

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Respuesta inmunoregulatoria diferencial en células de
cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 inducida por el medio
condicionado de células troncales mesenquimales de médula
ósea”**

TESIS

Que presenta

VÍCTOR MANUEL ARENAS LUNA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de Tesis

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dr. Salomón Hernández Gutiérrez

Ciudad de México

Marzo, 2023

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN; en conjunto con el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Panamericana, bajo la dirección del Dr. Bulmaro Cisneros Vega y el Dr. Salomón Hernández Gutiérrez.

El sustentante recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de CVU: 289169.

El trabajo estuvo bajo la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, el Dr. Efraín Garrido Guerrero y el Dr. Jaime García Mena, miembros del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN y el Dr. Juan José Montesinos Montesinos de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS.

Agradecimientos

Agradezco a cada una de las personas que participaron con su ayuda en la realización de este trabajo, en particular al:

Dr. Bulmaro Cisneros por haberme permitido ser su alumno, por su apoyo y valiosas recomendaciones.

Dr. Salomón Hernández por la oportunidad de formar parte de su laboratorio hace ya varios años, por su amistad, apoyo y disposición de brindarme un buen consejo en el ámbito académico y en el personal.

Al Dr. Juan José Montesinos Montesinos por los valiosos consejos y recomendaciones que siempre mejoraron y enriquecieron este trabajo.

A mi comité tutorial formado por la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, el Dr. Efraín Garrido Guerrero, el Dr. Jaime García por la revisión y valiosos comentarios realizados para mejorar este trabajo.

Al M. en C. Adrián Cortés por el apoyo técnico y metodológico durante la realización de este trabajo.

A Janneth Idelfonso por su cariño, amistad y compañía.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Karla, Farid, Esme, Diego por su amistad, compañía y apoyo en el laboratorio.

Gracias...

Al UNIVERSO, por permitirme la existencia en este mundo, y por el termino de un ciclo más de esta vida.

A mi MAMÁ, por su gran amor y apoyo incondicional, por sus enseñanzas y lecciones de vida.

A mi PAPÁ, por su cariño y gran interés en mí.

A mi HERMANO, por su amistad, ayuda y comprensión.

Índice

Índice	5
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	10
1 Introducción	11
1.1 Cáncer	11
1.2 Cáncer de mama.....	13
1.3 Microambiente tumoral.....	15
1.4 Mecanismos de inmunomodulación de las células cancerosas	16
1.5 Inmunomodulación de las células cancerosas a través de factores solubles..	17
1.6 Inmunomodulación de las células cancerosas a través de contacto celular ..	19
1.7 Células troncales mesenquimales	20
1.8 Efecto de las MSC en el desarrollo tumoral.....	22
2 Justificación	25
3 Hipótesis	26
4 Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos particulares	27
5 Materiales y métodos	27
5.1 Cultivos celulares	27
5.2 Caracterización de hBM-MSC	29
5.2.1 Inmunofenotipo.....	29
5.2.2 Diferenciación a Adipocitos	29
5.2.3 Diferenciación a condrocitos.....	29
5.2.4 Diferenciación a osteocitos.....	30
5.3 Preparación del medio condicionado derivado de hBM-MSC	30
5.4 Líneas celulares de cáncer de mama	30
5.5 Ensayos de migración	31
5.6 Ensayos de formación de colonias	31

5.7 Ensayos de qRT-PCR	32
5.8 Ensayos de proliferación de MNCs en cocultivos	33
5.9 Análisis Cuantitativo de Moléculas Solubles	34
5.10 Detección de la expresión deIDO en células de cáncer de mama	35
5.11 Detección de células Treg	35
5.12 Análisis estadístico	36
6 Resultados	36
6.1 Caracterización de hBM-MSC	36
6.2 Efecto del medio condicionado de las hBM-MSC en la proliferación de células de cáncer de mama	38
6.3 Efecto del hBM-MSC-cm sobre la capacidad de migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474.....	39
6.4 Efecto del hBM-MSC-cm en el crecimiento con independencia de anclaje de células de cáncer de mama.....	40
6.5 Efecto del hBM-MSC-cm en la expresión de genes inmunomoduladores en células MDA-MB-231 y BT-474	42
6.6 Análisis de proliferación de células mononucleares derivadas de sangre periférica en cocultivo con líneas celulares de cáncer de mama y hBM-MSC-cm	43
6.7 Evaluación de moléculas candidatas involucradas en la regulación de la proliferación de las MNCs	46
6.8 El hBM-MSC-cm induce diferencialmente la expresión deIDO en las líneas celulares de cáncer de mama estudiadas	48
6.9 Evaluación del efecto de hBM-MSC-cm sobre la capacidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 para generar linfocitos T reguladores (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺)	50
6.10 Propuesta de modelo de inmunoregulación diferencia entre las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474.....	52
7 Discusión	54
8 Conclusiones.....	60
9 Perspectivas.....	60
10 Bibliografía	61
11 Anexos	68

Índice de Figuras

Figura 1. Número de casos estimados de cáncer a nivel mundial al cierre del 2021.	12
Figura 2 Número de casos estimados de cáncer en México al cierre del 2021	12
Figura 3 Caracterización de células estromales mesenquimales de médula ósea humana utilizadas en este estudio (hBM-MSC).	37
Figura 4 La proliferación de células de cáncer de mama es afectada por el medio condicionado de BM-MSC.	38
Figura 5 La migración de las células de cáncer de mama es afectada por el medio condicionado de BM-MSC.	40
Figura 6 El crecimiento con independencia de anclaje en células de cáncer de mama es modificado por el medio condicionado de BM-MSC.	41
Figura 7 El hBM-MSC-cm induce la sobreexpresión de genes inmunomoduladores en células de cáncer de mama MDA-MB-231.....	43
Figura 8 Efecto inmunomodulador de células de cáncer de mama inducido por el hBM-MSC-cm.	45
Figura 9 Cuantificación de citocinas eIDO.	50
Figura 10 Capacidad de las células de MDA-MB-231 y BT-474 para generar linfocitos T reguladores (CD4+CD25+FoxP3+) bajo la influencia del hBM-MSC-cm.....	52
Figura 11 Modelo propuesto del efecto diferencial que tiene el hBM-MSC-cm sobre la capacidad inmunorreguladora de células de cáncer de mama BT-474 (luminal) y MDA-MB-231 (triple negativo).....	54

Índice de Tablas

Tabla 1 Características de los subtipos de cáncer de mama .	13
Tabla 2 Efecto del MSC-cm en líneas celulares de cáncer de mama.....	24
Tabla 3 Anticuerpos usados para la detección de proteínas por citometría de flujo.	28
Tabla 4 Oligonucleótidos usados para análisis de expresión por qRT-PCR.....	32
Tabla 5 Valores de DO570nm obtenidos en los ensayos de migración.....	39
Tabla 6 Valores de DO570nm obtenidos en los ensayos de crecimiento con independencia de anclaje.	41
Tabla 7 Valores de proliferación relativa de las MNCs en cocultivo con las células tumorales con y sin hBM-MSC-cm.....	44
Tabla 8 Concentración de citocinas evaluadas en el sobrenadante de los grupos de ensayo (MDA-MB-231).	47
Tabla 9 Concentración de citocinas evaluadas en el sobrenadante de los grupos de ensayo (BT-474).....	47
Tabla 10 Porcentaje de expresión deIDO en las células tumorales.....	48
Tabla 11 Población de linfocitos Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	51

Resumen

Dentro del microambiente tumoral existe una amplia heterogeneidad celular, en el cual se encuentran diversas extirpes celulares, entre ellas las células troncales mesenquimales (MSC), que pueden ser reclutadas de tejidos tan distantes como la médula ósea y contribuir en la patogénesis del tumor. Sin embargo, el impacto del papel inmunorregulador de las MSC asociado con la agresividad de las células de cáncer de mama a través de moléculas solubles no ha sido completamente dilucidado. Por lo que el objetivo de este trabajo in vitro, fue estudiar el efecto que las MSC derivadas de médula ósea (hBM-MSc) a través de su medio condicionado (hBM-MSc-cm) pueden tener sobre algunas propiedades tumorigénicas e inmunoregulatorias de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474. Nuestros resultados mostraron que el hBM-MSc-cm promueve la proliferación, migración y crecimiento con independencia de anclaje de las células BT-474 pero no de las células MDA-MB-231. Contrariamente el hBM-MSc-cm en células MDA-MB-231 indujo la sobreexpresión de los genes inmunosupresores como *TGF-β*, *IDO* e *IL-10*. Así mismo, los ensayos de inmunomodulación realizados con células mononucleares (MNCs) en cocultivo con las células MDA-MB-231 y hBM-MSc-cm mostraron una reducción en la tasa de proliferación de los linfocitos y un aumento en los niveles de las proteínas IL-10 y TGF-β en el sobrenadante e IDO intracelular en las células MDA-MB-231. Además, los niveles de TNF se redujeron y la proporción de células T reguladoras aumentó. Por el contrario, el hBM-MSc-cm no afectó la capacidad inmunomoduladora de las células tumorales BT-474. Por lo tanto, se observó un efecto diferencial entre ambas líneas celulares de cáncer de mama representativas de diferentes subtipos tumorales bajo el estímulo del hBM-MBS-cm. Finalmente entender la respuesta de las células cancerosas bajo la influencia de las MSC, podría ayudar a diseñar estrategias terapéuticas basadas en el comportamiento agresivo de las células tumorales.

Abstract

Inside the tumor microenvironment a wide cellular heterogeneity and several cell lines types are found, among them mesenchymal stem cells (MSC), which can be recruited from tissues as distant as the bone marrow and contribute to development of tumor pathogenesis. However, the impact of MSC on immunoregulatory processes associated to the aggressiveness of breast cancer cells through soluble molecules has not been completely elucidated. Therefore, the aim of this work was studying in vitro the effect of conditioned medium of MSCs derived from human bone marrow (hBM-MSC-cm) on some tumorigenic properties as well as the immunoregulatory capability of the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and BT-474. Our results showed that hBM-MSC-cm promotes proliferation, migration and anchorage-independent growth of BT-474 cells but not in MDA-MB-231 cells. Conversely, the hBM-MSC-cm in MDA-MB-231 cells induced the overexpression of the immunosuppressive genes *TGF- β* , *IDO* and *IL-10*. Likewise, immunomodulation assays performed with peripheral blood mononuclear cells (MNCs) in coculture with MDA-MB-231 and hBM-MSC-cm showed low levels of proliferation of lymphocyte and an increase *IL-10*, *TGF- β* protein levels in the cocultures supernatant and intracellular *IDO* in MDA-MB-231 cells. In addition, *TNF* levels were reduced and the proportion of regulatory T cells was increased. In contrast, hBM-MSC-cm did not affect the immunomodulatory capacity of BT-474 tumor cells. Therefore, a differential effect in both breast cancer cell lines representative of different tumor subtypes was observed under hBM-MSC-cm stimulus. Finally, understanding the response of cancer cells under the MSC influence could help in the therapeutic design of new strategies based on the aggressive behavior of tumor cells.

1 Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer por ser una enfermedad multifactorial es compleja, difícil de abordar y tiene una elevada tasa de mortalidad. A nivel molecular, el cáncer se caracteriza por una desregulación en los mecanismos de división celular, lo que promueve una proliferación descontrolada e ilimitada de las células cancerosas. Esta enfermedad es considerada multifactorial, debido al efecto conjunto de diversos factores genéticos y ambientales que pueden favorecerla, los cuales pueden ser hereditarios, o carcinogénicos de tipo químicos (aflatoxinas, asbestos, arsénico, etc), físicos (radiaciones ionizantes) y biológicos (infecciones por virus y bacterias), entre otros ¹.

El desarrollo del cáncer involucra múltiples procesos y etapas durante las cuales las células cancerosas son susceptibles a mutaciones, inestabilidad genómica y a eventos de selección celular, que favorecen la sobrevivencia, la proliferación celular, la capacidad de invadir tejidos normales circundantes y su propagación a través del sistema circulatorio y linfático (metástasis). Por otra parte, las células cancerosas se caracterizan por presentar un metabolismo desregulado, una alta capacidad de promover el proceso inflamatorio y el potencial de evadir la respuesta inmune, entre otros mecanismos ².

Actualmente, el cáncer es un grave problema de salud pública a nivel mundial que sigue en aumento y es considerada la segunda causa de muerte. Datos de la Organización Mundial de la Salud señalan que en el año 2021 se diagnosticaron 20 millones de nuevos casos y la mitad de ellos fallecieron a causa de esta enfermedad. En la actualidad se reconocen más de 200 tipos de cáncer. La figura 1 muestra los principales tipos de cáncer a nivel mundial, de los cuales el cáncer de mama es el más frecuente, seguido por el cáncer de próstata y pulmón ^{3,4}.

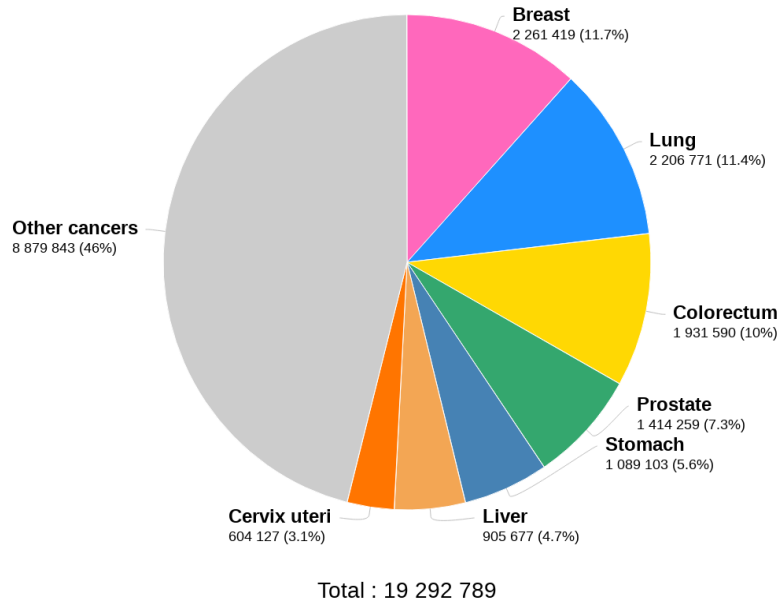


Figura 1. Número de casos estimados de cáncer a nivel mundial al cierre del 2021 ⁴. En México las estadísticas señalan que el número de casos de cáncer y la tasa de defunciones por tumores malignos aumentaron en la última década. En el año 2020 se reportaron un total de 195,499 nuevos casos de cáncer, con un total de 90,222 defunciones a causa de esta enfermedad. La figura 2 muestra los principales tipos de cáncer en México, de los cuales el cáncer de mama es el más frecuente, seguido por el cáncer de próstata y colorectal ⁴.

