final de 8 μg/ml, se mezcló con vortex y se procedió a hacer alícuotas de 1 ml en tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y mantenerlos a -80 °C hasta su uso.

Para comenzar la transducción de las células 67NR, 66cl4 y 4T1, éstas fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 3-4X10⁴ células por pozo, posteriormente fueron incubadas con HB utilizando 0.8 μl por ml de medio de cultivo durante una hora, después se le agregaron 0.5 ml de medio con los virus de interés y se dejó incubando 24 h. La selección se realizó por tres días con el uso de puromicina con las siguientes concentraciones: 67NR, 5 μg/ml; 66cl4 3 μg/ml y 4T1 2 μg/ml, finalizando la selección, las células se dejaron proliferar en medio con puromicina de mantenimiento con las siguientes concentraciones: 67NR, 2 μg/ml; 66cl4 1.5 μg/ml y 4T1 1 μg/ml para poder tener el número suficiente según el experimento a realizar.

Cuantificación de la secreción de MIF

Para la detección de MIF secretado, se utilizó el método de ELISA empleando el sistema comercial kit Duo Set mouse MIF (DY1978, R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 1X10⁵ células por pozo en placas de 6 pozos y posteriormente se recuperó el sobrenadante a las 16 h con o sin inhibidor de autofagia (CQ 10, 20 y 40 μM) o

expresando shRNAs NS, ATG7 o B1), según corresponda. Para las células 66cl4 con shRNA NS y con el de ATG7 se realizó la cuantificación de MIF a las 16, 24 y 48 horas de cultivo.

Cuantificación de la secreción de citocinas proinflamatorias

Para la cuantificación de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IFN- γ y TNF α se utilizó el sistema comercial de arreglo de perlas con anticuerpos para citocinas proinflamatorias de ratón (Cytometric Bead Array, 552364, BD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se analizaron las células 67NR, 66cl4 y 4T1, de las cuales se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 12 pozos, después de un tratamiento de 16 h con y sin CQ 10, 20 y 40 μ M se recuperó el sobrenadante para la cuantificación de citocinas proinflamatorias, las cuales se analizaron en el citómetro FACS Canto II (BD) utilizando el programa FCAP Array 3.0v para su análisis.

Cuantificación de ERO

Los niveles de ERO fueron cuantificados por citometría de flujo utilizando tinción con DHE. Se sembraron 1×10^5 células 67NR, 66Cl4 y 4T1 y se trataron con 10, 20 y 40 μ M de CQ por 16 horas +/- tratamiento antioxidante con NAC (3.5 y 7 mM). Así como también se sembraron 1×10^5 células 66cl4 con el shRNA de ATG7 y NS +/- tratamiento con NAC. Posteriormente se incubaron con DHE 10 μ M por 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar 2 veces las células con PBS, se tripsinizaron y centrifugaron a 2500 r.p.m., las células fueron resuspendidas en PBS con 3% de suero bovino fetal para ser filtradas y poder realizar lecturas a 488 nm con una emisión de 570 nm en el citómetro BD FACS Canto II. Se consideraron las células DHE altas las del percentil 50 y 75.

Análisis del promotor de MIF

Se analizó el promotor de MIF (-2000 pb a + 50 pb) de *Mus musculus* y *Homo sapiens* empleando el servidor web Enrichment (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) para obtener los posibles sitios de unión de los factores de transcripción (FT) al promotor de MIF ¹²⁴, debido a

que en el análisis anterior sólo se obtiene una lista de los FT, se utilizó la matriz de posicionamiento en JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>) y se seleccionaron aquellos que tuvieron una $p < 0.05$ ¹²⁵. El promotor central (- 40 pb a + 40 pb) se analizó con ElemeNT (<http://lifefaculty.biu.ac.il/gershon-tamar/index.php/resources>) el cual es una herramienta computacional para la detección de los factores de transcripción relacionados con el inicio de la transcripción importante para la validación de nuestro análisis ¹²⁶. Los FT del promotor central obtenidos en ElemeNT correspondieron a los obtenidos en Enrichment.

Análisis de la expresión de MIF en pacientes con cáncer de mama

Los datos de expresión del ARNm de MIF y el análisis de sobrevida de las muestras de pacientes de cáncer de mama fueron obtenidos de la base de datos del sitio web cBioPortal (www.cbioportal.org) empleando los datos de Z score de expresión del ARNm relativo a muestras diploides de un estudio de 1992 tumores primarios de cáncer de mama utilizando la clasificación PAM50 + Claudin-low ¹²⁷. Se excluyeron aquellos datos que no tenían una clasificación de los diferentes subtipos de cáncer de mama, según la clasificación PAM50 + Claudin-Low.

Para el análisis de sobrevida se obtuvieron las gráficas basado en la mayor diferencia entre los dos grupos analizados de alta y baja expresión de MIF.

Obtención de ARN y análisis por RT-PCR tiempo real

Se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos y 24 horas después se homogenizó con TRIzol (15596018, Sigma-Aldrich), la mezcla se almacenó a -80 °C para la posterior extracción de el RNA mediante el uso de fenol (p1037, Sigma-Aldrich) :cloroformo (C2432, Sigma-Aldrich) a una proporción de 1:1, las muestras se centrifugaron a 14000 r.p.m. por 5 minutos, se recuperó la fase acuosa y se agregaron 2 volúmenes de isopropanol (I9516, Sigma-Aldrich) para la precipitación del ADN, finalmente se lavó con etanol al 70% para eliminar sales y moléculas orgánicas.

Para la síntesis del ADNc, se realizó el protocolo del reactivo SuperScript II Reverse Transcriptase (18064014, Thermo Scientific). Para la amplificación del ADNc se siguió el protocolo de la Taq ADN polimerasa (EP0409, Thermo Scientific), empleando el sistema comercial Maxima Sybr Green/ROX qPCR (K0221, Thermo Scientific), con el termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad), utilizando las siguientes secuencias de primers (5'-3'): para MIF F, AGACCACGTGCTTAGCTGAG; MIF R, GCATCGCTACCGGTGGATAA; actina F, TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG; actina R, TTTGATGTCACGCACGATTTC. Los resultados se normalizaron respecto a la expresión del gen constitutivo *β-actina* los cuales se expresaron como el $\Delta\Delta Ct$.

Migración celular

La migración celular fue llevada a cabo en placa de 96 pozos en las cuales se sembraron de 4×10^5 células por pozo para que a las 24 horas se obtuviera una confluencia celular del 100%. Posteriormente con ayuda del aparato "WoundMaker"TM y siguiendo las instrucciones del fabricante, se realizó la herida en cada uno de los pozos, se lavaron dos veces con PBS y se le agregó el tratamiento correspondiente.

Las células fueron visualizadas cada 4 h para evaluar el cierre de la herida con respecto al tiempo en el sistema IncuCyte®ZOOM. Los resultados se expresan como el porcentaje del área del cierre de la herida, el cual es el área de la herida cubierta por las células que han migrado en función del tiempo, y fue calculado utilizando el programa ImageJ.

Niveles de los receptores de MIF

Se sembraron 1×10^5 células EpH4-EV, 67NR, 66cl4 y 4T1 por pozo en placas de 12 pozos, de tal manera que posteriormente se pudiera obtener un número de 1×10^6 de células en 500 μ l de medio DMEM suplementado en tubos de microcentrífuga por cada línea celular.

Las células se centrifugaron para descartar el medio de cultivo y se agregaron los anticuerpos Zombie Aqua (7143, Biolegend) (viabilidad), CD74-FITC (555318, BD Biosciences), CXCR2-PerCP (149603, Biolegend), CXCR4-AP (146507-Biolegend) y CXCR7-PE (331103,

Biolegend), resuspendidos en solución amortiguadora de pH FACS (PBS, 2% de FBS, 2mM de EDTA y 2mM de NaN₃). Se prepararon tubos con células sin teñir, todos los anticuerpos se utilizaron a una concentración de 1:1000 por cada millón de células. Como controles de compensación se emplearon los anticuerpos por separado, todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos.

Posteriormente se hicieron dos lavados con 500 µL de buffer FACS, se centrifugó y se resuspendieron en 300 µl de buffer FACS y 200 µl de PFA al 5%. Las muestras se analizaron en el citómetro Attune Nxt (Thermo Fisher Scientific) para la obtención de los datos. Una vez ajustada la auto-fluorescencia de las células, se registró el incremento de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los parámetros analizados mediante el programa FlowJo (BD Biosciences).

Análisis de la polarización de macrófagos

Para la obtención de células de médula ósea se utilizaron fémures y tibias de ratones WT y MIF^{-/-} los cuales se perfundieron con solución salina. Las células obtenidas se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio DMEM suplementado con suero bovino fetal. Se ajustaron a 2x10⁶ de células por ml y se sembró un ml por pozo en placas de 24 pozos.

Se agregaron 20 ng/ml del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, 554585, BD Biosciences) en medio DMEM suplementado como medio de diferenciación, agregándose de nuevo al día 3 y 5. Al día 7 se realizaron 2 lavados con DMEM y posteriormente, las células se sincronizaron por 2 horas en DMEM sin suero. Posteriormente se les retiró el medio de sincronización y se añadieron los siguientes estímulos de polarización en un volumen de 1 ml: Control: DMEM suplementado; DMSO: DMEM suplementado más 2.5 % de DMSO; NS: medio condicionado (MC) de 48 horas de cultivo de células 66cl4 con el shRNA NS; ATG7: MC de 48 horas de cultivo de células 66cl4 con el shRNA ATG7 (inhibición de autofagia); NS + ISO-1: medio NS + 100 µM de ISO-1 (475837, Calbiochem); ATG7 + ISO-1: medio ATG7 + 100 µM de ISO-1; M2: IL-4 (214-14, PeproTech) 50 ng/ml, IL-13 (210-13, PeproTech) 5 ng/ml.

Al tercer día se retiró el medio de cultivo y se dio un segundo estímulo en medio fresco como se explicó anteriormente y a las 72 horas se despegaron las células utilizando raspadores celulares, después se procedió a realizar la cuantificación de células positivas para macrófagos tipo M1 y M2 mediante citometría de flujo, empleando los siguientes anticuerpos: F4/80-PE (123110, Biolegend); CD11b-APC (561119, BD Biosciences) y CD206-FITC (141704, Biolegend), todos los anticuerpos se utilizaron a una concentración de 1:1000 en un millón de células; éstos se incubaron por 20 minutos y posteriormente se lavaron y fijaron en paraformaldehído al 5%. A partir de las células positivas para F4/80, se analizaron las células positivas para CD11c y CD206 que representan los macrófagos M1 y M2 respectivamente. Se utilizó el citómetro Attune Nxt para la obtención de los datos, los cuales se analizaron con el programa FlowJo.

Análisis estadístico

Los datos muestran el promedio +/- el error estándar de 3 a 4 experimentos independientes. Se utilizó la prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post-hoc* Tukey para comparaciones múltiples, una prueba *post-hoc* Dunnett's para comparar contra el control respectivo y una prueba *t* de student para comparaciones uno a uno empleando el programa GraphPad Prism 6.0c.

Resultados

Las células de CMTN con diferente capacidad metastásica presentan diferentes niveles de sensibilidad a la cloroquina que se relaciona con su autofagia basal

El cáncer de mama se puede clasificar histológicamente de acuerdo con los receptores que exprese ¹²⁸, siendo el triple negativo el más recurrente y de peor pronóstico ¹²⁹. Además, como se había mencionado anteriormente, este subtipo es el más sensible a la inhibición de la autofagia ¹³. Por esta razón, primero se cuantificó la autofagia basal en líneas celulares de CMTN de origen murino ¹²², utilizando la técnica de *Western blot* contra la proteína LC3II en conjunto

con el inhibidor lisosomal CQ que bloquea la degradación de los autofagosomas. La cantidad de LC3II en presencia de CQ y en ausencia de otro tratamiento puede utilizarse como medida de la cantidad de autofagosomas presentes en la célula a determinado tiempo y representa los niveles de autofagia basal ³¹.

Al comparar la acumulación de la proteína LC3II en presencia y ausencia de CQ, se observó que las líneas celulares de CMTN utilizadas, presentan diferentes niveles de autofagia basal (Figura 5 A), observando una mayor acumulación de la proteína LC3II en las líneas celulares metastásicas 66cl4 y 4T1 en comparación de la línea celular no metastásica 67NR y la mayor acumulación de LC3II en la línea celular 66cl4. En relación con la sensibilidad a la CQ, se empleó IP, el cual marca a las células que han perdido la integridad de su membrana plasmática y por lo tanto su viabilidad. De manera interesante, se observó que a las 24 horas, las células 66cl4 son las más sensibles al uso del inhibidor de autofagia CQ, seguido de las células 4T1 y finalmente las células 67NR (Figura 5 B-E).

De esta manera, se observó que las células de CMTN con capacidad metastásica presentaron mayores niveles de autofagia basal, relacionado a una mayor sensibilidad al uso de CQ. Asimismo, se realizó un ensayo de muerte celular a las 16 horas de tratamiento con CQ (Figura 5 F) para descartar muerte celular en los experimentos de secreción. En tal caso, si se evaluara secreción al medio de cultivo en células que han perdido integridad de su membrana plasmática, cualquier proteína que se encontrara en el medio podría ser producto de la muerte celular. No se encontraron diferencias significativas en muerte celular a 16 horas de tratamiento con CQ en ninguna de las tres líneas celulares estudiadas por lo que los experimentos de secreción con CQ se realizaron a 16 horas.

Resumiendo, los niveles basales de autofagia fueron indicativo de la sensibilidad al tratamiento con CQ siendo las células metastásicas y en específico la 66cl4, la más sensible al tratamiento con CQ.

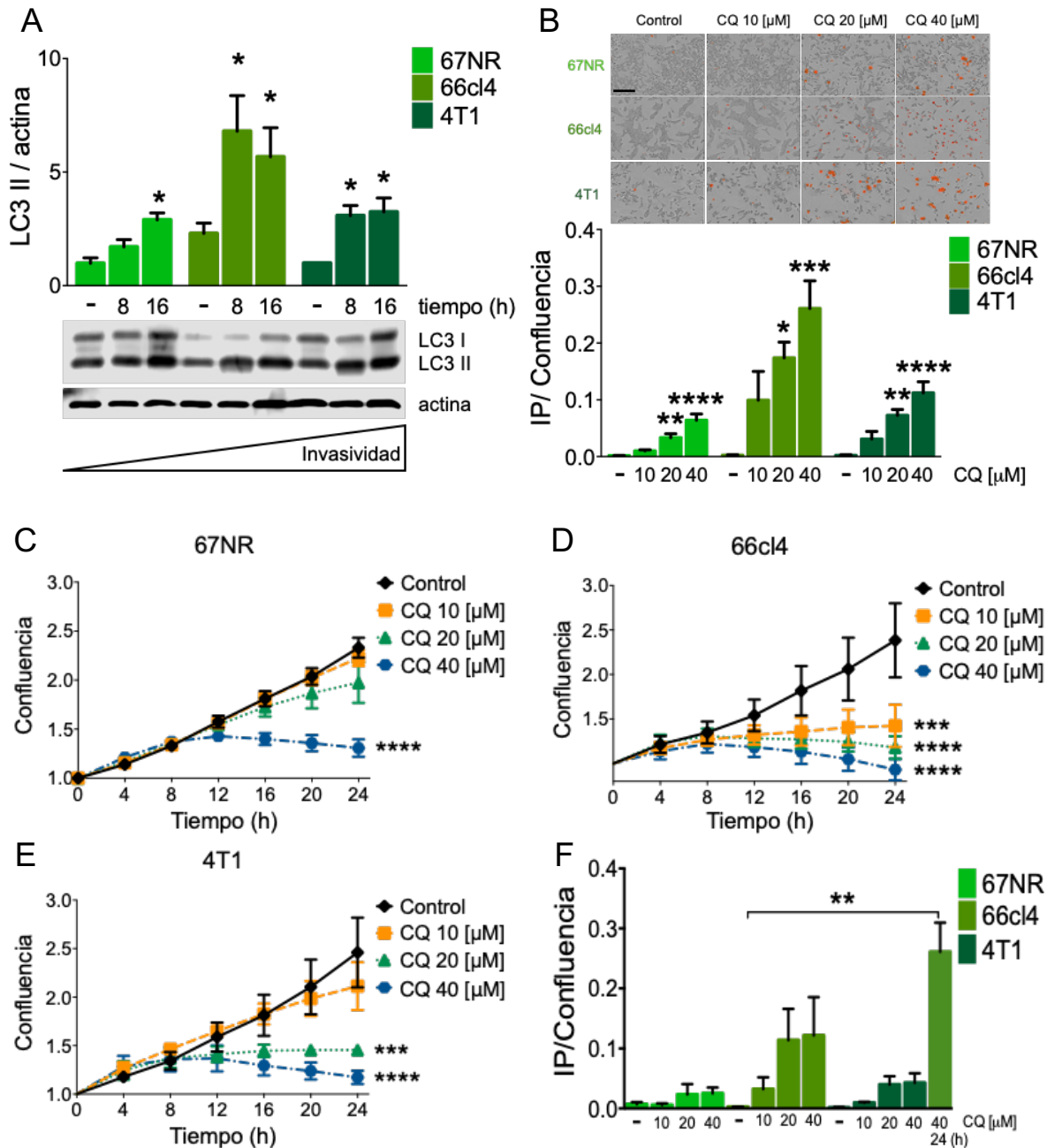


Figura 5. Las líneas celulares de cáncer de mama con distinta capacidad metastásica presentan diferentes niveles de autofagia basal relacionado a la sensibilidad de su inhibición.

La acumulación de la proteína LC3 II fue cuantificada por *Western blot* en células tratadas con 10 μ M de CQ en los tiempos que se indican en la imagen en las diferentes líneas de CMTN de origen murino (A). La muerte celular fue evaluada con el uso de IP 24 horas después del tratamiento con CQ (B). Curvas de proliferación de las líneas celulares 67NR, 66cl4 y 4T1 tratadas con diferentes concentraciones de CQ y a diferentes tiempos (C-E). La muerte celular fue cuantificada como el porcentaje de confluencia de células positivas a IP normalizadas con la confluencia total celular a 16 horas de tratamiento con CQ a las concentraciones indicadas. Como control positivo de muerte celular se incluyó a las células 66cl4 que fueron tratadas con 40 μ M de CQ a 24 horas (F). La barra de la escala en B representa 200 μ m. Las gráficas muestran el promedio \pm error estándar de tres o cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

La inhibición de la autofagia induce la secreción de MIF en las líneas celulares de CMTN

Considerando que la CQ se está empleando en ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, y además de que las células con mayores niveles de autofagia basal son más susceptibles a la inhibición de la autofagia, se analizó si la inhibición de la autofagia promueve la secreción de MIF como se ha reportado previamente para los macrófagos activados⁶⁷. Inicialmente, se evaluó una posible relación entre la malignidad de las células no tumorales y las tumorales con la secreción basal de MIF, para esto se utilizaron líneas celulares epiteliales no tumorales de mama de ratón, Eph4-Ev; células modificadas en MEK1 tumorigénicas, B-MEKDD 116; células de CMTN no invasiva, 67NR; células metastásicas a pulmón, 66cl4 y células altamente metastásicas 4T1. Se observó el mayor nivel de secreción basal en la línea celular 67NR. Las células tumorales altamente metastásicas, al igual que la no tumoral, fueron las que presentaron los menores niveles de secreción de MIF basal (Figura 6 A). Por lo tanto, no se observó una relación entre mayor capacidad metastásica y secreción basal de MIF.

Al utilizar CQ, observamos un incremento de la concentración de MIF en el medio de cultivo en las tres líneas celulares de CMTN, siendo las células 66cl4 las que presentaron una mayor secreción (Figura 6 B). La evaluación de la secreción se realizó a las 16 horas de tratamiento, tiempo en el cual no se observaron cambios significativos en la muerte celular (Figura 5 F).

Por lo tanto, la secreción de MIF inducida por el tratamiento con CQ fue un evento activo y no causado por muerte celular y el consecuente derrame del contenido citoplásmico al medio de cultivo. También se pudo observar que las líneas celulares 67NR y 4T1 presentaron un incremento en la secreción de MIF únicamente con la concentración más alta de CQ (40 μ M).

