



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas y Centro de Química-Instituto
de Ciencias
Maestría en Ciencias Químicas

**“Papel de la autofagia en la liberación del factor inhibidor
de la migración de macrófagos en líneas celulares de cáncer
de mama”**

**Tesis presentada para obtener el grado de: Maestría en Ciencias
Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular**

Presenta: Johari Salgado Gallegos

Dirección de tesis
Dra. Lourdes Millán Pérez Peña
Asesora
Dra. Paola Maycotte González

Junio de 2018



El presente trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de biología celular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del IMSS con el apoyo de la beca otorgada por CONACYT No. 580975 y los fondos otorgados por los cuales se pudo llevar a cabo esta tesis: CONACYT Ciencia Básica No. 258123. Fondos IMSS R-2015-785-069 FIS/IMSS/PRI0/15/049.





A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta, Dra. Patricia Aguilar Alonso, Dra. Lilian Karen Flores Mendoza y la Dra. Paulina Cortés Hernández, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **"Papel de la autofagia en la liberación del factor inhibidor de la migración de macrófagos en líneas celulares de cáncer de mama"**, que presenta el alumno **Johari Salgado Gallegos** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los dieciocho días del mes de junio del año dos mil dieciocho.

ATENTAMENTE


Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta


Dra. Patricia Aguilar Alonso


Dra. Lilian Karen Flores Mendoza


Dra. Paulina Cortés Hernández

A mis padres y hermanos

Para los que ayudaron o estuvieron a mi lado para la realización de esta Tesis va mi breve pero sincero agradecimiento:

A las Doctoras Paola y Lourdes. Les agradezco toda la paciencia que tuvieron conmigo y el gran salto que a su lado he podido dar en mi formación profesional y también personal, porque los buenos mentores, los de verdad, nos marcan para toda la vida.

Al Dr. Julio Reyes por su valioso apoyo y las facilidades para interceder por mi en apoyos del IMSS.

A mis compañeros de Laboratorio que me acompañaron en esta etapa de formación.

Resumen

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una proteína multifuncional que tiene un papel importante en el proceso inflamatorio. MIF es secretado principalmente por células inmunes y ciertos tipos de células que participan en la regulación de la respuesta inmune. En macrófagos, la secreción de MIF se ha relacionado a la inhibición de la autofagia y a otros procesos independientes de autofagia, pero todavía no se conoce con detalle su mecanismo de secreción. En cáncer, MIF participa en diversos estados de la progresión tumoral.

En cáncer de mama en particular, se ha encontrado dependencia de autofagia de las células cancerosas de tipo triple negativo para sobrevivir. Nosotros medimos los niveles de MIF secretados por líneas celulares de cáncer de mama cuando se inhibe la autofagia con cloroquina, y se encontró por primera vez que la autofagia podría modular la secreción de MIF diferencialmente en líneas celulares de cáncer de mama de diferentes subtipos. Esta diferencia en la secreción de MIF puede tener impacto en la sobrevivencia, proliferación y en el tipo de respuesta inflamatoria en cada subtipo de cáncer.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES GENERALES	
Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF).....	4
Funciones biológicas de MIF	5
Cáncer	6
Papel de MIF en cáncer.....	7
Cáncer de mama	8
Autofagia	10
Autofagia y cáncer	13
Autofagia y secreción	15
Especies reactivas de oxígeno.....	16
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	17
HIPÓTESIS.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	18
OBJETIVOS.....	19
METODOLOGÍA	
Diagrama de flujo.....	19
Cultivo de líneas celulares.....	20
Determinación de la concentración de proteína.....	21
Western blot.....	21
Prueba de ELISA.....	22
Medición de especies reactivas de oxígeno	23
RESULTADOS	
Cultivo, mantenimiento y ensayos de proliferación de las líneas celulares.....	23
Verificación de la inhibición de la autofagia mediante la medición de niveles de LC3 por Western blot	27

Determinación de la secreción de MIF al medio de cultivo.....	28
Determinación de niveles de p115.....	29
Determinación de niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en líneas celulares de cáncer de mama.....	30
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

Abreviaturas

MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
LPS	Lipopolisacárido
COX2	Cicloxigenasa 2
PGE2	Prostaglandina E2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gamma
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
Src	Oncogen de la familia de la proteína Src
CXCR	Receptor de quimiocinas CXC
TLR	Receptor tipo Toll
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
ER	Receptores de estrógenos
TN	Triple negativo
mTOR	Blanco de rapamicina en mamíferos
AMPK	Cinasa activada por AMP
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF
FADD	Proteína Fas-asociada con dominio de muerte
IP3	Inositol trifosfato
ATG	Relacionado a la autofagia
ULK1/2	Cinasas parecida a Unc-51, homólogo mamífero de ATG1
PtdIns 3P	Fosfatidil inositol trifosfato
LC3	Proteína de cadena ligera tipo 3 relacionada a la autofagia (Atg 6)
LC3-PE	LC3 acoplada a fosfatidil etanolamina (LC3II)
UBL	Proteína tipo ubiquitina
SNARE	Receptores de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida involucradas en fusión de vesículas
UVRAG	Proteína asociada al gen de resistencia a la radiación UV
SFB	Suero bovino fetal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DHE	Dihidroetidio

1.Introducción

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una proteína multifuncional que tiene un papel importante en el proceso inflamatorio (Lue, 2002). Se describió inicialmente en sobrenadantes de linfocitos T activos, donde se demostró que éstos inhibían la migración aleatoria de macrófagos *in vitro* (Nathan et al. 1971). Después, se encontró que esta proteína se expresa en diferentes tipos celulares, incluyendo eosinófilos, células epiteliales, células endoteliales, linfocitos y macrófagos (Conroy et al. 2010). Actualmente, MIF es considerada una proteína multifuncional que activa la producción de diversas citocinas inflamatorias, como TNF- α , IL1- β , IL-6 e IFN- γ . Además, actúa como hormona inmunomoduladora en la glándula pituitaria inducida por glucocorticoides (Nobre et al. 2017).

MIF es una citocina pleiotrópica en linfocitos y macrófagos, aunque puede funcionar como un factor endócrino. Se ha demostrado que MIF tiene al menos dos actividades catalíticas, una actividad tautomerasa y una actividad oxidorreductasa (Lue et al. 2002), aunque todavía no se ha encontrado la relevancia fisiológica de éstas.

MIF también se ha relacionado con la progresión tumoral ya que está implicado en casi todas las etapas de la carcinogénesis y altos niveles de su expresión están relacionados con diversos tipos de cáncer (Babu et al. 2012). Así, las diferentes actividades biológicas de MIF contribuyen a generar un microambiente que *in vivo* favorece el crecimiento y la invasión de tumores, ya que se ha demostrado que regula negativamente la expresión de supresores de tumores y de manera positiva a factores proinflamatorios como COX-2 y la PGE2. Además, se sabe que puede inducir angiogénesis, crecimiento tumoral, proliferación e invasión (Conroy et al. 2010).

MIF es secretado principalmente por células inmunes y ciertos tipos de células que participan en la regulación de la respuesta inmune del huésped. En su secuencia proteica, MIF no tiene la señal N-terminal de ingreso al retículo endoplásmico, y el mecanismo de su secreción aún se desconoce.

En macrófagos, la secreción de MIF se asocia al estímulo por LPS y bacterias (Flieger et al. 2003) y el mecanismo parece involucrar la inhibición de la autofagia y el aumento de ERO (Gupta et al. 2016, Lee et al. 2016). En cáncer, se ha encontrado que la secreción de MIF

puede ser inducida por radiación y que las ERO juegan un papel importante para su secreción (Gupta et al. 2016).

La autofagia (macroautofagia) es la captura de componentes intracelulares mediante vesículas llamadas autofagosomas que se fusionan con el lisosoma donde se degradan y se reciclan. La autofagia puede tener dos funciones en cáncer. Puede funcionar como supresor tumoral mediante la eliminación de proteínas mal plegadas y tóxicas, así como de organelos dañados. Alternativamente, puede ser promotora de tumores en las células tumorales a través del reciclaje intracelular mediado por autofagia que proporciona nutrientes en condiciones desfavorables para el tumor (White 2012).

En cáncer de mama en particular, se ha encontrado dependencia de autofagia de las células cancerosas para sobrevivir dependiendo del subtipo de cáncer de mama, siendo las líneas celulares triple negativo las más dependientes de autofagia (Maycotte et al. 2014). Por lo anterior, se podría sugerir a la inhibición de la autofagia para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, el cual por lo general tiene un mal pronóstico y no cuenta con un tratamiento dirigido.

En este trabajo estudiamos si la inhibición de la autofagia regula la secreción de MIF en diversas líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diversos subtipos de la enfermedad. El conocer el mecanismo de secreción de MIF y si éste está regulado por autofagia en cáncer de mama, abre la posibilidad de estudiar su posible uso como blanco terapéutico.

Antecedentes

Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF)

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) fue una de las primeras citocinas identificadas y descubiertas en los años 60s. MIF se describió inicialmente como una proteína que inhibía la migración aleatoria de los macrófagos en experimentos *in vitro* (David 1966). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que MIF juega un papel pro-inflamatorio y que participa en la activación de la fagocitosis, la adherencia, la distribución y el metabolismo de los macrófagos y la proliferación de células T (Calandra et al. 2003). Por tanto, MIF es una citocina que funciona como mediador de las defensas del cuerpo en el choque séptico, enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Lue et al. 2002).

El gen de *MIF* se expresa en el cromosoma 22q11.2, codifica para un polipéptido de 12.5 kDa y la proteína consta de 115 aminoácidos (Babu et al. 2012). Mediante cristalografía se ha mostrado que la forma activa es un homotrímero de 37.5 kD y que cada monómero consiste de cuatro hélices alfa antiparalelas y 4 láminas beta (Figura 1) (Sun et al. 1996).

La expresión génica de *MIF* está regulada por dos sitios polimórficos ubicados en la región promotora. El primero consiste en una repetición CATT en la posición -794 que presenta 5-8 repeticiones, el segundo es un polimorfismo de un nucleótido G / C en la posición -173 (Babu et al. 2012). La presencia de más de 5 repeticiones de CATT y del alelo -173 C, se ha asociado con una mayor susceptibilidad y gravedad de una variedad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. También se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de próstata y cáncer gástrico (Nobre et al. 2017). MIF carece de una secuencia señal de ingreso al retículo endoplásmico por lo que se secreta por una vía secretora no convencional que aún no está bien caracterizada. En el 2009 se identificó una proteína asociada al complejo de Golgi, p115, unida a MIF en el citoplasma por medio de un ensayo de doble híbrido. Al estimular la secreción de MIF, se encontró acumulación de ambas proteínas en los sobrenadantes, lo que es consistente con la liberación de MIF de las células junto con p115. La pérdida de p115 en monocitos y macrófagos produjo disminución en la secreción de MIF pero no de otras citocinas después de la estimulación inflamatoria, por lo que se sugiere que p115 es un intermediario crítico en la secreción regulada de MIF a partir de monocitos / macrófagos (Merk et al. 2009).

p115 es una proteína de transporte vesicular, esta es una proteína de membrana periférica que esta presente entre el citosol y el aparato de Golgi. P115 esta regulada por fosforilación. p115

desfosforilada se asocia a la membrana del Golgi y se disocia tras la fosforilación. p115 es reclutado por RAS para unirse a vesículas del complejo proteico de tipo II (COPII) para formar un complejo con proteínas SNARE que promueve la selección hacia el aparato de Golgi(Sohda et al. 1998)

MIF

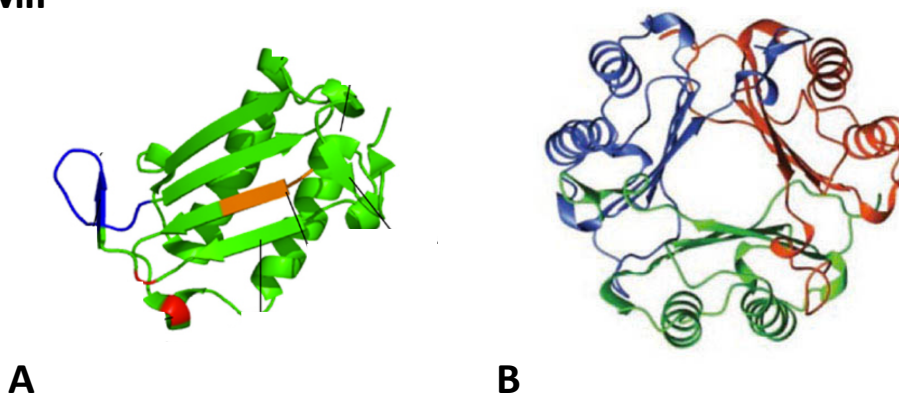


Figura 1. Estructura cristalográfica de MIF [PDB 3DJH]. A. El monómero de MIF incluye los aminoácidos 2-114. El dominio N-terminal (aminoácidos 2-5) se muestra en naranja. Cada monómero incluye dos hélices α antiparalelas y una lámina β de cuatro cadenas. B. homotrimer de MIF (Pawig et al. 2015).