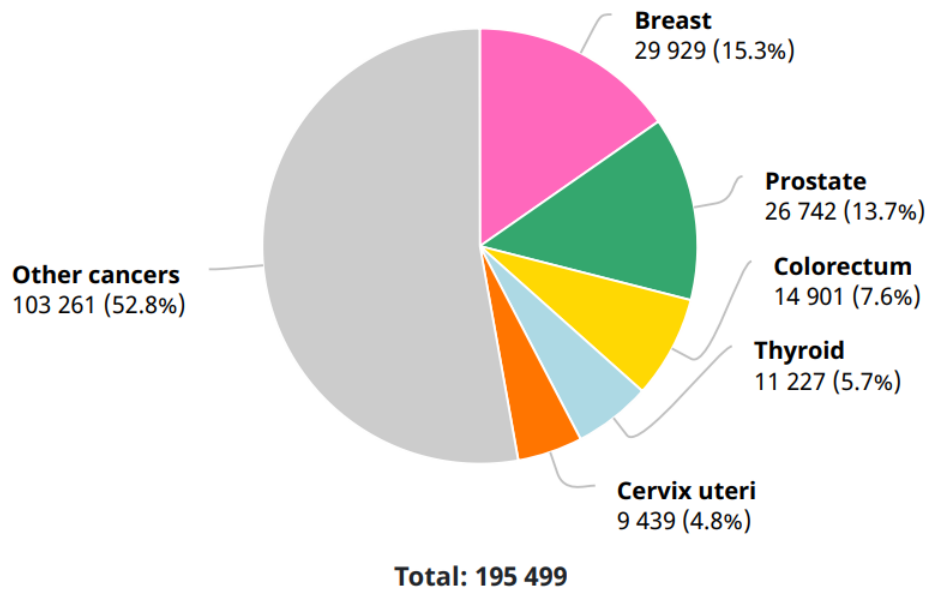


Figura 2 Número de casos estimados de cáncer en México al cierre del 2021 ⁴.

1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado en la población femenina y es considerada la segunda causa de muerte en mujeres a nivel mundial. En 2021 se reportaron 2.26 millones de nuevos casos, representando el 25.4% de todos los tipos de cáncer presente en mujeres a nivel mundial ⁴.

El cáncer de mama es considerado una enfermedad multifactorial y heterogénea. A nivel molecular el cáncer de mama se ha clasificado de acuerdo con la presencia o ausencia de receptores celulares como: el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), la expresión otros marcadores moleculares como Ki67, entre otros y algunas características histológicas particulares para cada uno de ellos. El cáncer de mama ha sido clasificado en cinco diferentes subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2⁺, Basal o Triple negativo y Parecido al normal (normal-like). La presencia de estos receptores en el cáncer de mama otorgan características biológicas, etiológicas y clínicopatológicas particulares (tabla 1) ^{5,6}.

Tabla 1 Características de los subtipos de cáncer de mama ⁷.

Subtipo	Inmunohistoquímica	Grado	Prognosis	Prevalencia
Luminal A	[ER ⁺ PR ⁺] HER2 ⁻ Ki67 ⁻	1 2	Buena	50-60%
Luminal B	[ER ⁺ PR ⁺] HER2 ⁻ Ki67 ⁺	2 3	Intermedia	15-20%
	[ER ⁺ PR ⁺] HER2 ⁺ Ki67 ⁺			
HER2 sobreexpresado	[ER ⁻ PR ⁻] HER2 ⁺	2 3	Mala	15-20%
Basal	[ER ⁻ PR ⁻] HER2 ⁻	3	Mala	8-37%
Parecido al normal	[ER ⁺ PR ⁺] HER2 ⁻ Ki67 ⁻	1 2 3	Intermedia	5-10%

ER: receptor de estrógeno; PR: receptor de progesterona; HER2 (ErbB2): receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; Ki67: marcador de proliferación celular.

Aunque esta categorización es considerada como la clasificación estándar del cáncer de mama, otros autores han propuesto algunas subdivisiones dentro de esta clasificación ⁸.

Los tumores de cáncer de mama que expresan los receptores de estrógenos y/o progesterona son considerados tumores con receptores hormonales positivos, mientras que los tumores que carecen de la expresión de los receptores (ER⁻, PR⁻ o HER2⁻) comúnmente son conocidos como triple negativo. La mayoría de los tumores de cáncer de mama caen principalmente en tres de los subtipos antes mencionados; es decir, luminal, HER2 sobreexpresado y basal en el cual los tumores triple negativo son los más heterogéneos y representativos del subtipo ^{6,9}.

El subtipo luminal es el más prevalente dentro del cáncer de mama y se caracteriza por expresar receptores hormonales, con un perfil de expresión semejante a las células epiteliales lumbales de la mama. Dentro del subtipo luminal se han reportado dos tipos: luminal A (ER⁺PR⁺HER2⁻) y luminal B (ER⁺PR⁺HER2⁺). El subtipo luminal A, se caracteriza por presentar una mayor expresión de genes relacionados a los estrógenos y una menor expresión de genes proliferativos como ki67, por lo que su crecimiento suele ser más lento, de baja agresividad y de mejor pronóstico que otros subtipos. El tratamiento terapéutico del subtipo luminal A suele ser hormonal o endocrino ¹⁰. Por otra parte, el subtipo luminal B presenta un comportamiento más agresivo, presenta una mayor expresión de ki67, por lo que el crecimiento de estas células cancerosas es más rápido, su grado de complejidad histológica es mayor y su pronóstico más desfavorable. El subtipo luminal B presenta una mayor tasa de recurrencia y una menor tasa de sobrevivencia en comparación con el subtipo luminal A. El tratamiento para este subtipo suele consistir en una combinación de estrategias de tipo hormonal junto con quimioterapia ^{5,6,10}.

Por otra parte, el subtipo basal es caracterizado por carecer de la expresión de los tres receptores principales ER⁺PR⁺HER2⁻ (triple negativo), presentar un perfil de expresión semejante al de las células mioepiteliales de la mama y una elevada expresión de genes relacionados a la proliferación, generalmente presentan TP53 mutado, por lo que estos tumores suelen ser de alto grado proliferativo. Los tumores triple negativo se caracterizan por ser clínicamente más agresivos y por carecer de una terapia específica dirigida, esto debido a la carencia de expresión de cualquiera de los tres receptores, por lo que la única opción terapéutica principalmente es dar quimioterapia ^{5,6,10}.

Actualmente el impacto que tiene el cáncer de mama en la salud pública ha motivado a los investigadores a tratar de conocer y profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo de esta patología, con la finalidad de proporcionar la estrategia terapéutica más adecuada para cada subtipo de cáncer de mama. Desafortunadamente, a pesar de ello muchos pacientes progresan a etapas avanzadas, ya que la mayoría de las investigaciones y fármacos que se utilizan en la actualidad tienen como blanco principal a las células cancerosas, dejando de lado la importancia e influencia que puede tener el microambiente en el tumor.

1.3 Microambiente tumoral

El desarrollo y la progresión del cáncer son procesos complejos, regulados por diversos mecanismos que de manera parcial ocurren a consecuencia de las interacciones dinámicas y multidireccionales que se dan entre los múltiples componentes que conforman el microambiente tumoral (TME). Actualmente se reconoce que el TME es el mayor regulador de la carcinogénesis, ya que puede influir directamente sobre el desarrollo tumoral tanto de manera positiva como negativa.

El TME está constituido por diferentes tipos celulares, dentro de las cuales se encuentran las células tumorales, células endoteliales, células inmunes y diversos tipos de células estromales como las células troncales

mesenquimales (MSC), entre otras. Así mismo, el TME está constituido por componentes no celulares que conforman la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, ácido hialurónico, laminina, entre otros)¹¹. Las interacciones que ocurren en el microambiente tumoral pueden ser a través de mecanismos que involucran el contacto célula-célula, la participación de complejos de matriz extracelular y/o moléculas solubles presentes en el microambiente (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, mediadores inflamatorios). A través de esta serie de interacciones, se establece una red de comunicación y señalización que conectan a las células tumorales con el resto de los componentes del tumor, promoviéndose de esta manera la carcinogénesis en todas sus etapas.

Desde el siglo XVIII, donde se describió al cáncer como un estado de inflamación crónica, la presencia de células inmunes en el TME ha adquirido interés en la investigación del cáncer. Partiendo del papel fisiológico del sistema inmunológico de generar una respuesta inmune antitumoral que elimine a las células neoplásicas, la presencia y participación activa de las células inmunes en el tumor pareciera contradictorio cuando estas actúan a favor del crecimiento tumoral ¹². De este manera, a pesar de la presencia de inflamación crónica en el microambiente tumoral, la respuesta inmune es débil debido a la promoción de un estado de inmunotolerancia que puede ser inducido por diferentes estirpes celulares presentes en el microambiente tumoral, entre ellas las células tumorales principalmente ¹³.

1.4 Mecanismos de inmunomodulación de las células cancerosas

En el microambiente tumoral guiadas por gradientes quimiotácticos, se infiltran una gran variedad de células inmunes (células T, células B, macrófagos, células dendríticas, etc) ¹⁴. En el tumor, existe la posibilidad de encontrar al mismo tiempo dos subclases de células inmunitarias: las células inmunoestimuladoras (macrófagos, linfocitos, células NK, células dendríticas, eosinófilos, etc) cuya función es crucial para el control del desarrollo tumoral

(respuesta anti-tumorigénica). Y las células inmunosupresoras que inhiben la función de las células inmunoestimulantes y están asociadas a la promoción del desarrollo tumoral (células mieloides supresoras, células reguladoras, macrófagos tipo 2, entre otras)¹⁵. En el microambiente tumoral se han descrito diferentes mecanismos antiinflamatorios que permiten el reclutamiento y promoción de células inmunes supresoras. En estos procesos, se involucra la participación de diferentes estirpes celulares que interactúan a través de contacto célula-célula y/o a través de factores solubles secretados ¹⁶.

Las células tumorales utilizan diversas estrategias para evadir al sistema inmune, dentro de las cuales tenemos la disminución en la expresión de antígenos tumorales, la producción soluble de moléculas de histocompatibilidad tipo I, la pérdida de moléculas de adhesión como ICAM, la sobreexpresión de moléculas anti-apoptóticas (BCL-2) y otras moléculas como el ligando 1 de muerte programada (PDL-1). Las células tumorales también producen moléculas inmunosupresoras como (VEGF, IL-10, IL-4, IDO, TGF- β , GM-CSF, etc), que alteran la capacidad de las células presentadoras de antígeno, la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias y la promoción de la desregulación del balance de células reguladoras/efectoras^{17,18}. Algunas de las moléculas solubles inmunomoduladoras secretadas por las células cancerosas son las siguientes: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleucina 10 (IL-10), la interleucina 4 (IL-4), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), indolamina 2,3-dioxygenasa 1 (IDO, entre otras.

1.5 Inmunomodulación de las células cancerosas a través de factores solubles

Las células cancerosas son las principales productoras del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), este factor promueve la angiogénesis y además promueve el escape inmunológico tumoral bloqueando la maduración de precursores de las células dendríticas (CD) CD34⁺, promueve

una baja expresión de MHC tipo II y una capacidad reducida para fagocitar antígenos en CD, lo que promueve su disfuncionalidad ^{17,19}. Así mismo, VEGF interfiere con el desarrollo de las células T e incluso promueve la inducción y mantenimiento de las células Treg en el tumor ²⁰.

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria e inmunosupresiva secretada por las células cancerosas y las células inmunes que promueve la sobrevivencia, proliferación, metástasis e inmunoescape de las mismas células neoplásicas. Ya que en las células tumorales disminuye la expresión de MHC tipo I. En células presentadoras de antígeno, la IL-10 disminuye la expresión de MHC tipo II, su diferenciación y sus propiedades de presentación de antígeno. En células NK la IL-10 inhibe su actividad citotóxica, lo que impide la consecuente activación de células T citotóxicas por parte de las células NK. En las células T, la IL-10 inhibe su polarización hacia Th1 y promueve su diferenciación hacia un fenotipo regulador. Así mismo, la IL-10 disminuye la producción de citocinas proinflamatorias como: TNF- α e IFN- γ , IL-1, IL-6, GM-CSF, etc en células T y macrófagos ²¹⁻²³.

La interleucina 4 (IL-4) es otra citocina inmunomoduladora secretada por células inmunes y algunas células cancerosas, que promueve una respuesta antiinflamatoria tipo Th2 en el microambiente tumoral. IL-4 activa y promueve la proliferación de células inmunosupresoras, como las células supresoras mieloides, macrófagos asociados a tumores y Treg. Así mismo, IL-4 estimula la producción de otras citocinas antiinflamatorias como IL-10 en las células Treg, lo que promueve la inhibición de la activación de otras células inmunes como las células T ^{24,25}.

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citocina pleiotrópica producida por diferentes tipos celulares, entre ellas las células cancerosas. TGF- β regula el crecimiento celular, diferenciación, migración y muerte celular. En el sistema inmune TGF- β controla la generación y función de varias células inmunes. En el sistema inmune innato, TGF- β inhibe a las células NK y regula

la expresión del complejo comportamiento de macrófagos y neutrófilos. TGF- β también controla la inmunidad adaptativa al promover la expansión de células Treg e inhibe la generación, proliferación y función de células T (a través de la disminución de la expresión de IL-2) y en células presentadoras de antígeno como las células dendríticas disminuye la expresión de MHC tipo II y de moléculas co-estimuladoras ²⁶⁻²⁸.