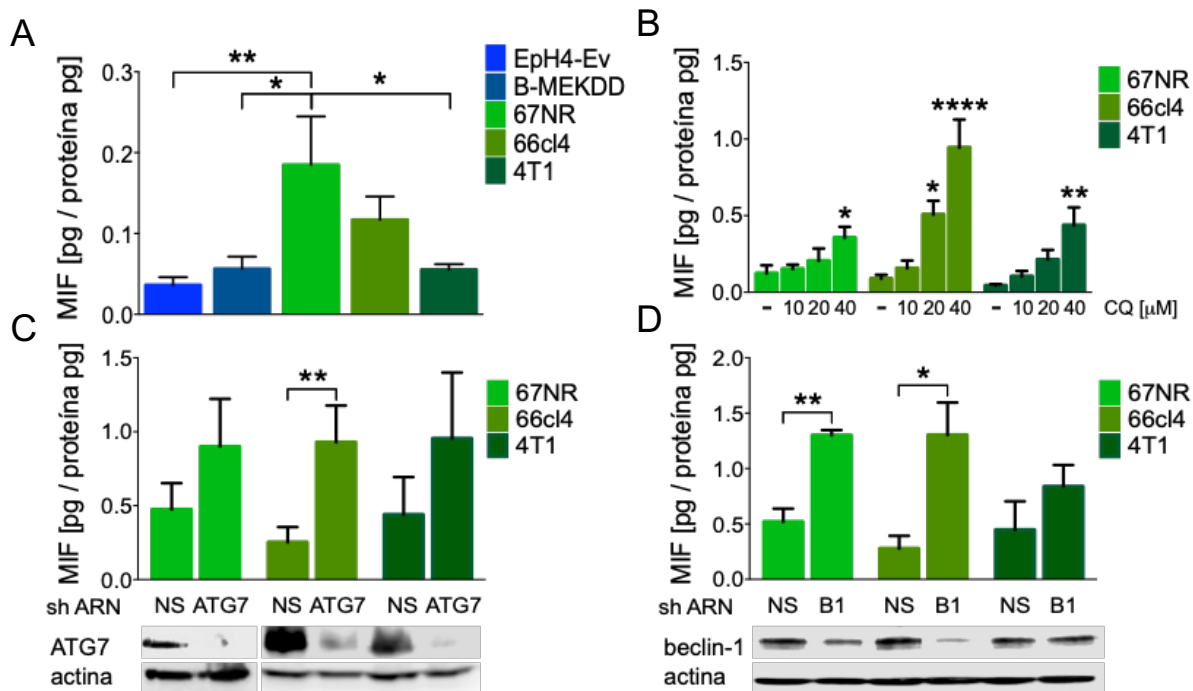


Figura 6. La inhibición de la autofagia induce la secreción de MIF en líneas celulares de cáncer de mama.

La secreción basal de MIF en el medio de cultivo fue evaluado en las células Eph4-Ev, células de mama epiteliales de ratón; B-MEKDD 116, línea celular tumorigénica transformada en MEK1; líneas celulares de CMTN 67NR; 66cl4 y 4T1 (A), el medio fue analizado a las 16 horas por el método de ELISA. La inhibición de la autofagia con CQ (B), o mediante el silenciamiento de ATG7 (C) o beclin 1 (B1) (D), provocaron la secreción de MIF en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama a las 16 horas de cultivo. En (C y D), las proteínas de ATG7 o beclin 1 fueron evaluados por el método de *Western blot* para confirmar la eficiencia del silenciamiento y son mostradas debajo de sus respectivas gráficas. Las gráficas muestran el promedio \pm error estándar de tres a cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Para descartar que el incremento en la secreción de MIF por el uso de CQ se deba a un efecto independiente de autofagia¹³⁰, se emplearon shRNAs para la inhibición genética de la autofagia. Se silenciaron las proteínas ATG7 (ATG7) y beclin 1 (B1) relacionadas con los pasos tempranos en la formación de autofagosomas¹⁷. Se obtuvo un incremento en la secreción de MIF en la línea celular 66cl4 cuando se utilizaron ambos silenciamientos, el shRNA B1 incrementó la secreción de MIF en las células 67NR y ningún shRNA incrementó la secreción de MIF al medio en las células 4T1 (Figura 6 C y D).

En todos los casos, la evaluación de la secreción de MIF se realizó a 16 horas al igual que se hizo cuando se empleó CQ. Para evaluar la eficiencia del silenciamiento, se utilizó el método de *Western blot* contra las proteínas de interés, donde se pudo observar que hay una eficiencia

semejante en las tres líneas celulares en cuanto al silenciamiento de ATG7 (Figura 6 C, abajo), mientras que el silenciamiento de beclin 1 no funcionó en las células 4T1 (Figura 6 D, abajo) por lo que no se descarta que la falta de secreción de MIF se deba a un silenciamiento deficiente en las células 4T1.

Estos resultados demuestran que la inhibición farmacológica y genética de la autofagia induce la secreción de MIF principalmente en las células de CMTN 66cl4. Las diferencias observadas con CQ y el silenciamiento genético en las células 67NR y 4T1 probablemente se deban al tiempo de colecta del sobrenadante o a cambios en la eficiencia del silenciamiento.

La inhibición de la autofagia induce la secreción de MCP1 e IL-6 en la línea celular 66cl4

Evidencia previamente reportada indica que la inhibición de la autofagia induce la secreción de diversas proteínas proinflamatorias^{34,60}. Por lo tanto, se cuantificó la secreción de citocinas proinflamatorias como MCP1, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF α e IL-12p70 empleando citometría de flujo. El tratamiento con CQ indujo un incremento en la secreción de las citocinas proinflamatorias MCP1 e IL-6 en la línea celular 66cl4 (Figura 7 A y B). Como se puede observar, el incremento de MCP1 se encontró con la concentración de 10 y 20 μ M, mientras que un incremento en la secreción de IL-6 se observó a la concentración de 20 μ M de CQ, lo que podría indicar que la cinética de secreción de las citocinas evaluadas es diferente en cada una de éstas. En las mismas condiciones, las células 67NR y 4T1 no presentaron incremento en la secreción de MCP1 o IL-6 (Figura 7 C-F). El resto de las citocinas proinflamatorias evaluadas no se pudieron detectar en el rango de detección en ninguna de las líneas celulares analizadas. Estos datos en conjunto indican que entre las diferentes líneas celulares de el CMTN estudiadas, la línea celular 66cl4 presenta un fenotipo de mayor secreción cuando se le inhibe la autofagia.

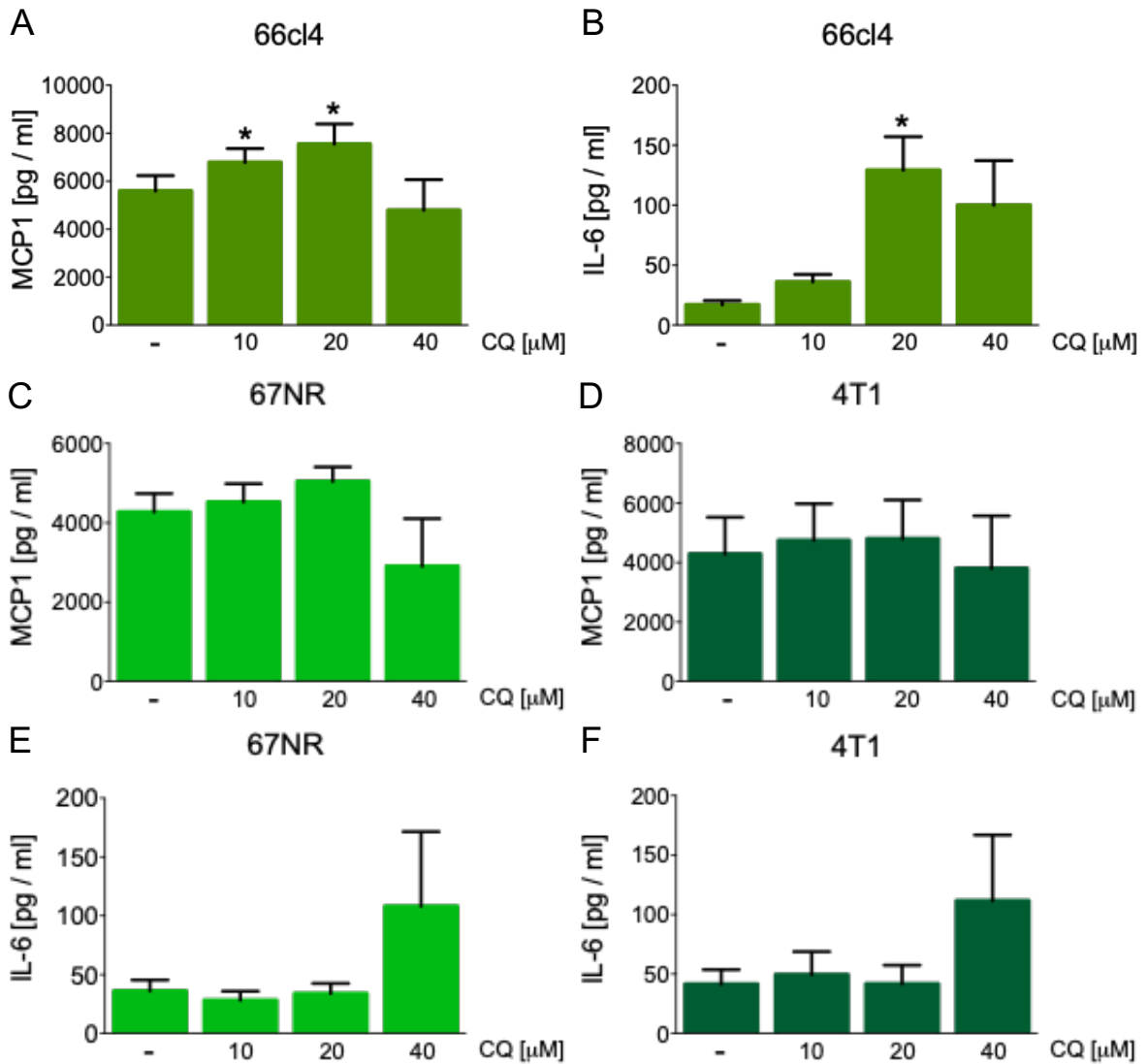


Figura 7. La inhibición de la autofagia con CQ induce la secreción de MCP1 e IL-6 en la línea celular 66cl4.

La secreción de MCP1 e IL-6 fue evaluada a las 16 horas de tratamiento con CQ a la concentración indicada usando un kit de CBA para citocinas proinflamatorias de ratón por citometría de flujo. La CQ indujo la secreción de MCP-1 (A) e IL-6 (B) en la línea celular 66cl4 y no así en las células 67NR y 4T1 (C-F). Las gráficas muestran el promedio +/- error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$.

La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia es mediada por las ERO

Debido a que se demostró que la inhibición de la autofagia produjo un incremento de la secreción de MIF en los macrófagos activados, y esta disminuyó cuando se utilizó un antioxidante ⁶⁷, primero se cuantificaron los niveles de las ERO en presencia del inhibidor de

autofagia CQ utilizando tinción con DHE. Se observó que las células 67NR no presentaron un incremento en las ERO (Figura 8 A) en ninguna de las concentraciones de CQ empleadas, sin embargo, con 40 μ M de CQ se observó un aumento en la secreción de MIF (Figura 6 B). En cuanto a las células 66cl4, con 20 y 40 μ M de CQ se provocó un incremento de las ERO (Figura 8 A) que se relacionó con un incremento en la secreción de MIF por estas células (Figura 6 B). Las células 4T1 tuvieron un incremento de las ERO a 20 μ M de CQ, pero en estas condiciones no se observaron cambios significativos en la secreción de MIF (Figura 6 B). Lo anterior indica que las ERO no están únicamente relacionadas con la secreción de MIF en las tres líneas celulares estudiadas ^{76,77}. Al respecto, se ha reportado que la proteína Uso1/p115 (p115) se une a MIF y se secreta en conjunto con esta citocina ⁷⁶. Por lo que se evaluaron los niveles de p115 a tiempos cortos (2 y 4 horas) antes de que se produzca un incremento significativo de la secreción de MIF con el tratamiento de CQ (Figura 6 B). Se observó un incremento en los niveles de p115 en las líneas celulares 67NR y 4T1 (Figura 8 B) sugiriendo una posible participación de esta proteína en estas líneas celulares para la secreción de MIF. Además, a 8 horas del tratamiento con CQ se observó una disminución en los niveles de la proteínas p115 en las líneas celulares 66cl4 y 4T1, que es un tiempo anterior a que ocurra la secreción de MIF. Por lo que la secreción de MIF estaría ocurriendo en conjunto con la secreción de p115 para estas líneas celulares.

Para evaluar el papel de las ERO en la secreción de MIF, se utilizó el antioxidante NAC, un precursor de el glutatión que disminuye las ERO en líneas celulares de cáncer de mama. El tratamiento con NAC disminuyó las ERO en la línea celular 66cl4 (Figura 8D) y la secreción de MIF inducida por CQ (Figura 8 C).

En conclusión, estos datos demuestran que la inhibición de la autofagia mediante el uso de CQ en células 66cl4 induce un incremento de las ERO que, a su vez, inducen la secreción de MIF.

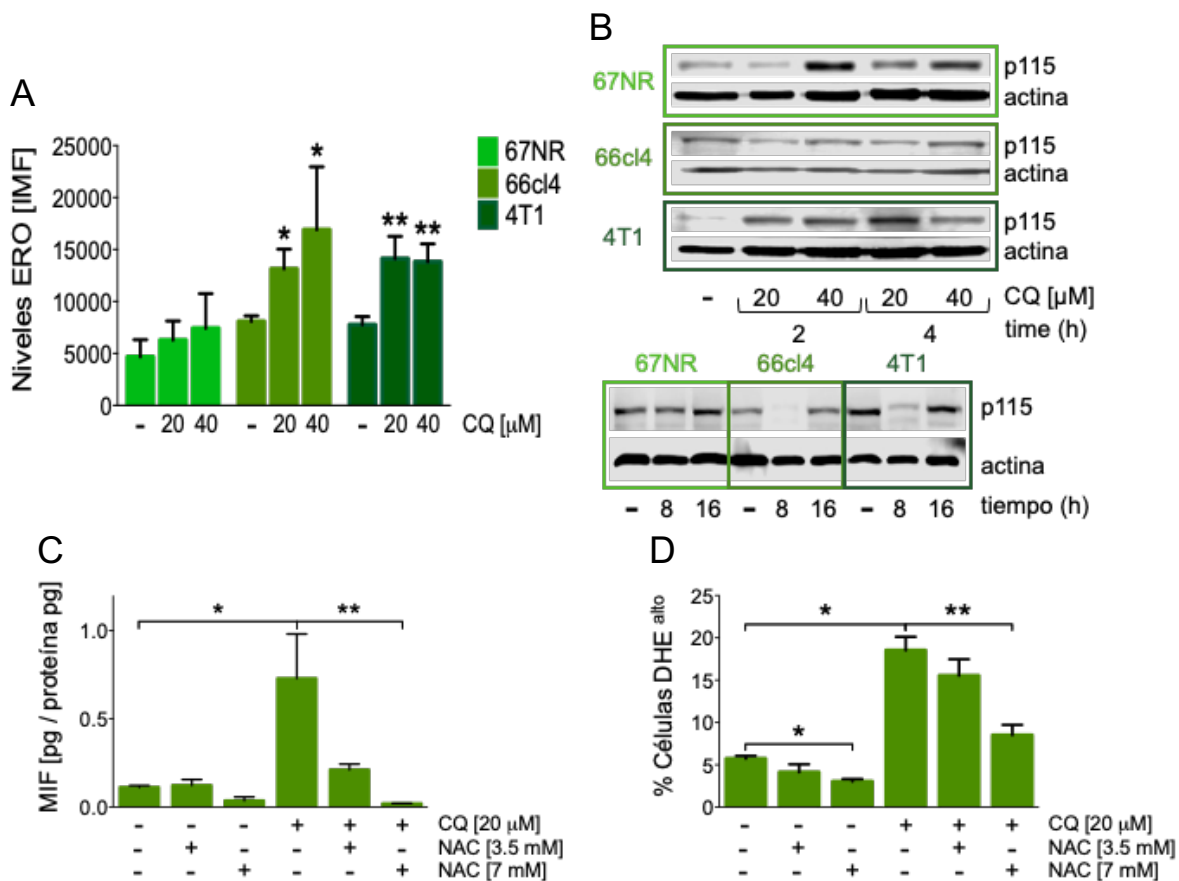


Figura 8. La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia fue mediada por la producción de las ERO y cambios en los niveles de la proteína p115.

Los niveles de las ERO fueron evaluados utilizando la tinción con DHE por citometría de flujo a las 16 horas de tratamiento con las concentraciones de CQ que se indican en (A). Los niveles de la proteína USO1/p115 fueron evaluados por el método de *Western blot* en las líneas celulares de cáncer de mama (B). El tratamiento con N-acetil cisteína (NAC) a las concentraciones indicadas disminuyó los niveles de las ERO inducidos por el tratamiento con CQ (D) disminuyendo también la secreción de MIF en la línea celular 66cl4 (C). Las gráficas presentan el promedio +/- error estándar de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Los subtipos de cáncer de mama más proliferativos presentan mayor expresión de MIF

Los niveles de expresión de MIF se han asociado a distintas características de malignidad en cáncer⁷⁵. Por lo ello, se realizó un análisis de muestras de pacientes con cáncer de mama obtenidas de la base de datos del cBioPortal, en el cual se analizó el nivel de expresión génica de 1992 muestras de tumores primarios de cáncer de mama¹²⁷. Al analizar una posible relación entre la expresión de MIF y los diferentes subtipos de la enfermedad⁹⁴, se observó que los subtipos luminal B, HER2 y basal, presentaron mayor expresión de MIF en comparación al

subtipo similar al normal (Figura 9 A). Estos tres subtipos corresponden a los subtipos más proliferativos de cáncer de mama ^{3,131}.

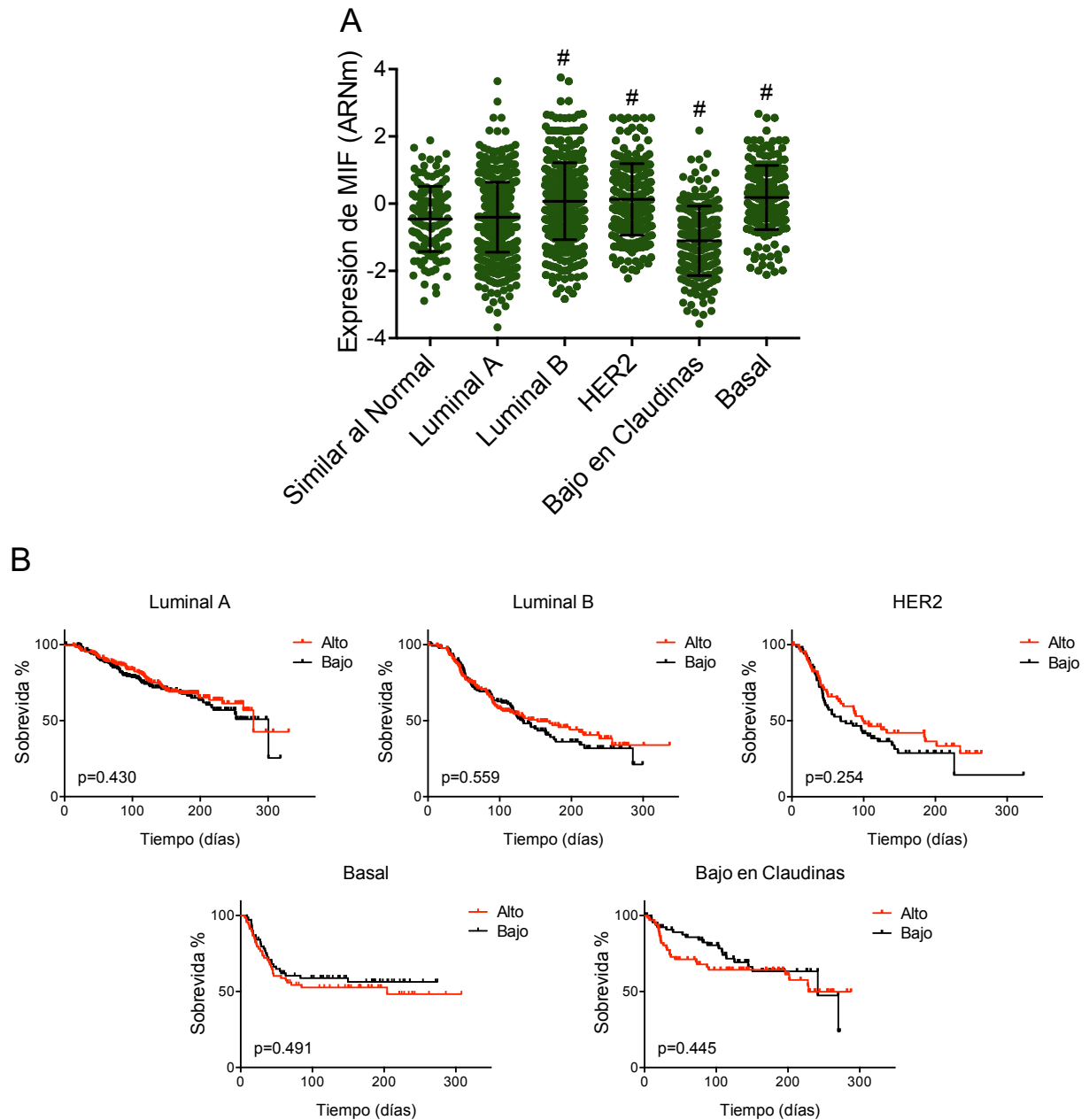


Figura 9. La cantidad relativa de MIF es mayor en los subtipos más proliferativos de cáncer de mama.

Expresión de MIF en diferentes subtipos de cáncer de mama obtenidos de la base de datos del cBioPortal, # $p < 0.0001$ (A). Gráficas de supervivencia de pacientes con cáncer de mamá con alta expresión (línea roja) y baja expresión (línea negra) de MIF en los diferentes subtipos de cáncer de mama (B).