Funciones biológicas de MIF

MIF es regulado positivamente por la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4) que reconoce la endotoxina lipopolisacárido (LPS) durante una infección microbiana, induciendo un aumento en la inflamación (Roger et al. 2001). Al respecto, los ratones deficientes en MIF tienen una menor respuesta inflamatoria que los ratones silvestres (Bucala et al. 2007).

MIF tiene tanto actividad tautomerasa como oxidorreductasa. La actividad tautomerasa le permite catalizar la conversión de D-dopacromo o L-dopacromo a sus derivados de indol, a través de los residuos de prolina en el residuo N-terminal que median esta actividad. Sin embargo, no se ha encontrado un sustrato endógeno para esta actividad enzimática (Lehmann et al. 2008).

MIF es una proteína multifuncional que activa la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ en respuesta a la unión con el receptor CD74 en conjunto con CD44.

MIF también se une a receptores de quimiocinas como CXCR2 y CXCR4 estimulando la quimiotaxis de leucocitos (Tillmann et al. 2013). Además de funcionar como citocina y quimiocina, funciona como una hormona, ya que es secretado junto con la hormona ACTH en la glándula pituitaria en respuesta a factores como la endotoxemia, contrarrestando la respuesta anti-inflamatoria e inmunosupresora de los glucocorticoides, y permitiendo la activación de las respuestas inflamatoria e inmune (Lerch et al. 2014 , Takahashi et al. 1998).

MIF se expresa en casi todas las células y tejidos humanos (Fagerberg et al. 2014) y su liberación se produce a partir de su almacenamiento en la célula (Calandra et al. 2003) y puede ejercer su actividad biológica en las células a través de vías de señalización celular. MIF se une al receptor CD74 junto con CD44 y Src y modula una serie de eventos que conducen a la fosforilación de ERK1/2, promoviendo la activación de proteínas efectoras de la respuesta inflamatoria (Shi et al. 2006, Bifulco et al. 2008). La unión de MIF a CD74 también activa la vía de AKT por medio de Src y PI3K, lo que conduce a diversas respuestas celulares. La activación de AKT es importante ya que permite que las células sean capaces de resistir la apoptosis debido a la fosforilación e inactivación de proteínas proapoptóticas como BAD y BAX (Lue et al. 2007). Alteraciones de las actividades biológicas de MIF están asociadas a diversas enfermedades incluyendo cáncer.

Cáncer

El cáncer inicia como una alteración celular que provoca un aumento descontrolado de células anormales que crecen de forma invasiva y se propagan a través de los tejidos, lo que perturba el funcionamiento normal del organismo. Cualquier parte del cuerpo es susceptible de verse afectada, de tal forma que existen más de 100 tipos de esta enfermedad (INEGI 2017). El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, siendo cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer colorectal, cáncer gástrico y cáncer de mama los responsables del mayor número de defunciones (Stewart et al. 2014).

Las células normales crecen y se dividen, pero tienen diversos mecanismos de control para su desarrollo, éstas sólo proliferan cuando son estimuladas por factores de crecimiento. Si están dañadas, existen mecanismos moleculares que pueden frenar la división para que sean reparadas, además de que sólo se pueden dividir un número limitado de veces. Si no pueden ser reparadas, entran en apoptosis (Hanahan et al. 2011). Todos los mecanismos de control deben

rebasarse para que una célula normal se convierta en cancerosa, y cada mecanismo es controlado por varias proteínas. Una proteína importante puede causar un mal funcionamiento en estos mecanismos que Hanahan y Weinberg han propuesto como las “características del cáncer” y son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-proliferativas, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, inducción de angiogénesis, invasión de tejidos y metástasis, reprogramación del metabolismo, evasión del sistema inmune, inestabilidad genómica e inflamación (Hanahan et al. 2011).

El origen del cáncer es multifactorial y no hay una causa directa que origine su aparición, a pesar de los avances significativos en la investigación del cáncer falta mucho por conocer sobre esta enfermedad para lograr una terapia efectiva en beneficio de los pacientes.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres y representa el 16% del total de los casos de cáncer. En México, representa el 34.3 % de los casos de cáncer en mujeres con una mortalidad de 15 defunciones por cada 100, 000 mujeres (INEGI 2016).

La mama se compone de diferentes tejidos (Figura 2), que van desde tejido graso a tejido denso. Dentro de este tejido existe una red de ductos, que se componen de diminutas estructuras llamadas lóbulos que contienen las glándulas productoras de leche. Conductos minúsculos conectan esta glándula mamaria, los cuales llevan la leche de los lóbulos al pezón, que se encuentra en medio de la aréola, que es el área más oscura que rodea al pezón. El cáncer de mama se origina por mutaciones en las células de la mama que provocan su crecimiento anormal y desordenado favoreciendo a que se puedan diseminar a otras partes del cuerpo. Debido a la estructura de las mamas, este tipo de cáncer se divide en dos tipos: ductal, cuando proviene de los conductos lactíferos y lobulillar cuando se produce en los lobulillos, estructuras donde se produce la leche materna (INEGI 2016).

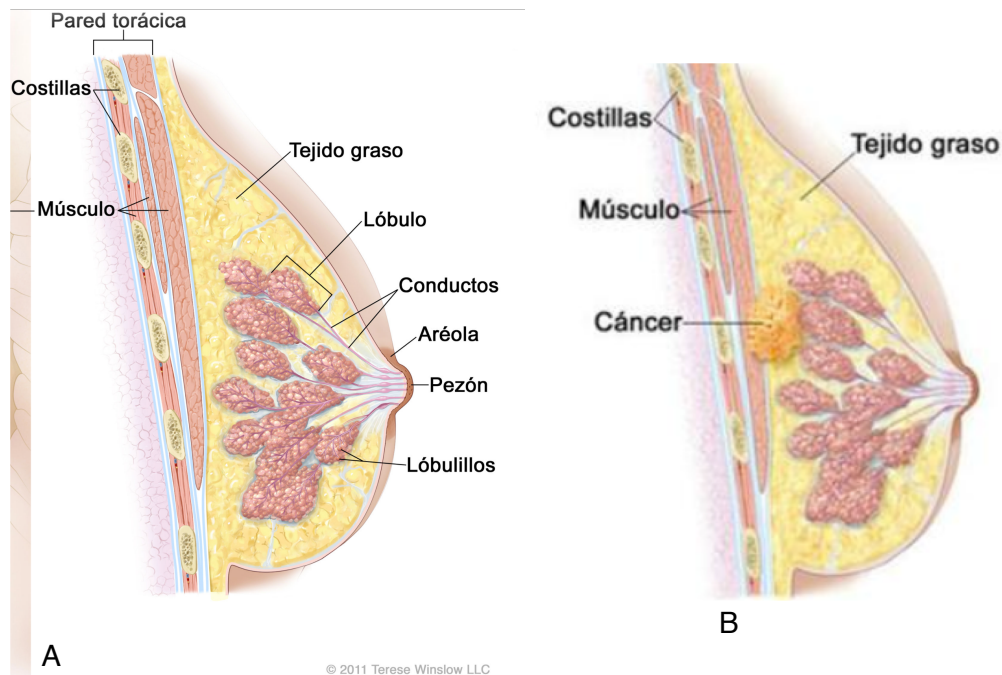


Figura 2. Estructura de la glándula mamaria. A. Normal. B. Tumor de mama (Tomado y modificado de Winslow, 2011).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que se puede clasificar utilizando una variedad de características clínicas, patológicas y genéticas. La clasificación puede ayudar en el pronóstico y la focalización del tratamiento a pacientes con subtipos específicos de la enfermedad. Actualmente, la presencia del receptor de estrógeno (ER) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano de tipo 2 (HER2) se utilizan rutinariamente como marcadores predictivos para seleccionar terapias adyuvantes específicas: Tamoxifen y taxanos para ER y Trastuzumab y lapatinib para HER2. Existe un tercer grupo de cáncer de mama que no tiene ninguno de los tipos de receptores al cual se le denomina triple negativo (TN), para el cual no existe terapia dirigida (Tabla 1) (Blows et al. 2010). Mutaciones en los genes BRCA1/2 están relacionadas al desarrollo de cáncer triple negativo (Gretchen et al. 2010). Se han desarrollado varios modelos para predecir el riesgo de portar una mutación BRCA1 o BRCA2 y desarrollar posteriormente cáncer de mama. Estos modelos generalmente incluyen información sobre la aparición y la etapa del diagnóstico de cáncer de mama y otros cánceres en individuos y sus familias. Los tumores de mama que surgen en los portadores de mutaciones

BRCA1 o BRCA2; sin embargo, también difieren entre sí, así como de los tumores esporádicos en términos de sus características patológicas (Mavaddat et al. 2010).

Sub-tipo de cáncer de mama	Características
Positivo a receptores hormonales de estrógenos y progesterona (ER+, RP+)	•60- 70 % de cánceres de mama •Sensibles a terapia hormonal con tamoxifen
Alta expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2)	•10-15% de los cánceres de mama •Terapias dirigidas al receptor (Tratuzumab, lapatinib)
Cáncer de mama triple negativo (TN)	•Aproximadamente 20% de los cánceres de mama •No responde a terapia dirigida •Tratamiento con radioterapia y quimioterapia

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama por inmunohistoquímica y sus características.

Papel de MIF en cáncer

Dado que MIF tiene un papel importante sobre la respuesta inmune inflamatoria, se ha relacionado con diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes como esclerosis múltiple, miocarditis autoinmune, artritis reumatoide y diabetes mellitus tipo 1 (Nalawade et al. 2017). Por otro lado, existe evidencia de que la inflamación tiene un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer. Es posible que MIF esté relacionado a un mayor riesgo de cáncer en enfermedad de esófago de Barrett, infección por *Helicobacter pylori*, enfermedades intestinales inflamatorias, hepatitis B o C, inflamación relacionada con la obesidad, inflamación inducida por partículas de tabaco, enfermedad celiaca, artritis reumatoide, esquistosomiasis y osteomielitis, las cuales están asociadas a un mayor riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer (Conroy et al. 2010).

En cáncer, MIF se expresa en casi todas las etapas de la malignidad de una amplia variedad de cánceres humanos (Babu et al. 2012). Las funciones biológicas de MIF tienen potencial para contribuir a modificar el microambiente *in vivo*, favoreciendo el crecimiento tumoral y la invasión. Al respecto, MIF puede tener un papel multifuncional en cáncer ya que ejerce efectos tanto autócrinos como parácrinos de regulación de la señalización intracelular de las células

cancerosas, promoviendo la proliferación celular, el crecimiento, la progresión, invasión y el escape inmune del tumor. MIF intracelularmente interactúa con p53 de una manera dependiente del estado redox de la célula, estabilizando el enlace entre p53 y Mdm2, evitando la fosforilación de p53 y evitando que realice su función (Nobre et al. 2017). También, a través de la activación del receptor CD74, MIF favorece la activación sostenida de ERK, inhibiendo el arresto celular y la apoptosis mediante la inducción de COX-2 que inhibe a p53 favoreciendo la proliferación y la diferenciación de células endoteliales, así como el crecimiento tumoral y la metástasis (Bucala and Donnelly 2007). También se ha descrito que MIF induce angiogénesis y que tiene un papel importante en la supresión de la apoptosis y la inducción de la autofagia en las células tumorales (Conroy et al. 2010).

La producción de MIF a través de señalización autócrina de las células tumorales, estimula la producción de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y angiogénicos, cuya expresión está asociada a la inhibición de la inducción de apoptosis dependiente de p53 y la activación de la respuesta inmune antitumoral (Conroy et al. 2010). Por lo tanto, se propone que MIF contribuye a la proliferación, invasión y escape inmune de las células cancerígenas para el crecimiento y la progresión del tumor (Richard et al. 2015).

Autofagia

La autofagia es un proceso de degradación lisosomal en el que la célula captura componentes citoplasmáticos para degradarlos y reutilizarlos. Hay tres tipos de autofagia en células eucariotas: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas y cada proceso es diferente entre sí. Este trabajo se centra en la macroautofagia que en lo sucesivo se denominará solamente autofagia. Este es un proceso evolutivamente conservado que ocurre de forma ubicua en todas las células eucariotas (Reggiori et al. 2002).