Otra molécula que promueve el desarrollo y progresión de tumoral y que participa en el establecimiento de un microambiente inmunosupresivo es la enzima citosólica relacionada en el catabolismo del triptófano: indolamina 2,3-dioxygenasa 1 (IDO). Se ha reportado que los principales mecanismos de inmunomodulación inducidos por IDO ocurren a consecuencia de la depleción del triptófano y la acumulación de kinurenina (producto de la actividad de IDO sobre el triptófano). Estas condiciones soportan el ambiente inflamatorio y promueven la inmunotolerancia hacia antígenos tumorales en células inmunes y estromales, a través de la promoción de un estado anérgico en células inmunes efectoras (disminuye la expresión en células T de CD8 y en células NK disminuye la expresión de receptores de activación e impide la secreción de enzimas). IDO también promueve y activa células inmunes tolerogénicas a través de la expresión FOXP3⁺ (Treg y células supresoras derivadas mieloides) ^{29,30}.

En el microambiente tumoral existen otro tipo de moléculas producidas por las células tumorales como: COX-2 y PGE2 que igualmente participan en la progresión tumoral, angiogénesis e inmunomodulación ^{29,31-33}.

1.6 Inmunomodulación de las células cancerosas a través de contacto celular

Otros mecanismos utilizados por las células cancerosas para evadir la respuesta inmune requieren el contacto célula-célula. Se conoce que las células tumorales sobreexpresa algunos receptores como el ligando de muerte programada (PDL-1) que induce anergia y/o apoptosis en células que

expresan PD-1 como los linfocitos T y B, también se promueve la actividad de las células Treg³⁴. Otro receptor es CTLA-4, que es expresado por las células T activadas y su estimulación promueve un efecto inhibitorio en los linfocitos³⁵. Curiosamente este receptor es expresado en células tumorales y debido a efecto inhibitorio, la sobreexpresión de este receptor en cáncer correlaciona con un mal pronóstico. Aunque se conoce poco sobre el mecanismos de acción en células tumorales, posiblemente CTLA-4 contribuye a la regulación de la expresión de PD-L1 en las células cancerosas y en la expresión de PD-1 en otras células inmunes^{36,37}.

A través de estos y otros mecanismos, las células tumorales pueden establecer un estado de inmunotolerancia, en el que respuesta inmune antitumoral es débil por lo que se promueve la sobrevivencia y promoción de las células tumorales.

Curiosamente, dentro del microambiente tumoral, las células cancerosas no son las únicas células con capacidad inmunoreguladora. La compleja interacción que ocurre entre las células cancerosas, el TME inmunitario relacionado a la inflamación y otras condiciones como la hipoxia promueven el reclutamiento de otro tipo de células al microambiente, como es el caso de las MSC. De hecho, las células tumorales secretan algunas citocinas, factores inflamatorios (TGF β , TNF α , IL-8 e IL-1 β), factores de crecimiento (TGF- β , EGF, PDGF, SCF, HGF, IGF-1 y GF); factores angiogénicos (β FGF, HIF1 α y VEGF) y quimiocinas (CCL2, CCL5, CCL22 y SDF-1 α) que promueven la migración de un gran número de MSC hacia el estroma del tumor desde otros tejidos y tan lejanos como la médula ósea hacia donde pueden influir de manera positiva o negativa en la tumorigénesis³⁸⁻⁴³.

1.7 Células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales son un grupo heterogéneo de células multipotenciales presentes en diferentes órganos y tejidos como: cordón umbilical, tejido adiposo, pulpa dental, músculo esquelético, médula ósea (BM), entre otros. En cultivo, las MSC son células adherentes con morfología

tipo fibroblastoide que expresan ciertos marcadores de superficie específicos (principalmente CD73, CD90, CD105, CD44 and CD29) y son negativas a otros marcadores (CD3, CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79, CD133 y al antígeno leucocitario humano). Las MSC presentan una gran capacidad de diferenciación a diversos tipos celulares (adipocitos, condrocitos, osteocitos, entre otros, bajo las condiciones adecuadas de cultivo), capacidad de autorrenovación y fisiológicamente participan en la regulación de la homeostasis para la reparación de tejidos e inmunidad ⁴⁴⁻⁴⁶.

En el contexto inflamatorio del ambiente tumoral, las MSC también tienen la capacidad de afectar la proliferación y maduración de células del sistema inmune innato y adaptativo ^{47,48}. De hecho, esta actividad inmunoregulatoria de las MSC es activada por la presencia de algunas citocinas inflamatorias como TNF α , IFN- γ e IL-1 α presentes en el TME ^{49,50}. Una vez activadas, las MSC secretan una gran variedad de moléculas inmunosupresoras como IL-10, TGF- β , NO, IDO, PGE2, entre otras ^{51,52}. Estos mediadores protegen a las células cancerosas, reduciendo la maduración y la proliferación de células T, promueven la generación y activación de células Treg, disminuyen la proliferación y diferenciación de células B, y la actividad de células NK ⁵³⁻⁵⁵.

Actualmente, una gran variedad de estudios ha reportado que las MSC pueden modificar algunas funciones de las células cancerosas, y repercutir en múltiples etapas de la progresión tumoral en distintos tipos de cáncer (próstata, colón, gástrico, mama, linfoma, piel, etc). De hecho, se ha observado que las células tumorales tras su interacción con las MSC en cocultivo, se promueve la proliferación, la capacidad metastásica (adhesión, migración e invasión), la quimioresistencia, entre otros procesos en las células cancerosas ⁵⁶⁻⁶².

A pesar de las propiedades protumorigénicas de las MSC reportadas en diferentes estudios, es importante tomar en cuenta que otras investigaciones han reportado un efecto antitumorigénico por parte de las MSC, a través de la supresión de la angiogénesis, promoción de un infiltrado inflamatorio, inducción del arresto al ciclo celular, apoptosis entre otros mecanismos ^{63,64}.

1.8 Efecto de las MSC en el desarrollo tumoral

El efecto que tienen las MSC sobre las células tumorales es compleja y repercute en múltiples niveles. Se sabe que las MSC pueden promover la troncalidad (“stemness”) en las células tumorales, a través de la secreción de moléculas como IL-6, proteína morfogénica de hueso, TGF- β , PGE2, CXCL7 y la activación de la vía de señalización (IL-6/JAK/STAT3). E incluso se ha descrito que la secreción de PGE2 por parte de las MSC, promueve un fenotipo de troncalidad en las células cancerosas (CD133⁺, aldehído deshidrogenasa (ALDH) positivas^{65,66}.

La MSC, tienen la capacidad de promover la migración y potencial metastásico de las células tumorales a través de la inducción de la transición epitelio-mesénquima, ^{67,68} promoviendo la expresión de vimentina, fibronectina, proteína específica de fibroblastos 1 y disminuyendo de la expresión de E-cadherina y β -catenina ^{40,67-69}. Así mismo, las MSC promueven en células tumorales de mama, próstata, pulmón la expresión de metaloproteasas (MMP2 y MMP9) ^{70,71}. Otros mecanismos de en los que se encuentran implicadas son aquellos de migración que involucran moléculas como: CXCL1/CXCL5-CXCR2 y RE/CXCR4 ^{72,73} y por medio de CCL5 promueven la metástasis pulmonar en cáncer de mama ⁷⁴.

En el microambiente tumoral, las MSC pueden promover directamente el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos expresando marcadores de potencial angiogénico como CD31 y localizándose cerca de los mismos vasos dónde secretan moléculas solubles que promueven la angiogénesis como LIF, M-CSF, MIP-2, VEGF, IFN- γ y TNF α ⁷⁵⁻⁷⁷.

Interesantemente, se cree que en cierta medida las MSC son responsables de la resistencia a fármacos de las células tumorales, ya que las MSC secretan moléculas que promueven la sobrevivencia y crecimiento tumoral (SDF-1, IL-6, NO, G-CSF, M-CSF, GM-CSF), las MSC también promueven la síntesis de componentes de matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágeno) e

incluso estimulan la síntesis de ácidos grasos que protegen a las células tumorales del efecto de los fármacos. Así mismo, las MSC promueven la autofagia para reciclar macromoléculas y sintetizan factores antiapoptóticos, (Mcl-1) que promueven la sobrevivencia y el crecimiento de las células tumorales adyacentes ⁷⁸⁻⁸¹.

Los múltiples efectos que pueden ejercer las MSC sobre las células tumorales ocurren a través de complejos mecanismos que pueden involucrar el contacto célula-célula o por vía paracrina mediante la secreción de factores solubles ⁵². Sin embargo, diversos autores han atribuido de cierta manera el mayor impacto que tienen las MSC en el desarrollo y progresión tumoral, a la gran variedad de moléculas secretadas por las MSC (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, etc).

Debido a la complejidad del microambiente tumoral y serias dificultades técnicas y metodológicas, no son muchos los estudios que han analizado las múltiples interacciones moleculares que ocurren entre las células cancerosas y su entorno tumoral. Debido a esto, se han realizado diferentes estudios in vitro, dónde se evalúa de manera indirecta el efecto que tienen las MSC sobre las células de cáncer de mama en diferentes procesos, a través de la exposición de las células cancerosas al medio dónde las MSC son cultivadas (medio condicionado de MSC: MSC-cm). Estos estudios, han demostrado que el MSC-cm puede promover o inhibir las propiedades tumorigénicas de algunos tipos de células cancerosas de mama. En la tabla 2 se muestran estudios relevantes donde evalúan el efecto del medio condicionado de MSC derivadas de distintos tejidos sobre células de cáncer de mama.

Tabla 2 Efecto del MSC-cm en líneas celulares de cáncer de mama.

Origen del medio condicionado	Células de cáncer de mama	Efecto observado	Referencia
ADMSC	MCF7	-Disminuye la viabilidad celular	82
AD-MS	MCF7	-Disminuye la viabilidad celular	83
AD-MS	MDA-MB-231	-Incrementa su capacidad migratoria	84
CU-MS, AD-MS, y BMMSC	MDA-MB-231	-Ningún efecto sobre la proliferación celular -Incrementa su capacidad migratoria -No tiene efecto sobre la apoptosis y necrosis celular	85
BM-MS	MCF7	-Incrementa la proliferación celular - No tiene efecto sobre la apoptosis celular	86
CU-MS	MCF7 MDA-MB-231	Promueve la migración y proliferación	87
CU-MS	MDA-MB-231	-Inhibe la proliferación celular, migración, invasión y metástasis. -Incrementa la apoptosis celular.	88
UT-MS	MDA-MB-231 MCF7	- Inhibe su proliferación, formación de esferoides e invasión - Promueve la apoptosis celular No presenta efecto en la proliferación, formación de esferoides e invasión	89
BM-MS	MCF7	Promueve la formación de mamosferas Incrementa la expresión de N-cadherina, vimentina	69
BM-MS	MCF7 MDA-MB-231	Inhibición del crecimiento celular Reducción de la migración e invasión	90

BM-MSC: MSC derivadas de médula ósea; CUMSC: MSC derivadas de cordón umbilical; ADMSC: MSC derivadas de tejido adiposo; UTCMSC: MSC derivadas de cuello uterino.

Tomando en consideración la influencia que tienen las MSC en la fisiología de las células tumorales, en procesos como: proliferación, capacidad metastásica, quimioresistencia, entre otras, en el microambiente tumoral y dada la importancia que tienen para el establecimiento de un ambiente inmunosupresivo en el cáncer; en este trabajo decidimos evaluar in vitro utilizando líneas celulares de cáncer de mama, el efecto que el medio condicionado de MSC derivadas de médula ósea (hBM-MSC-cm) tiene sobre las propiedades inmunorreguladoras de dos líneas celulares con diferentes características de agresividad: la línea celular de adenocarcinoma de mama con alto crecimiento y potencial metastásico MDA-MB-231 (origen basal) con perfil triple negativo PR⁻, ER⁻ y ERBB2⁻ y la línea celular de cáncer de mama ductal con crecimiento lento y débilmente invasivo BT-474 (origen luminal) perfil triple positivo PR⁺, ER⁺ y ERBB2⁺ ⁹¹.

2 Justificación

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y multifactorial que representa un grave problema de salud pública en la población femenina a nivel mundial. En nuestro país es la segunda causa de mortalidad en mujeres adultas. En este contexto de malignidad y de transformación a nivel celular, el sistema inmunológico juega un papel primordial ya que, en algún momento del desarrollo tumoral, puede estar involucrado en el establecimiento de un ambiente inmunosupresivo al interior del microambiente tumoral. Por otro lado, la presencia de factores solubles secretados principalmente por las células tumorales puede generar de cierta manera un tropismo dirigido que puede conducir la atracción de diversas estirpes celulares, algunas de ellas con capacidad inmunoreguladora como las MSC que una vez alojadas en el microambiente tumoral interaccionan con las células tumorales y participan en

el desarrollo y progresión de algunos tipos de cáncer. Por ello, es de gran importancia médica, conocer el efecto que pueden ejercer las MSC sobre algunas propiedades tumorigénicas y sobre la capacidad de modular la respuesta inmune de células tumorales de cáncer de mama con diferentes características de agresividad. Para ello utilizamos diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de mama y células mesenquimales derivadas de médula ósea. Por lo tanto, este trabajo podría contribuir a profundizar en el conocimiento y ayudar a dilucidar las discrepancias en el comportamiento agresivo de algunos subtipos representativos del cáncer de mama.