Debido a que se ha propuesto a MIF como una citocina protumoral ¹³² y considerando que los subtipos de cáncer de mama más proliferativos presentan mayor expresión de MIF (Figura 9 A), se determinó si la alta expresión de MIF está asociada al pronóstico en algún subtipo de cáncer de mama. Para esto, se analizó la expresión alta y baja de MIF en las mismas muestras de cáncer de mama anteriormente analizadas. No se encontró relación alguna de la expresión de MIF con el pronóstico de la enfermedad en ninguno de los subtipos de cáncer de mama (Figura 9 B). Por lo cual, la alta o baja expresión de MIF no es un factor de mal pronóstico en cáncer de mama, al menos en estos datos analizados.

La inhibición de la autofagia induce la secreción y expresión de MIF mediada por las especies reactivas de oxígeno

Con la finalidad de analizar el control de expresión de MIF, se realizó un análisis *in silico* de los FT relacionados con el promotor de *MIF* (Figura 10 A), encontrando sitios para los FT activados por las ERO como BACH1, HIF1A, Fos, NFkB ¹³³, Ahr¹³⁴, CREB¹³⁵ o E2F1¹³⁶. Lo anterior sugiere que el incremento de las ERO mediado por la inhibición de la autofagia podría estar relacionado con la actividad de los FT relacionados a MIF que promovería una mayor expresión de esta citocina.

Teniendo en cuenta que la secreción de MIF involucra que haya una producción suficiente de esta citocina en las vesículas secretoras y considerando que la inhibición de la autofagia incrementó las ERO y la secreción de MIF, se decidió determinar el papel de las ERO en la expresión de MIF. Se cuantificaron los niveles de expresión de MIF basal entre las células de CMTN (Figura 10 B), y se observó que las células tumorales no invasivas presentan mayor expresión de MIF en comparación a las invasivas y la no tumoral, que se relacionan a sus niveles de secreción basal (Figura 6 A). Al analizar la expresión de MIF en células con la autofagia inhibida (ATG7 shRNA), observamos un aumento en la expresión de MIF. Este aumento se evitó con el uso del antioxidante NAC (Figura 10 D), a una concentración capaz de disminuir las ERO (Figura 10 C).

Por lo tanto, estos resultados demuestran que la inhibición de la autofagia induce un aumento en las ERO, un incremento en la expresión de MIF, probablemente mediada por los FT relacionados con las ERO y un incremento en la secreción de esta citocina.

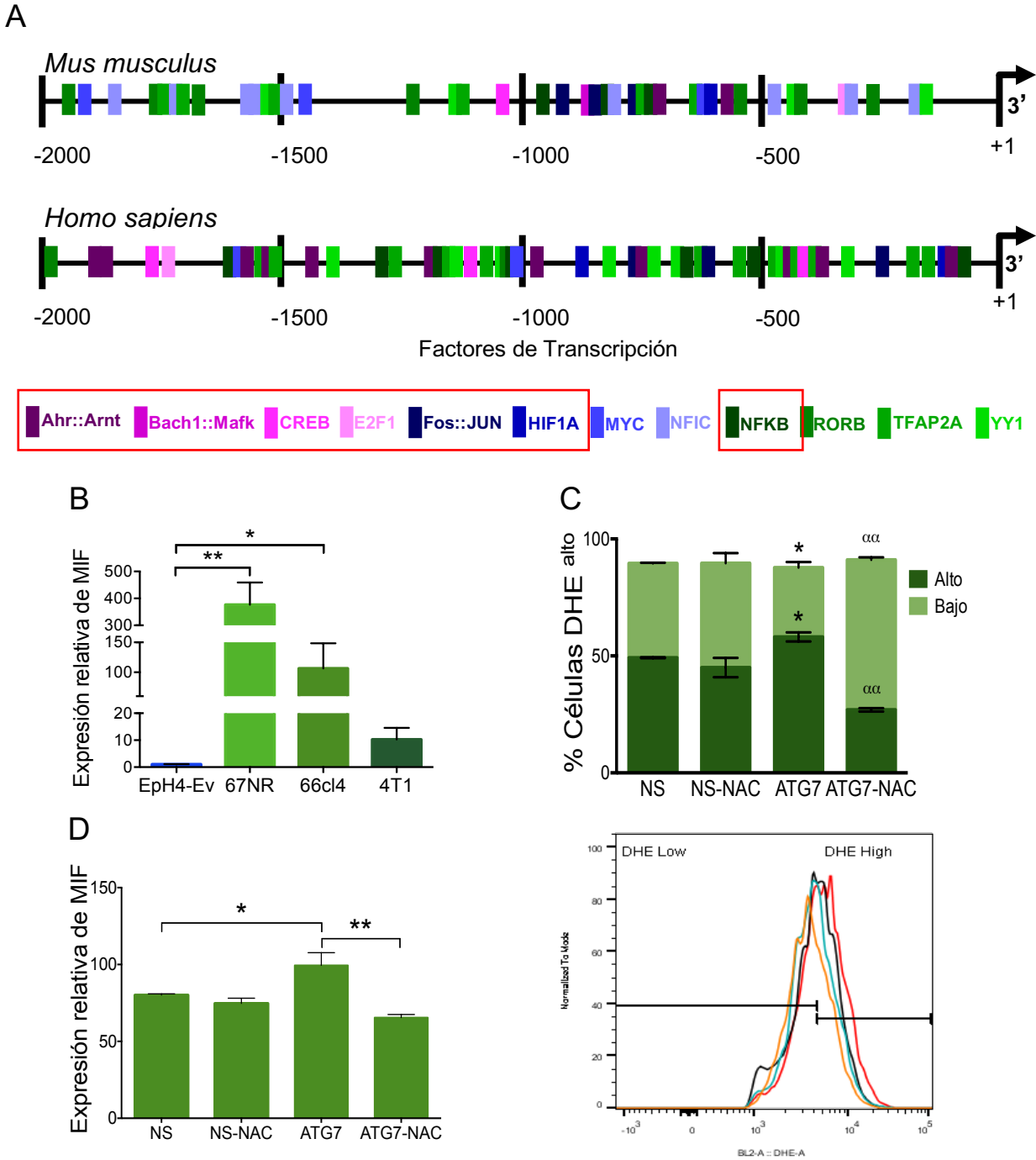
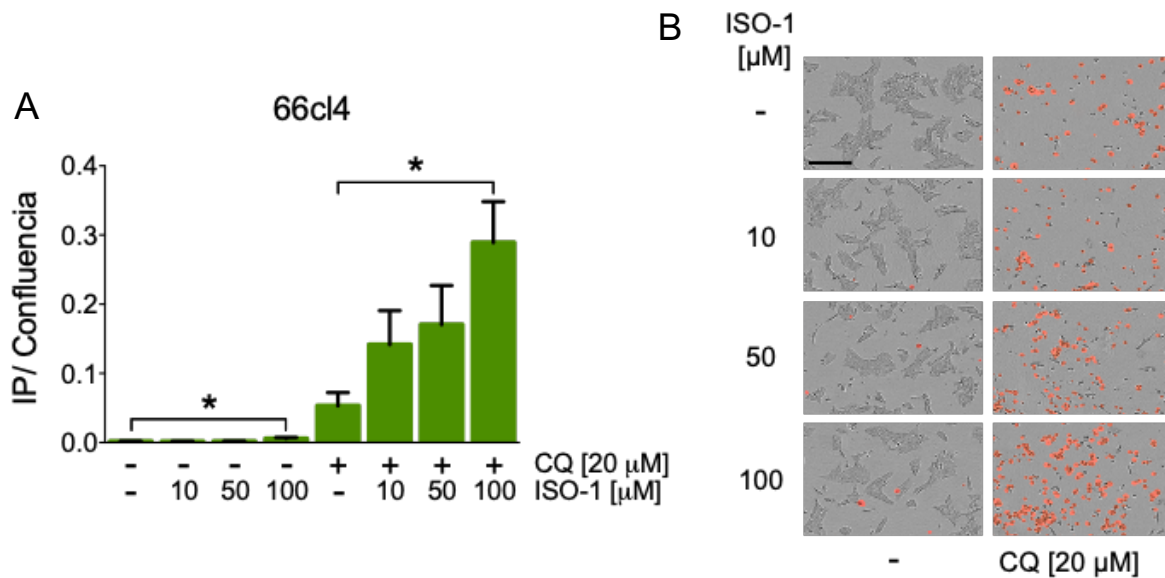


Figura 10. La inhibición genética de la autofagia induce la expresión de MIF mediada por las ERO.

Análisis de los factores de transcripción activados por las ERO (marcados en recuadro rojo) en el promotor de *MIF* de *Mus musculus* y *Homo sapiens* (A), $p < 0.05$. RT-qPCR de *MIF* en las células no tumorales y de CMTN (B). Niveles de las ERO relacionados con la expresión de MIF (C) en las células 66cl4 con inhibición de autofagia y/o ERO (D). Las gráficas muestran el promedio \pm error estándar de tres experimentos diferentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia media la sobrevida celular

Considerando que MIF activa la vía de señalización PI3K relacionada con sobrevida celular a través de su receptor CD74^{51,137}, y puesto que las células analizadas presentaron diferencias en la secreción de MIF mediada por la inhibición de la autofagia, se decidió determinar el efecto de MIF en la sobrevida de las células que lo secretan. Para esto, se utilizó el inhibidor específico de MIF a diferentes concentraciones, el cual no inhibe a los otros miembros de la familia de MIF, ISO-1¹³⁸, y actúa tanto intra como extracelularmente¹³⁸. El tratamiento con ISO-1 incrementó la muerte de las células 66cl4, y potenció la muerte inducida por el inhibidor de autofagia CQ (Figura 11 A). Sin embargo, no se observó un incremento en la muerte celular en las líneas celulares 67NR o 4T1 (Figura 11 C y D) en las mismas condiciones de tratamiento. De esta manera, se pudo observar que la inhibición de la autofagia por el uso de CQ produce un incremento de la secreción de MIF en las células 66cl4, la cual es importante como señalización autocrina de sobrevida celular.



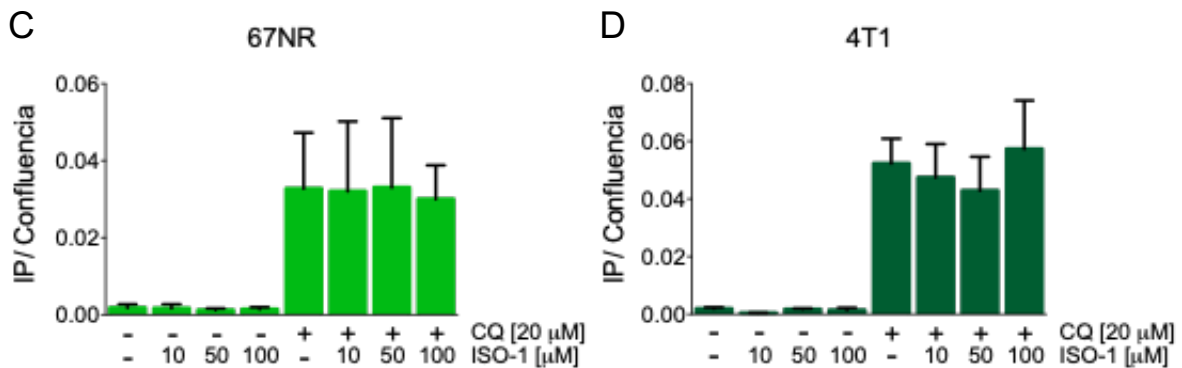


Figura 11. La inhibición de la autofagia incrementó la secreción de MIF, que promueve la sobrevivencia de manera autocrina.

El tratamiento con el inhibidor de MIF, ISO-1, incrementó la muerte de la línea celular 66cl4 cuando es usado en combinación con un tratamiento con CQ por 24 horas (A) a la concentración que se indica. Sin embargo no se observó un efecto en las células 67NR (C) y 4T1 (D). Imágenes representativas de IP donde la barra de la escala en (B) representa 200 μm. Las gráficas muestran el promedio +/- error estándar de cuatro experimentos independientes, * p < 0.05.

La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia induce la migración en las células de CMTN

Debido a que en un tumor podemos encontrar heterogeneidad celular, y como se había mencionado antes, las células 67NR, 66cl4 y 4T1 provienen del mismo tumor¹²³, evaluamos si la secreción de MIF por las células 66cl4 (que fueron las que presentaron una mayor secreción de MIF) tenía algún efecto paracrino en las células 67NR y 4T1. Para esto, recolectamos el MC de las células 66cl4 con y sin la autofagia inhibida (expresando un shRNA contra ATG7 o el NS) a 16 horas, tiempo en el cual anteriormente se había demostrado una secreción de MIF inducida por el silenciamiento de ATG7. El MC se les agregó a las células 67NR y 4T1, las cuales se habían preparado anteriormente para el ensayo de herida.

Se observó un incremento en la migración de las células 67NR y 4T1 (Figura 12 A y B) inducido por el tratamiento con el MC ATG7. Debido a que la secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia está relacionada con la producción de las ERO, se agregó NAC a las células 66cl4 durante su cultivo. El tratamiento con el NAC disminuyó considerablemente la migración de las células 67NR y 4T1 inducido por el MC ATG7 (Figura 12 D). Por otro lado, debido a que la inhibición de la autofagia también promueve la secreción de otras citocinas proinflamatorias como MCP1 o IL-6 (Figura 7), para evaluar el papel de MIF en el incremento de la migración

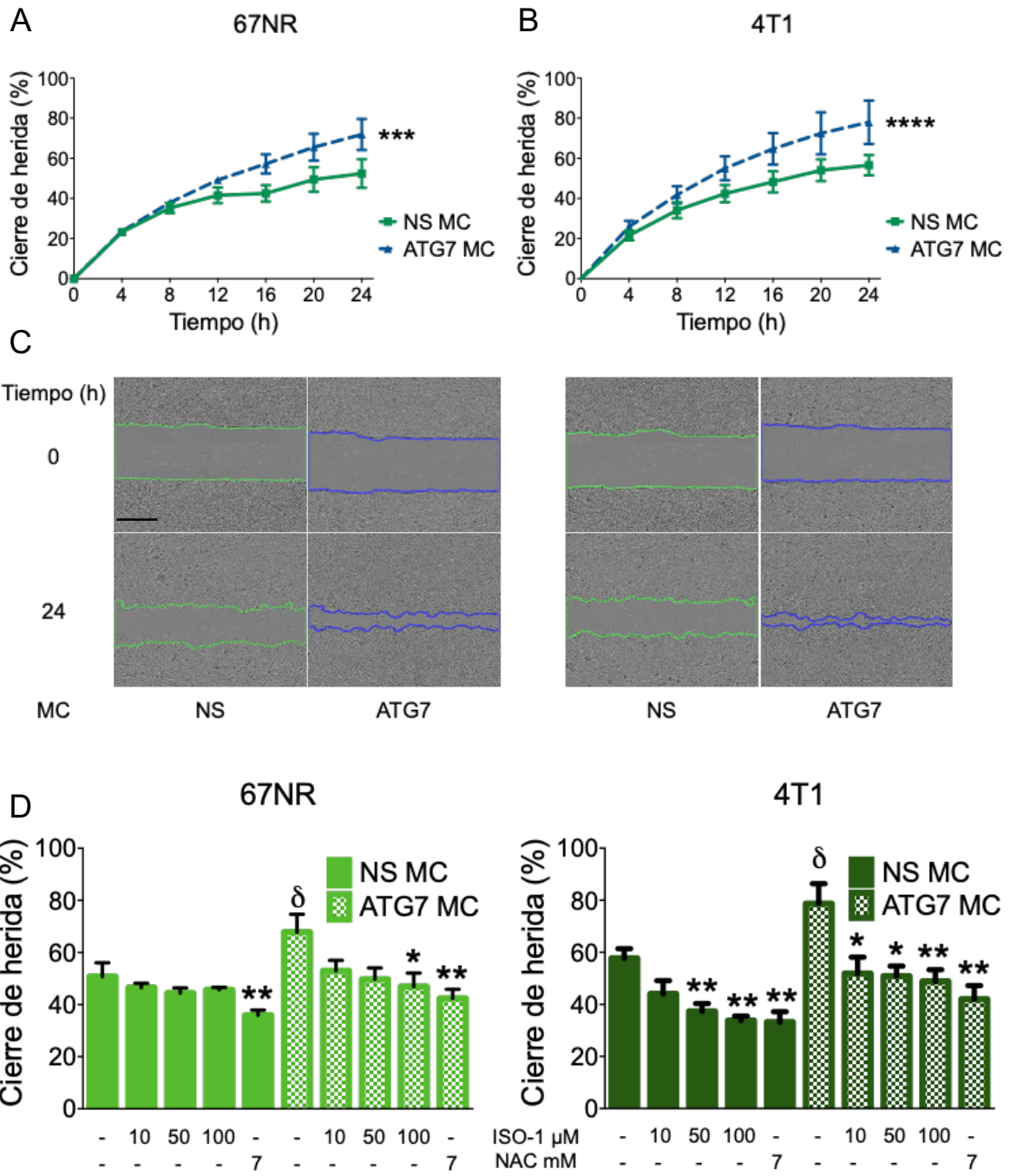
celular inducido por el MC ATG7, se utilizó el inhibidor específico de MIF, ISO-1, el cual se agregó al MC de las células 66cl4 posterior a su recolección. Se observó una disminución en la migración de las células 67NR y 4T1 al utilizar ISO-1 (Figura 12 D). Para verificar que este efecto no se deba específicamente al uso del shRNA contra ATG7, se utilizó otro shRNA contra beclin 1 (B1) obteniendo resultados similares (Figura 12 E).

En conjunto, nuestros datos demuestran que la inhibición de la autofagia en células 66cl4 incrementa la producción de las ERO, y la secreción de MIF, la cual es importante para la señalización paracrina y la inducción de migración de las células de CMTN.

Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo expresan los receptores para MIF a niveles más elevados que un control de células epiteliales

Puesto que MIF extracelular señala a través de sus diferentes receptores promoviendo sobrevida y migración ¹³², se analizaron los niveles de los receptores de MIF en las células de CMTN. Se observó que las células de CMTN presentaron mayores niveles de los receptores CD74 y CXCR2 en comparación a las células no tumorigénicas (Figura 13 A y B). Incluso, los niveles de ambos receptores se relacionaron con una mayor capacidad metastásica de las células tumorales, por lo que su expresión podría estar relacionada con la capacidad invasiva de las células analizadas.

Por el contrario, no se encontraron cambios significativos en los niveles del receptor CXCR4 entre las células no tumorales y tumorales (Figura 13 C) y sólo las células 4T1, más metastásicas, presentaron mayores niveles del receptor CXCR7 en comparación al control y a las células 66cl4 (Figura 13 D). En consecuencia, la línea celular 4T1, metastásica a diferentes órganos presentó mayor expresión de los receptores CD74, CXCR2 y CXCR7. La línea celular 66cl4, metastásica únicamente a pulmón, presentó niveles elevados de CD74 y CXCR2 al igual que las células no metastásicas 67NR, aunque en menor medida. Por lo anterior, los niveles elevados de los receptores CD74, CXCR2 y CXCR7 se relacionaron con una mayor invasividad. Se podría sugerir que la señalización de MIF se puede dar principalmente a través de los receptores CD74, CXCR2 y CXCR7 en las líneas celulares de cáncer de mama, pero no de CXCR4, relacionándose la alta expresión de el receptor CXCR7 con la mayor capacidad metastásica.



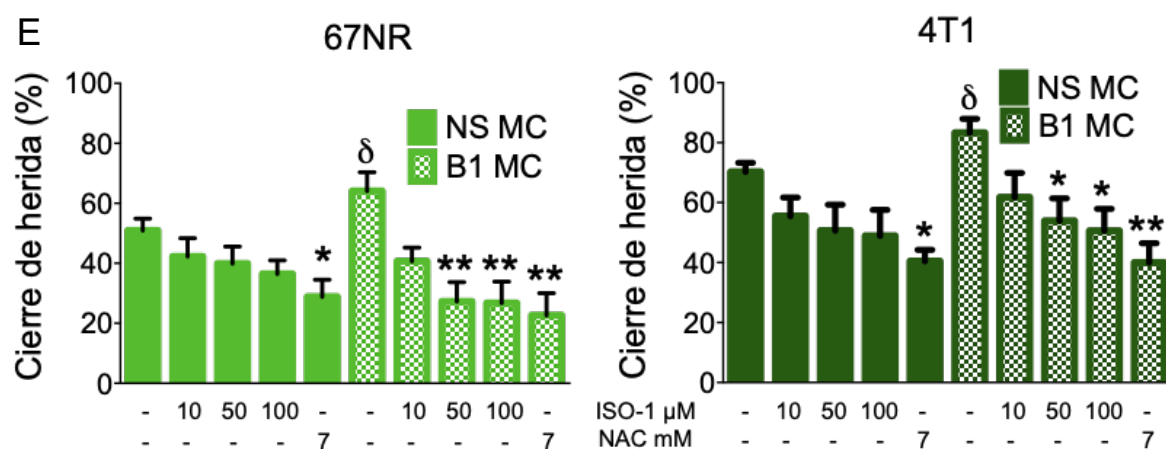


Figura 12. La secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia incrementó la migración de las células de cáncer de mama de manera paracrina.