La autofagia está activa de forma basal para la eliminación de proteínas y organelos dañados. Sin embargo, la autofagia se puede inducir como respuesta celular a diversas condiciones de estrés, como la privación de nutrientes, el calor y el estrés oxidativo. También desempeña un papel importante en el desarrollo y la diferenciación celular (Levine et al. 2004).

El proceso de autofagia comienza con la formación de una membrana que se denomina fagóforo que probablemente se deriva de la membrana del retículo endoplásmico (ER), endosomas y/o el aparato de Golgi (Klionsky 2007). El origen del fagóforo en mamíferos no está muy claro, se

sabe que se expande para envolver el material citoplasmático como proteínas agregadas y también organelos dañados. Una vez que los materiales citoplasmáticos quedan secuestrados en esta estructura de doble membrana se le denomina autofagosoma. El autofagosoma madura fusionándose con el lisosoma, provocando la degradación del contenido del autofagosoma. Permeasas y transportadores lisosomales exportan aminoácidos y otros subproductos de la degradación hacia el citoplasma donde podrán ser reutilizados (Glick et al. 2010, Mizushima 2007).

En levaduras, los genes que codifican para las proteínas involucradas en la autofagia se denominan *ATG* y cuentan con genes ortólogos en plantas y mamíferos (Mizushima 2007). A nivel molecular, este proceso está regulado por proteínas relacionadas a la autofagia o proteínas ATG.

La inanición es uno de los estímulos más típicos para inducir autofagia ya que se sabe que la falta de cualquier tipo de nutriente esencial puede inducir autofagia. En levaduras, se ha encontrado que la falta de nitrógeno es el estímulo más potente. Sin embargo, la falta de otros nutrientes como fuentes de carbono, aminoácidos e incluso sulfato pueden inducir autofagia, pero con menor eficiencia (Mizushima 2007).

La autofagia es regulada por un sistema altamente organizado; *in vivo* es regulada principalmente por la insulina. Así, la autofagia hepática es suprimida por la insulina y potenciada por el glucagon (Klionsky 2007, Mizushima 2007). Otras hormonas, factores de crecimiento y señales de privación de nutrientes parecen contribuir también a la regulación de la autofagia. La privación de suero puede inducir autofagia en muchos tipos de cultivos celulares. La falta de aminoácidos y la señalización por insulina convergen en la proteína mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos), la cual es un regulador de la señalización de nutrientes. Los tratamientos con inhibidores de mTOR como la rapamicina inducen autofagia (Mizushima 2007). Además de la señalización de insulina y aminoácidos, también participan otros factores en la regulación de la autofagia, incluyendo a Bcl-2, las especies reactivas de oxígeno (ERO), AMPK, p19 ARF, DRAM, calpaína, TRAIL, FADD e IP3 (Mizushima 2007).

La proteína mTOR y la cinasa AMPK regulan la autofagia a través de la fosforilación de la proteína cinasa ULK 1 y 2. Un estímulo de inducción de autofagia da como resultado la desfosforilación y activación de ULK. ULK es un complejo de proteínas formado por ATG13, ATG10 y FIP200. ULK fosforila y activa a *beclin-1* iniciando así el proceso de nucleación. Este

complejo formado por *beclin-1* contiene a p150, ATG14, y VPS34 (una PI3K de clase III) y se ubica en el sitio de iniciación de formación del fagóforo (Figura 3) (Tanida 2011).

Una vez iniciada la nucleación, VPS34 ayuda a la formación de fosfatidilinositol 3 fosfato (PtdIns3P) en la superficie del fagóforo y sirve como punto de anclaje para proteínas con dominios de unión a PtdIns3P. WIPI se une a ATG16L1 cuando se une al complejo ATG5-12, este complejo tiene actividad enzimática de tipo ligasa E3 del complejo de ubiquitinación. La unión de ATG16 con WIPI2 recluta a ATG5-12 al fagóforo y regula su actividad (Figura 4) (Mizushima 2007).

La biogénesis de los autofagosomas es regulada por dos sistemas denominados UBL (sistema tipo ubiquitina). El primer sistema conjuga ATG5 con ATG12, formando el complejo ATG5-ATG12 y se une a ATG16L1 para formar el complejo tipo E3 que forma parte del segundo sistema de conjugación UBL. Este complejo se une y activa a ATG3 que cataliza la unión covalente de LC3 con fosfatidiletanolamina (LC3-PE) y la recluta a lo largo de la superficie de la membrana de los autofagosomas (Mizushima 2007). El complejo LC3-PE permite el acoplamiento de proteínas adaptadoras específicas como p62 que se unen a proteínas ubiquitinadas que no se degradan por el proteasoma (Mizushima 2007, White 2012).

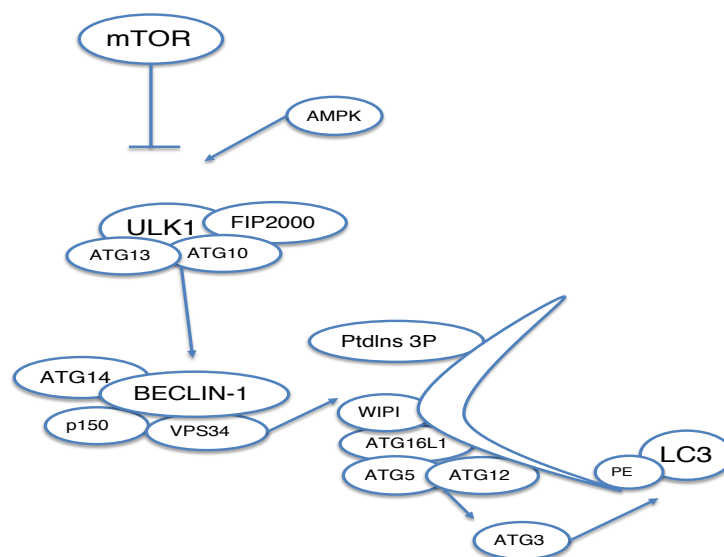


Figura 3. Iniciación del autofagosoma: La iniciación y formación del autofagosoma depende de complejos de proteínas ATG que interactúan formando complejos para ayudar a la iniciación de la formación de la membrana que formara el autofagosoma (Tomado y modificado Tanida, 2011).

Una vez formado el autofagosoma, se fusiona con los lisosomas a través de la participación de múltiples proteínas, incluyendo proteínas SNARE y UVRAG. Después de la fusión, esta estructura se denomina autofagolisosoma donde el contenido es degradado por las enzimas lisosomales y posteriormente reciclado por la célula (Figura 4) (Klionsky 2007).

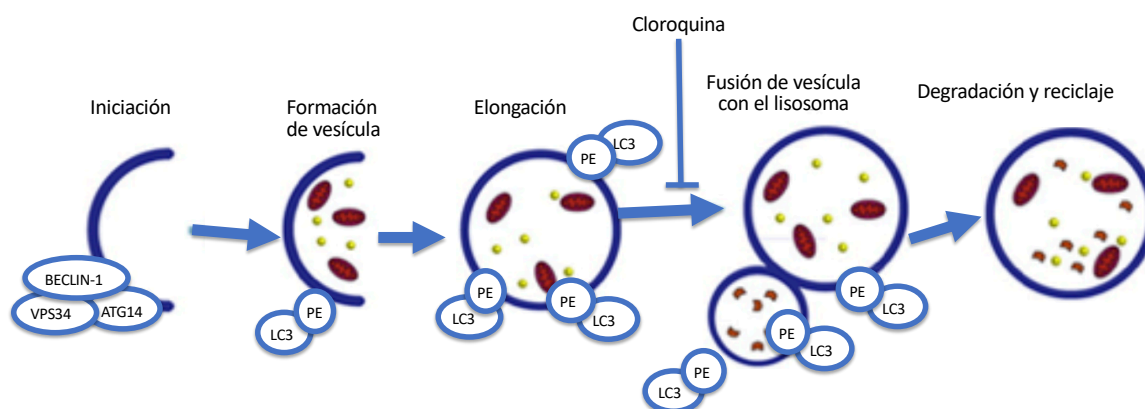


Figura 4. Etapas de formación del autofagosoma (Tomado y modificado de Wen, 2013).

Autofagia y Cáncer

La autofagia puede funcionar como un proceso supresor de tumores a través de la eliminación de proteínas mal plegadas y tóxicas u organelos dañados (White 2012). Alternativamente, la autofagia puede ser un proceso protumorigénico, donde las células tumorales utilizan esta vía para obtener sustratos para el metabolismo y la sobrevivencia en condiciones de estrés (White 2012). El proceso autofágico también se ha relacionado con diversos aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa en respuesta a una infección (Silva et al. 2013). Sin embargo, el papel de la autofagia en la regulación de la respuesta inmune en cáncer aún no está bien definido. Estudios recientes sugieren que la autofagia estimula la liberación de citocinas a partir de células del sistema inmune así como de líneas celulares de cáncer (Maycotte et al. 2015, de Castro et al. 2012).

Se han observado alteraciones en la vía de la autofagia en varios trastornos, incluyendo enfermedades metabólicas, miopatías, trastornos neurodegenerativos, enfermedades infecciosas e inflamatorias, enfermedades autoinmunes, envejecimiento y cáncer. El cáncer es una de las primeras enfermedades vinculadas genéticamente a un deterioro de la autofagia con la propuesta de que *beclin-1* funciona como un supresor tumoral haploinsuficiente. Al respecto, se encontró

que el gen de *beclin-1* está deletado en un alto porcentaje de tumores de ovario, mama y próstata y su silenciamiento en ratones heterocigotos resulta en un aumento de la formación de tumores espontáneos incluyendo cáncer de pulmón, hígado, linfomas y lesiones precancerosas mamarias (Qu et al. 2003). Se ha establecido una relación entre la expresión de *beclin-1* y el pronóstico del cáncer, bajos niveles de *beclin-1* se asocian con un mal pronóstico en cáncer gástrico, colorectal, páncreas, esófago y mama, así como en condrosarcoma, mientras que altos niveles de expresión se asocian con una mayor supervivencia en los gliomas de alto grado, carcinoma hepatocelular y linfomas de células B (White 2012). La posibilidad de que *beclin-1* sea un supresor de tumores es importante para el cáncer de mama. Cuando *beclin-1* es deletada completamente en ratones, éstos mueren en etapas tempranas de la embriogénesis, pero cuando el gen es eliminado de manera heterocigótica, los ratones mutantes sufren de una alta incidencia de tumores espontáneos en mama (Qu et al. 2003). Sin embargo, se han encontrado delecciones de *beclin-1* principalmente asociadas a BRCA1 en tumores de mama y de ovario humano, esto sugiere que la pérdida de BRCA1 induce tumorigénesis y que *beclin-1* se pierde debido a su proximidad en el loci. por otra parte, en un estudio reciente no se encontró ninguna evidencia de mutaciones o pérdida de *beclin-1* en otros tipos de cáncer, poniendo en duda si éste es un supresor tumoral real en todos los tipos de cáncer humanos (Laddha et al. 2014).

La autofagia puede disminuir la formación de tumores. Así, la autofagia es el mecanismo de degradación de las mitocondrias dañadas que podrían inducir estrés oxidativo, daño en el ADN e inestabilidad genómica (White 2012). El daño tisular crónico puede provocar una respuesta inflamatoria que promovería el crecimiento del tumor a través de la producción de citocinas. La inhibición de la autofagia en algunos casos aumenta la producción de citocinas (Maycotte et al. 2015, Lee et al. 2016). Además, la supresión de la autofagia aumenta los niveles de p62, una proteína adaptadora que recluta agregados proteicos y organelos al autofagosoma a través de su unión con LC3, la cual activa una respuesta de supervivencia antioxidante mediada por NRF2 que podría favorecer a la promoción de tumores (White 2012).