3 Hipótesis

Si las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 de los subtipos triple negativo y luminal son sensibles al estímulo del medio condicionado derivado de células troncales mesenquimales de médula ósea, entonces sus propiedades tumorigénicas e inmunomodulatorias se verán modificadas de manera diferencial.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar mediante ensayos in vitro la respuesta tumorigénica e inmunomodulatoria de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 en presencia del medio condicionado derivado de células troncales mesenquimales de médula ósea humana.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto que tiene el hBM-MSC-cm en la proliferación, la migración y el crecimiento con independencia de anclaje en las células MDA-MB-231 y BT-474.
2. Evaluar por qRT-PCR el efecto que tiene el hBM-MSC-cm en la expresión de los genes inmunomoduladores *IL-4*, *IL-10*, *TGF-β* e *IDO* en las células MDA-MB-231 y BT-474.
3. Evaluar en cocultivos la capacidad inmoduladora que tienen las células MDA-MB-231 y BT-474 sobre la proliferación de células mononucleares derivadas de sangre periférica (MNCs) en presencia del hBM-MSC-cm.
4. Cuantificar los niveles de TNF, IL-4, IL-10 y TGF-β en el sobrenadante de los cocultivos de las células MDA-MB-231 y BT-474 con MNCs bajo el efecto del hBM-MSC-cm, así como también cuantificar los niveles de IDO intracelular en las células cancerosas.
5. Evaluar el efecto del hBM-MSC-cm sobre la capacidad de las células MDA-MB-231 y BT-474 de promover la generación de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺).

5 Materiales y métodos

5.1 Cultivos celulares

Las hBM-MSC fueron aisladas de médula ósea humana por aspiración de cresta ilíaca de tres donantes adultos hematológicamente sanos, según el procedimiento establecido en el Hospital de Traumatología y Ortopedia del Instituto Mexicano del Seguro Social (protocolo 1411). Las hBM-MSC se caracterizaron según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ⁴⁶. Una vez obtenidas, las muestras de médula ósea se colocaron en tubos cónicos de 50 mL (Corning, Nueva York, NY, USA) que

contenían 15 mL de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) y se separaron en un gradiente de densidad con Ficoll-Paque Plus a una densidad de $1,077 \pm 0,001$ g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 30 min y la interfaz se lavó con PBS que contenía FBS al 3 % y EDTA 1 mM. El botón de las células mononucleares se resuspendió en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; glucosa baja) suplementado con SFB al 15%, glutamina 10 μ l/ml (200 mM), penicilina 100U y estreptomina 100 μ g. El número y la viabilidad de las células nucleadas se determinaron con solución de Turck y azul de tripano (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), respectivamente. Se sembraron 5×10^6 células mononucleares en placas de Petri de 100 mm (Corning, Nueva York, NY, USA) y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ y 90 % de humedad. Después de 4 días, las células se lavaron con PBS y el medio se reemplazó dos veces por semana. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 80 al 90 %, las células se recolectaron y sembraron para expandirlas. Los experimentos se realizaron en pasaje ≤ 10 .

Todos los anticuerpos en este trabajo fueron usados de acuerdo con las instrucciones indicadas por el proveedor (Tabla 3).

Tabla 3 Anticuerpos usados para la detección de proteínas por citometría de flujo.

Antígeno	Marca	Número de catálogo
CD90	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555597
CD105	Ebioscience, San Diego, CA, USA	48-1057-42
CD73	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	561258
HLA-A	Biologend, San Diego, CA, USA	555552
HLA-DR	Biologend, San Diego, CA, USA	307616
CD45	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555483
CD31	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555445
CD34	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555824
CD 14	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555398
CD3	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555333
7AAD	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	559925
CD45	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	559865
IDO	RyD systems, Minneapolis, MN, USA	IC6030P
CD4	BD Biosciences San Diego, CA, USA	555346

CD25	BD Biosciences San Diego, CA, USA	555432
FoxP3	Ebioscience, San Diego, CA, USA	25-4777-42

5.2 Caracterización de hBM-MSC

5.2.1 Inmunofenotipo

Las hBM-MSC se caracterizaron según los criterios establecidos por el ISCT internacional⁴⁶. Se usaron anticuerpos monoclonales conjugados contra CD73, CD90, CD45, CD31, CD73, CD14, CD105, HLA-A y HLA-DR para analizar las células por citometría de flujo.

Para analizar la morfología de las hBM-MSC, se sembraron $0,3 \times 10^6$ hBM-MSC/cm² en placas de Petri P35 al 40 % de confluencia (Corning, Nueva York, NY, USA), después las células se fijaron con 4 % de PFA y se tiñieron con azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) y se observaron al microscopio (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Stuttgart, Germany).

5.2.2 Diferenciación a Adipocitos

Para evaluar el potencial de diferenciación de hBM-MSC, se sembraron $0,8 \times 10^5$ hBM-MSC en medio DMEM bajo en glucosa (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA suplementado con SFB al 10 % en placas de Petri P35 (Corning, Nueva York, EE. Nueva York, Estados Unidos). Al alcanzar el 60 % de confluencia, las células se incubaron con el medio del kit de diferenciación adipogénica MesenCult (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canadá) y se incubaron durante 21 días. El medio se reemplazó dos veces por semana. Para visualizar las vacuolas de lípidos, las células se tiñeron con solución rojo oleoso O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA).

5.2.3 Diferenciación a condrocitos

Se colocaron 3×10^5 hBM-MSC en tubos de 15 ml y se resuspendieron en medio DMEM bajo en glucosa (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA) suplementado con SFB al 10 %. Los tubos se centrifugaron a $300 \times g$ para obtener un botón celular. Se eliminó el sobrenadante y se agregó medio de diferenciación condrogénica (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, EE. UU.). El botón celular se incubó durante 28 días. La micromasa se fijó, hidrató e incluyó en Tissue-Tek (Sakura CA, EE. UU.), después de lo cual se realizaron cortes de $4 \mu\text{m}$ y se tiñeron con Azul alcian (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) para evaluar la presencia de sulfato de condroitina.

5.2.4 Diferenciación a osteocitos

Se sembraron $0,8 \times 10^5$ hBM-MSc en placas de Petri P35 (Corning, Nueva York, NY, USA) con medio DMEM bajo en glucosa (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) suplementado con 10 % de SFB. Al alcanzar un 60 % de confluencia, las células se incubaron con medio osteogénico StemPro (Gibco, Carlsbad, California, CA, USA) durante 21 días. El medio de diferenciación se reemplazó dos veces por semana. El análisis de osteocitos se realizó con tinción de rojo alizarín, que detecta depósitos de calcio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA).

5.3 Preparación del medio condicionado derivado de hBM-MSc

Para obtener el medio acondicionado, se cultivaron hBM-MSc hasta que alcanzaron una confluencia del 70–80%, después de lo cual se reemplazó el medio con medio libre de SFB. Después de 48 h, el medio se recolectó y se centrifugó durante 5 min a 2,000 rpm y se filtró con una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ (Millex GS; Millipore, Massachusetts, USA). El medio condicionado derivado de las hBM-MSc (hBM-MSc-mc) se usó inmediatamente o se congeló a -80°C hasta su uso. Una mezcla 2:3 de medio acondicionado más medio fresco fue utilizado experimentalmente como Sepehr et al. reportaron previamente ⁹².

5.4 Líneas celulares de cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 se adquirieron del ATCC y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Biowest, Missouri, MO, USA) suplementado con SFB al 10%, 2 mM de L-glutamina, 25 mM de HEPES, 100U de penicilina y 100 µg de estreptomicina en una atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad a 37 °C. Los experimentos se llevaron a cabo en el pase ≤13.

5.5 Ensayos de migración

Los ensayos de migración fueron realizados en placas de 24 pozos usando insertos con membrana de poro de 8 µm (Millipore, Burlington, MA, USA); en la parte superior del inserto se colocaron 2×10^5 células BT-474 o MDA-MB-231, previamente incubadas en medio RPMI 1640 desprovisto de SFB por 12 h. En la parte inferior del inserto se colocó el medio quimioatrayente bajo tres condiciones 1. una monocapa hBM- MSC; 2. 200 µL de medio condicionado de BM- MSC; 3. medio RPMI 1640 fresco suplementado con 10% de SFB. Después de 24 h de incubación, se analizó el paso de las células a través del poro utilizando QCM chemotaxis cell migration kit (Millipore, Burlington, MA, USA), siguiendo las especificaciones del proveedor. La cantidad de colorante cristal violeta fue cuantificada a 570 nm¹⁴.

5.6 Ensayos de formación de colonias

Los ensayos de crecimiento con independencia de anclaje se realizaron con el kit semicuantitativo CytoSelect 96-well Cell Transformation Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones establecidas por el proveedor. 2×10^3 células de cáncer de mamá fueron sembradas solas y en cocultivo con 2×10^2 hBM- MSC en 50 µL de matriz mezclada con medio RPMI 1640 o RPMI 1640/DMEM bajo en glucosa relación 1:1 en los cocultivos. Así mismo se adicionó medio condicionado de las hBM- MSC-cm a algunos grupos donde se encontraban las células de cáncer de mama. Después de seis días de incubación, la matriz se solubilizó y se evaluó la proliferación celular

mediante ensayos de reducción con MTT (bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), cuya densidad óptica fue determinada a 570 nm.

5.7 Ensayos de qRT-PCR

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 fueron sembradas a una confluencia de 60–70%. Posteriormente, el medio se reemplazó con hBM-MS-CM. Después de 48 h, el ARN total se extrajo con TRIzol-cloroformo y se trató con ADNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total utilizando un oligonucleótido (dT18), siguiendo las indicaciones del proveedor (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los niveles de expresión relativa de varios genes se analizaron mediante qRT-PCR usando el Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se usó la expresión de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de normalización. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg. Finalmente, la expresión relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT^{93}}$. Los oligonucleótidos para cada gen analizado se diseñaron utilizando el programa Oligo Analyzer Tool y se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Oligonucleótidos usados para análisis de expresión por qRT-PCR.

Prueba		Secuencia	Amplicón (bp)
GAPDH	F	FGGTGTGAACCATGAGAAGTATGA	123
	R	GAGTCCTTCCACGA TACCAAAG	
IDO	F	AGGATTCTTCCTGGTCTCTCT	102
	R	GTGTCCCGTTCTTGCATTTG	
TGF-β	F	CGTGGAGCTGTACCAGAAATAC	112
	R	C ACAACTCCGGTGACATCAA	
IL-10	F	GCTGGAGGACTTTAAGGGTTAC	106
	R	GATGTCTG GGTCTTGGTTCTC	
IL-4	F	GTTCTACAGCCACCATGAGAA	94
	R	CCGTTTCAGGAATCGGATCA	

5.8 Ensayos de proliferación de MNCs en cocultivos

Para realizar ensayos de inmunomodulación, se obtuvieron células mononucleares derivadas de sangre periférica de donantes adultos sanos (n=3). La sangre periférica se diluyó con PBS (1:2) y las células se separaron en un gradiente de densidad con Ficoll-Paque Plus a una densidad de $1,077 \pm 0,001$ g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 30 min, luego de lo cual se recolectó la interfase y se lavó con PBS. El número y la viabilidad de las células nucleadas se determinaron con solución de Turck y azul tripano (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), respectivamente. Las MNCs se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, 100 U de penicilina y 100 µg de estreptomina hasta su uso.

Para evaluar el efecto de hBM-MS-CM en la inmunomodulación de células tumorales BT-474 y MDA-MB-231, se realizaron ensayos de proliferación de linfocitos en placas de 48 pocillos durante un período de 6 días. Previamente, las MNCs se tiñeron con éster de succinimidil de carboxifluoresceína (CFSE, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) y se sembraron en cocultivos con células de cáncer de mama. Finalmente, las MNCs fueron activadas con fitohemaglutinina (7,5 µg/mL). Los grupos analizados fueron: (1) MNCs activadas (control positivo); (2) MNCs más células tumorales; (3) MNCs más células tumorales más hBM-MS-CM; y (4) MNCs más hBM-MS-CM. Las células de los cocultivos se sembraron en las siguientes proporciones: 3:1 MNC/MDA-MB-231 and 2:1 MNC/BT-474 (1×10^5 MNCs, 5×10^4 células BT-474 y 3×10^4 células MDA-MB-231).

Tras el período de incubación, las células presentes en los cocultivos se prepararon para el análisis de la proliferación de MNCs por citometría de flujo. Las fueron disgregadas y se lavadas con PBS-EDTA 1 mM y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. Posteriormente, las células se bloquearon con SFB durante 20 min a 4 °C y se lavaron con PBS-EDTA. A continuación, las células se incubaron con anti CD3 (antígeno de células T; BD Biosciences, San Diego,

CA, USA) y 7AAD (excluye células muertas; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) en 100 μ l de PBS-EDTA a 4 °C durante 20 min. La proliferación de MNCs (linfocitos CD3⁺) fue analizada en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, USA), adquiriendo 10000 eventos por muestra. Las células obtenidas en los ensayos de proliferación se normalizaron usando el grupo de las MNCs activadas como control de proliferación, cuyo valor se consideró como 100 %. Los datos se analizaron en el programa FlowJo™ v.10.7.1 (Ashland, OR, USA).

5.9 Análisis Cuantitativo de Moléculas Solubles

Los sobrenadantes de cada grupo se recolectaron y congelaron a -70 °C hasta su análisis. La concentración de citocinas se determinó utilizando un kit Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se desarrolló una curva estándar mediante la preparación de diluciones en serie para cada molécula analizada (0–500 pg/mL). Posteriormente se agregaron 10 μ L de las perlas que reconocen las citoquinas TNF, IL-10 e IL-4 a 50 μ L de cada muestra o muestras estándar. Luego, las muestras se incubaron a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 30 min. Después de tres lavados con 1 mL de buffer de lavado, las células se centrifugaron a 1200 rpm y el botón se resuspendió en 300 μ L del mismo buffer de lavado. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) y la concentración de citocinas se determinó con el software LegendPlex v7.1 (San Diego, CA, USA). La concentración de TGF- β se determinó utilizando el kit un kit Cytometric Bead Array TGF- β (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se realizaron diluciones en serie de TGF- β para realizar una curva estándar (40-10 000 pg/mL). Posteriormente, 17 μ L de cada muestra se activaron con 3,4 μ L de HCl 1N durante 10 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se neutralizaron con 3.4 μ L de NaOH 1.2N/Hepes 0.5M. Después, 17 μ L de muestras activadas o muestras estándar se incubaron con perlas de captura durante 2 h protegidas de la luz. Al finalizar

el tiempo de incubación, se añadieron 300 μ L de buffer de lavado y se centrifugaron a 1.800 rpm durante 5 min. Finalmente, las muestras se incubaron con reactivo detector de PE a temperatura ambiente durante 2 h y se realizó un segundo lavado. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo espectral Aurora (Cytex Biosciences, Fremont, CA, USA), y se determinó la concentración de TGF- β . con el software LegendPlex v7.1 (San Diego, CA, USA).