El medio condicionado (MC) colectado de las células 66cl4 transducidas con shRNA no silenciante (NS MC) o ATG7 (ATG7 MC), fue agregado a las células 67NR (A) o 4T1 (B) para evaluar su capacidad de migración mediante el ensayo de herida. Imágenes representativas de las células 67NR o 4T1 tratadas con MC de las células 66cl4 se muestra en (C), la barra de escala en las imágenes representa 400 µm. El incremento de la migración de las células 67NR o 4T1 inducido por el MC de ATG7 se evitó con el uso de un antioxidante (NAC) o cuando se utilizó el inhibidor de MIF (ISO-1) en el MC de las células 66cl4 a las concentraciones indicadas (D), lo cual también se observó cuando se utilizó el MC de las células 66cl4 con shRNA contra beclin 1 (B1) (E). Las gráficas muestran el área cubierta por la migración de las células en los tiempos indicados o a las 24 horas (D y E). También se muestra el promedio +/- error estándar de tres o cuatro experimentos independientes, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. En (d) δ: diferente al NS MC, *: diferente de sus respectivos NS MC.

Para evaluar el efecto paracrina de MIF inducido por la inhibición de la autofagia, se decidió primero evaluar si la inhibición de la autofagia incrementaba la secreción de MIF con respecto al tiempo, para esto, se analizó la secreción de MIF a 24 y 48 horas, con el propósito de obtener una mayor concentración de MIF en el medio y poder utilizarlo como MC en experimentos posteriores. La inhibición genética de la autofagia incrementó la secreción de MIF de manera dependiente del tiempo (Figura 14 A) en células 66cl4, lo que sugiere que la secreción de MIF es un evento sostenido por lo menos 48 horas después del sembrado en condiciones de inhibición de autofagia inducida por el shRNA para ATG7.

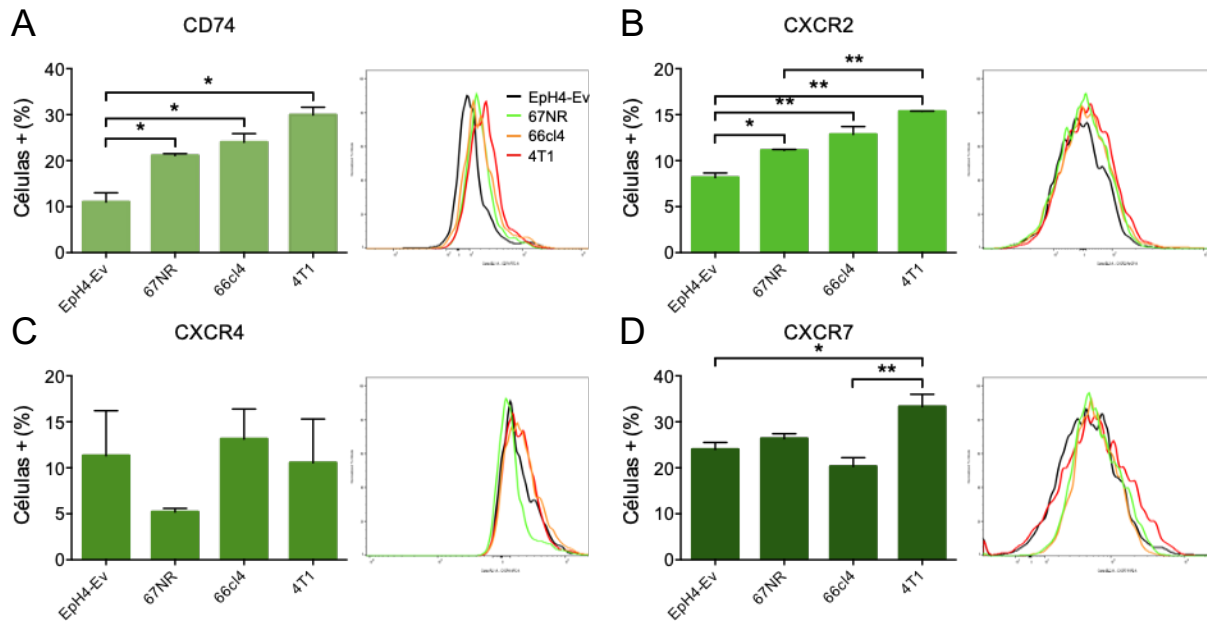


Figura 13. Las células de CMTN tienen los más altos niveles de receptores para MIF.

Los niveles de los receptores CD74 (A) y CXCR2 (B) están presentes en mayor medida en las células de CMTN con respecto a la célula no tumoral. En cuanto al receptor CXCR4 no hubo diferencia significativa entre las diferentes líneas celulares (C), además de que el receptor CXCR7 se presenta más en las células 4T1 que corresponde a la más metastásica. Cada gráfica tiene a su derecha una imagen representativa de los histogramas los cuales fueron evaluados por citometría de flujo. Las gráficas muestran el promedio +/- error estándar de tres experimentos diferentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En cuanto a las vías de señalización activadas por MIF como consecuencia de la unión a sus receptores, se analizó por WB la activación de ERK y AKT (Figura 14 B), empleando el MC NS y MC ATG7 de las células 66cl4 en las células 67NR y 4T1 +/- 100 μ M de ISO-1, tratadas por 24 horas. Se observó un incremento en la activación de la vía de Akt en las células 4T1 cuando se les trató con el MC ATG7 de las células 66cl4, la cual pudo evitarse con el uso de ISO-1. En el caso de las células 67NR, se observó un incremento en la fosforilación de ERK con el MC ATG7, el cual también se evitó con ISO-1. Estos datos muestran que MIF secretado por las células 66cl4 con la autofagia inhibida (shRNA ATG7), produjo una activación de las vías de señalización relacionadas con MIF dependiente del tipo celular y probablemente relacionada con la expresión de sus distintos receptores.

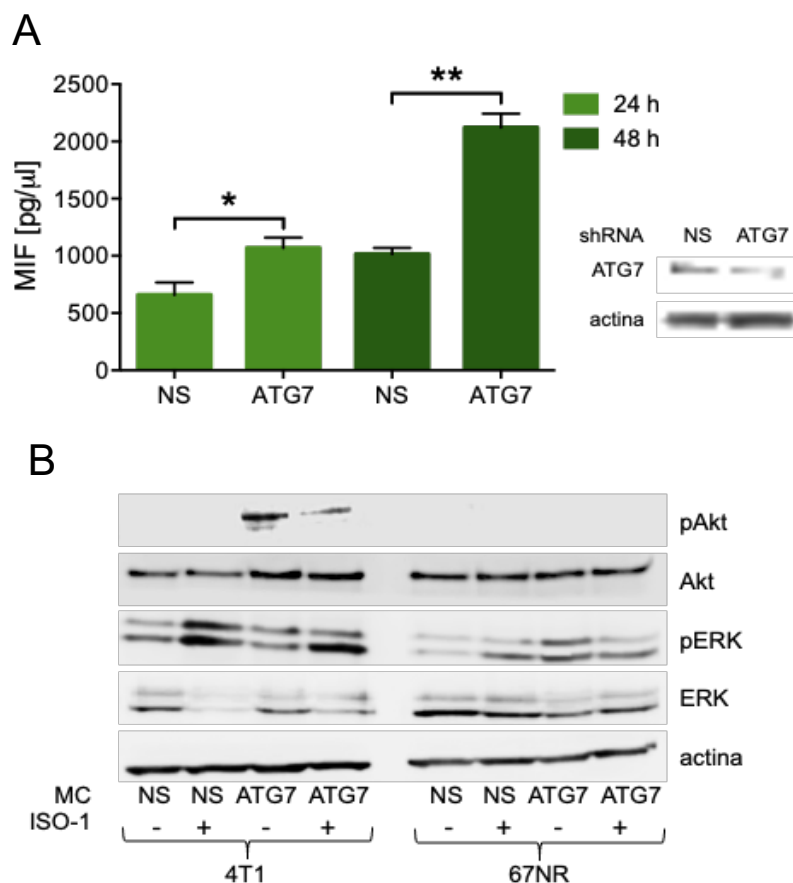


Figura 14. Efecto del medio condicionado (MC) de las células 66cl4 en las vías de señalización activadas por MIF.

(A) Cuantificación de MIF por el método de ELISA en las células 66cl4 con un shRNA no silenciante (NS) o contra *Atg7* (ATG7 shRNA). (B) *Western Blot* de Akt y ERK de las células 67NR y 4T1 tratadas con el MC de 48 horas de las células 66cl4 con y sin autofagia (NS, ATG7). Las gráficas muestran el promedio +/- error estándar de tres experimentos diferentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

La secreción de MIF mediada por la inhibición de la autofagia en las células de cáncer de mama triple negativo induce la polarización de los macrófagos hacia el tipo M1

Otro evento importante en la progresión tumoral es la participación de las células del sistema inmune. Al respecto, se ha demostrado en otros trabajos que MIF promueve el reclutamiento de las células MDSC, teniendo un efecto positivo en el tamaño del tumor y la metástasis¹⁰¹. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de MIF en la polarización de los macrófagos hacia tipo M1 y M2.

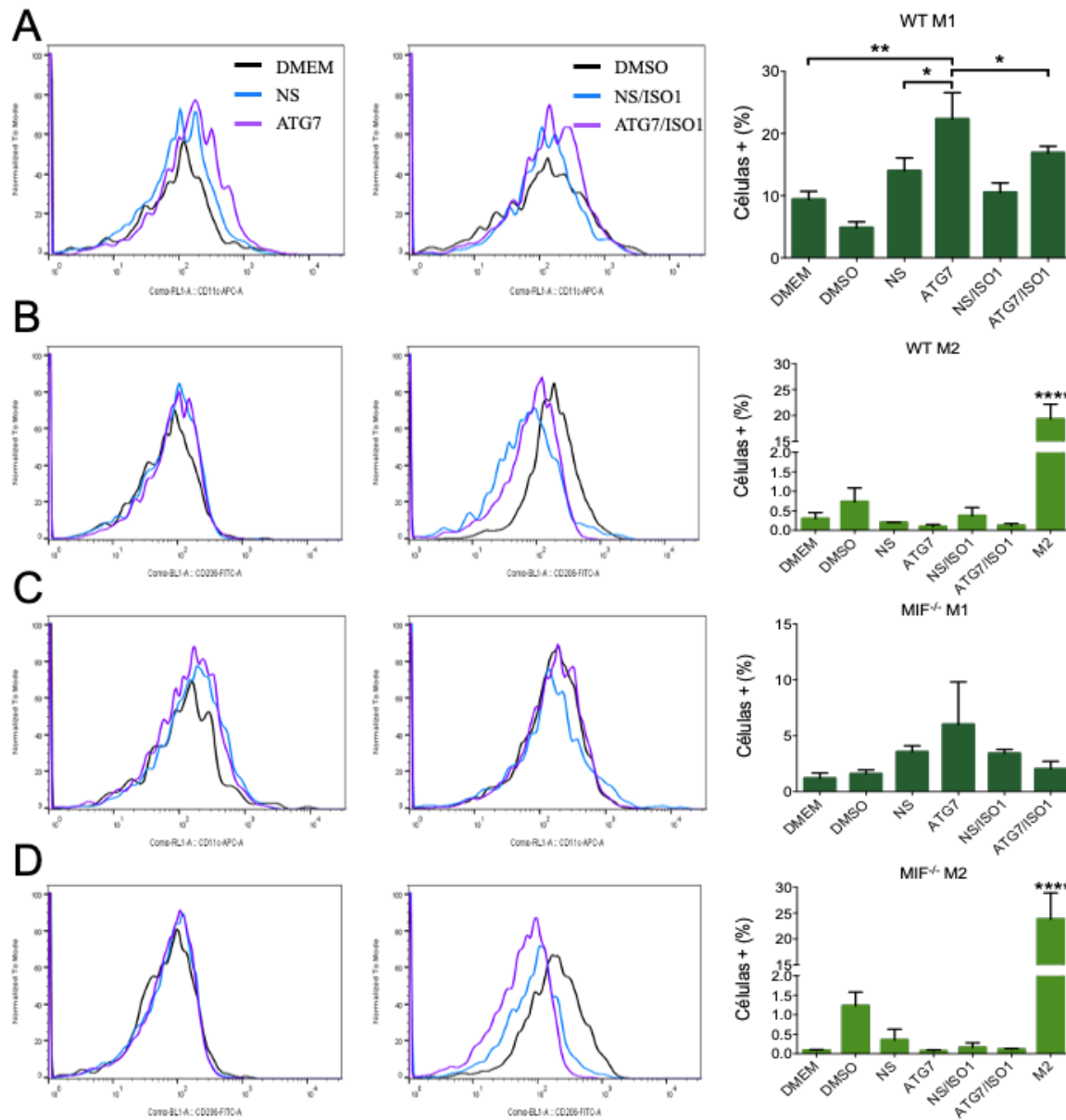


Figura 15. El MIF secretado por la inhibición de la autofagia en las células de CMTN promueve la polarización de los macrófagos hacia el tipo M1.

Análisis de la polarización de los macrófagos M1 (A y C) y M2 (B y D) en ratones control (A y B) y deficientes en MIF (MIF^{-/-}) (C y D). Histogramas representativos de los niveles de los marcadores para los macrófagos M1 (CD11c) y M2 (CD206) mediante citometría de flujo con sus respectivas gráficas las guías de colores corresponden a cada columna de gráficas. M2 en las gráficas muestran los controles de polarización. Se muestra el promedio +/- error estándar de tres experimentos diferentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Considerando lo anterior, se utilizó el MC de las células 66c14 con shRNA NS o contra ATG7, colectado durante 48 horas de cultivo (Figura 14 A). Al utilizar este MC en los macrófagos aislados de médula ósea de ratones control (WT) o deficientes de MIF (MIF^{-/-}), se determinó

que el MC ATG7 provocó una polarización de los macrófagos hacia el tipo M1 (Figura 15 A) lo cual se pudo disminuir al utilizar el inhibidor de MIF, ISO-1 (Figura 15 A). La polarización hacia M1 no se observó en los macrófagos aislados de ratones MIF^{-/-} (Figura 15 C). Es de notar que el MC ATG7 no provocó un incremento en la polarización de los macrófagos hacia el tipo M2, tanto en ratones WT como MIF^{-/-}.

Estos resultados demuestran que MIF en el medio, así como el MIF de los macrófagos, son importantes en la polarización hacia el tipo M1. Por lo tanto, la inhibición de la autofagia incrementó la secreción de MIF en las células de cáncer de mama y esta secreción indujo la polarización de macrófagos hacia el tipo M1.

Discusión

La autofagia es un mecanismo de reciclaje celular que ayuda a las células tumorales a sobrevivir a diversos tipos de estrés, como hipoxia, privación de nutrientes y anoikis^{51,54}, entre otros. Es por esto que se ha propuesto como blanco terapéutico en diferentes tipos de cáncer.

En este sentido, existen ensayos clínicos que utilizan los inhibidores de autofagia CQ e HCQ junto con quimioterapia para tratar diversos tipos de cáncer¹². Sin embargo, se ha propuesto considerar biomarcadores específicos para el uso de inhibidores de la autofagia en aquellos tipos de cáncer que se beneficiarán más con este tratamiento. Por ejemplo, se ha reportado que los tumores con alteraciones en la vía de RAS-RAF-MEK presentan mayor dependencia a la autofagia y existen estudios clínicos que utilizan inhibidores de la autofagia para tratar diferentes tipos de cáncer con mutaciones en estas vías¹³⁹.

En cuanto al cáncer de mama, se ha reportado que el CMTN es el más susceptible a la inhibición de la autofagia debido a una alta actividad de STAT3¹³. En el presente trabajo encontramos que las células que provienen del mismo tumor, pero con diferente capacidad metastásica presentaron diferente sensibilidad a la CQ. Lo anterior es un indicativo de la heterogeneidad celular intra-tumoral que confiere resistencia a diversas terapias¹⁴⁰, debido a la presencia de poblaciones celulares que pueden tener una diferente respuesta a un mismo tratamiento^{141,142}. Más aún, las tres líneas celulares de cáncer de mama que utilizamos pertenecen al subtipo de el CMTN¹²³, el cual se caracteriza por tener un mal pronóstico al presentar la mayor recurrencia y agresividad entre todos los subtipos de cáncer de mama¹²⁹. A pesar de que la inhibición

farmacológica de la autofagia con CQ en estas células inhibió su proliferación e incrementó la muerte celular, el efecto fue más evidente en las células metastásicas en comparación a las no metastásicas (Figura 5 B-D). Lo anterior posiblemente esté relacionado con los niveles de la autofagia basal, ya que las células metastásicas presentaron mayor autofagia basal (Figura 5 A). Por lo tanto, a pesar de que el CMTN es más sensible a la inhibición de la autofagia, nuestros datos sugieren que el uso de CQ en este tipo de cáncer tendrá un mayor efecto en las células con un fenotipo más invasivo.

Si bien es cierto que la inhibición de la autofagia en las células de cáncer de mama *in vitro* incrementa la muerte celular o disminuye la proliferación celular ^{13,14,143}, también son importantes los estudios de la inhibición de la autofagia en el desarrollo del cáncer de mama *in vivo* ¹⁴⁴.

En este sentido, cabe mencionar que la formación de tumores primarios en modelos singénicos involucra la inoculación ortotópica de las células tumorales (como las células 4T1) o las células transformadas que sobreexpresen algún protooncogen (como el modelo MMTV-PyMT). En el primer caso son las células tumorales ya transformadas y en el segundo caso las células están en una etapa temprana de transformación maligna. Esto es importante debido a que la inhibición farmacológica ¹⁴ y genética ¹⁴⁵ de la autofagia no provocó cambios en el crecimiento tumoral primario en el modelo 4T1. Por otro lado, la inhibición genética de la autofagia en el modelo MMTV-PyMT produce una disminución del tamaño del tumor primario ^{71,146}. Lo que indicaría que la inhibición de la autofagia es mejor en etapas tempranas del proceso tumoral o un papel de la autofagia dependiente del subtipo molecular. Debido a que un análisis de expresión génica del modelo murino MMTV-PyMT comparándolo con muestras de cáncer de mama humano se observó que comparte expresión génica similar a los tumores del tipo luminal ¹⁴⁷.

También, existen trabajos que estudian la inhibición de la autofagia y su papel en el proceso de metástasis. En este sentido, se ha observado que la respuesta al tratamiento varía. Si el uso de CQ se da como adyuvante de la cirugía, no hay cambios en la aparición de focos metastásicos comparado con el control; caso contrario al efecto de la CQ como neoadyuvante que retrasa el tiempo de aparición de metástasis ¹⁴. Lo anterior indica que la inhibición de autofagia tiene efectos en las células presentes en el tumor retrasando el proceso de metástasis y/o disminuyendo la proliferación celular ¹⁴⁶.

Lo anterior es importante debido a que la mortalidad de pacientes con cáncer de mama se debe a que las células tumorales pueden producir metástasis a diferentes órganos ¹⁴⁸. En este sentido, en un modelo de cáncer de mama de ratón MMTV-PyMT con eliminación inducible de los genes *Atg12* o *Atg5* para inhibir la autofagia, se observó un aumento en el tamaño de los focos metastásicos, sin cambios en la cantidad de los mismos, lo que indica una mayor proliferación de las células tumorales ¹⁴⁶. Sin embargo, en este mismo trabajo, el tratamiento con CQ no provocó cambios en el tamaño ni en el número de los focos metastásicos ¹⁴⁶, al igual que en el trabajo donde se emplearon las células 4T1 (CMTN) donde el uso de CQ no mostró cambios significativos en la cantidad de los focos metastásicos comparados con el control ¹⁴. En los trabajos anteriormente mencionados, las células tumorales se inocularon por la vena de la cola en ratones singénicos.

En resumen, los trabajos que estudian la relación de la autofagia con el proceso metastásico en el cáncer de mama, demuestran que la inhibición de la autofagia en las células tumorales circulantes parece no afectar su capacidad metastásica, pero si su proliferación, lo que sugiere que sería mejor inhibir la autofagia en etapas más tempranas del proceso tumoral, lo que repercute en el proceso metastásico. Además, para estos estudios se debe de considerar el modelo de cáncer de mama utilizado, el tipo de inhibición para la autofagia empleado y los parámetros que se evalúan en las diversas investigaciones.

Es importante mencionar que a pesar de la importancia de utilizar manipulación genética para inhibir específicamente la autofagia, el tratamiento que se utiliza actualmente en la clínica para este propósito es la CQ por lo que los resultados utilizando este fármaco podrían relacionarse directamente con lo que se espera de los estudios clínicos en curso. Sin embargo, se ha reportado que la inhibición de la autofagia promueve la secreción de diversas citocinas proinflamatorias como IL-6, IFN- γ , IL-1A, IL-1 β e IL-18 ³⁴. Al respecto, en un trabajo reciente, se demostró que la inhibición de la autofagia, tanto farmacológica como genética, induce la secreción de MIF en los macrófagos diferenciados con PMA, en conjunto con un estímulo inflamatorio con LPS ⁶⁷. Interesantemente, esta secreción de MIF fue disminuida con el uso del antioxidante NAC o del antioxidante mitocondrial MitoTEMPO ⁶⁷. Debido a lo anterior, resultó interesante evaluar si la inhibición de la autofagia en el cáncer de mama estaría regulando la secreción de MIF, ya que

se ha relacionado con diversos tipos de cáncer, como el de mama, colon, cerebro, ovario, cervix, vejiga, próstata, hígado y riñón ⁷⁴ como una citocina protumoral ¹⁴⁹.