Se ha demostrado que la autofagia tiene un papel como promotor de tumores en cáncer de mama en modelos de cáncer de mama mediados por oncogenes (Karantza et al. 2007). Por lo tanto, se sugiere que la dependencia de la autofagia en cáncer de mama podría ser un posible blanco terapéutico en este tipo de cáncer. La autofagia está especialmente vinculada a fuertes impulsos oncogénicos como la transformación mediada por RAS o alteraciones en su señalización, que

inducen cambios en las vías metabólicas para satisfacer las demandas de biosíntesis de la célula (Guo et al. 2011). Aunque la transformación por RAS no es un evento común en el cáncer de mama. Otras vías de oncogenes que están activadas en tumores de mama, incluyendo HER2, Myc y PI3K, que al activarse producen alteraciones metabólicas similares a la transformación mediada por RAS (Mariño et al. 2011). Por otra parte, componentes de la vía PI3K y RAS-RAF-MEK se amplifican en los cánceres de tipo basal y la adicción a la autofagia puede ser inducida por transformación de RAS en células de cáncer de mama (Debnath 2011, Guo et al. 2011). En el modelo 4T1 de cáncer de mama, el tratamiento con cloroquina (CQ), un agente farmacológico que bloquea la autofagia mediante su acumulación en el lisosoma e inhibición de la degradación de autofagosomas, produce disminución en el crecimiento del tumor, aumento de la supervivencia y disminución de la metástasis (Jiang et al. 2010). Es muy probable que la mayoría de los tumores de cáncer de mama tengan alteraciones en la vía de la autofagia, se han identificado mutaciones en proteínas que son importantes reguladores de la vía tales como PI3K, alteraciones en la vía PI3K-mTOR, p53, EGFR y Bcl-2 (Maycotte et al. 2014).

Las vías de la autofagia son prevalentes en numerosos tipos de cáncer. Una búsqueda de Clinicaltrials.gov identificó 3 estudios clínicos actualmente en curso que evalúan la autofagia y usan hidroxiclороquina y cloroquina dos inhibidores de la autofagia. Estos estudios de fase I y fase II, evalúan el beneficio terapéutico de la combinación de moduladores de la autofagia con tratamientos anticancerosos actuales, demuestran evidencia temprana para la aplicación en la terapia resistente al cáncer (Duffy et al. 2015).

Autofagia y secreción

El microambiente tumoral incluye componentes estromales residentes, células de cáncer, fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune que se reclutan. Además de la compleja arquitectura tisular de un tumor, las células de cáncer dentro de un tumor son heterogéneas en sus firmas moleculares (heterogeneidad intratumoral). En el microambiente tumoral se liberan factores quimiotácticos como IL-1, IFN- γ , y MIF que son responsables del reclutamiento y activación de células inmunes (Schauer et al. 2013, Yang et al. 2016, Chuang et al. 2012).

Diversos estudios en macrófagos han mostrado que la autofagia puede regular la transcripción, procesamiento y secreción de algunas proteínas como las de la familia de IL-1 e IL-8. La inhibición farmacológica o genética de la autofagia en macrófagos y células dendríticas produce un aumento de la secreción de IL-1 β , IL-1 α e IL-8 en respuesta a un estímulo con LPS. En células de cáncer de mama se ha encontrado que hay un aumento de la secreción de IL-6 cuando se inhibe la autofagia (Harris et al. 2011, Harris 2013, Maycotte et al. 2015).

La secreción de IL-1 β es un proceso de 2 etapas. Primero, la transcripción de pro-IL-1 es inducida por estímulos inflamatorios como LPS, seguido de la activación del inflamasoma por un segundo estímulo como ERO. Por lo que la inhibición de la autofagia da como resultado la acumulación del segundo estímulo que activa el inflamasoma. Posteriormente, los autofagosomas pueden secuestrar y degradar componentes del inflamasoma (Harris et al. 2011). Por otro lado, también se ha descrito que la inducción de autofagia en macrófagos activados estimula la secreción de IL-1 β y se ha observado colocalización de IL-1 β con LC3 (Dupont et al. 2011). Por lo tanto, el papel específico de la autofagia en la secreción de IL-1 β así como de otras citocinas todavía no es muy claro.

Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las ERO son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O₂) por reducción química parcial de la misma. En este grupo, se incluyen al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que se produce cuando el O₂ es reducido con 2 electrones, y las formas reactivas del oxígeno, que incluyen al anión superóxido (O₂^{•-}) y al radical hidroxilo (HO[•]) (Alessio et al. 2006). También existen otras especies como el radical alcohoxilo, peroxilo, el dióxido de nitrógeno y los lípidos peroxidados. Algunas de estas ERO poseen electrones no apareados y son por tanto, radicales libres. Las ERO tienen un papel importante en procesos fisiológicos habituales pero en concentraciones elevadas o cuando son producidas en algún sitio intracelular específico, éstas pueden ejercer efectos tóxicos. Las ERO se originan como un subproducto de las rutas metabólicas celulares y en ocasiones funcionan como un segundo mensajero crítico en una variedad de vías de señalización intracelular. Por lo tanto, un defecto o deficiencia en el sistema de defensa antioxidante, por un lado y / o la generación excesiva de ERO pueden desencadenar estrés oxidativo (Alessio et al. 2006).

Se ha documentado la participación directa o indirecta de ERO en diversas enfermedades (Stanner et al. 2004). Así, en los últimos años, ha aumentado el número de trabajos que demuestran que las ERO pueden ser las causantes o estar involucradas en el desarrollo de distintos padecimientos, incluyendo el cáncer.

Antecedentes directos

La autofagia se ha relacionado con diversos aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa pero el papel de la autofagia en la regulación de la respuesta inmune en cáncer aún no está bien definido. Existen estudios que sugieren que la autofagia regula la liberación de citocinas a partir de líneas celulares de cáncer y de células inmunes (Harris 2013, Jiang et al. 2013). Lo anterior podría tener un papel importante en la regulación de las células inmunes infiltradas al tumor. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo sugieren que la autofagia regula la secreción de citocinas en líneas celulares de cáncer de mama de manera diferencial dependiente de la línea celular estudiada (Maycotte et al. 2015).

Una de las citocinas que se afecta consistentemente al inhibir la autofagia en las líneas celulares de cáncer de mama que se estudiaron en experimentos preliminares, es el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Figura 5, datos no publicados). En macrófagos, se ha encontrado que la inhibición de la autofagia aumenta la secreción de MIF y esta secreción es dependiente de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Lee et al. 2016). En ese trabajo se propone que la autofagia regula las ERO mitocondriales y esto tiene un papel fundamental en la secreción de citocinas proinflamatorias. Estudios previos sugieren que MIF juega un papel importante en la progresión tumoral (Babu et al. 2012), además de que regula la liberación de otras citocinas que también se encuentran alteradas por la inhibición de la autofagia (Figura 5, datos no publicados). Actualmente, existen diversos estudios clínicos utilizando inhibidores de la autofagia junto con quimioterapia en diversos tipos de cáncer (Rubinsztein et al. 2012). En cáncer de mama en particular, se sabe que hay una dependencia a la autofagia y esta cambia de acuerdo al subtipo de cáncer, ya que cuando se inhibe la autofagia en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (TN) se induce muerte celular y no así en células positivas a receptores de estrógenos (RE+) (Maycotte et al. 2014).

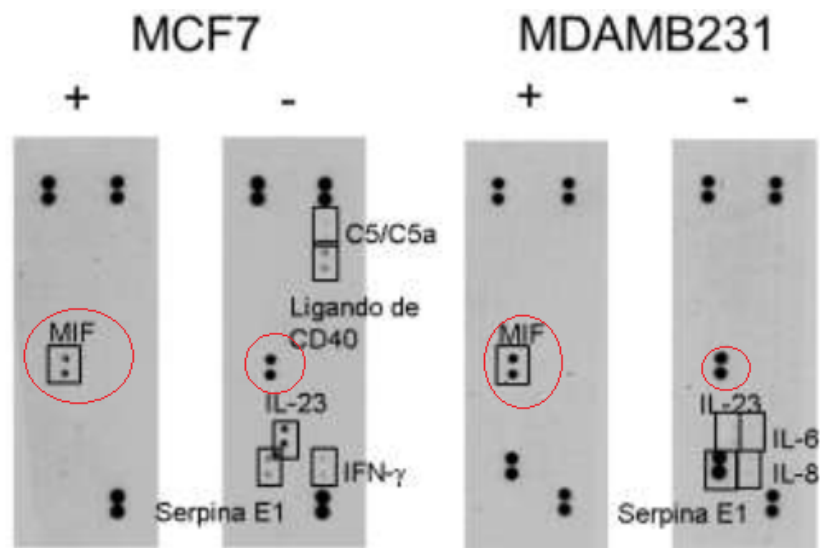


Figura 5. Citocinas presentes en el sobrenadante de cultivos de las líneas celulares MCF7 (RE+) y MDA-MB-231 (TN) en presencia (+) y ausencia (-) de autofagia. La autofagia regula la secreción de citocinas de manera diferencial en líneas celulares de diferentes subtipos de cáncer de mama. La secreción de MIF aumenta cuando se inhibe la autofagia en ambas líneas celulares.

Justificación

La autofagia es un mecanismo importante para la sobrevivencia de las células en general que también está relacionado con aspectos del sistema inmune innato y adaptativo. Aunque el papel de la autofagia en la regulación del sistema inmune en cáncer no está aún bien definido, existe evidencia que sugiere que la autofagia participa en la liberación de algunas citocinas proinflamatorias. Dado que actualmente se están llevando a cabo diversos estudios clínicos donde se utilizan inhibidores de autofagia junto con otras terapias para el tratamiento del cáncer y que la inhibición de la autofagia puede ser un blanco terapéutico en cáncer de mama, es importante conocer el papel de la autofagia en la secreción de MIF, una citocina pro-inflamatoria con un papel importante en la progresión tumoral.

Hipótesis

La inhibición de la autofagia aumenta la secreción de MIF en líneas celulares de cáncer de mama mediante la regulación de la producción de ERO y/o mediante la degradación de p115.

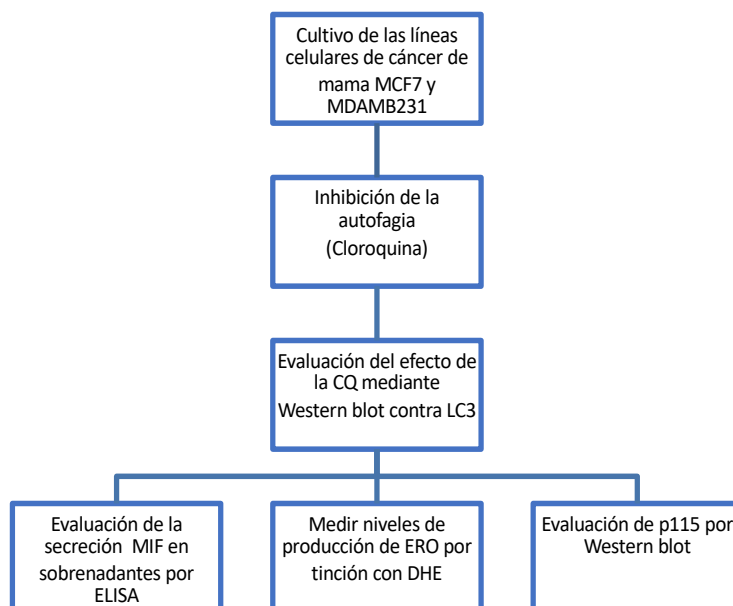
Objetivos

Objetivo general

Determinar el papel de la autofagia en la secreción del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) en líneas celulares de cáncer de mama.

Objetivos específicos

- Inhibir la autofagia en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA MB 231 por métodos farmacológicos.
- Evaluar si la inhibición de la autofagia influye en la secreción de MIF al medio de cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDA MB 231.
- Determinar si la autofagia modula la secreción de MIF mediante la degradación de p115.
- Determinar si la autofagia modula la secreción de MIF mediante la inhibición de la producción de ERO.



METODOLOGÍA

Cultivo de las líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares MCF10A (no tumorales), MDA MB 231 (triple negativo, TN) y MCF-7 (ER+). Las líneas celulares se cultivaron en los siguientes medios: MDAMB231 (DMEM F12 con 10 % de suero fetal bovino, SFB); MCF10A (DMEM F12 5% de suero de caballo, 20 ng/ml de EGF, 0.5 mg/mL de hidrocortisona, 100 ng/mL de toxina colérica, 10 µg/mL de insulina); MCF-7 (MEM con 10 % SFB y 0.01 mg/mL de insulina).

Para los experimentos de proliferación se sembraron 3000 células por pozo en placa de 96 pozos y se midió su proliferación por 24 y 48 horas usando el equipo IncuCyte ZOOM, mediante el cual se puede hacer la observación y cuantificación del porcentaje de confluencia de las células en el pozo a lo largo del tiempo por medio de la recopilación y el análisis automático de imágenes. Al final se midió la muerte celular usando ioduro de propidio (IP), agregando 10 µl de una dilución concentración final 2.5 µg/mL preparada a partir de una solución 1mg/mL. Las células se incubaron 10 min y se tomo foto en el IncuCyte ZOOM midiendo el número de puntos con fluorescencia roja y normalizando contra el % de confluencia de células en cada foto para determinar la muerte celular (Figura 7).