5.10 Detección de la expresión deIDO en células de cáncer de mama

Los mismos grupos analizados anteriormente, se usaron para cuantificar mediante citometría de flujo la expresión deIDO intracelular en células de cáncer de mama. Después de 6 días de cocultivo, las células se trataron con Golgi Stop (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) durante 5 h. Las células del cocultivo se recolectaron y marcaron con anticuerpo CD45 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) durante 30 min a 4 °C. Después las células fueron permeabilizadas y fijadas con Fixation/Permeabilization Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) durante 1 h. Finalmente, las células se marcaron con antiIDO (RyD systems, Minneapolis, MN, USA) durante 30 min a 4 °C. Las células CD45-IDO⁺ se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), se adquirieron 10,000 eventos de cada muestra y se analizaron con el software FlowJo™ v.10.7.1 (Ashland, OR, USA).

5.11 Detección de células Treg

Los mismos grupos ensayados anteriormente se utilizaron para cuantificar por citometría de flujo la proporción de linfocitos T reguladores con inmunofenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Después de 6 días de cocultivo, las células se recolectaron y marcaron con anticuerpos CD4 y CD25 (BD Biosciences San Diego, CA, USA) durante 30 min a 4 °C, después de lo cual se fijaron y permeabilizaron con Fixation/Permeabilization Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) durante 1 h. Finalmente, las células se marcaron con FoxP3

(Ebioscience, San Diego, CA, USA) durante 30 min a 4 °C. Las células triple positivas se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), se adquirieron 10,000 eventos de cada muestra y se analizaron con el software FlowJo™ v.10.7.1 (Ashland, OR, USA).

5.12 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas para todos los ensayos. Se realizaron comparaciones por pares corregidas por Bonferroni para ensayos de proliferación celular y análisis de expresión génica relativa. Por otro lado, los ensayos de proliferación relativa de las MNCs y la cuantificación de factores solubles se analizaron mediante ANOVA unidireccional con comparaciones por pares corregidas por Bonferroni. El análisis de datos se realizó con el programa Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

6 Resultados

6.1 Caracterización de hBM-MSC

Los cultivos primarios aislados de hBM-MSC se caracterizaron de acuerdo con los criterios establecidos por la ISCT⁹⁴. El perfil de expresión de marcadores de superficie se analizó mediante citometría de flujo. Las hBM-MSC mostraron una alta expresión de los marcadores: CD90, CD105, CD73 y HLA-A, mientras que no expresaron HLA-DR, CD45, CD34, CD14 y CD31 (Figura 3A). Posteriormente se evaluó su capacidad de diferenciación a los tres linajes básicos, tras su incubación en medios de diferenciación específicos (ver Materiales y Métodos).

Los cultivos de hBM-MSC mostraron propiedades adherentes con morfología similar a fibroblastos, capacidad de diferenciación a los tres linajes básicos: adipocitos que se identificaron por la formación de vacuolas lipídicas y que fueron evidenciadas con rojo oleoso; condrocitos que mostraron la formación

de matriz condrogénica a través de la tinción de sulfato de condroitina con azul de alcian; y en osteocitos detectando la formación de depósitos de calcio teñidos con rojo de alizarina (Figura 3B).

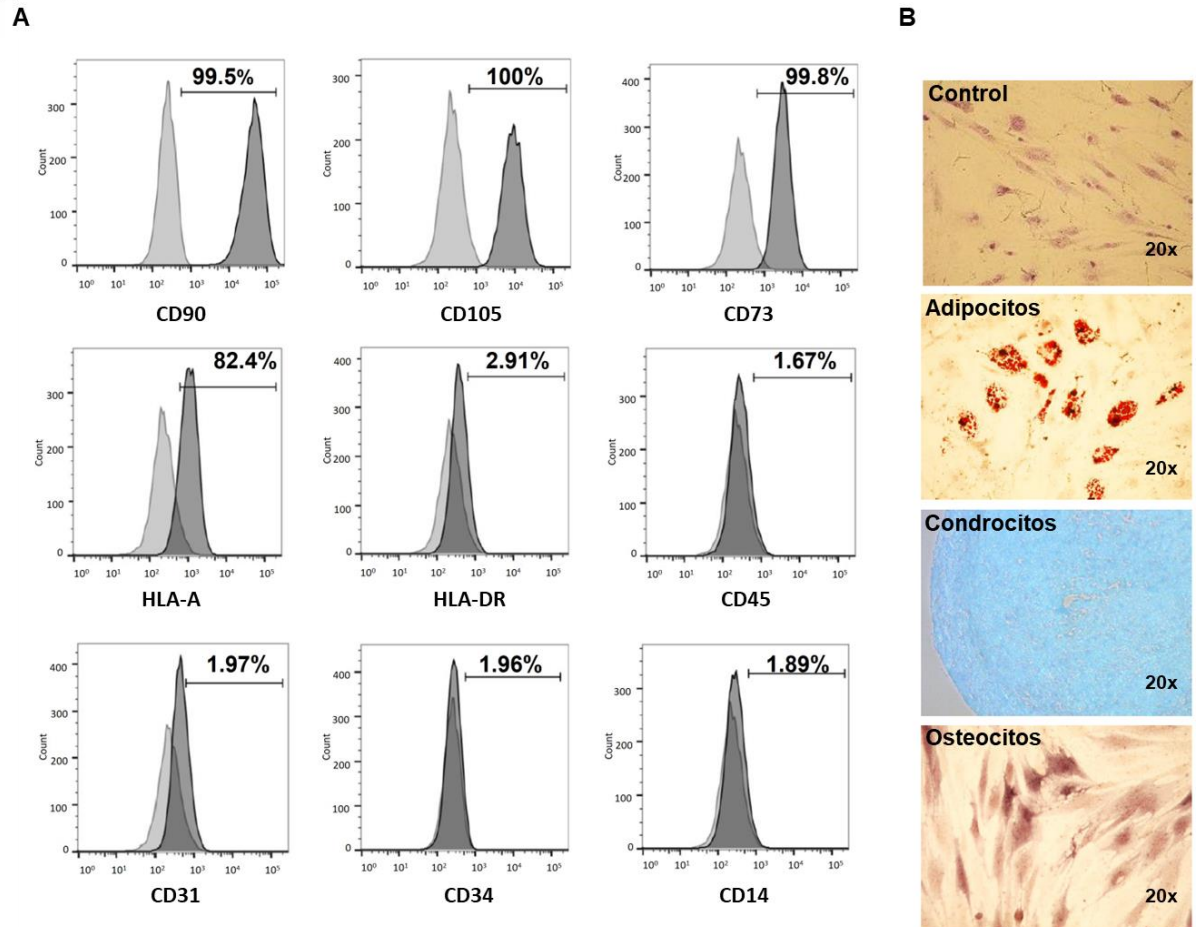


Figura 3 Caracterización de células estromales mesenquimales de médula ósea humana utilizadas en este estudio (hBM-MSC). (A) Histograma representativo de inmunofenotipos evaluados por citometría de flujo, que muestra los marcadores de superficie evaluados. (B) Ensayo de diferenciación: hBM-MSC (control); adipocitos diferenciados después de 21 días, presentando vacuolas evidenciadas con rojo oleoso; condrocitos diferenciados después de 21 días, mostrando la tinción de sulfato de condroitina con azul de alcian, y osteocitos diferenciados después de 28 días, mostrándose depósitos de calcio teñidos con rojo de alizarin.

Una vez confirmada la identidad de las hBM-MSC, evaluamos la influencia del hBM-MSC-cm en algunas propiedades tumorigénicas y de inmunomodulación de dos líneas celulares de cáncer de mama.

Diversos estudios han reportado, que las MSC presentes en el microambiente tumoral, pueden influir de manera paracrina en diversas propiedades tumorigénicas propias de las células cancerosas¹⁶ que pueden ser evaluados in vitro. Por lo tanto, nos preguntamos si el medio condicionado de hBM-MSC pudiera tener un efecto directo sobre la proliferación, la migración y crecimiento con independencia de anclaje en células de cáncer de mama que particularmente representan dos subtipos: triple negativo (MDA-MB-231) y triple positivo (BT-474).

6.2 Efecto del medio condicionado de las hBM-MSC en la proliferación de células de cáncer de mama

La figura 4 muestra el efecto que el medio condicionado de las hBM-MSC tiene efecto diferencial sobre la proliferación de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474. Como se puede observar el hBM-MSC-cm no tiene efecto en la proliferación de las células MDA-MB-23, en comparación con las células BT-474 dónde la proliferación fue promovida, en relación con su respectivo control.

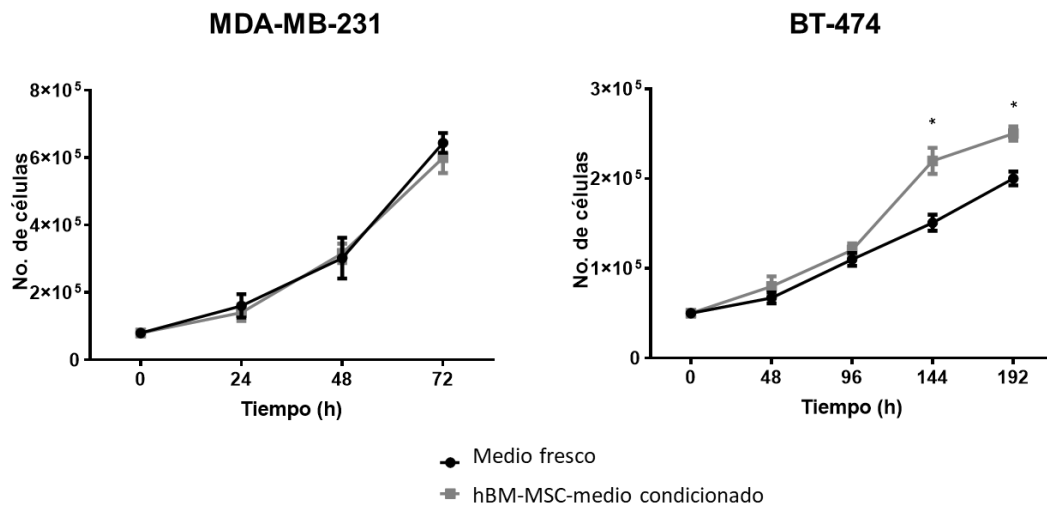


Figura 4 La proliferación de células de cáncer de mama es afectada por el medio condicionado de BM-MSC. Las células MDA-MB-231 y BT-474 se incubaron con hBM-MSC-cm o medio fresco y se realizó una curva de proliferación durante 72 h y 192 h respectivamente. Todos los valores representan el promedio de tres réplicas de

tres experimentos independientes. Los datos se muestran como media \pm SEM; * $p < 0.05$.

6.3 Efecto del hBM-MSC-cm sobre la capacidad de migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474

Con el objetivo de evaluar el efecto que tiene el hBM-MSC-cm sobre la capacidad migratoria de células tumorales, evaluamos su paso a través de una membrana de 8 μm , utilizando como quimioatrayente el hBM-MSC-cm, hBM-MSC o medio fresco. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos.

Para el caso de las células triple negativas MDA-MB-231, se observa que las hBM-MSC no modificó su capacidad de migración. Por el contrario, se aprecia que el hBM-MSC-cm redujo la migración de las células MDA-MB-231 con respecto al control. Por otro lado, los resultados mostraron que las hBM-MSC y su medio condicionado (hBM-MSC-cm) favorecen la capacidad de migración de las células BT-474 en comparación con su control según se muestra en la figura 5. Estos resultados sugieren que las hBM-MSC y su medio condicionado tienen un mayor efecto sobre capacidad basal de las células BT-474 en comparación con las células MDA-MB-231.

Tabla 5 Valores de $\text{DO}_{570\text{nm}}$ obtenidos en los ensayos de migración.

MDA-MB-231 Quimioatrayente	$\text{DO}_{570\text{nm}}$	BT-474 Quimioatrayente	$\text{DO}_{570\text{nm}}$
hBM-MSC	0.265 ± 0.010	hBM-MSC	0.255 ± 0.007
hBM-MSC-cm	0.174 ± 0.020	hBM-MSC-cm	0.260 ± 0.014
RPMI + 10 %SFB	0.244 ± 0.016	RPMI + 10 %SFB	0.158 ± 0.017

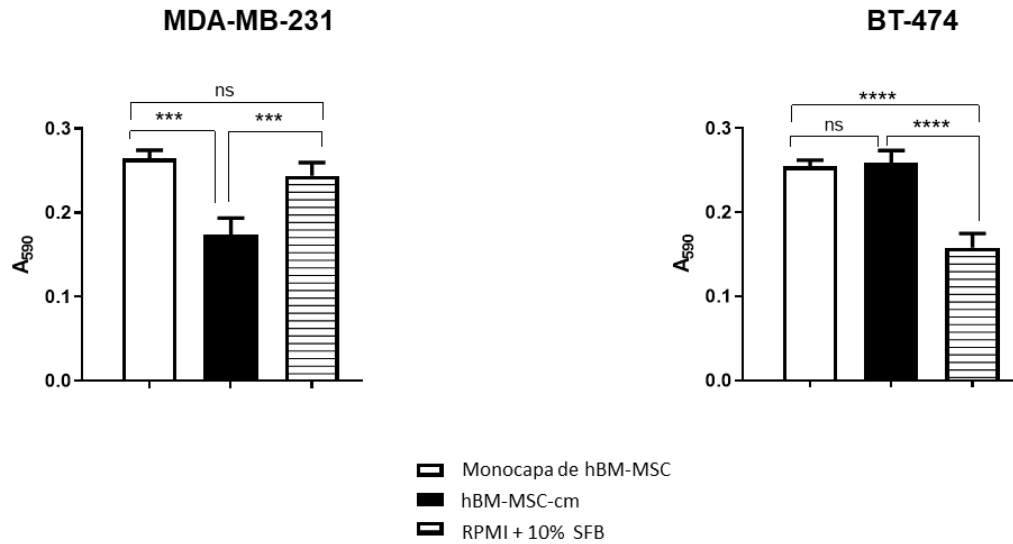


Figura 5 La migración de las células de cáncer de mama es afectada por el medio condicionado de BM-MSC. Las células MDA-MB-231 y BT-474 fueron desprovisto de SFB por 12 h y se evaluó la migración celular a través de un inserto guiado por diferentes condiciones quimioatrayentes (una monocapa hBM-MSC, hBM-MSC-cm y medio fresco con 10% SFB). La cantidad de colorante cristal violeta fue cuantificada a 570 nm Las gráficas muestran el valor de densidad óptica (570 nm) de células teñidas con cristal violeta que migraron a través de la membrana de 8 μ m. Todos los valores representan el promedio de tres réplicas de tres experimentos independientes. Los datos se muestran como media \pm SEM; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns no significativo.