Para evaluar lo anterior, empleamos dos enfoques diferentes: la inhibición farmacológica de la autofagia con la CQ (Figura 6 B) para evaluar lo que pasaría en un contexto terapéutico y la inhibición genética de la autofagia con los shRNAs dirigidos contra proteínas ATG para inhibir la autofagia de manera específica (Figura 6 C, D). En el presente trabajo, demostramos por primera vez que la inhibición de la autofagia produce un incremento de la secreción de MIF de las células de cáncer de mama ¹⁴³. Observamos que el tratamiento con el inhibidor farmacológico CQ y la inhibición genética de la autofagia, provocaron que las células 66cl4 secretaran MIF en el medio de cultivo (Figura 6 A-D).

De manera general, las células 66cl4 presentaron la mayor secreción de MIF como respuesta a la inhibición de la autofagia al compararse con las otras células de CMTN. Además, como se ha mencionado anteriormente, la inhibición de la autofagia no solo produce la secreción de MIF, sino que se ha relacionado con la secreción de otras citocinas proinflamatorias ³⁴. En este sentido, al evaluar la secreción de otras proteínas proinflamatorias como respuesta al tratamiento con la CQ, observamos un incremento en la secreción de MCP1 e IL-6, nuevamente en las células 66cl4 (Figura 7 A, B) que fueron las que presentaron una mayor secreción de MIF en respuesta a la inhibición de la autofagia. La secreción de citocinas proinflamatorias puede promover la malignidad en diversos modelos de el cáncer en general ^{39,150} y de el cáncer de mama en particular ⁵³. El incremento de la secreción de IL-6 ya se había demostrado en las células de cáncer de mama que son independientes de autofagia ⁷⁰, la cual promueve el mantenimiento troncal de las células de cáncer de mama dependientes de autofagia. Por otro lado, la secreción de MCP1 se ha relacionado con la invasividad de las células de CMTN mediante la activación de la vía de las MAPK ¹⁵¹ y también con el reclutamiento de monocitos hacia el tumor con actividad protumoral ¹⁵².

Esto podría indicar que en un tumor existen células que responden a la inhibición de la autofagia con una mayor secreción de citocinas proinflamatorias, como lo demostrado con las células 66cl4, lo que podría promover el crecimiento tumoral. Es importante mencionar que la secreción de MIF, IL-6 y MCP1 se evaluó a tiempos previos a aquellos en los que se pudo detectar daño en la membrana plasmática causada por la muerte celular. Debido a que la línea celular 66cl4 mostró la mayor sensibilidad a la inhibición de la autofagia, es posible que la secreción de MIF,

que ocurre antes de que las células mueran, represente un mecanismo de sobrevida similar a lo reportado con la proteína HMGB-1 ¹⁵³ como una forma de señalización autocrina y/o paracrina. En este sentido, se ha reportado que MIF puede activar vías de señalización de Akt y ERK relacionadas con sobrevida y migración ¹³².

Para evaluar el papel autocrino de la secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia, se realizó un experimento donde se utilizó CQ en conjunto con el inhibidor de MIF, ISO-1, en las células 66cl4, las cuales mostraron un incremento de la secreción de MIF con el tratamiento con CQ. Observamos un aumento en la muerte de las células 66cl4 con el tratamiento de ambos inhibidores al compararse con la CQ sola (Figura 11 A). De esta manera, demostramos que la secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia promovió la sobrevida celular de manera autocrina. Mientras que para determinar el efecto paracrino de la secreción de MIF inducida por la inhibición de la autofagia, se utilizó el medio condicionado (MC) de las células 66cl4 a las cuales se les inhibió la autofagia con los shRNAs contra proteínas ATG. Este MC incrementó la migración celular de las células 4T1 y 67NR a las que no se les inhibió la autofagia (Figura 12 A-C). De manera importante, este aumento en la migración se evitó con el uso del antioxidante NAC y con el inhibidor específico de MIF, ISO-1 (Figura 12 D, E).

Nuestros resultados indican que si bien es cierto que la inhibición de la autofagia produjo un incremento en la secreción de diversas proteínas proinflamatorias, la secreción de MIF tiene un papel relevante en la sobrevida y migración en las células de cáncer de mama. Lo que sugiere que el tratamiento de cáncer de mama con inhibidores de autofagia se beneficiaría con la inhibición conjunta de MIF en el tratamiento de el CMTN.

Cabe mencionar que ISO-1 es un inhibidor de MIF que se utiliza en la clínica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias ¹⁵⁴. Su mecanismo de acción involucra la unión al sitio activo de MIF, para inhibir su actividad enzimática y producir un cambio conformacional en el dominio de unión a sus receptores ¹³⁸. Por lo tanto, para evaluar si ISO-1 se une a MIF en el MC e inhibe la unión con sus receptores, evaluamos el efecto del MC de las células 66cl4 con inhibición de la autofagia en la activación de las vías de señalización de ERK y Akt en otras líneas celulares (Figura 14 B). El tratamiento con el MC indujo la fosforilación de Akt en las células 4T1 y de ERK en las células 67NR, lo que indica las citocinas secretadas como respuesta a la inhibición de la autofagia en el MC señalaron a otras líneas celulares de cáncer de manera paracrina. De

manera importante, ISO-1 disminuyó la fosforilación tanto de Akt (en las células 4T1) como de ERK (en las células 67NR) lo que sugiere que esta activación se debe a la señalización mediada por MIF.

La activación de diversas vías de señalización como respuesta a MIF posiblemente se deba al tipo de receptor que presenta cada línea celular. Al respecto, encontramos que los receptores CD74 y CXCR2 se encuentran elevados en todas las líneas celulares tumorales estudiadas con respecto a una línea celular no tumoral (Figura 13 A, B). Es de notar, que la línea celular más metastásica (4T1) presentó mayores niveles del receptor CXCR2 con respecto a la línea celular no tumoral y no metastásica, y mayores niveles del receptor CXCR7 (Figura 13 D) con respecto a la línea celular no tumoral y otra con menor grado metastásico, lo que evidencia que, entre mayor capacidad metastásica, mayor presencia de los receptores CXCR2 y CXCR7. Al respecto, la alta expresión de CXCR7 se ha asociado con un mal pronóstico en cáncer de mama y otros tipos de cáncer como el de vejiga, cervical, riñón, hígado, pulmón, páncreas, estómago y útero¹⁵⁵, además de que se ha demostrado que la expresión de este receptor en la línea celular 4T1 promueve su migración, crecimiento tumoral y metástasis⁸⁵, lo que podría hacerlo un posible blanco terapéutico.

Trabajos anteriores han estudiado la secreción de MIF en los macrófagos activados. Además, se ha reportado que MIF no es secretado por la vía clásica de secreción; retículo endoplásmico/aparato de Golgi, sino que involucra transportadores de tipo ABC de la subfamilia 1⁷⁷. Posteriormente se demostró que es necesaria la interacción de MIF con la proteína asociada a Golgi, p115, para la secreción de MIF, con la cual se secreta conjuntamente⁷⁶. Finalmente, se demostró que la inhibición de la autofagia incrementa la secreción de MIF en los macrófagos activados y puede ser inhibida con el uso de un antioxidante general, como el NAC⁶⁷.

Estos datos demostraron que el mecanismo de secreción de MIF puede ser el conjunto de diversos eventos celulares como los ya mencionados anteriormente. Con respecto a la secreción de MIF mediada por inhibición de la autofagia, se ha reportado un papel importante de la producción de las ERO, ya que en macrófagos activados el uso del antioxidante NAC y específicamente el uso de un antioxidante de las ERO mitocondriales, mitotempo, disminuyó la secreción de esta citocina⁶⁷.

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo, encontramos que el uso de NAC disminuyó la producción de las ERO mediada por la inhibición de la autofagia y a su vez, la secreción de MIF por primera vez en células tumorales (Figura 8 C,D). Lo anterior demuestra que el mecanismo por el que la inhibición de la autofagia regula la secreción de MIF involucra las ERO, y este mecanismo parece estar conservado en los macrófagos activados por LPS ⁶⁷ y en las células de cáncer de mama por lo que podría ser un mecanismo común en todas las células productoras de MIF.

Para identificar el papel de las ERO en la regulación de la secreción de MIF, se realizó un análisis *in silico* del promotor del gen de MIF y al igual que en estudios previos, encontramos sitios de unión para factores de transcripción regulados por las ERO, como NF- κ B, Fos, HIF1A¹³³, Ahr¹³⁴ CREB¹³⁵, y E2F1¹³⁶ (Figura 10 A) que podrían promover la expresión del gen en respuesta a un incremento de las ERO. Queda por identificar el o los factores de transcripción que se activan en respuesta a un aumento de las ERO y son capaces de incrementar la expresión de MIF. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que la inhibición de la autofagia incrementó la expresión del ARNm de MIF, y este aumento se evitó con el uso del antioxidante NAC (Figura 10 D). Este incremento de las ERO probablemente se debe a una acumulación de organelos dañados como mitocondrias que no estarían siendo degradadas por mitofagia como resultado de la inhibición de la autofagia ⁴⁹, lo que promueve un incremento de la transcripción de MIF y su posterior secreción.

Por lo tanto, nuestros datos demuestran por primera vez que la inhibición de la autofagia incrementa la expresión de MIF dependiente de las ERO, y que este aumento en su expresión determina el aumento en su secreción.

Otro regulador importante de la secreción de MIF es la proteína p115, asociada con el aparato de Golgi, también conocida como proteína asociada a transitos, la cual se considera esencial para el tráfico vesicular entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi ⁷⁵. En trabajos previos se ha reportado que el silenciamiento de p115 disminuye la secreción de MIF, además de que la secreción de MIF se produce en conjunto con la secreción de la proteína p115 en los macrófagos activados ⁷⁶. Nosotros encontramos que la inhibición de la autofagia produce un incremento en los niveles proteicos intracelulares de p115 a tiempos cortos (2 horas). De manera interesante, también observamos que a tiempos más largos (8 horas), los niveles de p115

disminuyeron en presencia del inhibidor de autofagia CQ (Figura 8 B), probablemente debido a una secreción conjunta de MIF con p115. Es importante mencionar que para poder evaluar el papel de la proteína p115 en la secreción de MIF, faltó realizar un silenciamiento de p115 y analizar si se afecta la secreción de MIF y en qué líneas celulares ocurre.

Debido al papel protumoral de MIF ¹⁴⁸ y a que se ha asociado con diversos tipos de cáncer ^{73,74} fue importante determinar si la expresión de MIF es un factor de pronóstico en cáncer de mama, para esto se analizó la expresión del ARNm de MIF en una base de datos de muestras de pacientes con este tipo de cáncer ¹²⁷.

Los subtipos Luminal B, HER2, y Basal, que corresponden a los subtipos de tumores que presentan una mayor proliferación, fueron los que presentaron mayores niveles de expresión de MIF (Figura 9 A), probablemente sugiriendo una relación de MIF con una alta proliferación tumoral. Sin embargo, al analizar la expresión de MIF entre niveles altos y bajos en pacientes con cáncer de mama de los diferentes subtipos de esta enfermedad, no observamos diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia (Figura 9 B), esto contrasta a lo reportado recientemente en la que la expresión de MIF es de mal pronóstico en el CMTN ¹⁰⁴. Esta discrepancia se podría deber al uso de diferentes bases de datos, al número de muestras analizadas, al corte entre altos y bajos niveles de MIF utilizados y al empleo de una clasificación diferente de cáncer de mama. Debido a que en la clasificación por inmunohistoquímica, se realiza de acuerdo al tipo de receptor que se exprese³ (receptor de estrógeno, de progesterona o el HER2), mientras que la clasificación molecular se basa en la expresión de un grupo de 50 genes⁹⁴. Esto es importante, ya que el CMTN tiene una correspondencia con el subtipo bajo en claudinas y basal del 71 y 83 %, respectivamente¹²⁹. Además, una característica del subtipo bajo en claudinas es su enriquecimiento en propiedades biológicas similares a las células troncales de mama, y el subtipo basal tiene una alta expresión en genes relacionados a proliferación celular¹²⁹. Por lo tanto, en el CMTN se estaría tomando un gran porcentaje tanto de los bajos en claudinas como de los basales, teniendo una mezcla de pacientes con características biológicas diferentes, lo que podría hacer variar los resultados de acuerdo a la clasificación de cáncer de mama empleada.

En cuanto a los niveles de proteína de MIF intracelular se ha observado que las células no invasivas tienen mayor expresión de MIF en comparación con las células invasivas de cáncer

de mama ¹⁰⁵. En este sentido, trabajos anteriores realizados en muestras de tejidos de pacientes con cáncer de mama encontraron mayores niveles citosólicos de MIF en tejido tumoral en comparación con el tejido circundante ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, los niveles de MIF en el tejido se asociaron con un menor tamaño tumoral y mejor pronóstico ¹⁰⁵, lo que sugiere que el posible efecto protector del MIF intracelular se puede deber a la acción de MIF sobre la proteína JAB1, que promueve la degradación de p53 o su propia auto-regulación ⁹¹. Por otro lado, otros trabajos han analizado el papel de MIF sérico en la progresión tumoral. En este sentido, se ha reportado una mayor cantidad de MIF en suero de pacientes con cáncer de mama en comparación con personas sin la enfermedad ^{106,107}. Por lo que se ha propuesto que MIF en suero podría tener una función importante *in vivo*, en la promoción del tumor ¹⁰⁷.

Otro aspecto importante en el cáncer es el microambiente tumoral ¹⁵⁶, donde se encuentran las células tumorales y no tumorales, como las células del sistema inmune. Al respecto, se ha observado que en un tumor se pueden encontrar células de inmunidad innata y adaptativa ¹⁰⁹ las cuales en etapas iniciales pueden suprimir la formación del tumor, mediante mecanismos como el de detectar y eliminar las células tumorales. Sin embargo, las células tumorales pueden evadir al sistema inmune por diversos mecanismos como la desregulación del MHC clase 1, lo que les permite evadir a las células T CD8⁺ ¹¹¹, la sobreexpresión de moléculas inhibitorias como PDL1 o CTLA4 ¹¹¹, la promoción de un ambiente inflamatorio que tiene una función protumoral ^{157,158}, o mediante el reclutamiento de células inmunosupresoras. Al respecto, se sabe que la expresión de MIF en las células 4T1 produce un reclutamiento de las células inmunosupresoras derivadas del tejido mieloide que ayudan al establecimiento y metástasis de células de cáncer de mama o la producción de quimiocinas importantes para el reclutamiento de las células protumorales ¹⁰¹. Otras células del sistema inmune importantes para la progresión tumoral son los macrófagos asociados con tumores ¹¹⁴. Para estudiar el efecto de la secreción de MIF en la polarización de los macrófagos, utilizamos monocitos diferenciados a partir de médula ósea de ratones control y ratones MIF^{-/-}. En ambos casos, se agregó MC de las células 66cl4 con la autofagia inhibida mediante el shRNA contra ATG7, que promueve la secreción de MIF, y para evaluar el efecto de MIF se utilizó el inhibidor ISO-1.

Nuestros datos demostraron por primera vez que la secreción de MIF dependiente de la inhibición de la autofagia en las células de cáncer de mama promueve la polarización de los

macrófagos hacia el tipo M1. Otro aspecto por resaltar fue que los macrófagos provenientes de ratones deficientes en MIF no presentaron polarización hacia el tipo M1, en comparación con los macrófagos provenientes de los ratones silvestres, lo que sugiere que el MIF proveniente de los macrófagos es importante para su polarización. En este sentido, ya se ha reportado que la adición del MIF recombinante induce mayor secreción de MIF en las células de cáncer de mama ¹⁰⁵, por lo que faltó demostrar si el MIF extracelular podría promover la secreción del MIF intracelular de los macrófagos teniendo una función aditiva a su polarización hacia el subtipo M1, lo que no ocurre en los macrófagos que no expresan MIF. Por lo tanto, tanto el MIF extracelular como intracelular de los macrófagos tienen una función importante en la polarización hacia el tipo M1, los cuales se caracterizan por la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-12, IL-23 y TNF.

A pesar de que de manera tradicional se asocia a los macrófagos tipo M2 como promotores de tumores y a los M1 como supresores de tumores, el proceso inflamatorio en el tumor también se ha asociado con efectos protumorales relacionados con un mal pronóstico en el paciente ^{73,114,159}. Al respecto, en un análisis de citocinas y quimiocinas inflamatorias como TNF α , IL-1 β , CXCL8, MCP-1 y CCL5, se observó una mayor expresión de estas citocinas en pacientes con CMTN comparados a pacientes con cáncer de mama tipo luminal A, el cual tiene mejor pronóstico que el triple negativo ¹⁶⁰. Además, en cáncer pancreático, se ha demostrado que exosomas cargados con MIF derivados del tumor primario, promueven la activación de los macrófagos alveolares y un proceso de inflamación en el sitio blanco metastásico que favorece la metástasis hacia hígado ¹⁶¹; lo que sugiere una función protumoral de MIF y de la promoción de la inflamación mediada por MIF sobre todo en etapas tardías de la progresión tumoral o que favorece el establecimiento de metástasis.

Como perspectiva, resulta importante poder evaluar en un modelo *in vivo* de cáncer de mama el efecto de la inhibición de la autofagia en conjunto con el inhibidor de MIF en el crecimiento tumoral, metástasis y la participación de células del sistema inmune en la progresión tumoral. Lo que podría indicar la importancia de la inhibición de la autofagia en conjunto con una terapia dirigida hacia MIF en el tratamiento del cáncer de mama.

Conclusiones

En este trabajo demostramos que las células metastásicas de CMTN presentaron mayor sensibilidad al uso del inhibidor de autofagia CQ en comparación con las células no metastásicas del mismo subtipo de cáncer de mama, sin embargo, la inhibición farmacológica y genética de la autofagia provocó un incremento de la secreción de MIF relacionado con un incremento de las ERO, las cuales promovieron un incremento en la expresión de MIF. De manera importante la secreción de MIF presentó efectos positivos en la sobrevida y migración de tipo autocrino y paracrino, respectivamente, relacionado con la activación de vías de señalización de ERK y Akt mediadas por la actividad de MIF. También observamos que la secreción de MIF de células de CMTN mediada por la inhibición de la autofagia polarizó a los macrófagos hacia el subtipo M1, que se caracterizan por ser de tipo proinflamatorio (Figura 16).

Debido a lo anterior y ya que se propone a la inhibición de la autofagia como posible blanco terapéutico en diversos tipos de cáncer, nuestros resultados sugieren que se debería considerar que este tratamiento también promovería la secreción de citocinas proinflamatorias del tumor, como MIF. Si bien es cierto que los niveles de expresión de MIF no tienen valor pronóstico en cáncer de mama, los niveles de sus receptores son mayores en células de el subtipo de CMTN en comparación a una célula no tumoral, lo que indicaría que las células tumorales podrían presentar una mayor respuesta al MIF secretado. De manera importante al demostrar que el incremento en la secreción de MIF promueve la polarización de los macrófagos hacia el tipo M1, que son de tipo proinflamatorio, la inflamación puede ser un evento importante en el proceso tumoral. En definitiva, la inhibición de la autofagia en el CMTN se debe considerar junto con el uso de otros fármacos como coadyuvantes, particularmente inhibidores de MIF y así mejorar el pronóstico de las pacientes.