Para medir la secreción de MIF se sembraron 100,000 células por pozo en placa de 12 pozos, 24 horas después se agregó el tratamiento con CQ a las concentraciones indicadas y se midieron los niveles de MIF secretado después de 24 horas por la técnica de ELISA. Posteriormente al retiro del sobrenadante, se tripsinizaron las células y el botón celular fue resuspendido en solución RIPA (Tris-HCl 50mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5 %, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 1mM, SDS 0.1%) a 4°C y sonicado para lisar las células. De acuerdo con el número de células en el pozo, los resultados de la medición de MIF se normalizaron sobre los µg de proteínas totales del botón celular en cada muestra.

Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó espectrofotométricamente por el método de Bradford. En una placa de 96 pozos se tomó 1µL de la muestra del extracto celular en buffer RIPA y se añadieron 100 µL de agua, posteriormente se agregaron 100 µL del reactivo de Bradford 2X. Se leyó la absorbancia a 495 nm contra un blanco de PBS 1X. Se usó un estándar

de albúmina 1 mg/mL para realizar una curva estándar en la cual se interpolan los valores de absorbancia de las muestras para determinar la concentración.

Western blot

Con base en el manual de usuario de Biorad, se prepararon geles de poliacrilamida al 12% (gel separador: 12 % de acrilamida, 8 % de bisacrilamida y 3.75 % de 1.5 M Tris-HCl/SDS pH=6.8; gel concentrador: 3.9 % de acrilamida, 0.8 % de bisacrilamida, 3.75 % de 0.5 M Tris-HCl/SDS; pH=8.8). La polimerización de los geles se inició con la adición de persulfato de amonio (0.005%) y se aceleró con TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina) al 0.01%. Las alícuotas de los extractos celulares se diluyeron en 30 µL de solución amortiguadora por muestra (amortiguador de Laemmli: 25 mL de 0.5 M Tris-HCl/SDS pH=6.8, 20 mL de glicerol, 4 g de SDS, 2ml de β-mercaptoetanol, 1mg de azul de bromofenol, aforado a 100mL). Esta mezcla se hirvió por 5 min y se depositaron en los pozos del gel de aplicación. Posteriormente, se sometieron a una electroforesis en una solución amortiguadora a pH alcalino (Glicina 0.192 M, Tris 0.025 M, SDS 0.1 %) a 100 voltios para la separación de las proteínas.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (EMD Millipore IPVH15150) mediante el sistema de electrotransferencia semiseca de BioRad, durante 45 min a 15 milivoltios. Terminada la transferencia, los sitios inespecíficos de la membrana se bloquearon por incubación durante 1 h en una solución de leche descremada al 5% disuelta en TBS-Tween (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7.4, Tween-20 0.1 %) y las membranas se incubaron a 4°C toda la noche en agitación constante con los anticuerpos contra LC3 (NOVUSBIO, NB100-2220) a una concentración de 1:2000 en una solución de leche descremada al 5 % en amortiguador TBS-tween; p115 (Thermo Fisher, PAS-30281) a una concentración de 1:5000, diluidos en una solución de albúmina sérica bovina al 5 % en amortiguador TBS-tween. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra actina (Sigma A5441) a una concentración de 1:5000, diluidos en una solución de albúmina sérica bovina al 5% en amortiguador TBS-tween. Después de tres lavados más se incubaron 2 horas con anticuerpos secundarios anti-raton (Sigma A2304-1ML) y anti-conejo (Sigma A0545-1ML) diluidos 1-80000.

Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween 0.1 % durante 10 min y se revelaron con una mezcla 1:1 de luminol y peróxido (EMD Millipore WBKLD0500).

Simultáneamente con las muestras se corrió un estándar de referencia con proteínas coloreadas de peso molecular conocido (Thermo Scientific, PagueRuler, 26619). Las bandas se analizaron con un lector de quimioluminiscencia (Licor).

Prueba de ELISA

Para medir la secreción de MIF, se utilizó la prueba de ELISA, se utilizó el kit Human MIF DuoSet ELISA de R&D systems (DY289) el cual tiene un anticuerpo primario contra MIF que se utiliza como anticuerpo de captura a una concentración de 2 µg/mL en buffer PBS, un anticuerpo de detección contra MIF marcado con biotina que se usa a una concentración de 100 ng/mL, estándar de MIF recombinante y un conjugado de estreptavidina con peroxidasa de rábano. Como bloqueador se utilizó BSA (Sigma, A2058-100G) al 1 % libre de IgG. Para lavar se utilizó PBS-Tween-20 al 0.05 %, pH 7.2. Para revelar el ELISA se utilizó un anticuerpo contra MIF de humano conjugado con biotina, el cual se preparó en PBS a la concentración de 100 ng/mL y finalmente, se agregó estreptavidina acoplada a peroxidasa diluida 1:200 para su uso.

Como control positivo se utilizó MIF recombinante, como control negativo se utilizó el pozo con medio de cultivo con suero de cada línea celular.

Para llevar a cabo el ensayo, en una placa de 96 pozos de alta adherencia DY991 de R&D systems se agregaron 100 µL del anticuerpo de captura 2 µg/mL y se incubó toda la noche a TA. El exceso de antígeno se removió lavando 3 veces con 300 µL de PBS-Tween 0.01 %, luego de los lavados se agregaron 100 µL de BSA al 3% para bloquear las regiones inespecíficas durante 2 horas a 37 °C.

Se lavó el exceso BSA 3 veces con 100 µL de PBS-Tween 0.01 %. Se agregaron 100 µL del medio de cultivo de las líneas celulares con sus controles respectivos y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se lavó 3 veces con 100 µL de PBS-Tween 0.01 %. Posteriormente, 100 µL del anticuerpo secundario conjugado a biotina, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavó el exceso de anticuerpo conjugado 3 veces con 100 µL de PBS-Tween 0.01 %. Se agregan 100 µL del conjugado de estreptavidina-HRP, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con 100 µL de PBS-Tween 0.01 % y se agregaron 100

μL de una mezcla 1:1 de la solución sustrato DY999 R&D Systems. Se incubó 15 min a TA y se agregaron 50 μL de la solución de paro (H₂SO₄ 2N). La placa se leyó en el lector de ELISA a 450 nm restando el fondo a 575 nm.

Medición de Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Para medir las ERO se utilizó dihidroetidio (DHE) (Sigma, 37291-25MG), un reactivo que es capaz de reaccionar directamente con los radicales superóxidos oxidándose a etidio. Este compuesto que presenta una fluorescencia azul pasa a tener una fluorescencia roja propia del etidio tras su oxidación y se acumula en el núcleo, donde se intercala en el ADN (Bucana, Saiki and Nayar 1986).

A partir de una solución 5 mM de DHE se prepara una solución 5 μM en medio de cultivo, se agregaron 500 μL al cultivo celular y se incubaron 10 min, después de la tinción con DHE, se tiñeron los núcleos con Hoechst y se contaron manualmente después de la visualización en el microscopio de fluorescencia (Zeiss AxioVert utilizando el software AxioVision). Para esto, las muestras se incubaron 10 min con DHE, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con una solución de formalina (Sigma HT501128-L) que contiene formaldehído al 4% durante 10 min. Se le hicieron 2 lavados con PBS y se agregó Hoechst para teñir los núcleos y contrastar con el DHE. Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia, se tomaron fotografías de varios campos y se contó el número de células teñidas con DHE (rojas) y el número de células teñidas con Hoechst (azules).

RESULTADOS

Cultivo, mantenimiento y ensayos de proliferación de las líneas celulares

La línea celular MCF7 son células humanas derivadas de un adenocarcinoma de tejido mamario (ATCC, HTB-22). Son células adherentes de morfología epitelial, positiva a receptores de hormonas. La línea celular MDAMB231 son células humanas derivadas de un adenocarcinoma de tejido mamario, son células adherentes de morfología alargada, del tipo TN por lo que carece de receptores hormonales y HER2 (ATCC, HTB-26) (Figura 6).

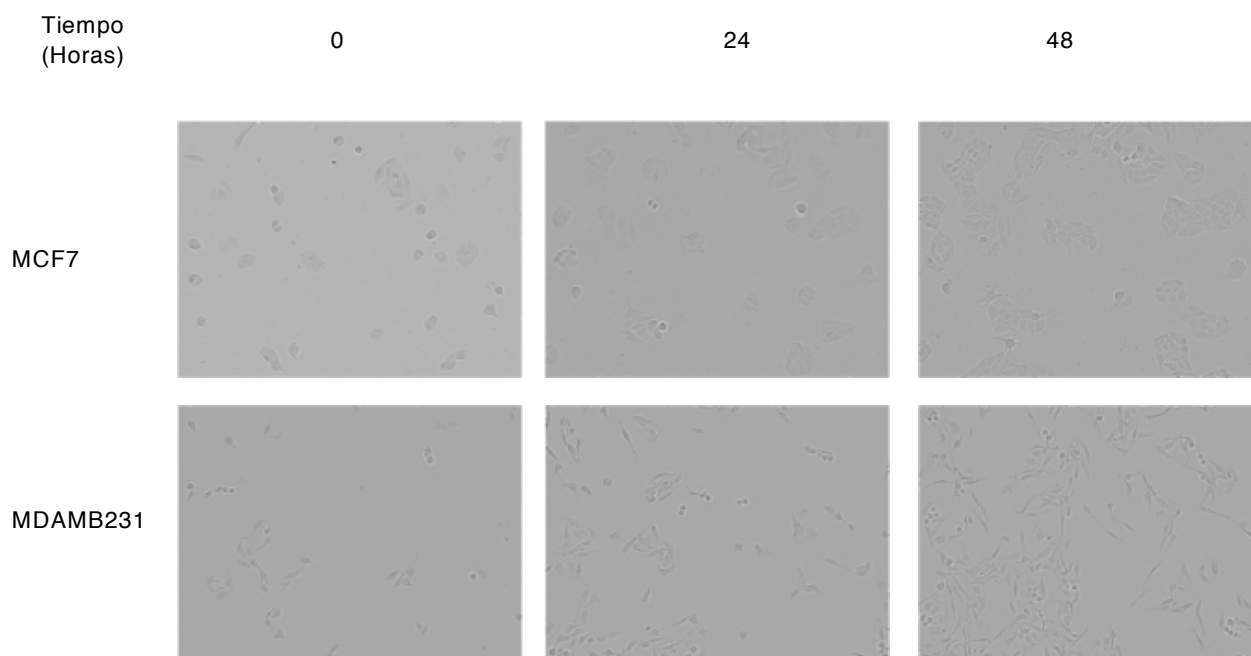


Figura 6: Características morfológicas de las líneas celulares MCF7 y MDAMB231. Curso temporal de 48 horas. Se muestra la población celular en tiempo 0, a las 24 y 48 horas donde se observa el aumento en la confluencia. La línea celular MCF7 tiene una morfología epitelial, la línea celular MDAMB231 tiene una morfología alargada de tipo mesenquimal.

Para evaluar el papel de la inhibición farmacológica de la autofagia mediante el tratamiento con CQ, las células fueron tratadas con concentraciones de 10, 20 y 40 μM de CQ y se evaluó su proliferación durante 48 horas (Figura 7). Se corroboró que el crecimiento de estas líneas celulares es afectado por la CQ conforme aumenta su concentración. De acuerdo con resultados publicados anteriormente (Maycotte et al, 2014), la línea celular MDAMB231 se vio más afectada en su proliferación por el tratamiento con CQ al compararse con la línea MCF-7 (Figura 8).

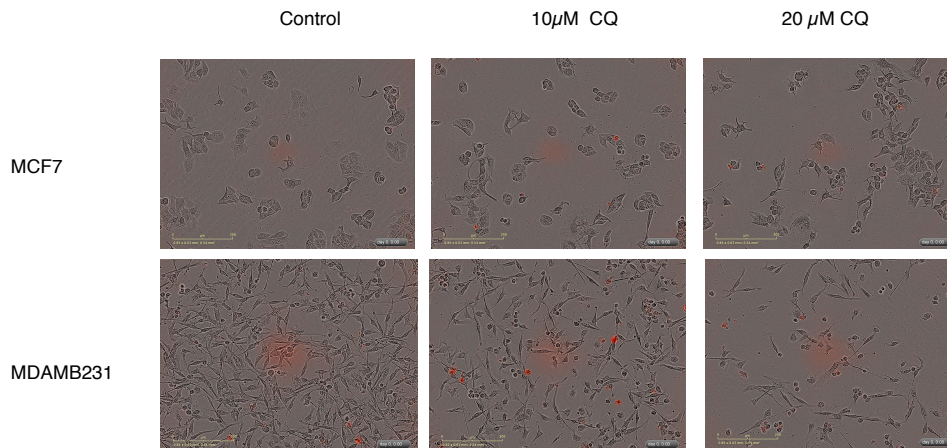


Figura 7: Líneas celulares MCF7, y MDAMB231 48 horas después del tratamiento con cloroquina (CQ) a las concentraciones indicadas. Las fotos muestran contraste de fases y fluorescencia roja después de teñir con ioduro de propidio (IP).