6.4 Efecto del hBM-MSC-cm en el crecimiento con independencia de anclaje de células de cáncer de mama

Con este ensayo se evalúa in vitro la propiedad de pérdida del contacto celular ya que en condiciones normales la célula inhibe el crecimiento y la proliferación cuando se siembran en un gel o matriz de agar. Está característica la suelen perder las células una vez que son transformadas. Por ello, evaluamos el efecto que el hBM-MSC-cm tiene sobre el crecimiento con independencia de anclaje mediante la formación de colonias en agar suave en las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-474, la formación de colonias fue evaluada haciendo ensayos con MTT, cuyos resultados obtenidos se muestran en la tabla 6. La figura 6 muestra el efecto que las hBM-MSC y su medio

condicionado tienen sobre las MDA-MB-231, en ambos grupos no observamos ningún efecto significativo en la formación de colonias con respecto al grupo control. Sin embargo, cuando evaluamos las células BT-474 observamos que las hBM-MSC y su medio condicionado favorecen el crecimiento con independencia de las células BT-474 con respecto a su grupo control.

Tabla 6 Valores de DO570nm obtenidos en los ensayos de crecimiento con independencia de anclaje.

Grupo MDA-MB-231	DO _{570nm}	Grupo BT-474	DO _{570nm}
231	0.111 ± 0.019	474	0.233 ± 0.001
231 + hBM-MSC-cm	0.134 ± 0.013	474 + hBM-MSC-cm	0.308 ± 0.026
231 + hBM-MSC	0.152 ± 0.024	474 + hBM-MSC	0.307 ± 0.013
hBM-MSC	0.025 ± 0.002	hBM-MSC	0.025 ± 0.002

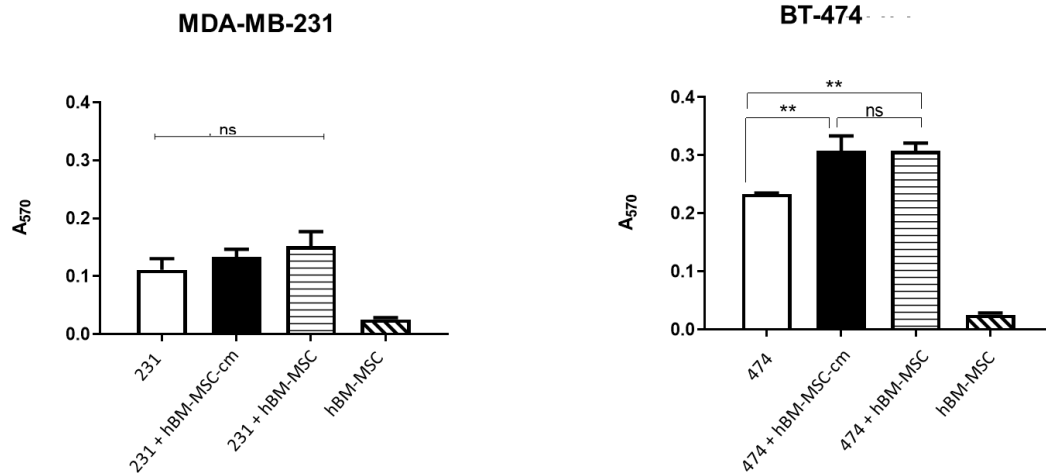


Figura 6 El crecimiento con independencia de anclaje en células de cáncer de mama es modificado por el medio condicionado de BM-MSC. Las células MDA-MB-231 y BT-474 fueron cultivadas en una matriz en presencia o ausencia del hBM-MSC con y sin el hBM-MSC-cm. Después de 6 días de incubación la proliferación celular se evaluó con MTT. Las gráficas muestran los valores de densidad óptica obtenidos de la reducción del MTT a 570 nm. Todos los valores representan el promedio de tres réplicas de tres experimentos independientes. Los datos se muestran como media ± SEM; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001; ns no significativo.

Al observar que las MSC a través de su medio condicionado tenían un efecto diferencial sobre algunas propiedades del potencial tumorigénico de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si bajo el estímulo del hBM-MSC-cm las células cancerosas también podían modificar su capacidad de inmunomodulación.

6.5 Efecto del hBM-MSC-cm en la expresión de genes inmunomoduladores en células MDA-MB-231 y BT-474

Se sabe que las líneas celulares derivadas del cáncer producen una serie de moléculas entre ellas citocinas, que pueden modificar la respuesta inmune local. Por lo que, para responder a la pregunta de si el hBM-MSC-cm es capaz de modular la expresión de algunos genes ligados a inmunoregulación en las células tumorales. Las células MDA-MB-231 y BT-474 se incubaron con el hBM-MSC-cm y se determinaron los niveles de expresión de *TGF-β*, *IDO*, *IL-4* e *IL-10* mediante qRT-PCR. Observamos un aumento significativo en la expresión relativa de los genes inmureguladores *TGF-β* (7.1 ± 0.20), *IDO* (17.79 ± 0.61) e *IL-10* (2.19 ± 0.37) pero no en la expresión de *IL-4* (0.49 ± 0.02) en las células MDA-MB-231 incubadas con el hBM-MSC-cm, en comparación con el control (medio fresco). En el caso de las células BT-474 no se observaron cambios en la expresión de los genes inflamatorios evaluados (Figura 7).

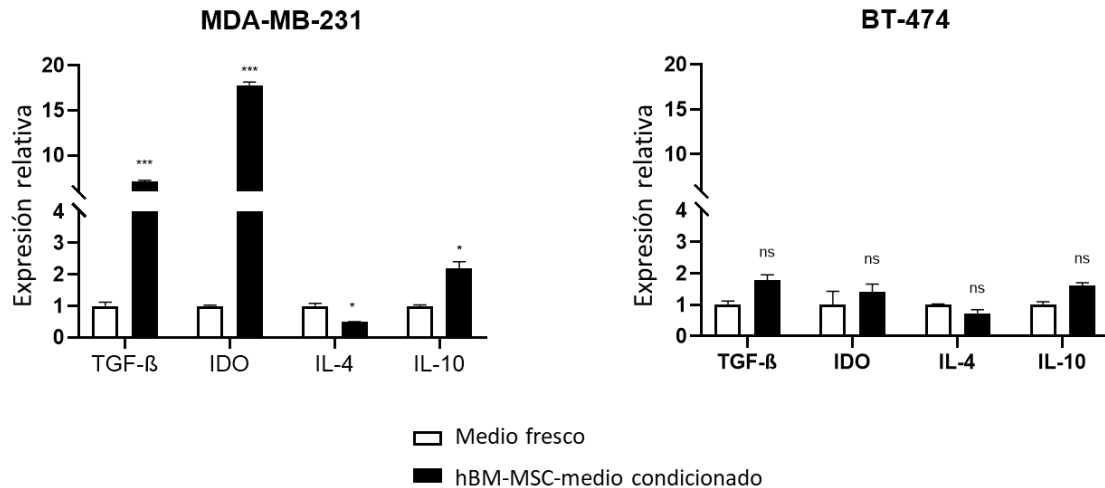


Figura 7 El hBM-MSC-cm induce la sobreexpresión de genes inmunomoduladores en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 y BT-474 se incubaron con hBM-MSC-cm o medio fresco. Después de 48 h, se aisló el ARN y se evaluó el nivel de expresión de TGF-β, IDO, IL-4 e IL-10 mediante qRT-PCR. Los resultados se presentan como nivel de expresión relativa. Todos los valores representan el promedio de tres réplicas de tres experimentos independientes. Los datos se muestran como media ± SEM; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ns no significativo.

La modificación en los niveles de expresión de estos genes inducida por el hBM-MSC-cm sugiere que las células MDA-MB-231 podrían poseer una mayor capacidad inmunosupresora con respecto a las células BT-474. Aunque ambas líneas celulares se derivan de cáncer de mama, el efecto ejercido por el hBM-MSC-cm en cada subtipo celular fue diferente.

6.6 Análisis de proliferación de células mononucleares derivadas de sangre periférica en cocultivo con líneas celulares de cáncer de mama y hBM-MSC-cm

Para analizar el efecto del hBM-MSC-cm sobre la capacidad inmunorreguladora de las células tumorales (MDA-MB-231 y BT-474), se realizaron ensayos de cocultivo con células mononucleares derivadas de sangre periférica (MNCs), teñidas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) y activadas con fitohemaglutinina. Después del periodo de incubación de 6 días, se evaluó la proliferación de MNCs (linfocitos CD3⁺) mediante citometría de flujo, a través de la detección de la marca

fluorescente del CFSE, puesto que tras cada división celular la marca fluorescente intracelular es menor a la que poseía la célula parental. Tras el análisis de los datos se determinaron los valores de proliferación relativa, tomando como 100% el valor de la proliferación de las MNCs en medio fresco, dichos valores se muestran en la tabla 7.

Como se observa en la Figura 8, en presencia de las células MDA-MB-231 encontramos una marcada disminución en la proliferación relativa de las MNCs en dos de los grupos analizados: (1) MNCs más células MDA-MB-231; y (2) MNCs más células MDA-MB-231 más hBM-MSC-cm, e incluso en el último grupo (MNCs + 231 + hBM-MSC-cm) observamos una fuerte disminución en la tasa de proliferación de las MNCs. Sin embargo, el hBM-MSC-cm sólo no mostró un efecto proliferativo en las MNCs. Contrariamente, las células BT-474 no afectaron la proliferación de las MNCs en los grupos analizados, lo que pone en evidencia la incapacidad de las células BT-474 para regular la proliferación de los linfocitos bajo las condiciones analizadas. Así mismo, el hBM-MSC no tuvo influencia sobre las células BT-474 para modificar la proliferación de las MNCs, como lo sugirieron los ensayos de expresión génica, ya que el hBM-MSC no modificó la expresión de los genes inmunoreguladores analizados. A diferencia de las células BT-474, las células MDA-MB-231 mostraron una capacidad inmunorreguladora sobre la proliferación de las MNCs, que se amplificó en presencia del hBM-MSC-cm.

Tabla 7 Valores de proliferación relativa de las MNCs en cocultivo con las células tumorales con y sin hBM-MSC-cm.

Grupo	Proliferación relativa de MNCs (%)	Grupo	Proliferación relativa de MNCs (%)
MNCs	100.0 ± 4.38	MNCs	100.0 ± 4.38
MNCs + 231	64.00 ± 9.80	MNCs + 474	98.77 ± 6.36
MNCs + 231 + hBM-MSC-cm	21.58 ± 10.09	MNCs + 474 + hBM-MSC-cm	102.68 ± 5.65
MNCs + hBM-MSC-cm	104.69 ± 1.41	MNCs + hBM-MSC-cm	104.69 ± 1.41

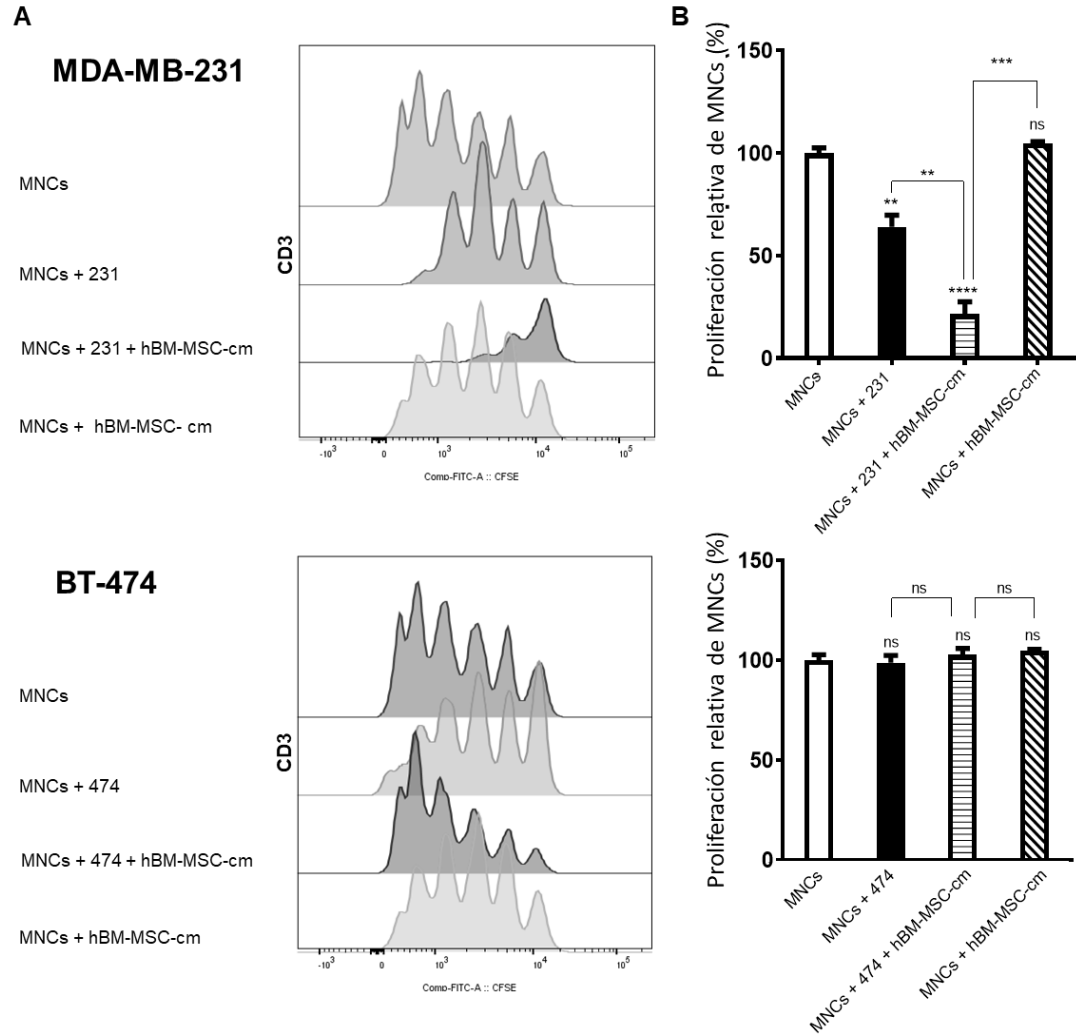


Figura 8 Efecto inmunomodulador de células de cáncer de mama inducido por el hBM-MS-CM. Las células mononucleares (MNCs) fueron teñidas con CFSE y activadas con fitohemaglutinina y cocultivadas en la presencia de las células MDA-MB-231 o BT-474, con o sin hBM-MS-CM durante 6 días. La tasa de proliferación de las MNCs activadas (linfocitos CD3⁺) se utilizó como control positivo (100%). La figura muestra (A) los histogramas representativos de un experimento y (B) los gráficos muestran la proliferación relativa de MNCs (linfocitos CD3⁺) de tres hBM-MS-CM aislados de diferentes donadores (n=3). Datos se presentan como media ± SEM; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