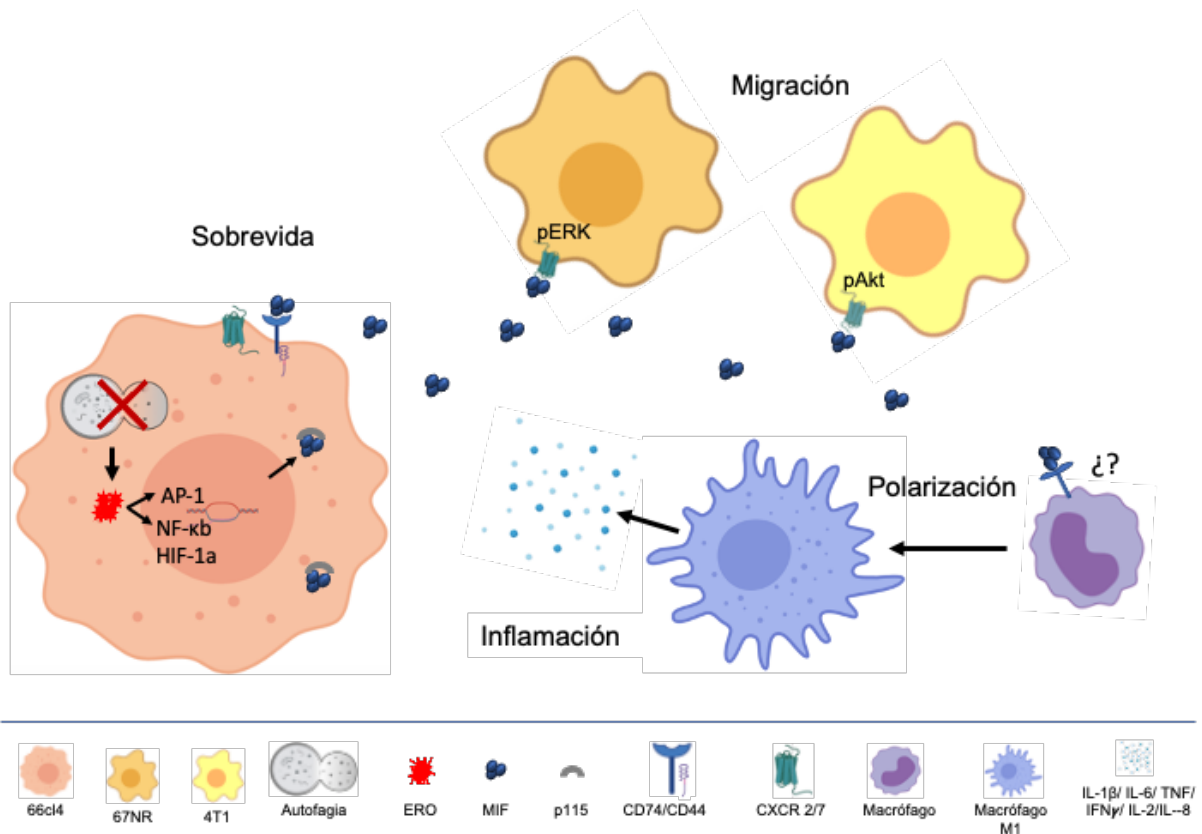


Figura 16. Papel de MIF en la progresión tumoral de cáncer de mama.

La inhibición de la autofagia en las células 66cl4 de cáncer mama triple negativo incrementa la secreción de MIF mediado por un incremento de las especies reactivas de oxígeno. Esta secreción de MIF tiene efectos autocrino de sobrevida y paracrino de migración en las células 67NR y 4T1, mediado por los receptores de MIF presentes en las líneas celulares de CMTN. Finalmente la secreción de MIF provocó la polarización de los macrófagos hacia el tipo M1 mediando una respuesta inflamatoria. Por lo que se debería considerar el uso de la cloroquina en conjunto de fármacos como el inhibidor de MIF en el tratamiento del CMTN.

Referencias

- (1) Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, B. F. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [21 December 2020].
- (2) INEGI. Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cancer de Mama. *Infocancer Mexico* **2018**, 1–13.
- (3) Russnes, H. G.; Lingjærde, O. C.; Børresen-Dale, A. L.; Caldas, C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. *American Journal of Pathology* **2017**, *187* (10), 2152–2162. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.04.022>.
- (4) Escrivá-De-Romaní, S.; Arumí, M.; Zamora, E.; Bellet, M. Neoadjuvant Model as a Platform for Research in Breast Cancer and Novel Targets under Development in This Field. *Breast Care* **2018**, *13* (4), 251–262. <https://doi.org/10.1159/000492122>.

- (5) O'Reilly, E. A.; Gubbins, L.; Sharma, S.; Tully, R.; Guang, M. H. Z.; Weiner-Gorzell, K.; McCaffrey, J.; Harrison, M.; Furlong, F.; Kell, M.; McCann, A. The Fate of Chemoresistance in Triple Negative Breast Cancer (TNBC). *BBA Clinical* **2015**, *3*, 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbaci.2015.03.003>.
- (6) Jitariu, A. A.; Cîmpean, A. M.; Ribatti, D.; Raica, M. Triple Negative Breast Cancer: The Kiss of Death. *Oncotarget* **2017**, *8* (28), 46652–46662. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16938>.
- (7) Lyons, T. G.; Traina, T. A. Emerging Novel Therapeutics in Triple-Negative Breast Cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2019; pp 377–399. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_20.
- (8) McCann, K. E.; Hurvitz, S. A.; McAndrew, N. Advances in Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Drugs* **2019**, *79* (11), 1217–1230. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01155-4>.
- (9) Bertucci, F.; Gonçalves, A. Immunotherapy in Breast Cancer: The Emerging Role of PD-1 and PD-L1. *Current Oncology Reports* **2017**, *19* (10). <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0627-0>.
- (10) Guang, M. H. Z.; Kavanagh, E. L.; Dunne, L. P.; Dowling, P.; Zhang, L.; Lindsay, S.; Bazou, D.; Goh, C. Y.; Hanley, C.; Bianchi, G.; Anderson, K. C.; O’Gorman, P.; McCann, A. Targeting Proteotoxic Stress in Cancer: A Review of the Role That Protein Quality Control Pathways Play in Oncogenesis. *Cancers*. 2019, p 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11010066>.
- (11) Weyburne, E. S.; Wilkins, O. M.; Sha, Z.; Williams, D. A.; Pletnev, A. A.; de Bruin, G.; Overkleeft, H. S.; Goldberg, A. L.; Cole, M. D.; Kisselev, A. F. Inhibition of the Proteasome B2 Site Sensitizes Triple-Negative Breast Cancer Cells to B5 Inhibitors and Suppresses Nrf1 Activation. *Cell Chemical Biology* **2017**, *24* (2), 218–230. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.12.016>.
- (12) Levy, J. M. M.; Towers, C. G.; Thorburn, A. Targeting Autophagy in Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2017**, *17* (9), 528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>.
- (13) Maycotte, P.; Gearheart, C. M.; Barnard, R.; Aryal, S.; Levy, J. M. M.; Fosmire, S. P.; Hansen, R. J.; Morgan, M. J.; Porter, C. C.; Gustafson, D. L.; Thorburn, A. STAT3-Mediated Autophagy Dependence Identifies Subtypes of Breast Cancer Where Autophagy Inhibition Can Be Efficacious. *Cancer Research* **2014**, *74* (9), 2579–2590. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3470>.
- (14) Barnard, R. A.; Regan, D. P.; Hansen, R. J.; Maycotte, P.; Thorburn, A.; Gustafson, D. L. Autophagy Inhibition Delays Early but Not Late-Stage Metastatic Disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2016**, *358* (2), 282–293. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.233908>.
- (15) Chude, C. I.; Amaravadi, R. K. Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061279>.
- (16) Jiang, P.; Mizushima, N. Autophagy and Human Diseases. *Cell Research*. 2014, pp 69–79. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.161>.
- (17) Feng, Y.; He, D.; Yao, Z.; Klionsky, D. J. The Machinery of Macroautophagy. *Cell Research* **2014**, *24* (1), 24–41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>.

- (18) Klionsky, D. J.; Eskelinen, E. L.; Deretic, V. Autophagosomes, Phagosomes, Autolysosomes, Phagolysosomes, Autophagolysosomes... Wait, I'm Confused. *Autophagy* **2014**, *10* (4), 549–551. <https://doi.org/10.4161/aut.28448>.
- (19) Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K. F. Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of Pathology* **2010**, *221* (1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>.
- (20) Rubinsztein, D. C.; Codogno, P.; Levine, B. Autophagy Modulation as a Potential Therapeutic Target for Diverse Diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, *11* (9), 709–730. <https://doi.org/10.1038/nrd3802>.
- (21) Galluzzi, L.; Pietrocola, F.; Bravo-San Pedro, J. M.; Amaravadi, R. K.; Baehrecke, E. H.; Cecconi, F.; Codogno, P.; Debnath, J.; Gewirtz, D. A.; Karantza, V.; Kimmelman, A.; Kumar, S.; Levine, B.; Maiuri, M. C.; Martin, S. J.; Penninger, J.; Piacentini, M.; Rubinsztein, D. C.; Simon, H.; Simonsen, A.; Thorburn, A. M.; Velasco, G.; Ryan, K. M.; Kroemer, G. Autophagy in Malignant Transformation and Cancer Progression. *The EMBO Journal* **2015**, *34*, 856–880. <https://doi.org/10.15252/emboj.201490784>.
- (22) Choi, A. M. K.; Ryter, S. W.; Levine, B. Autophagy in Human Health and Disease. *New England Journal of Medicine* **2013**, *368* (7), 651–662. <https://doi.org/10.1056/nejmra1205406>.
- (23) Kuma, A.; Hatano, M.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakaya, H.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y.; Tokuhiya, T.; Mizushima, N. The Role of Autophagy during the Early Neonatal Starvation Period. *Nature* **2004**, *432* (7020), 1032–1036. <https://doi.org/10.1038/nature03029>.
- (24) Yoshii, S. R.; Kuma, A.; Akashi, T.; Hara, T.; Yamamoto, A.; Kurikawa, Y.; Itakura, E.; Tsukamoto, S.; Shitara, H.; Eishi, Y.; Mizushima, N. Systemic Analysis of Atg5-Null Mice Rescued from Neonatal Lethality by Transgenic ATG5 Expression in Neurons. *Developmental Cell* **2016**, *39* (1), 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.001>.
- (25) Karsli-Uzunbas, G.; Guo, J. Y.; Price, S.; Teng, X.; Laddha, S. v.; Khor, S.; Kalaany, N. Y.; Jacks, T.; Chan, C. S.; Rabinowitz, J. D.; White, E. Autophagy Is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance. *Cancer Discovery* **2014**, *4* (8), 915–927. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0363>.
- (26) Wong, P. M.; Puente, C.; Ganley, I. G.; Jiang, X. The ULK1 Complex Sensing Nutrient Signals for Autophagy Activation. *Autophagy* **2013**, *9* (2), 124–137. <https://doi.org/10.4161/aut.23323>.
- (27) Jung, C. H.; Ro, S. H.; Cao, J.; Otto, N. M.; Kim, D. H. MTOR Regulation of Autophagy. *FEBS Letters* **2010**, *584* (7), 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>.
- (28) Geng, J.; Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 Ubiquitin-like Conjugation Systems in Macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Reports* **2008**, *9* (9), 859–864. <https://doi.org/10.1038/embo.2008.163>.
- (29) Klionsky, D. J.; Schulman, B. A. Dynamic Regulation of Macroautophagy by Distinctive Ubiquitin-like Proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* **2014**, *21* (4), 336–345. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2787>.
- (30) Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 Conjugation System in Mammalian Autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2004**, *36* (12), 2503–2518. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>.

- (31) Klionsky, D. J.; Agholme, L.; Agnello, M.; Agostinis, P.; Aguirre-ghiso, J. A.; Ahn, H. J.; Ait-mohamed, O.; Brown, E. J.; Brumell, J. H.; Brunetti-pierri, N.; Brunk, U. T.; Bulman, D. E.; Bultman, S. J.; Bultynck, G.; Burbulla, L. F.; Bursch, W.; Butchar, J. P.; Buzgariu, W.; Bydlowski, S. P.; Cadwell, K.; Cahová, M.; Cai, D.; Cai, J.; Cai, Q.; Calabretta, B.; Calvo-garrido, J.; Camougrand, N.; Campanella, M.; Campos-salinas, J.; Candi, E.; Cao, L.; Caplan, A. B.; Carding, S. R.; Cardoso, S. M.; Carew, J. S.; Carlin, C. R.; Carmignac, V.; Carneiro, L. A. M.; Carra, S.; Caruso, R. A.; Casari, G.; Casas, C.; Castino, R.; Cebollero, E.; Cecconi, F.; Celli, J.; Chaachouay, H.; Chae, H.; Chai, C.; Chan, D. C.; Chan, E. Y.; Chang, R. C.; Che, C.; Chen, C.; Chen, G.; Chen, G.; Chen, M.; Chen, Q.; Chen, S. S.; Chen, W.; Chen, X.; Chen, X.; Chen, X.; Chen, Y.; Chen, Y.; Chen, Y.; Chen, Y.; Chen, Z.; Cheng, A.; Cheng, C. H. K.; Cheng, Y.; Cheong, H.; Cheong, J.; Cherry, S.; Chess-williams, R.; Cheung, Z. H.; Chevet, E.; Chiang, H.; Chiarelli, R.; Chiba, T.; Chu, C. T.; Chuang, T.; Chueh, S.; Chun, T.; Chwae, Y.; Chye, M.; Codogno, P.; Coller, H. A.; Colombo, M. I.; Comincini, S.; Condello, M.; Condorelli, F.; Costes, S.; Coto-montes, A.; Couve, E.; Coxon, F. P.; Cregg, J. M.; Crespo, J. L.; Fésüs, L.; Feuer, R.; Figueiredo-pereira, M. E.; Fimia, G. M.; Fingar, D. C.; Finkbeiner, S. Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (4th Edition) - Table, Glossary and References. *Autophagy* **2020**. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>.
- (32) Towers, C. G.; Fitzwalter, B. E.; Regan, D.; Goodspeed, A.; Morgan, M. J.; Liu, C. W.; Gustafson, D. L.; Thorburn, A. Cancer Cells Upregulate NRF2 Signaling to Adapt to Autophagy Inhibition. *Developmental Cell* **2019**, *50* (6), 690-703.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.010>.
- (33) Mauthe, M.; Orhon, I.; Rocchi, C.; Zhou, X.; Luhr, M.; Hijlkema, K. J.; Coppes, R. P.; Engedal, N.; Mari, M.; Reggiori, F. Chloroquine Inhibits Autophagic Flux by Decreasing Autophagosome-Lysosome Fusion. *Autophagy* **2018**, *14* (8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
- (34) Cotzomi-Ortega, I.; Aguilar-Alonso, P.; Reyes-Leyva, J.; Maycotte, P. Autophagy and Its Role in Protein Secretion: Implications for Cancer Therapy. *Mediators of Inflammation* **2018**, *2018*, V. <https://doi.org/10.1155/2018/4231591>.
- (35) Kimura, T.; Jia, J.; Claude-Taupin, A.; Kumar, S.; Choi, S. W.; Gu, Y.; Mudd, M.; Dupont, N.; Jiang, S.; Peters, R.; Farzam, F.; Jain, A.; Lidke, K. A.; Adams, C. M.; Johansen, T.; Deretic, V. Cellular and Molecular Mechanism for Secretory Autophagy. *Autophagy* **2017**, *13* (6), 1084–1085. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1307486>.
- (36) Kimura, T.; Jia, J.; Kumar, S.; Choi, S. W.; Gu, Y.; Mudd, M.; Dupont, N.; Jiang, S.; Peters, R.; Farzam, F.; Jain, A.; Lidke, K. A.; Adams, C. M.; Johansen, T.; Deretic, V. Dedicated SNARE s and Specialized TRIM Cargo Receptors Mediate Secretory Autophagy . *The EMBO Journal* **2017**, *36* (1), 42–60. <https://doi.org/10.15252/embj.201695081>.
- (37) White, E. Deconvoluting the Context-Dependent Role for Autophagy in Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12* (6), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc3262>.
- (38) Thorburn, A. Autophagy and Its Effects: Making Sense of Double-Edged Swords. *PLoS Biology* **2014**, *12* (10), 10–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001967>.
- (39) Rojas-Sanchez, G.; Cotzomi-Ortega, I.; Pazos-Salazar, N. G.; Reyes-Leyva, J.; Maycotte, P. Autophagy and Its Relationship to Epithelial to Mesenchymal Transition:

- When Autophagy Inhibition for Cancer Therapy Turns Counterproductive. *Biology* **2019**, *8* (4), 71. <https://doi.org/10.3390/biology8040071>.
- (40) Hippert, M. M.; O'Toole, P. S.; Thorburn, A. Autophagy in Cancer: Good, Bad, or Both? *Cancer Research* **2006**, *66* (19), 9349–9351. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1597>.
- (41) Young, A. R. J.; Narita, M.; Ferreira, M.; Kirschner, K.; Sadaie, M.; Darot, J. F. J.; Tavaré, S.; Arakawa, S.; Shimizu, S.; Watt, F. M.; Narita, M. Autophagy Mediates the Mitotic Senescence Transition. *Genes and Development* **2009**, *23* (7), 798–803. <https://doi.org/10.1101/gad.519709>.
- (42) Saito, H.; Inazawa, J.; Saito, S.; Kasumi, F.; Koi, S.; Sagae, S.; Kudo, R.; Saito, J.; Noda, K.; Nakamura, Y. Detailed Deletion Mapping of Chromosome 17q in Ovarian and Breast Cancers: 2-CM Region on 17q21.3 Often and Commonly Deleted in Tumors. *Cancer Research* **1993**, *53* (14), 3382–3385.
- (43) Aita, V. M.; Liang, X. H.; Murty, V. V. S.; Pincus, D. L.; Yu, W.; Cayanis, E.; Kalachikov, S.; Gilliam, T. C.; Levine, B. Cloning and Genomic Organization of Beclin 1, a Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17q21. *Genomics* **1999**, *59* (1), 59–65. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5851>.
- (44) Qu, X.; Yu, J.; Bhagat, G.; Furuya, N.; Hibshoosh, H.; Troxel, A.; Rosen, J.; Eskelinen, E.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; Cattoretti, G.; Levine, B. Promotion of Tumorigenesis by Heterozygous Disruption of the Beclin 1 Autophagy Gene. **2003**, *112* (12), 1809–1820. <https://doi.org/10.1172/JCI200320039>. Introduction.
- (45) Takamura, A.; Komatsu, M.; Hara, T.; Sakamoto, A.; Kishi, C.; Waguri, S.; Eishi, Y.; Hino, O.; Tanaka, K.; Mizushima, N. Autophagy-Deficient Mice Develop Multiple Liver Tumors. *Genes and Development* **2011**, *25* (8), 795–800. <https://doi.org/10.1101/gad.2016211>.
- (46) Rosenfeldt, M. T.; O'Prey, J.; Morton, J. P.; Nixon, C.; Mackay, G.; Mrowinska, A.; Au, A.; Rai, T. S.; Zheng, L.; Ridgway, R.; Adams, P. D.; Anderson, K. I.; Gottlieb, E.; Sansom, O. J.; Ryan, K. M. P53 Status Determines the Role of Autophagy in Pancreatic Tumour Development. *Nature* **2013**, *504* (7479), 296–300. <https://doi.org/10.1038/nature12865>.
- (47) Rao, S.; Tortola, L.; Perlot, T.; Wirnsberger, G.; Novatchkova, M.; Nitsch, R.; Sykacek, P.; Frank, L.; Schramek, D.; Komnenovic, V.; Sigl, V.; Aumayr, K.; Schmauss, G.; Fellner, N.; Handschuh, S.; Glösmann, M.; Pasierbek, P.; Schleederer, M.; Resch, G. P.; Ma, Y.; Yang, H.; Popper, H.; Kenner, L.; Kroemer, G.; Penninger, J. M. A Dual Role for Autophagy in a Murine Model of Lung Cancer. *Nature Communications* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4056>.
- (48) Santana-Codina, N.; Mancias, J. D.; Kimmelman, A. C. The Role of Autophagy in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology* **2017**, *1*, 19–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-041816-122338>.
- (49) Yun, H. R.; Jo, Y. H.; Kim, J.; Shin, Y.; Kim, S. S.; Choi, T. G. Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (9), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21093289>.
- (50) Hu, Y. L.; DeLay, M.; Jahangiri, A.; Molinaro, A. M.; Rose, S. D.; Carbonell, W. S.; Aghi, M. K. Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma. *Cancer Research* **2012**, *72* (7), 1773–1783. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3831>.