El propósito de realizar estas curvas de proliferación en conjunto con la medición de la muerte celular fue determinar el tiempo más largo en el que no se observara muerte celular con el tratamiento con CQ en ambas líneas celulares para posteriormente poder hacer determinaciones de secreción de MIF.

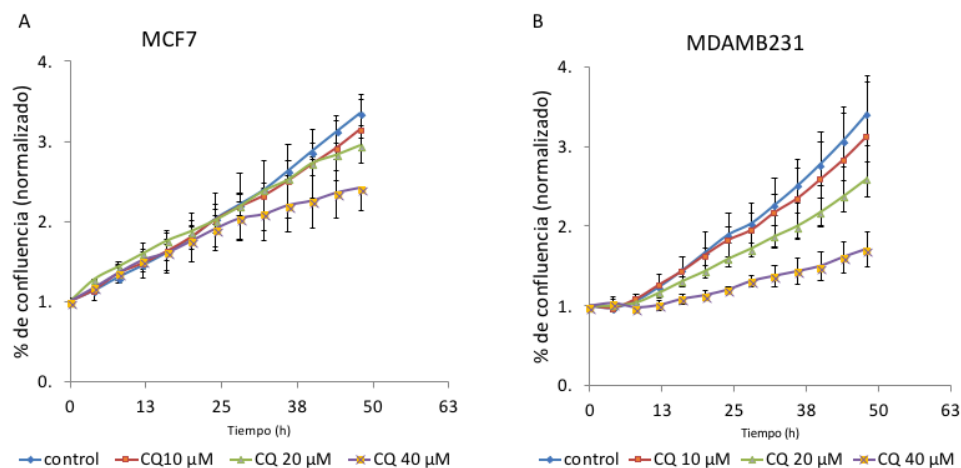


Figura 8 . Efecto de la cloroquina sobre la proliferación de líneas de cáncer de mama. Se utilizó CQ a distintas concentraciones (μM) en ambas líneas celulares. A. La línea celular MCF7 tratada con CQ empieza a disminuir su proliferación después de las 24 horas con CQ 40 μM . B. La línea celular MDAMB231 tratada con CQ disminuye su proliferación a partir de las 10 horas con la misma concentración de CQ. Se muestra proliferación medida como % de confluencia por pozo, normalizada al tiempo=0h . Las gráficas muestran media $\pm$ desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Se midió la muerte celular con ioduro de propido (IP) a 24 y a 48 horas (Figura 9) para estandarizar las condiciones en las que posteriormente se evaluaría la secreción de MIF. Si se observara muerte celular, la secreción en el medio podría deberse a la liberación del contenido intracelular de las células que mueren y no a un proceso controlado de secreción. El IP es un fluoróforo que normalmente no puede permear a la membrana plasmática y únicamente puede permear e incorporarse al ADN nuclear en las células con membrana plasmática dañada (muertas). A las 48 horas encontramos muerte celular con diferencias significativas a la concentración de 20 y 40 μM de CQ, respecto al control en la línea celular MDAMB231. A las 24 horas, no se encontraron diferencias en la muerte celular por tratamiento con CQ a ninguna de sus concentraciones (Figura 9). Por lo tanto, se utilizaron estas concentraciones y este tiempo para inhibir la autofagia en experimentos posteriores.

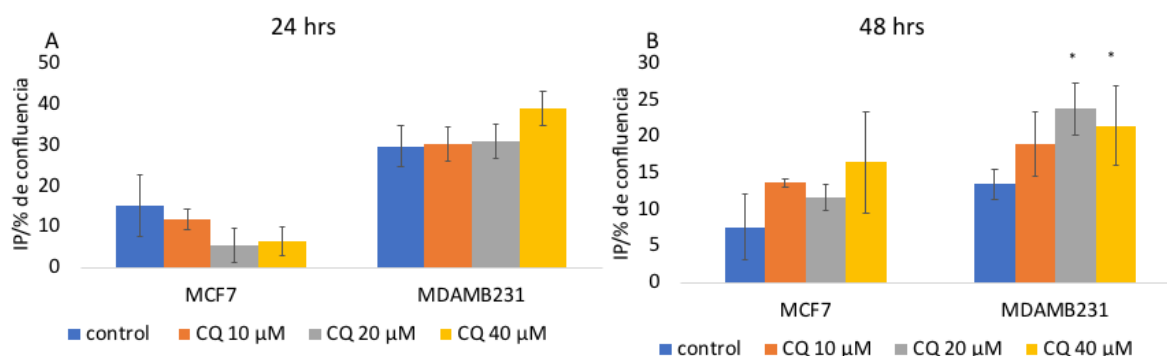


Figura 9. Efecto de la CQ sobre la muerte celular en líneas celulares de cáncer de mama. A. A las 24 horas no se observó muerte celular significativa en las líneas celulares MCF7 y MDAMB231. B. A las 48 hrs, la línea celular MCF7 no presentó muerte celular, sin embargo, en la línea celular MDAMB231 a partir de 20 μM de CQ ya encontramos muerte celular. La muerte celular se evaluó mediante incorporación de IP (numero de núcleos rojos) y se normalizó al % de confluencia en contraste de fases por pozo. Las gráficas muestran media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, * = distinto al control con p menor a 0.05.

Verificación de la inhibición de la autofagia mediante la medición de niveles de LC3 por Western blot.

Para verificar que la CQ inhibiera la autofagia en ambas líneas celulares a las concentraciones utilizadas, se evaluó la cantidad de LC3II por Western Blot. LC3 es una proteína que normalmente se encuentra en el citoplasma y se puede utilizar para monitorear la autofagia. La técnica se basa en la detección por inmunoblot de la conversión de LC3I a LC3II (LC3 acoplado a fosfatidiletanolamina), ya que la cantidad de LC3II se correlaciona con el número de autofagosomas. Sin embargo, LC3 es degradada por autofagia una vez que el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, por lo que es necesario medir la cantidad de LC3II degradada en los autolisosomas y su comparación en presencia y ausencia de inhibidores lisosomales como la cloroquina después de un estímulo inductor de autofagia (Mizushima and Yoshimori 2007). Después del tratamiento con CQ se esperaba un aumento en la cantidad de LC3II ya que la CQ inhibe la degradación de los autofagosomas en el lisosoma.

Se observó un aumento en LC3II en ambas líneas celulares con el tratamiento con CQ (Figura 10). En las dos líneas celulares, se observó una mayor acumulación de LC3II a la concentración de 20 μ M comparada con la de 10 μ M, lo que podría sugerir que la concentración de 10 μ M no se está bloqueando por completo la degradación de autofagosomas.

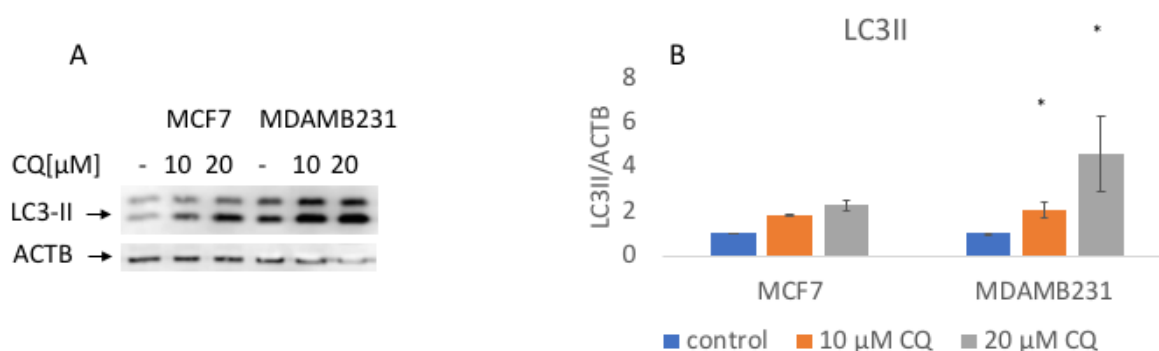


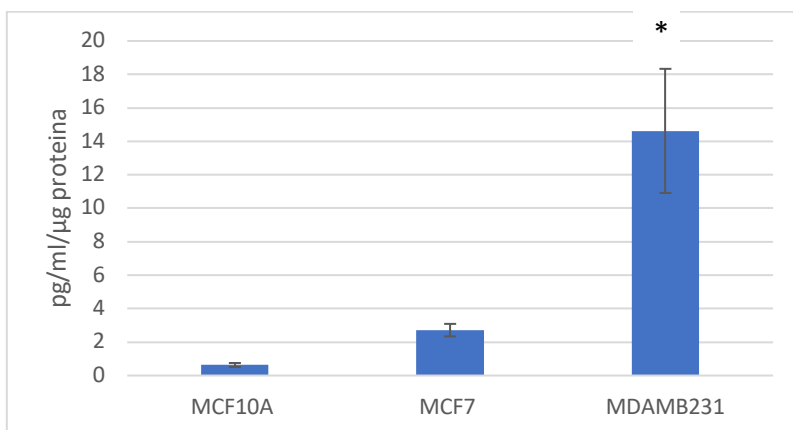
Figura 10. Determinación de la inhibición de la autofagia mediante WB contra LC3. Se utilizaron lisados celulares tratados con CQ a las concentraciones indicadas durante 24 horas. A. WB contra LC3 y actina (ACTB). B. Las gráficas de densitometría muestran la cantidad de LC3II normalizada contra actina de 3 experimentos independientes. * = distinto al control con p menor a 0.05.

Determinación de la secreción de MIF al medio de cultivo

Para corroborar si la inhibición de autofagia influye en la secreción de MIF al medio de cultivo, se evaluó la secreción de MIF mediante la técnica de ELISA. Se colectaron los sobrenadantes de cultivos de las líneas celulares MCF7 y MDAMB231 tratados con 10 y 20 μ M de CQ por 24 h, para las mediciones de secreción utilizó como control no tumoral la línea celular MCF10A. Se tomaron los sobrenadantes del medio de cultivo después de 24 horas de tratamiento y se midió MIF en el sobrenadante por medio de la técnica de ELISA. La cantidad de MIF secretado fue normalizada contra la cantidad de proteína total extraída de las células de donde se tomó el sobrenadante. Se observó una mayor secreción de MIF en la línea celular MDAMB231 en comparación con la línea celular no tumoral MCF10A y la línea celular MCF7, presentando 23.2 veces más en comparación con MCF10A y 5.3 veces más comparado con MCF7 (Figura 11, A).

Los niveles de MIF en la línea celular no tumoral MCF10A no variaron con el tratamiento con CQ. Sin embargo, en la línea celular MCF7 hay un incremento en la secreción de MIF a 20 μ M de CQ, secretando 18.52 pg/mL/ μ g de MIF, lo cual corresponde a un incremento de 6.82 veces con respecto a su control. En la línea celular MDAMB231 no se observaron cambios significativos en la secreción de MIF siendo los valores observados de MIF: en 10.76 pg/mL/ μ g con el tratamiento de 10 μ M de CQ y de 11.8 pg/mL/ μ g con 20 μ M de CQ en comparación con los 14.62 pg/mL/ μ g del control (Figura 12, B).

A



B

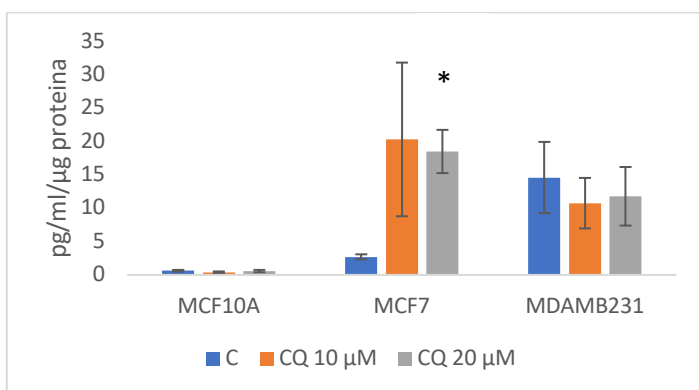


Figura 11. Determinación de la concentración de MIF secretada al medio mediante ELISA en MCF10A, MCF7 y MDAMB231 en condiciones basales y después de un tratamiento de 24 horas con CQ. A) niveles de MIF basales en las líneas celulares. B) La secreción de MIF es regulada por tratamiento con CQ de manera diferencial en las líneas celulares de cáncer de mama. La gráfica muestra media $\pm$ desviación estándar de tres experimentos independientes. * = distinto al control con p menor a 0.05.