6.7 Evaluación de moléculas candidatas involucradas en la regulación de la proliferación de las MNCs

Para determinar las moléculas que pudieran estar involucradas en la inhibición de la proliferación de las MNCs, se recolectó el sobrenadante de los mismos grupos analizados en la figura 8 y se cuantificaron los niveles de TNF, IL-4, IL-10 y TGF- β (Figura 9A). La figura 9A muestra los gráficos de los datos que se presentan en las tablas 8 y 9.

En las células MDA-MB-231, los niveles de TNF disminuyeron en los siguientes grupos: (1) MNCs más células MDA-MB-231 y (2) MNCs más células MDA-MB-231 más hBM-MSC-cm. Sin embargo, los niveles de TNF no cambiaron significativamente en el grupo de MNCs más hBM-MSC-cm con respect al grupo control. A diferencia del TNF, la expresión de IL-10 aumentó en los siguientes grupos: (1) MNCs más células MDA-MB-231; y (2) MNCs más células MDA-MB-231 más hBM-MSC-cm, con un aumento sustancial en el último grupo (Tabla 8). Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en la expresión de IL-10 en el grupo con presencia de MNCs más hBM-MSC-cm en comparación con el grupo control. Así mismo, no se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión de IL-4 en ninguno de los grupos analizados. Con respecto a los niveles de TGF- β , estos aumentaron significativamente en los grupos: (1) MNCs más células MDA-MB-231; y (2) MNCs más células MDA-MB-231 más hBM-MSC-cm y (3) MNCs más hBM-MSC-cm. Sin embargo, no se observaron diferencias entre estos tres grupos. La menor tasa de proliferación de las MNCs en presencia de células MDA-MB-231 podría deberse a la disminución de los niveles de la citocina proinflamatoria TNF y el aumento de los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 y TGF- β .

Tabla 8 Concentración de citocinas evaluadas en el sobrenadante de los grupos de ensayo (MDA-MB-231).

Grupo	TNF (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	TGF-β (pg/mL)
MNCs	134.69 ± 14.32	6.43 ± 2.5	7.23 ± 1.51	473.28 ± 49.96
MNCs + 231	33.74 ± 3.52	55.02 ± 0.49	4.69 ± 0.43	605.58 ± 67.69
MNCs + 231 + hBM- MSC-cm	35.84 ± 0.55	76.75 ± 1.25	10.19 ± 2.61	621.68 ± 18.01
MNCs + hBM- MSC-cm	150 ± 26.88	7.69 ± 2.72	6.63 ± 1.21	599.83 ± 29.98

Con respecto a los ensayos usando las células BT-474, los niveles de TNF no cambiaron significativamente en los siguientes grupos: (1) MNCs más células BT-474 y (2) MNCs más células BT-474 más hBM-*MSC-cm* y (3) MNCs más hBM-*MSC-cm* (Tabla 9). De igual manera, la Figura 9A muestra los niveles de concentración de IL-10 e IL-4. Aunque los niveles de concentración de estas citocinas difieren, este par de moléculas presentan una tendencia similar. Sin embargo, cuando se analizó cada grupo por separado, no se encontraron cambios estadísticamente significativos. El análisis de TGF-β mostró una disminución significativa en los grupos: (1) MNCs más células BT-474 y (2) MNCs más células BT-474 más hBM-*MSC-cm*, pero sin diferencia entre estos dos grupos. Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo MNCs más hBM-*MSC-cm* en comparación con el grupo control.

Tabla 9 Concentración de citocinas evaluadas en el sobrenadante de los grupos de ensayo (BT-474).

Grupo	TNF (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	TGF-β (pg/mL)
MNCs	134.69 ± 14.32	6.43 ± 2.5	7.23 ± 1.51	473.28 ± 49.96
MNCs + 474	105.68 ± 7	7.24 ± 2.5	5.55 ± 0.59	186.94 ± 95.33
MNCs + 474 + hBM- MSC-cm	113.43 ± 5	6.7 ± 1.95	5.13 ± 1.5	265.18 ± 73.41

MNCs + hBM-MSC-cm	150 ± 26.88	7.69 ± 2.72	6.63 ± 1.21	599.93 ± 29.98
-------------------	-------------	-------------	-------------	----------------

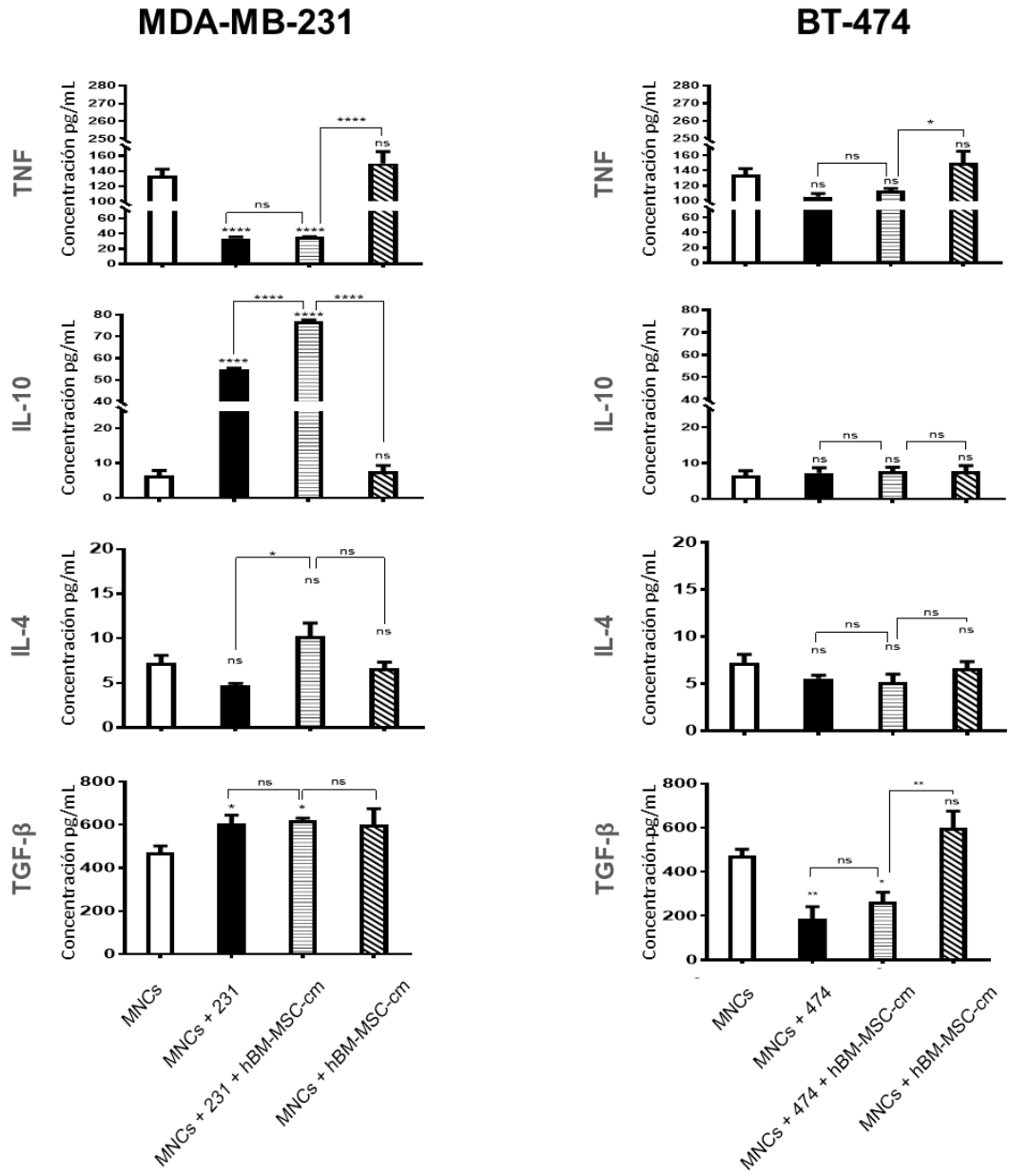
6.8 El hBM-MSC-cm induce diferencialmente la expresión deIDO en las líneas celulares de cáncer de mama estudiadas

Para evaluar el efecto del hBM-MSC-cm sobre la capacidad de las células cancerosas (MDA-MB-231 y BT-474) para producir moléculas inmunosupresoras en cocultivo con MNCs, evaluamos la expresión deIDO intracelular en células tumorales mediante citometría de flujo, cuyos resultados se muestran en la table 10 y en la Figura 9B. Los niveles de proteínaIDO aumentaron en las células MDA-MB-231 en los grupos: (1) MNCs más células MDA-MB-231 y (2) MNCs más células MDA-MB-231 más hBM-MSC-cm; sin embargo, llama la atención que este último grupo tuvo una mayor expresión deIDO. Este hecho confirma que el hBM-MSC-cm puede ejercer un efecto sinérgico sobre las propiedades inmunorreguladoras de las células MDA-MB-231 posiblemente aumentado de manera significativa los niveles deIDO. En contraste, ninguno de los grupos analizados con las células BT-474 mostraron cambios significativos en los niveles de expresión deIDO.

Tabla 10 Porcentaje de expresión deIDO en las células tumorales.

Grupo	%IDO	Grupo	%IDO
MNCs	0.30 ± 0.23	MNCs	0.30 ± 0.23
MNCs + 231	16.83 ± 0.35	MNCs + 474	0.40 ± 0.07
MNCs + 231 + hBM-MSC-cm	29.73 ± 4.44	MNCs + 474 + hBM-MSC-cm	0.22 ± 0.12
MNCs + hBM-MSC-cm	0.77 ± 0.74	MNCs + hBM-MSC-cm	0.77 ± 0.74

A



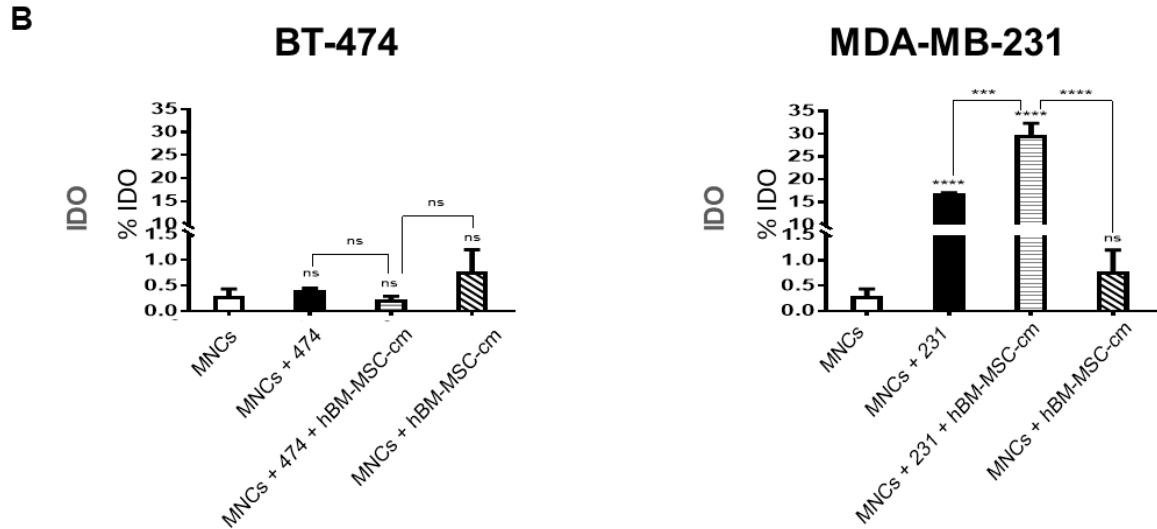


Figura 9 Cuantificación de citocinas e IDO. Las MNCs se activaron con fitohemaglutinina y se cocultivaron durante 6 días en presencia de las células MDA-MB-231, BT-474, con o sin hBM-MS-CM (n=3). (A) Los niveles de TNF, IL-4, IL-10 y TGF- β se cuantificaron en los sobrenadantes utilizando una matriz de perlas citométricas. La concentración de citocinas detectadas en el sobrenadante de las MNCs (n=3) activadas se consideró como concentración basal. (B) IDO se cuantificó como porcentaje intracelular en células MDA-MB-231 y BT-474 mediante citometría de flujo. Los datos se presentan como media \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

6.9 Evaluación del efecto de hBM-MS-CM sobre la capacidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474 para generar linfocitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)

La influencia de las MSC a lo largo del desarrollo tumoral se ha asociado con el establecimiento de un entorno inmunotolerogénico, a través de la liberación de moléculas solubles. En este sentido, las MSC pueden promover la diferenciación de las células inmunitarias a determinados fenotipos reguladores, cuya presencia puede facilitar el desarrollo del tumor inhibiendo la respuesta inmune antitumoral. El perfil de expresión génica y la concentración de citocinas descritos previamente en las figuras 7 y 9 mostraron que la capacidad inmunomoduladora en ambas líneas celulares de cáncer de mama podría diferir bajo la influencia del hBM-MS-CM. Por lo tanto, nos preguntamos si estos mecanismos inmunomoduladores podría estar

implicada la presencia de células T reguladoras con fenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Los resultados se muestran en la tabla 11 y en la figura 10. En los cultivos con las células BT-474, no se encontraron cambios significativos en la proporción de células Treg en los siguientes grupos: (1) CMNs más células BT-474; y (2) CMNs más células BT-474 más hBM-MSC-cm. Sin embargo, en el grupo de CMNs más hBM-MSC-cm, observamos un aumento en la proporción de células Treg como se esperaba, debido a la presencia de factores solubles que pueden ser secretados por las MSC.