- (51) Jiang, X.; Overholtzer, M.; Thompson, C. B. Autophagy in Cellular Metabolism and Cancer. *Journal of Clinical Investigation* **2015**, *125* (1), 47–54. <https://doi.org/10.1172/JCI73942>.
- (52) Fung, C.; Lock, R.; Gao, S.; Salas, E.; Debnath, J. Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Molecular Biology of the Cell* **2008**, *19*, 797–806. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1092>.
- (53) Lock, R.; Kenific, C. M.; Leidal, A. M.; Salas, E.; Debnath, J. Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion. *Cancer Discovery* **2014**, *4* (4), 466–479. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0841>.
- (54) Bousquet, G.; el Bouchtaoui, M.; Sophie, T.; Leboeuf, C.; de Bazelaire, C.; Ratajczak, P.; Giacchetti, S.; de Roquancourt, A.; Bertheau, P.; Verneuil, L.; Feugeas, J.-P.; Espié, M.; Janin, A. Oncotarget 35205 www.impactjournals.com/oncotarget Targeting Autophagic Cancer Stem-Cells to Reverse Chemoresistance in Human Triple Negative Breast Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8* (21), 35205–35221.
- (55) Guo, J. Y.; Chen, H. Y.; Mathew, R.; Fan, J.; Strohecker, A. M.; Karsli-Uzunbas, G.; Kamphorst, J. J.; Chen, G.; Lemons, J. M. S.; Karantza, V.; Coller, H. A.; DiPaola, R. S.; Gelinias, C.; Rabinowitz, J. D.; White, E. Activated Ras Requires Autophagy to Maintain Oxidative Metabolism and Tumorigenesis. *Genes and Development* **2011**, *25* (5), 460–470. <https://doi.org/10.1101/gad.2016311>.
- (56) Guo, J. Y.; Karsli-Uzunbas, G.; Mathew, R.; Aisner, S. C.; Kamphorst, J. J.; Strohecker, A. M.; Chen, G.; Price, S.; Lu, W.; Teng, X.; Snyder, E.; Santanam, U.; DiPaola, R. S.; Jacks, T.; Rabinowitz, J. D.; White, E. Autophagy Suppresses Progression of K-Ras-Induced Lung Tumors to Oncocytomas and Maintains Lipid Homeostasis. *Genes and Development* **2013**, *27* (13), 1447–1461. <https://doi.org/10.1101/gad.219642.113>.
- (57) Yang, S.; Wang, X.; Contino, G.; Liesa, M.; Sahin, E.; Ying, H.; Bause, A.; Li, Y.; Stomme, J. M.; Dell'Antonio, G.; Mautner, J.; Tonon, G.; Haigis, M.; Shirihai, O. S.; Doglioni, C.; Bardeesy, N.; Kimmelman, A. C. Pancreatic Cancers Require Autophagy for Tumor Growth. *Genes and Development* **2011**, *25* (7), 717–729. <https://doi.org/10.1101/gad.2016111>.
- (58) Levy, J. M. M.; Thompson, J. C.; Griesinger, A. M.; Amani, V.; Donson, A. M.; Birks, D. K.; Morgan, M. J.; Mirsky, D. M.; Handler, M. H.; Foreman, N. K.; Thorburn, A. Autophagy Inhibition Improves Chemosensitivity in BRAFV600E Brain Tumors. *Cancer Discovery* **2014**, *4* (7), 773–780. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0049>.
- (59) Xie, X.; Koh, J. Y.; Price, S.; White, E.; Mehnert, J. M. Atg7 Overcomes Senescence and Promotes Growth of BrafV600E-Driven Melanoma. *Cancer Discovery* **2015**, *5* (4), 410–423. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1473>.
- (60) Jiang, S.; Dupont, N.; Castillo, E. F.; Deretic, V. Secretory versus Degradative Autophagy: Unconventional Secretion of Inflammatory Mediators. *Journal of Innate Immunity* **2013**, *5* (5), 471–479. <https://doi.org/10.1159/000346707>.
- (61) Malhotra, V. Unconventional Protein Secretion: An Evolving Mechanism. *EMBO Journal*. 2013, pp 1660–1664. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.104>.
- (62) Bel, S.; Pendse, M.; Wang, Y.; Li, Y.; Ruhn, K. A.; Hassell, B.; Leal, T.; Winter, S. E.; Xavier, R. J.; Hooper, L. v. Infection of the Intestine. **2017**, *1052* (September), 1047–1052.

- (63) Chen, Y. da; Fang, Y. T.; Cheng, Y. L.; Lin, C. F.; Hsu, L. J.; Wang, S. Y.; Anderson, R.; Chang, C. P.; Lin, Y. S. Exophagy of Annexin A2 via RAB11, RAB8A and RAB27A in IFN- γ -Stimulated Lung Epithelial Cells. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06076-4>.
- (64) Dupont, N.; Jiang, S.; Pilli, M.; Ornatowski, W.; Bhattacharya, D.; Deretic, V. Autophagy-Based Unconventional Secretory Pathway for Extracellular Delivery of IL-1 β . *EMBO Journal* **2011**, *30* (23), 4701–4711. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.398>.
- (65) Harijith, A.; Ebenezer, D. L.; Natarajan, V. Reactive Oxygen Species at the Crossroads of Inflammasome and Inflammation. *Frontiers in Physiology* **2014**, *5* (September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00352>.
- (66) Nakahira, K.; Haspel, J. A.; Rathinam, V. A. K.; Lee, S. J.; Dolinay, T.; Lam, H. C.; Englert, J. A.; Rabinovitch, M.; Cernadas, M.; Kim, H. P.; Fitzgerald, K. A.; Ryter, S. W.; Choi, A. M. K. Autophagy Proteins Regulate Innate Immune Responses by Inhibiting the Release of Mitochondrial DNA Mediated by the NALP3 Inflammasome. *Nature Immunology* **2011**, *12*, 222–230. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- (67) Lee, J. P. W.; Foote, A.; Fan, H.; Peral de Castro, C.; Lang, T.; Jones, S. A.; Gavrilescu, N.; Mills, K. H. G.; Leech, M.; Morand, E. F.; Harris, J. Loss of Autophagy Enhances MIF/Macrophage Migration Inhibitory Factor Release by Macrophages. *Autophagy* **2016**, *12*, 907–916. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1164358>.
- (68) Leidal, A. M.; Huang, H. H.; Marsh, T.; Solvik, T.; Zhang, D.; Ye, J.; Kai, F. B.; Goldsmith, J.; Liu, J. Y.; Huang, Y. H.; Monkkonen, T.; Vlahakis, A.; Huang, E. J.; Goodarzi, H.; Yu, L.; Wiita, A. P.; Debnath, J. The LC3-Conjugation Machinery Specifies the Loading of RNA-Binding Proteins into Extracellular Vesicles. *Nature Cell Biology* **2020**, *22* (2), 187–199. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0450-y>.
- (69) Kraya, A. A.; Piao, S.; Xu, X.; Zhang, G.; Herlyn, M.; Gimotty, P.; Levine, B.; Amaravadi, R. K.; Speicher, D. W. Identification of Secreted Proteins That Reflect Autophagy Dynamics within Tumor Cells. *Autophagy* **2015**, *11* (1), 60–74. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984273>.
- (70) Maycotte, P.; Jones, K. L.; Goodall, M. L.; Thorburn, J.; Thorburn, A. Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion. *Molecular Cancer Research* **2015**, *13*, 651–658. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0487>.
- (71) Wei, H.; Wei, S.; Gan, B.; Peng, X.; Zou, W.; Guan, J. L. Suppression of Autophagy by FIP200 Deletion Inhibits Mammary Tumorigenesis. *Genes and Development* **2011**, *25* (14), 1510–1527. <https://doi.org/10.1101/gad.205101>.
- (72) Day, I. Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity. *153*.
- (73) Bucala, R.; Donnelly, S. C. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Probable Link between Inflammation and Cancer. *Immunity* **2007**, *26* (3), 281–285. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.005>.
- (74) Nobre, C. C. G.; de Araújo, J. M. G.; Fernandes, T. A. A. de M.; Cobucci, R. N. O.; Lanza, D. C. F.; Andrade, V. S.; Fernandes, J. V. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. *Pathology and Oncology Research* **2017**, *23* (2), 235–244. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0138-6>.
- (75) Lolis, E.; Bucala, R. Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2003**, *7* (2), 153–164. <https://doi.org/10.1517/14728222.7.2.153>.

- (76) Merk, M.; Baugh, J.; Zierow, S.; Leng, L.; Pal, U.; Lee, S. J.; Ebert, A. D.; Mizue, Y.; Trent, J. O.; Mitchell, R.; Nickel, W.; Kavathas, P. B.; Bernhagen, J.; Bucala, R. The Golgi-Associated Protein P115 Mediates the Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *The Journal of Immunology* **2009**, *182* (11), 6896–6906. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803710>.
- (77) Flieger, O.; Engling, A.; Bucala, R.; Lue, H.; Nickel, W.; Bernhagen, J. Regulated Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Mediated by a Non-Classical Pathway Involving an ABC Transporter. *FEBS Letters* **2003**, *551*, 78–86. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00900-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00900-1).
- (78) Harris, J.; VanPatten, S.; Deen, N. S.; Al-Abed, Y.; Morand, E. F. Rediscovering MIF: New Tricks for an Old Cytokine. *Trends in Immunology* **2019**, *40* (5), 447–462. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.03.002>.
- (79) Calandra, T.; Roger, T. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Regulator of Innate Immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2003, pp 791–800. <https://doi.org/10.1038/nri1200>.
- (80) Leng, L.; Metz, C. N.; Fang, Y.; Xu, J.; Donnelly, S.; Baugh, J.; Delohery, T.; Chen, Y.; Mitchell, R. A.; Bucala, R. MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *Journal of Experimental Medicine* **2003**, *197* (11), 1467–1476. <https://doi.org/10.1084/jem.20030286>.
- (81) Shi, X.; Leng, L.; Wang, T.; Wang, W.; Du, X.; Li, J.; McDonald, C.; Chen, Z.; Murphy, J. W.; Lolis, E.; Noble, P.; Knudson, W.; Bucala, R. CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex. *Immunity* **2006**, *25* (4), 595–606. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.020>.
- (82) Jankauskas, S. S.; Wong, D. W. L.; Bucala, R.; Djurdjaj, S.; Boor, P. Evolving Complexity of MIF Signaling. *Cellular Signalling* **2019**, *57* (December 2018), 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.01.006>.
- (83) Richard, V.; Kindt, N.; Decaestecker, C.; Gabius, H. J.; Laurent, G.; Noël, J. C.; Saussez, S. Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Its Receptor (CD74) in Human Breast Cancer. *Oncology Reports* **2014**, *32*, 523–529. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3272>.
- (84) Bernhagen, J.; Krohn, R.; Lue, H.; Gregory, J. L.; Zerneck, A.; Koenen, R. R.; Dewor, M.; Georgiev, I.; Schober, A.; Leng, L.; Kooistra, T.; Fingerle-Rowson, G.; Ghezzi, P.; Kleemann, R.; McColl, S. R.; Bucala, R.; Hickey, M. J.; Weber, C. MIF Is a Noncognate Ligand of CXC Chemokine Receptors in Inflammatory and Atherogenic Cell Recruitment. *Nature Medicine* **2007**, *13* (5), 587–596. <https://doi.org/10.1038/nm1567>.
- (85) Wani, N. A.; Nasser, M. W.; Ahirwar, D. K.; Zhao, H.; Miao, Z.; Shilo, K.; Ganju, R. K. C-X-C Motif Chemokine 12/C-X-C Chemokine Receptor Type 7 Signaling Regulates Breast Cancer Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Microenvironment. *Breast Cancer Research* **2014**, *16* (3), 1–17. <https://doi.org/10.1186/bcr3665>.
- (86) Sugimoto, H.; Taniguchi, M.; Nakagawa, A.; Tanaka, I.; Suzuki, M.; Nishihira, J. Crystal Structure of Human D-Dopachrome Tautomerase, a Homologue of Macrophage Migration Inhibitory Factor, at 1.54 Å Resolution. *Biochemistry* **1999**, *38* (11), 3268–3279. <https://doi.org/10.1021/bi982184o>.

- (87) Illescas, O.; Pacheco-Fernández, T.; Lalette, J. P.; Rodriguez, T.; Rodriguez-Sosa, M. Immune Modulation by the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Family: D-Dopachrome Tautomerase (DDT) Is Not (Always) a Backup System. *Cytokine* **2020**, *133* (September 2019), 155121. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155121>.
- (88) Suzuki, M.; Sugimoto, H.; Nakagawa, A. Migration Inhibitory Factor from Rat Liver. **1996**, *3* (3), 259–266.
- (89) Suzuki, M.; Sugimoto, H.; Tanaka, I.; Nishihira, J. Substrate Specificity for Isomerase Activity of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Its Inhibition by Indole Derivatives. *Journal of Biochemistry* **1997**, *122* (5), 1040–1045. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021844>.
- (90) Al-Abed, Y.; Metz, C. N.; Cheng, K. F.; Aljabari, B.; VanPatten, S.; Blau, S.; Lee, H.; Ochani, M.; Pavlov, V. A.; Coleman, T.; Meurice, N.; Tracey, K. J.; Miller, E. J. Thyroxine Is a Potential Endogenous Antagonist of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (20), 8224–8227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017624108>.
- (91) Kleemann, R.; Hausser, A.; Geiger, G.; Mischke, R.; Burger-Kentischer, A.; Flieger, O.; Johannes, F. J.; Roger, T.; Calandra, T.; Kapurniotu, A.; Grell, M.; Finkelmeier, D.; Brunner, H.; Bernhagen, J. Intracellular Action of the Cytokine MIF to Modulate AP-1 Activity and the Cell Cycle through Jab1. *Nature* **2000**, *408* (6809), 211–216. <https://doi.org/10.1038/35041591>.
- (92) Lue, H.; Thiele, M.; Franz, J.; Dahl, E.; Speckgens, S.; Leng, L.; Fingerle-Rowson, G.; Bucala, R.; Lüscher, B.; Bernhagen, J. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Promotes Cell Survival by Activation of the Akt Pathway and Role for CSN5/JAB1 in the Control of Autocrine MIF Activity. *Oncogene* **2007**, *26* (35), 5046–5059. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210318>.
- (93) Fingerle-Rowson, G.; Petrenko, O.; Metz, C. N.; Forsthuber, T. G.; Mitchell, R.; Huss, R.; Moll, U.; Müller, W.; Bucala, R. The P53-Dependent Effects of Macrophage Migration Inhibitory Factor Revealed by Gene Targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 9354–9359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533295100>.
- (94) Koboldt, D. C.; Fulton, R. S.; McLellan, M. D.; Schmidt, H.; Kalicki-Veizer, J.; McMichael, J. F.; Fulton, L. L.; Dooling, D. J.; Ding, L.; Mardis, E. R.; Wilson, R. K.; Ally, A.; Balasundaram, M.; Butterfield, Y. S. N.; Carlsen, R.; Carter, C.; Chu, A.; Chuah, E.; Chun, H. J. E.; Coope, R. J. N.; Dhalla, N.; Guin, R.; Hirst, C.; Hirst, M.; Holt, R. A.; Lee, D.; Li, H. I.; Mayo, M.; Moore, R. A.; Mungall, A. J.; Pleasance, E.; Robertson, A. G.; Schein, J. E.; Shafiei, A.; Sipahimalani, P.; Slobodan, J. R.; Stoll, D.; Tam, A.; Thiessen, N.; Varhol, R. J.; Wye, N.; Zeng, T.; Zhao, Y.; Birol, I.; Jones, S. J. M.; Marra, M. A.; Cherniack, A. D.; Saksena, G.; Onofrio, R. C.; Pho, N. H.; Carter, S. L.; Schumacher, S. E.; Tabak, B.; Hernandez, B.; Gentry, J.; Nguyen, H.; Crenshaw, A.; Ardlie, K.; Beroukhim, R.; Winckler, W.; Getz, G.; Gabriel, S. B.; Meyerson, M.; Chin, L.; Kucherlapati, R.; Hoadley, K. A.; Auman, J. T.; Fan, C.; Turman, Y. J.; Shi, Y.; Li, L.; Topal, M. D.; He, X.; Chao, H. H.; Prat, A.; Silva, G. O.; Iglesia, M. D.; Zhao, W.; Usary, J.; Berg, J. S.; Adams, M.; Booker, J.; Wu, J.; Gulabani, A.; Bodenheimer, T.; Hoyle, A. P.; Simons, J. v.; Soloway, M. G.; Mose, L. E.; Jefferys, S. R.; Balu, S.; Parker, J. S.; Hayes, D. N.; Perou, C. M.; Malik, S.; Mahurkar, S.; Shen,

H.; Weisenberger, D. J.; Triche, T.; Lai, P. H.; Bootwalla, M. S.; Maglinte, D. T.; Berman, B. P.; van den Berg, D. J.; Baylin, S. B.; Laird, P. W.; Creighton, C. J.; Donehower, L. A.; Noble, M.; Voet, D.; Gehlenborg, N.; di Cara, D.; Zhang, J.; Zhang, H.; Wu, C. J.; Yingchun Liu, S.; Lawrence, M. S.; Zou, L.; Sivachenko, A.; Lin, P.; Stojanov, P.; Jing, R.; Cho, J.; Sinha, R.; Park, R. W.; Nazaire, M. D.; Robinson, J.; Thorvaldsdottir, H.; Mesirov, J.; Park, P. J.; Reynolds, S.; Kreisberg, R. B.; Bernard, B.; Bressler, R.; Erkkila, T.; Lin, J.; Thorsson, V.; Zhang, W.; Shmulevich, I.; Ciriello, G.; Weinhold, N.; Schultz, N.; Gao, J.; Cerami, E.; Gross, B.; Jacobsen, A.; Sinha, R.; Aksoy, B. A.; Antipin, Y.; Reva, B.; Shen, R.; Taylor, B. S.; Ladanyi, M.; Sander, C.; Anur, P.; Spellman, P. T.; Lu, Y.; Liu, W.; Verhaak, R. R. G.; Mills, G. B.; Akbani, R.; Zhang, N.; Broom, B. M.; Casasent, T. D.; Wakefield, C.; Unruh, A. K.; Baggerly, K.; Coombes, K.; Weinstein, J. N.; Haussler, D.; Benz, C. C.; Stuart, J. M.; Benz, S. C.; Zhu, J.; Szeto, C. C.; Scott, G. K.; Yau, C.; Paull, E. O.; Carlin, D.; Wong, C.; Sokolov, A.; Thusberg, J.; Mooney, S.; Ng, S.; Goldstein, T. C.; Ellrott, K.; Grifford, M.; Wilks, C.; Ma, S.; Craft, B.; Yan, C.; Hu, Y.; Meerzaman, D.; Gastier-Foster, J. M.; Bowen, J.; Ramirez, N. C.; Black, A. D.; Pyatt, R. E.; White, P.; Zmuda, E. J.; Frick, J.; Lichtenberg, T. M.; Brookens, R.; George, M. M.; Gerken, M. A.; Harper, H. A.; Leraas, K. M.; Wise, L. J.; Tabler, T. R.; McAllister, C.; Barr, T.; Hart-Kothari, M.; Tarvin, K.; Saller, C.; Sandusky, G.; Mitchell, C.; Iacocca, M. v.; Brown, J.; Rabeno, B.; Czerwinski, C.; Petrelli, N.; Dolzhansky, O.; Abramov, M.; Voronina, O.; Potapova, O.; Marks, J. R.; Suchorska, W. M.; Murawa, D.; Kycler, W.; Ibbs, M.; Korski, K.; Sychala, A.; Murawa, P.; Brzeziński, J. J.; Perz, H.; Łażniak, R.; Teresiak, M.; Tatka, H.; Leporowska, E.; Bogusz-Czerniewicz, M.; Malicki, J.; Mackiewicz, A.; Wiznerowicz, M.; van Le, X.; Kohl, B.; Viet Tien, N.; Thorp, R.; van Bang, N.; Sussman, H.; Phu, B. D.; Hajek, R.; Hung, N. P.; Phuong, T. V. T.; Thang, H. Q.; Khan, K. Z.; Penny, R.; Mallery, D.; Curley, E.; Shelton, C.; Yena, P.; Ingle, J. N.; Couch, F. J.; Lingle, W. L.; King, T. A.; Gonzalez-Angulo, A. M.; Dyer, M. D.; Liu, S.; Meng, X.; Patangan, M.; Waldman, F.; Stöppler, H.; Rathmell, W. K.; Thorne, L.; Huang, M.; Boice, L.; Hill, A.; Morrison, C.; Gaudio, C.; Bshara, W.; Daily, K.; Egea, S. C.; Pegram, M. D.; Gomez-Fernandez, C.; Dhir, R.; Bhargava, R.; Brufsky, A.; Shriver, C. D.; Hooke, J. A.; Campbell, J. L.; Mural, R. J.; Hu, H.; Somiari, S.; Larson, C.; Deyarmin, B.; Kvecher, L.; Kovatich, A. J.; Ellis, M. J.; Stricker, T.; White, K.; Olopade, O.; Luo, C.; Chen, Y.; Bose, R.; Chang, L. W.; Beck, A. H.; Pihl, T.; Jensen, M.; Sfeir, R.; Kahn, A.; Chu, A.; Kothiyal, P.; Wang, Z.; Snyder, E.; Pontius, J.; Ayala, B.; Backus, M.; Walton, J.; Baboud, J.; Berton, D.; Nicholls, M.; Srinivasan, D.; Raman, R.; Girshik, S.; Kigonya, P.; Alonso, S.; Sanbhadti, R.; Barletta, S.; Pot, D.; Sheth, M.; Demchok, J. A.; Shaw, K. R. M.; Yang, L.; Eley, G.; Ferguson, M. L.; Tarnuzzer, R. W.; Zhang, J.; Dillon, L. A. L.; Buetow, K.; Fielding, P.; Ozenberger, B. A.; Guyer, M. S.; Sofia, H. J.; Palchik, J. D. Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* **2012**, *490* (7418), 61–70.
<https://doi.org/10.1038/nature11412>.

- (95) Kleemann, R.; Kapurniotu, A.; Frank, R. W.; Gessner, A.; Mischke, R.; Flieger, O.; Jüttner, S.; Brunner, H.; Bernhagen, J. Disulfide Analysis Reveals a Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) as Thiol-Protein Oxidoreductase. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *280* (1), 85–102.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1864>.