Determinación de niveles de p115

Merck en 2009 mostró que la secreción de MIF en macrófagos dependía de una proteína relacionada al aparato de Golgi (p115), la cual disminuía la secreción de MIF al ser silenciada. Para ver si la proteína p115 estaba involucrada en la secreción de MIF en las líneas celulares de cáncer de mama estudiadas se extrajeron proteínas totales de las líneas celulares MCF7 y MDAMB231 tratadas con 10 y 20 μ M de CQ. Se realizó Western blot utilizando un anticuerpo

contra p115. Como resultados preliminares con una n=1, los niveles de p115 no parecen verse afectados por la adición de CQ (Figura 12).



Figura 12. Western blot para p115 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDAMB231 tratadas con distintas concentraciones de CQ por 24 horas.

Determinación de niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en líneas celulares de cáncer mama

Lee en el 2016 determinó que la autofagia regulaba la secreción de MIF en macrófagos y que esta secreción era dependiente de ERO. Por otro lado, mis resultados parciales de la determinación de p115 donde no se observaron cambios en los niveles de la misma con el tratamiento con CQ (Figura 12) sugerían que p115 no era la responsable del incremento en la secreción de MIF observado después del tratamiento con CQ. Por lo tanto, evaluamos los niveles de ERO en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDAMB231, para determinar su posible participación en la secreción de MIF. Después de 24 hrs de tratamiento con CQ a 10 y 20 μ M, se agregó medio con DHE 5 μ M y se incubó por 20 min. Posteriormente, se fijaron las células y se tiñeron los núcleos con Hoechst para teñir núcleos totales. Las muestras se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

Los niveles basales de ERO en la línea celular MCF7 fueron menores que en la MDAMB231 (Figura 13), lo que sugiere que la línea celular triple negativo tiene normalmente niveles más altos de ERO a comparación del subtipo ER+.

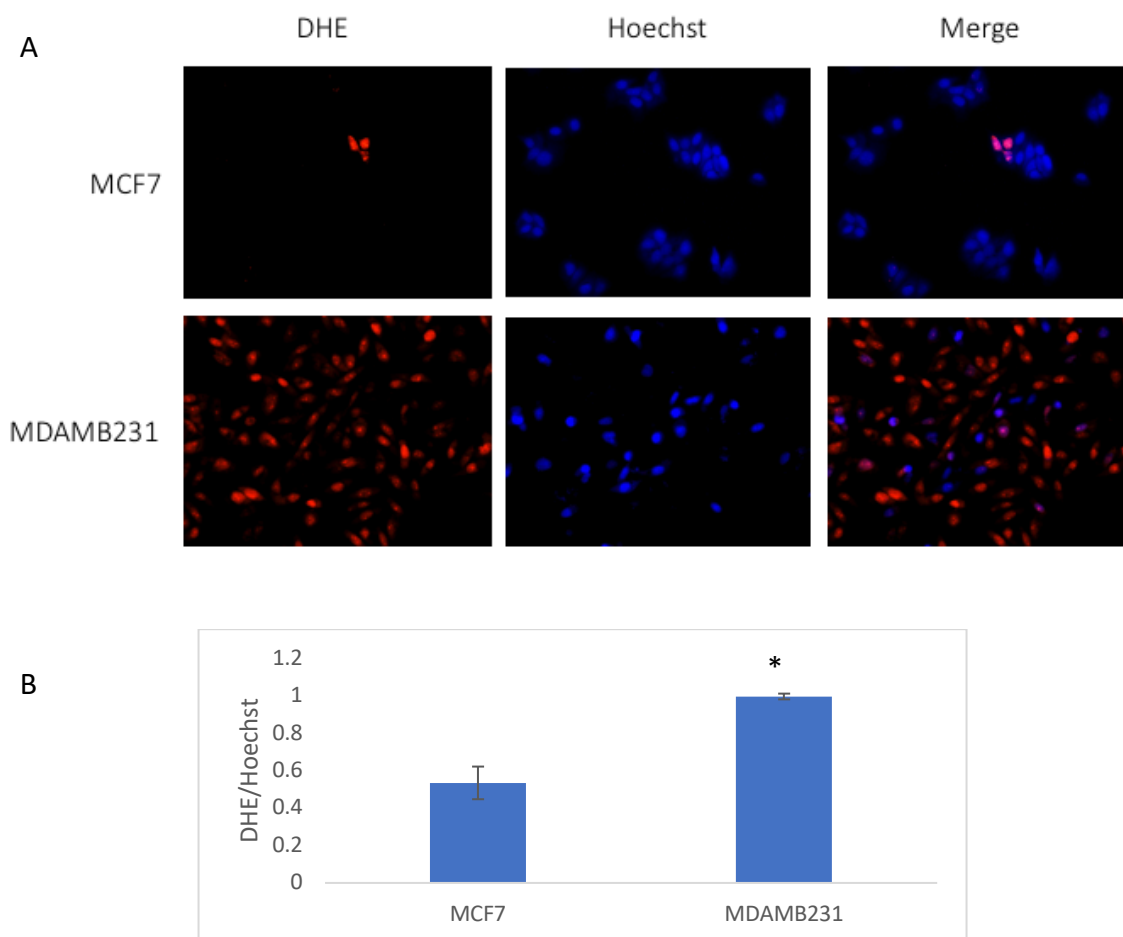


Figura 13. Niveles basales de ERO en las líneas celulares MCF7 y MDAMB31 mediante tinción de DHE (rojo). Se utilizó tinción con Hoechst (azul) para teñir los núcleos totales. A. Fotos de microscopía de fluorescencia. B. Cuantificación del conteo de núcleos teñidos con DHE sobre el total de núcleos.

Después de 24 hrs de tratamiento con CQ 20 μ M (Figura 14) se observó un aparente aumento de ERO en la línea celular MCF7 y no así a la concentración de CQ 10 μ M, mientras que en la línea celular MDAMB231 no se observa un cambio detectable con esta metodología debido a que se mantienen altos niveles todo el tiempo.

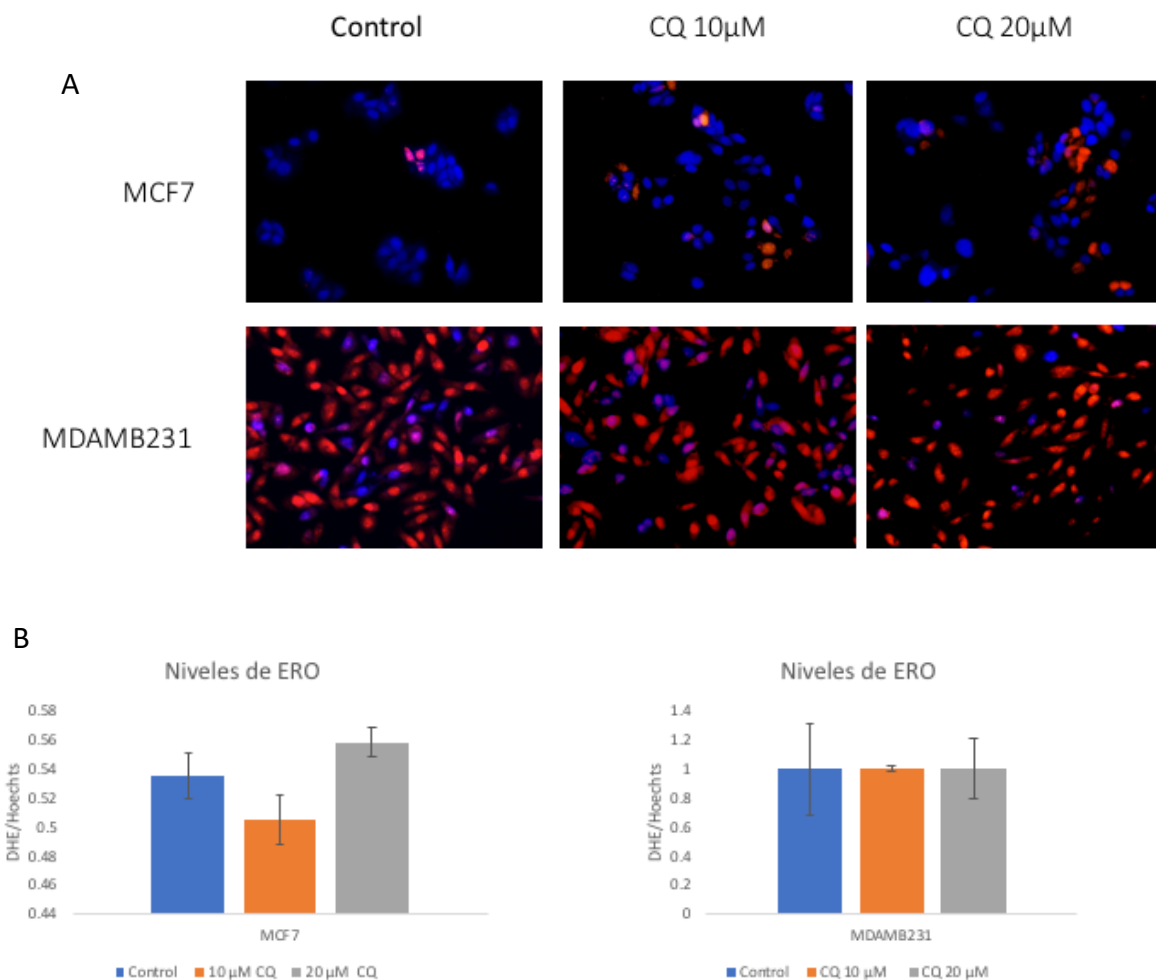


Figura 14. Evaluación de ERO en las líneas celulares MCF7 y MDAMB231 mediante tinción de DHE (rojo) después del tratamiento con CQ por 24 horas a distintas concentraciones. Se utilizó tinción con Hoechst (azul) para teñir los núcleos totales. A. Fotografías representativas de microscopía de fluorescencia. B. Cuantificación del conteo de núcleos teñidos con DHE sobre los núcleos totales. n=1.

Discusión

Por varios años se ha propuesto a MIF como una proteína importante para la regulación de la inflamación. Aunque se identificó como una citocina secretada por células especializadas del sistema inmune, existen múltiples trabajos en los que se le relaciona con diferentes etapas de la progresión y la modificación del microambiente tumoral (Bucala and Donnelly 2007). En macrófagos, su secreción es estimulada a través del receptor TLR4. Por otro lado, en algunos

tipos de cáncer, como glioblastoma o cáncer colorectal, se ha observado secreción de MIF inducida por estímulos como radiación ionizante y otros estímulos de estrés (Gupta et al. 2016). Nuestros resultados demuestran por primera vez que la inhibición farmacológica de la autofagia podría modular la secreción de MIF, una citocina pro-inflamatoria y pro-tumorigénica de líneas celulares de cáncer. La regulación de esta secreción ocurre de manera diferencial en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a distintos subtipos de la enfermedad.

Sobre el mecanismo de secreción de MIF que aún se desconoce, Merk en el 2009 demostró que en macrófagos, MIF necesitaba a p115 una proteína que participa en el tráfico vesicular. Nosotros no encontramos cambios importantes en los niveles de p115 al utilizar CQ, por lo que proponemos que la inhibición de la autofagia con CQ induce secreción de MIF independiente de p115, lo cual está de acuerdo a los hallazgos de Lee en el 2016 en macrófagos.

Se sabe que las ERO pueden señalizar para secretar algunas proteínas como la insulina y otras citocinas (Leloup et al. 2009, Liu et al. 2014). También se ha sugerido la participación de la autofagia para la secreción de otras proteínas como IL-1 β y IL-23 (Harris et al. 2011, de Castro et al. 2012). Lee en el 2016 demostró que la secreción de MIF necesitaba un aumento en ERO para su secreción. La diferencia que encontramos en los niveles basales de ERO entre los subtipos RE(+) y TN podría estar relacionada a la secreción de MIF en condiciones basales ya que, aunque no evaluamos ERO en la línea celular MCF10A, se encontró una mayor secreción basal de MIF en la línea celular MDAMB231 la cual mostró altos niveles de ERO también en condiciones basales.

La autofagia puede controlar los niveles de ERO en la célula, principalmente mediante la eliminación de mitocondrias dañadas mediante la mitofagia (Guo et al. 2011). Por lo tanto, en la línea celular con niveles bajos de ERO, al inhibir la autofagia se produce un aumento de ERO particularmente a la concentración de 20 μ M de CQ (datos preliminares), en donde también observamos un incremento en la secreción de MIF. Mientras, en las células donde hay niveles altos de ERO, se observan niveles más altos de MIF en condiciones basales y proponemos que al inhibir la autofagia la secreción de MIF no aumenta por haber altos niveles basales de ERO y por tanto, un máximo de proteína secretada. Es importante en un futuro usar un antioxidante para poder determinar la participación de ERO en la secreción de MIF mediada por autofagia.