- (96) Mitchell, R. A.; Liao, H.; Chesney, J.; Fingerle-Rowsor, G.; Baugh, J.; David, J.; Bucala, R. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Sustains Macrophage Proinflammatory Function by Inhibiting P53: Regulatory Role in the Innate Immune Response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (1), 345–350. <https://doi.org/10.1073/pnas.012511599>.
- (97) Babu, S. N.; Chetal, G.; Kumar, S. Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Potential Marker for Cancer Diagnosis and Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2012**, *13* (5), 1737–1744. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.5.1737>.
- (98) Lv, W.; Chen, N.; Lin, Y.; Ma, H.; Ruan, Y.; Li, Z.; Li, X.; Pan, X.; Tian, X. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Breast Cancer Metastasis via Activation of HMGB1/TLR4/NF Kappa B Axis. *Cancer Letters* **2016**, *375* (2), 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.005>.
- (99) Chesney, J.; Metz, C.; Bacher, M.; Peng, T.; Meinhardt, A.; Bucalal, R. An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Angiogenesis and the Growth of a Murine Lymphoma. **1999**, No. 5, 181–191.
- (100) Balogh, K. N.; Templeton, D. J.; Cross, J. v. Macrophage Migration Inhibitory Factor Protects Cancer Cells from Immunogenic Cell Death and Impairs Anti-Tumor Immune Responses. *PLoS ONE* **2018**, *13* (6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197702>.
- (101) Simpson, K. D.; Templeton, D. J.; Cross, J. v; Simpson, K. D.; Templeton, D. J.; Cross, J. v. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Tumor Growth and Metastasis by Inducing Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. **2015**. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201161>.
- (102) Lang, T.; Lee, J. P. W.; Elgass, K.; Pinar, A. A.; Tate, M. D.; Aitken, E. H.; Fan, H.; Creed, S. J.; Deen, N. S.; Traore, D. A. K.; Mueller, I.; Stanisic, D.; Baiwog, F. S.; Skene, C.; Wilce, M. C. J.; Mansell, A.; Morand, E. F.; Harris, J. Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Required for NLRP3 Inflammasome Activation. *Nature Communications* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04581-2>.
- (103) Kim, M. J.; Kim, W. S.; Kim, D. O.; Byun, J. E.; Huy, H.; Lee, S. Y.; Song, H. Y.; Park, Y. J.; Kim, T. D.; Yoon, S. R.; Choi, E. J.; Ha, H.; Jung, H.; Choi, I. Macrophage Migration Inhibitory Factor Interacts with Thioredoxin-Interacting Protein and Induces NF-KB Activity. *Cellular Signalling* **2017**, *34*, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.03.007>.
- (104) Charan, M.; Das, S.; Mishra, S.; Chatterjee, N.; Varikuti, S.; Kaul, K.; Misri, S.; Ahirwar, D. K.; Satoskar, A. R.; Ganju, R. K. Macrophage Migration Inhibitory Factor Inhibition as a Novel Therapeutic Approach against Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Death and Disease* **2020**, *11* (9). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02992-y>.
- (105) Verjans, E.; Noetzel, E.; Bektas, N.; Schütz, A. K.; Lue, H.; Lennartz, B.; Hartmann, A.; Dahl, E.; Bernhagen, J. Dual Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Breast Cancer. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 230. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-230>.
- (106) Richard, V.; Kindt, N.; Saussez, S. Macrophage Migration Inhibitory Factor Involvement in Breast Cancer (Review). *International Journal of Oncology* **2015**, *47* (5), 1627–1633. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3185>.
- (107) Avalos-Navarro, G.; Muñoz-Valle, J. F.; Daneri-Navarro, A.; Quintero-Ramos, A.; Franco-Topete, R. A.; Morán-Mendoza, A. de J.; Ocegüera-Villanueva, A.; Bautista-

- Herrera, L. A.; Topete-Camacho, A.; del Toro-Arreola, A. Circulating Soluble Levels of MIF in Women with Breast Cancer in the Molecular Subtypes: Relationship with Th17 Cytokine Profile. *Clinical and Experimental Medicine* **2019**, *19* (3), 385–391. <https://doi.org/10.1007/s10238-019-00559-6>.
- (108) Xu, X.; Wang, B.; Ye, C.; Yao, C.; Lin, Y.; Huang, X.; Zhang, Y.; Wang, S. Overexpression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Angiogenesis in Human Breast Cancer. *Cancer Letters* **2008**, *261* (2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.11.028>.
- (109) Vesely, M. D.; Kershaw, M. H.; Schreiber, R. D.; Smyth, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology* **2011**, *29*, 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>.
- (110) Zhang, Y.; Zhang, Z. The History and Advances in Cancer Immunotherapy: Understanding the Characteristics of Tumor-Infiltrating Immune Cells and Their Therapeutic Implications. *Cellular and Molecular Immunology* **2020**, *17* (8), 807–821. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>.
- (111) Garner, H.; de Visser, K. E. Immune Crosstalk in Cancer Progression and Metastatic Spread: A Complex Conversation. *Nature Reviews Immunology* **2020**, *20* (8), 483–497. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0271-z>.
- (112) Otvos, B.; Silver, D. J.; Mulkearns-Hubert, E. E.; Alvarado, A. G.; Turaga, S. M.; Sorensen, M. D.; Rayman, P.; Flavahan, W. A.; Hale, J. S.; Stoltz, K.; Sinyuk, M.; Wu, Q.; Jarrar, A.; Kim, S. H.; Fox, P. L.; Nakano, I.; Rich, J. N.; Ransohoff, R. M.; Finke, J.; Kristensen, B. W.; Vogelbaum, M. A.; Lathia, J. D. Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion. *Stem Cells* **2016**, *34* (8), 2026–2039. <https://doi.org/10.1002/stem.2393>.
- (113) Mitchell, R. A.; Yaddanapudi, K. Stromal-Dependent Tumor Promotion by MIF Family Members. *Cellular Signalling* **2014**, *26* (12), 2969–2978. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.09.012>.
- (114) Chanmee, T.; Ontong, P.; Konno, K.; Itano, N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **2014**, *6* (3), 1670–1690. <https://doi.org/10.3390/cancers6031670>.
- (115) Kim, B. S.; Tilstam, P. v.; Arnke, K.; Leng, L.; Ruhl, T.; Piecychna, M.; Schulte, W.; Sauler, M.; Frueh, F. S.; Storti, G.; Lindenblatt, N.; Giovanoli, P.; Pallua, N.; Bernhagen, J.; Bucala, R. Differential Regulation of Macrophage Activation by the MIF Cytokine Superfamily Members MIF and MIF-2 in Adipose Tissue during Endotoxemia. *FASEB Journal* **2020**, *34* (3), 4219–4233. <https://doi.org/10.1096/fj.201901511R>.
- (116) Castro, B. A.; Flanigan, P.; Jahangiri, A.; Hoffman, D.; Chen, W.; Kuang, R.; Lay, M. de; Yagnik, G.; Wagner, J. R.; Mascharak, S.; Sidorov, M.; Shrivastav, S.; Kohanbash, G.; Okada, H.; Aghi, M. K. Macrophage Migration Inhibitory Factor Downregulation : A Novel Mechanism of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy. *Nature Publishing Group* **2017**, No. August 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.1>.
- (117) Wang, Q.; Wei, Y.; Zhang, J. Combined Knockdown of D-Dopachrome Tautomerase and Migration Inhibitory Factor Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion in

- Human Cervical Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* **2017**, *27* (4), 634–642. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000951>.
- (118) Merk, M.; Zierow, S.; Leng, L.; Das, R.; Du, X.; Schulte, W.; Fan, J.; Lue, H.; Chen, Y.; Xiong, H.; Chagnon, F.; Bernhagen, J.; Lolis, E.; Mor, G.; Lesur, O.; Bucala, R. The D-Dopachrome Tautomerase (DDT) Gene Product Is a Cytokine and Functional Homolog of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (34), 577–585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102941108>.
- (119) Jankauskas, S. S.; Wong, D. W. L.; Bucala, R.; Djudjaj, S.; Boor, P. Evolving Complexity of MIF Signaling. *Cellular Signalling* **2019**, *57* (December 2018), 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.01.006>.
- (120) Penticuff, J. C.; Woolbright, B. L.; Sielecki, T. M.; Weir, S. J.; Taylor, J. A. MIF Family Proteins in Genitourinary Cancer: Tumorigenic Roles and Therapeutic Potential. *Nature Reviews Urology* **2019**, *16* (5), 318–328. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0171-9>.
- (121) Aslakson, C. J.; Miller, F. R. Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. *Cancer Research* **1992**, *52* (6), 1399–1405.
- (122) Eckhardt, B. L.; Parker, B. S.; van Laar, R. K.; Restall, C. M.; Natoli, A. L.; Tavaría, M. D.; Stanley, K. L.; Sloan, E. K.; Moseley, J. M.; Anderson, R. L. Genomic Analysis of a Spontaneous Model of Breast Cancer Metastasis to Bone Reveals a Role for the Extracellular Matrix. *Molecular Cancer Research* **2005**, *3* (1), 1–13.
- (123) Lou, Y.; Preobrazhenska, O.; Auf Dem Keller, U.; Sutcliffe, M.; Barclay, L.; McDonald, P. C.; Roskelley, C.; Overall, C. M.; Dedhar, S. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Is Not Sufficient for Spontaneous Murine Breast Cancer Metastasis. *Developmental Dynamics* **2008**, *237* (10), 2755–2768. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21658>.
- (124) Kuleshov, M. v.; Jones, M. R.; Rouillard, A. D.; Fernandez, N. F.; Duan, Q.; Wang, Z.; Koplev, S.; Jenkins, S. L.; Jagodnik, K. M.; Lachmann, A.; McDermott, M. G.; Monteiro, C. D.; Gundersen, G. W.; Ma'ayan, A. Enrichr: A Comprehensive Gene Set Enrichment Analysis Web Server 2016 Update. *Nucleic acids research* **2016**, *44* (W1), W90–W97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>.
- (125) Fornes, O.; Castro-Mondragon, J. A.; Khan, A.; van der Lee, R.; Zhang, X.; Richmond, P. A.; Modi, B. P.; Correard, S.; Gheorghe, M.; Baranašić, D.; Santana-Garcia, W.; Tan, G.; Chèneby, J.; Ballester, B.; Parcy, F.; Sandelin, A.; Lenhard, B.; Wasserman, W. W.; Mathelier, A. JASPAR 2020: Update of the Open-Access Database of Transcription Factor Binding Profiles. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48* (D1), D87–D92. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>.
- (126) Sloutskin, A.; Danino, Y. M.; Orenstein, Y.; Zehavi, Y.; Doniger, T.; Shamir, R.; Juven-Gershon, T. ElementNT: A Computational Tool for Detecting Core Promoter Elements. *Transcription* **2015**, *6* (3), 41–50. <https://doi.org/10.1080/21541264.2015.1067286>.
- (127) Curtis, C.; Shah, S. P.; Chin, S.-F.; Turashvili, G.; Rueda, O. M.; Dunning, M. J.; Speed, D.; Lynch, A. G.; Samarajiwa, S.; Yuan, Y.; Gräf, S.; Ha, G.; Haffari, G.; Bashashati, A.; Russell, R.; McKinney, S.; METABRIC Group; Langerod, A.; Green, A.; Provenzano, E.; Wishart, G.; Pinder, S.; Watson, P.; Markowitz, F.; Murphy, L.;

- Ellis, I.; Purushotham, A.; Borresen-Dale, A.-L.; Brenton, J. D.; Tavaré, S.; Caldas, C.; Aparicio, S. The Genomic and Transcriptomic Architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **2012**, 486 (June), 346-352.
- (128) Dai, X.; Li, T.; Bai, Z.; Yang, Y.; Liu, X.; Zhan, J.; Shi, B. Breast Cancer Intrinsic Subtype Classification, Clinical Use and Future Trends. *American Journal of Cancer Research* **2015**, 5 (10), 2929–2943.
- (129) Prat, A.; Perou, C. M. Deconstructing the Molecular Portraits of Breast Cancer. *Molecular Oncology* **2011**, 5 (1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>.
- (130) Salas, E.; Roy, S.; Marsh, T.; Rubin, B.; Debnath, J. Oxidative Pentose Phosphate Pathway Inhibition Is a Key Determinant of Antimalarial Induced Cancer Cell Death. *Oncogene* **2016**, 35 (22), 2913–2922. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.348>.
- (131) Rakha, E. A.; Green, A. R. Molecular Classification of Breast Cancer: What the Pathologist Needs to Know. *Pathology* **2017**, 49 (2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.012>.
- (132) O'Reilly, C.; Doroudian, M.; Mawhinney, L.; Donnelly, S. C. Targeting MIF in Cancer: Therapeutic Strategies, Current Developments, and Future Opportunities. *Medicinal Research Reviews* **2016**, 36, 440–460. <https://doi.org/10.1002/med.21385>.
- (133) Hayes, J. D.; Dinkova-Kostova, A. T.; Tew, K. D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **2020**, 38 (2), 167–197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>.
- (134) Kubli, S. P.; Bassi, C.; Roux, C.; Wakeham, A.; Göbl, C.; Zhou, W.; Jafari, S. M.; Snow, B.; Jones, L.; Palomero, L.; Thu, K. L.; Cassetta, L.; Soong, D.; Berner, T.; Ramachandran, P.; Baniasadi, S. P.; Duncan, G.; Lindzen, M.; Yarden, Y.; Herranz, C.; Lazaro, C.; Chu, M. F.; Haigh, J.; Tinto, P.; Silvester, J.; Cescon, D. W.; Petit, A.; Pettersson, S.; Pollard, J. W.; Mak, T. W.; Pujana, M. A.; Cappello, P.; Gorrini, C. Ahr controls redox homeostasis and shapes the tumor microenvironment in BRCA1-associated breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci* **2019**, 116 (9), 3604-3613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815126116>
- (135) Gào, X.; Schöttker, B. Reduction-oxidation pathways in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget* **2017**, 8, 51888-51906. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17128>
- (136) Espada, L.; Meo-Evoli, N.; Sancho, P.; Real, S.; Fabregat, I.; Ambrosio, S.; Tauler, A. ROS Production Is Essential for the Apoptotic Function of E2F1 in Pheochromocytoma and Neuroblastoma Cell Lines. *PLoS One* **2012**, 7 (12), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051544>
- (137) Conroy, H.; Mawhinney, L.; Donnelly, S. C. Inflammation and Cancer: Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)-the Potential Missing Link. *Qjm* **2010**, 103 (11), 831–836. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcq148>.
- (138) Al-Abed, Y.; Dabideen, D.; Aljabari, B.; Valster, A.; Messmer, D.; Ochani, M.; Tanovic, M.; Ochani, K.; Bacher, M.; Nicoletti, F.; Metz, C.; Pavlov, V. A.; Miller, E. J.; Tracey, K. J. ISO-1 Binding to the Tautomerase Active Site of MIF Inhibits Its pro-Inflammatory Activity and Increases Survival in Severe Sepsis. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280 (44), 36541–36544. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500243200>.
- (139) Mulcahy Levy, J. M.; Thorburn, A. Autophagy in Cancer: Moving from Understanding Mechanism to Improving Therapy Responses in Patients. *Cell Death and Differentiation* **2020**, 27 (3), 843–857. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0474-7>.

- (140) Almendro, V.; Marusyk, A.; Polyak, K. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2013**, *8*, 277–302. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163923>.
- (141) Koren, S.; Bentires-Alj, M. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. *Molecular Cell* **2015**, *60* (4), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.031>.
- (142) Brooks, M. D.; Burness, M. L.; Wicha, M. S. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* **2015**, *17* (3), 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.014>.
- (143) Cotzomi-Ortega, I.; Rosas-Cruz, A.; Ramírez-Ramírez, D.; Reyes-Leyva, J.; Rodriguez-Sosa, M.; Aguilar-Alonso, P.; Maycotte, P. Autophagy Inhibition Induces the Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) with Autocrine and Paracrine Effects on the Promotion of Malignancy in Breast Cancer. *Biology* **2020**, *9* (1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/biology9010020>.
- (144) Kenific, C. M.; Thorburn, A.; Debnath, J. Autophagy and Metastasis: Another Double-Edged Sword. *Current Opinion in Cell Biology* **2010**, *22* (2), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.10.008>.
- (145) Starobinets, H.; Ye, J.; Broz, M.; Barry, K.; Goldsmith, J.; Marsh, T.; Rostker, F.; Krummel, M.; Debnath, J. Antitumor Adaptive Immunity Remains Intact Following Inhibition of Autophagy and Antimalarial Treatment. *Journal of Clinical Investigation* **2016**, *126* (12), 4417–4429. <https://doi.org/10.1172/JCI85705>.
- (146) Marsh, T.; Kenific, C. M.; Suresh, D.; Gonzalez, H.; Shamir, E. R.; Mei, W.; Tankka, A.; Leidal, A. M.; Kalavacherla, S.; Woo, K.; Werb, Z.; Debnath, J. Autophagic Degradation of NBR1 Restricts Metastatic Outgrowth during Mammary Tumor Progression. *Developmental Cell* **2020**, *52* (5), 591–604.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.025>.
- (147) Herschkowitz, J. I.; Simin, K.; Weigman, V. J.; Mikaelian, I.; Usary, J.; Hu, Z.; Rasmussen, K. E.; Jones, L. P.; Assefnia, S.; Chandrasekharan, S.; Backlund, M. G.; Yin, Y.; Khramtsov, A. I.; Bastein, R.; Quackenbush, J.; Glazer, R. I.; Brown, P. H.; Green, J. E.; Kopelovich, L.; Furth, P. A.; Palazzo, J. P.; Olopade, O. I.; Bernard, P. S.; Churchill, G. A.; Dyke, T. V.; Perou, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biology* **2007**, *8* (5), 1–17. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76>.
- (148) Schmadeka, R.; Harmon, B. E.; Singh, M. Triple-Negative Breast Carcinoma: Current and Emerging Concepts. *American Journal of Clinical Pathology* **2014**, *141* (4), 462–477. <https://doi.org/10.1309/AJCPQN8GZ8SILKGN>.
- (149) Zhang, M.; Yan, L.; Kim, J. A. Modulating Mammary Tumor Growth, Metastasis and Immunosuppression by SiRNA-Induced MIF Reduction in Tumor Microenvironment. *Cancer Gene Therapy* **2015**, *22* (10), 463–474. <https://doi.org/10.1038/cgt.2015.42>.
- (150) Landskron, G.; de La Fuente, M.; Thuwajit, P.; Thuwajit, C.; Hermoso, M. A. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research* **2014**, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/149185>.
- (151) Dutta, P.; Sarkissyan, M.; Paico, K.; Wu, Y.; Vadgama, J. v. MCP-1 Is Overexpressed in Triple-Negative Breast Cancers and Drives Cancer Invasiveness and

- Metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment* **2018**, *170* (3), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4760-8>.
- (152) Qian, B. Z.; Li, J.; Zhang, H.; Kitamura, T.; Zhang, J.; Campion, L. R.; Kaiser, E. A.; Snyder, L. A.; Pollard, J. W. CCL2 Recruits Inflammatory Monocytes to Facilitate Breast-Tumour Metastasis. *Nature* **2011**, *475* (7355), 222–225. <https://doi.org/10.1038/nature10138>.
- (153) Thorburn, J.; Horita, H.; Redzic, J.; Hansen, K.; Frankel, A. E.; Thorburn, A. Autophagy Regulates Selective HMGB1 Release in Tumor Cells That Are Destined to Die. *Cell Death and Differentiation* **2009**, *16* (1), 175–183. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.143>.
- (154) Al-Abed, Y.; VanPatten, S. MIF as a Disease Target: ISO-1 as a Proof-of-Concept Therapeutic. *Future Medicinal Chemistry*. 2011, pp 45–63. <https://doi.org/10.4155/fmc.10.281>.
- (155) Lounsbury, N. Advances in CXCR7 Modulators. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ph13020033>.
- (156) Lim, B.; Woodward, W. A.; Wang, X.; Reuben, J. M.; Ueno, N. T. Inflammatory Breast Cancer Biology: The Tumour Microenvironment Is Key. *Nature Reviews Cancer* **2018**, *18* (8), 485–499. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0010-y>.
- (157) Gonzalez, H.; Hagerling, C.; Werb, Z. Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression. *Genes and Development* **2018**, *32* (19–20), 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/GAD.314617.118>.
- (158) Gajewski, T. F.; Schreiber, H.; Fu, Y. X. Innate and Adaptive Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Nature Immunology* **2013**, *14* (10), 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>.
- (159) Hsieh, C. C.; Wang, C. H. Aspirin Disrupts the Crosstalk of Angiogenic and Inflammatory Cytokines between 4t1 Breast Cancer Cells and Macrophages. *Mediators of Inflammation* **2018**, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/6380643>.
- (160) Liubomirski, Y.; Lerrer, S.; Meshel, T.; Rubinstein-Achiasaf, L.; Morein, D.; Wiemann, S.; Körner, C.; Ben-Baruch, A. Tumor-Stroma-Inflammation Networks Promote pro-Metastatic Chemokines and Aggressiveness Characteristics in Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10* (APR), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00757>.
- (161) Costa-Silva, B.; Aiello, N. M.; Ocean, A. J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B. K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M. T.; Molina, H.; Xiang, J.; Zhang, T.; Theilen, T. M.; García-Santos, G.; Williams, C.; Ararso, Y.; Huang, Y.; Rodrigues, G.; Shen, T. L.; Latori, K. J.; Lothe, I. M. B.; Kure, E. H.; Hernandez, J.; Doussot, A.; Ebbesen, S. H.; Grandgenett, P. M.; Hollingsworth, M. A.; Jain, M.; Mallya, K.; Batra, S. K.; Jarnagin, W. R.; Schwartz, R. E.; Matei, I.; Peinado, H.; Stanger, B. Z.; Bromberg, J.; Lyden, D. Pancreatic Cancer Exosomes Initiate Pre-Metastatic Niche Formation in the Liver. *Nature Cell Biology* **2015**, *17* (6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>.