Actualmente se están llevando a cabo estudios clínicos donde se utiliza cloroquina en combinación con la quimioterapia tradicional para tratar cáncer de mama (<https://www.clinicaltrials.gov/>). Estos estudios clínicos se están realizando en pacientes de cáncer de mama sin importar el subtipo. La diferencia en la secreción de MIF mediada por autofagia podría tener distinto impacto en la sobrevivencia, en la proliferación celular y en el tipo de respuesta inflamatoria tumoral de cada uno de estos subtipos de cáncer de mama tratados con inhibidores de autofagia. Por lo tanto, será importante hacer más estudios que podrían ayudar a dirigir una terapia más eficiente, dependiendo del subtipo de cáncer de mama que se presente.

Conclusiones

1. Se inhibió farmacológicamente la autofagia en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDAMB231
2. La secreción de MIF aumenta significativamente cuando se inhibe la autofagia de manera farmacológica en la línea celular MCF7
3. Los datos preliminares sugieren que p115 no participa en la modulación de la secreción de MIF mediada por autofagia
4. La línea celular MDAMB231 presenta niveles basales mayores de ERO en comparación de la línea celular MCF7
5. La inhibición farmacológica de la autofagia aumenta los niveles de ERO en la línea celular MCF7 y no en la MDAMB231

Bibliografía

- Alessio, H. M. & A. E. Hagerman. 2006. *Oxidative stress, exercise and aging*. World Scientific.
- Babu, S. N., G. Chetal & S. Kumar (2012) Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 13, 1737.
- Bifulco, C., K. McDaniel, L. Leng & R. Bucala (2008) Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor. *Current pharmaceutical design*, 14, 3790-3801.
- Blows, F. M., K. E. Driver, M. K. Schmidt, A. Brooks, F. E. Van Leeuwen, J. Wesseling, M. C. Cheang, K. Gelmon, T. O. Nielsen & C. Blomqvist (2010) Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine*, 7, e1000279.
- Bucala, R. & S. C. Donnelly (2007) Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity*, 26, 281-285.
- Bucana, C., I. Saiki & R. Nayar (1986) Uptake and accumulation of the vital dye hydroethidine in neoplastic cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 34, 1109-1115.
- Calandra, T. & T. Roger (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews immunology*, 3, 791-800.
- Chuang, Y.-C., W.-H. Su, H.-Y. Lei, Y.-S. Lin, H.-S. Liu, C.-P. Chang & T.-M. Yeh (2012) Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation. *PloS one*, 7, e37613.
- Conroy, Mawhinney & Donnelly (2010) Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)—the potential missing link. *QJM: An International Journal of Medicine*, 103, 831-836.
- David, J. R. (1966) Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 56, 72-77.
- de Castro, C. P., S. A. Jones, C. N. Cheallagh, C. A. Hearnden, L. Williams, J. Winter, E. C. Lavelle, K. H. G. Mills & J. Harris (2012) Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion. *The Journal of Immunology*, 189, 4144-4153.
- Debnath, J. (2011) The multifaceted roles of autophagy in tumors—implications for breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16, 173.
- Duffy, A., J. Le, E. Sausville & A. Emadi (2015) Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 75, 439-447.
- Dupont, N., S. Jiang, M. Pilli, W. Ornatowski, D. Bhattacharya & V. Deretic (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *The EMBO journal*, 30, 4701-4711.
- Fagerberg, L., B. M. Hallström, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg, M. Habuka, S. Tahmasebpour, A. Danielsson & K. Edlund (2014) Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 397-406.

- Flieger, O., A. Engling, R. Bucala, H. Lue, W. Nickel & J. Bernhagen (2003) Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Letters*, 551, 78-86.
- Glick, D., S. Barth & K. F. Macleod (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221, 3-12.
- Gretchen, G. L., A. Burke & W. F. Anderson (2010) EPIDEMIOLOGY OF TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCERS. *Breast disease*, 32, 5-24.
- Guo, J. Y., H.-Y. Chen, R. Mathew, J. Fan, A. M. Strohecker, G. Karsli-Uzunbas, J. J. Kamphorst, G. Chen, J. M. S. Lemons & V. Karantz (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & development*, 25, 460-470.
- Gupta, Y., V. Pasupuleti, W. Du & S. M. Welford (2016) Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion Is Induced by Ionizing Radiation and Oxidative Stress in Cancer Cells. *PLoS ONE*, 11, e0146482.
- Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Harris, J. (2013) Autophagy and IL-1 Family Cytokines. *Frontiers in Immunology*, 4, 83.
- Harris, J., M. Hartman, C. Roche, S. G. Zeng, A. O'Shea, F. A. Sharp, E. M. Lambe, E. M. Creagh, D. T. Golenbock & J. Tschopp (2011) Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 9587-9597.
- INEGI. (2016) "Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)" Datos nacionales.
- INEGI. (2017) "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) "DATOS NACIONALES. INEGI.
- Jiang, P.-D., Y.-L. Zhao, X.-Q. Deng, Y.-Q. Mao, W. Shi, Q.-Q. Tang, Z.-G. Li, Y.-Z. Zheng, S.-Y. Yang & Y.-Q. Wei (2010) Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 64, 609-614.
- Jiang, S., N. Dupont, E. F. Castillo & V. Deretic (2013) Secretory versus degradative autophagy: unconventional secretion of inflammatory mediators. *Journal of innate immunity*, 5, 471-479.
- Karantz, V. & E. White (2007) Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy*, 3, 610-613.
- Klionsky, D. J. (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 931-937.
- Laddha, S. V., S. Ganesan, C. S. Chan & E. White (2014) Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers. *Molecular cancer research*, 12, 485-490.
- Lee, J. P. W., A. Foote, H. Fan, C. Peral de Castro, T. Lang, S. A. Jones, N. Gavrilescu, K. H. G. Mills, M. Leech & E. F. Morand (2016) Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages. *Autophagy*, 12, 907-916.
- Lehmann, L. E., S. U. Weber, D. Fuchs, M. Book, S. Klaschik, J.-C. Schewe, A. Hoeft & F. Stüber (2008) Oxidoreductase Macrophage Migration Inhibitory Factor is simultaneously increased in leukocyte subsets of patients with severe sepsis. *Biofactors*, 33, 281-291.
- Leloup, C., C. Turrel-Cuzin, C. Magnan, M. Karaca, J. Castel, L. Carneiro, A.-L. Colombani, A. Ktorza, L. Casteilla & L. Pénicaud (2009) Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Obligatory Signals for Glucose-Induced Insulin Secretion. *Diabetes*, 58, 673-681.

- Lerch, J. K., D. A. Puga, O. Bloom & P. G. Popovich (2014) Glucocorticoids and macrophage migration inhibitory factor (MIF) are neuroendocrine modulators of inflammation and neuropathic pain after spinal cord injury. 409-414.
- Levine, B. & D. J. Klionsky (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6, 463-477.
- Liu, W., Y. Peng, Y. Yin, Z. Zhou, W. Zhou & Y. Dai (2014) The involvement of NADPH oxidase-mediated ROS in cytokine secretion from macrophages induced by Mycobacterium tuberculosis ESAT-6. *Inflammation*, 37, 880-892.
- Lue, H., R. Kleemann, T. Calandra, T. Roger & J. Bernhagen (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and Infection*, 4, 449-460.
- Lue, H., M. Thiele, J. Franz, E. Dahl, S. Speckgens, L. Leng, G. Fingerle-Rowson, R. Bucala, B. Lüscher & J. Bernhagen (2007) 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*, 26, 5046-5059.
- Mariño, G., I. Martins & G. Kroemer (2011) Autophagy in Ras-induced malignant transformation: fatal or vital? *Molecular cell*, 42, 1-3.
- Mavaddat, N., T. R. Rebbeck, S. R. Lakhani, D. F. Easton & A. C. Antoniou (2010) Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms. *Breast Cancer Research*, 12, R28-R28.
- Maycotte, P., C. M. Gearheart, R. Barnard, S. Aryal, J. M. M. Levy, S. P. Fosmire, R. J. Hansen, M. J. Morgan, C. C. Porter & D. L. Gustafson (2014) STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer research*, 74, 2579-2590.
- Maycotte, P., K. L. Jones, M. L. Goodall, J. Thorburn & A. Thorburn (2015) Autophagy supports breast cancer stem cell maintenance by regulating IL6 secretion. *Molecular Cancer Research*, 13, 651-658.
- Maycotte, P. & A. Thorburn (2014) Targeting autophagy in breast cancer. *World journal of clinical oncology*, 5, 224.
- Merk, M., J. Baugh, S. Zierow, L. Leng, U. Pal, S. J. Lee, A. D. Ebert, Y. Mizue, J. O. Trent, R. Mitchell, W. Nickel, P. B. Kavathas, J. Bernhagen & R. Bucala (2009) The Golgi-associated Protein p115 Mediates the Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Journal of immunology*, 182, 6896-6906.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21, 2861-2873.
- Mizushima, N. & T. Yoshimori (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-545.
- Nalawade, S. A., Y. Al-Abed & T. G. Forsthuber. (2017) Advances in Understanding the Role of MIF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. In *MIF Family Cytokines in Innate Immunity and Homeostasis*, 77-95.
- Nobre, C. C. G., J. M. G. de Araújo, T. A. A. d. M. Fernandes, R. N. O. Cobucci, D. C. F. Lanza, V. S. Andrade & J. V. Fernandes (2017) Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. *Pathology & Oncology Research*, 23, 235-244.

- Pawig, L., C. Klasen, C. Weber, J. Bernhagen & H. Noels (2015) Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 6, p429.
- Qu, X., J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E.-L. Eskelinen, N. Mizushima & Y. Ohsumi (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1809.
- Richard, V., N. Kindt & S. Saussez (2015) Macrophage migration inhibitory factor involvement in breast cancer. *International journal of oncology*, 47, 1627-1633.
- Roger, T., J. David, M. P. Glauser & T. Calandra (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 414, 920-924.
- Rubinsztein, D. C., P. Codogno & B. Levine (2012) Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 11, 709-730.
- Schauer, I. G., J. Zhang, Z. Xing, X. Guo, I. Mercado-Urbe, A. K. Sood, P. Huang & J. Liu (2013) Interleukin-1 β promotes ovarian tumorigenesis through a p53/NF- κ B-mediated inflammatory response in stromal fibroblasts. *Neoplasia*, 15, 409IN14-420IN18.
- Shi, X., L. Leng, T. Wang, W. Wang, X. Du, J. Li, C. McDonald, Z. Chen, J. W. Murphy & E. Lolis (2006) CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, 25, 595-606.
- Silva, L. M. & J. U. Jung. 2013. Autophagy and Immunity. In *Autophagy and Cancer*, 145-165. Springer.
- Stanner, S. A., J. Hughes, C. N. M. Kelly & J. Buttriss (2004) A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public health nutrition*, 7, 407-422.
- Stewart, B. W. & C. P. Wild. 2014. World Cancer Report 2014.[Internet] Geneva: OMS, IARC; 2014 [Access 20 noviembre 2017]. In *Disponible en: Disponible en: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp>*.
- Sohda, M., Y. Misumi, A. Yano, N. Takami & Y. Ikehara (1998) Phosphorylation of the vesicle docking protein p115 regulates its association with the Golgi membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5385-5388.
- Sun, H.-W., M. Swope, C. Craig, S. Bedarkar, J. Bernhagen, R. Bucala & E. Lolis (1996) The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Engineering, Design and Selection*, 9, 631-635.
- Takahashi, N., J. Nishihira, Y. Sato, M. Kondo, H. Ogawa, T. Ohshima, Y. Une & S. Todo (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Molecular medicine*, 4, 707.
- Tanida, I. (2011) Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & redox signaling*, 14, 2201-2214.
- Tillmann, S., J. Bernhagen & H. Noels (2013) Arrest functions of the MIF ligand/receptor axes in atherogenesis. *Frontiers in immunology*, 4, 113.
- White, E. (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12, 401-410.
- Yang, Y.-Q., W.-J. Dong, X.-F. Yin, Y.-N. Xu, Y. Yang, J.-J. Wang, S.-J. Yuan, J. Xiao, J. H. DeLong & L. Chu (2016) Interferon-related secretome from direct interaction between immune

cells and tumor cells is required for upregulation of PD-L1 in tumor cells. *Protein & cell*, 7, 538-543.