Por otro lado, observamos una proporción significativamente mayor de células Treg en los grupos de cocultivos en presencia de células tumorales MDA-MB-231 que aquellas generadas sólo en presencia de hBM-MSC-cm (Figura 10). Sin embargo, la interacción entre el hBM-MSC-cm y las MDA-MB-231 resultó en una mayor proporción significativa de células Treg, lo que no ocurrió con las células BT-474. Este resultado parece corroborar la idea de que hBM-MSC-cm podría actuar sinérgicamente y mejorar el poder inmunorregulador intrínseco de las células MDA-MB-231 en comparación con las células BT-474.

Tabla 11 Población de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Grupo	% CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺	Grupo	% CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺
MNCs	5.09 ± 0.71	MNCs	5.09 ± 0.71
MNCs + 474	5.86 ± 2.11	MNCs + 231	19.33 ± 1.27
MNCs + 474 + hBM-MSC-cm	6.64 ± 2.98	MNCs + 231 + hBM-MSC-cm	26.27 ± 3.21
MNCs + hBM-MSC-cm	11.97 ± 0.50	MNCs + hBM-MSC-cm	11.97 ± 0.50

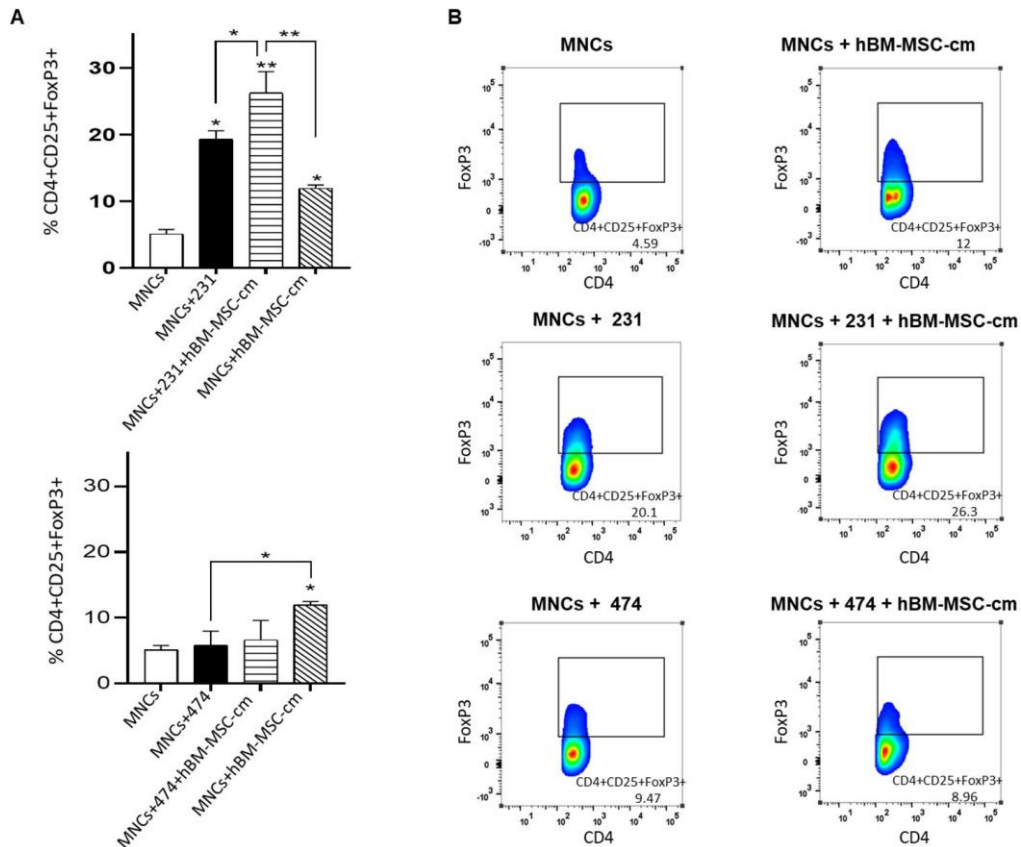


Figura 10 Capacidad de las células de MDA-MB-231 y BT-474 para generar linfocitos T reguladores (CD4+CD25+Foxp3+) bajo la influencia del hBM-MSC-cm (n=3). (A) Una vez que las MNCs se activaron con fitohemaglutinina y se cocultivaron en presencia de MDA-MB-231, BT-474, con o sin el hBM-MSC-cm, se determinó el porcentaje promedio de células CD4+CD25+Foxp3+ mediante citometría de flujo después de 6 días de cultivo. La población de CD4+CD25+Foxp3+ observada en el cultivo de MNCs activadas se consideró como control. (B) diagramas de puntos representativos de cada grupo. Los datos muestran la media \pm SEM del porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+ de tres experimentos independientes; * diferencia significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

6.10 Propuesta de modelo de inmunoregulación diferencia entre las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474

Con base en los resultados de este estudio, proponemos un modelo basado en los resultados obtenidos en este trabajo, que pretende aclarar el efecto diferencial observado del hBM-MSC-cm, a través de moléculas solubles en la respuesta inmunorreguladora de las células de cáncer de mama MDA-MB-231

y BT-474 (Figura 11). La línea celular de cáncer de mama triple negativa MDA-MB-231 expuesta a hBM-MSC-cm sobreexpresa los genes TGF- β , IDO e IL-10. En ensayos de inmunorregulación de células mononucleares (MNCs) en cocultivo con MDA-MB-231 y hBM-MSC-cm, observamos una reducción en la proliferación de linfocitos junto con aumento en los niveles de IL-10 y TGF- β y niveles reducidos de TNF; también se observaron aumentos en la expresión de IDO intracelular en las células MDA-MB-231. En consecuencia, posiblemente la presencia de estas moléculas aumenta la proporción de células T reguladoras en los ensayos de inmunomodulación. Por el contrario, la hBM-MSC-cm no afecta la capacidad inmunomoduladora de las células del subtipo luminal BT-474. Por lo tanto, existe un efecto inmunorregulador diferencial de las MSC en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474.

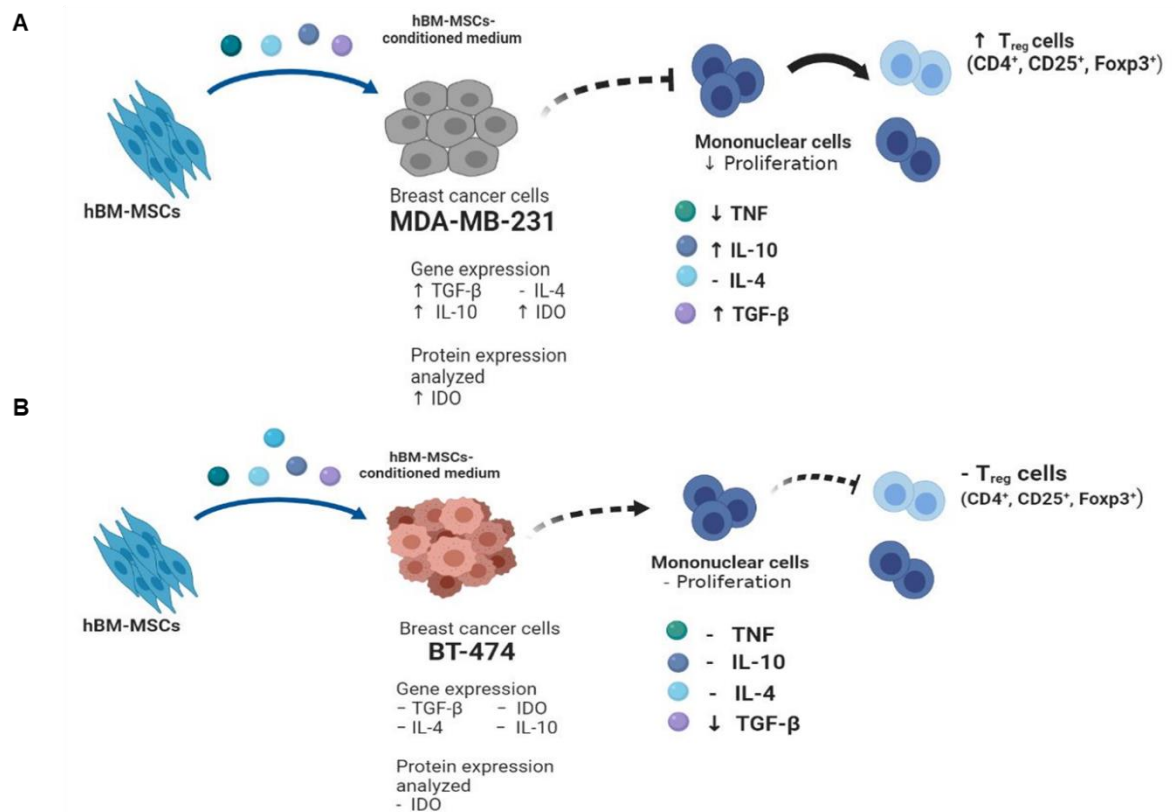


Figura 11 Modelo propuesto del efecto diferencial que tiene el hBM-MSC-cm sobre la capacidad inmunorreguladora de células de cáncer de mama BT-474 (luminal) y MDA-MB-231 (triple negativo). La figura muestra las posibles interacciones promovidas por factores solubles secretados al medio por las hBM-MSC sobre (A) células MDA-MB-231 y (B) BT-474, afectando de manera diferencial algunas propiedades tumorigénicas y la capacidad de cada línea celular para modular su respuesta inmune. Las células MDA-MB-231 derivadas de un subtipo de cáncer de mama triple negativo muestran un gran potencial supresor en relación con las células B-474 derivadas de un subtipo de cáncer de mama luminal. (↑: aumento; ↓: disminución; -: sin modificación).

7 Discusión

Con el fin de comprender algunos de los posibles efectos de las interacciones celulares que ocurren entre diferentes componentes del microambiente tumoral, analizamos el efecto del hBM-MSC-cm sobre algunas propiedades tumorigénicas e inmunomoduladoras in vitro, de dos líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB -231 y BT-474. Estas líneas celulares fueron cuidadosamente seleccionadas para este trabajo con base a su relevancia clínica, agresividad y al subtipo al que pertenecen. La línea celular MDA-MB-231 representa un cáncer de mama de tipo basal o triple negativo y es altamente proliferativo a diferencia de las células BT-474 que representan un cáncer de mama de tipo luminal (triple positivo) y son de crecimiento lento. Curiosamente, los pacientes con cáncer de mama triple negativo presentan tasas más elevadas de metástasis, heterogeneidad celular, resistencia a los medicamentos, generalmente un mal pronóstico y exhiben elevadas tasas de morbilidad y mortalidad ⁶. Clínicamente, los pacientes con cáncer triple negativo tienden a presentar una recurrencia dentro de los tres años posteriores a la cirugía primaria, mientras que los pacientes con cáncer de mama luminal la recurrencia se presenta recurrencia mucho tiempo después de la cirugía primaria ⁹⁵.

Partiendo del efecto que pueden tener las MSC en el desarrollo y progression del cáncer, decidimos evaluar el efecto in vitro que tienen las hBM-MSC

mediante la secreción de moléculas solubles, a través de su medio condicionado sobre algunas propiedades relacionadas a la tumorigenicidad como la proliferación celular, la migración y el crecimiento con independencia de anclaje en las células MDA-MB-231 y BT-474. Tras analizar los resultados obtenidos, observamos que el hBM-MSC-cm tiene un efecto diferente en ambas líneas celulares, cuando analizamos diversas propiedades, observando un mayor estímulo en las células BT-474 bajo el estímulo del medio condicionado ya que se favoreció el crecimiento, la migración y el crecimiento con independencia de anclaje. Sin embargo, en las células MDA-MB-231 no tuvo mayor efecto en estas tres propiedades evaluadas, incluso resultó interesante que la capacidad migratoria disminuyó en presencia del hBM-MSC-cm. Esto coincide con estudios reportados previamente que señalan una mayor migración de las BT-474⁹⁶ en comparación con las MDA-MB-231⁸⁸. Este comportamiento atribuido posiblemente a la presencia de PR. Lo cual resulta interesante, ya que se ha visto que células tumorales positivas a receptores hormonales están involucradas de manera más frecuente en procesos de metástasis hacia la médula ósea ⁹⁷⁻⁹⁹, tejido del cual derivan las MSC utilizadas en este trabajo; mientras que estirpes del subtipo basal que clínicamente son más agresivas hacen preferentemente metástasis hacia otros órganos como pulmones, hígado y cerebro ⁹⁹.

Tras el efecto diferencial del hBM-MSC-cm sobre las líneas celulares de cáncer de mama analizados (MDA-MB-231 y BT-474), nos cuestionamos, si a través de su medio condicionado las MSC podrían promover diferencialmente la expresión de genes inmunorreguladores como *IDO*, *TGF-β*, *IL-4* e *IL-10* en las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-474, los cuales pueden ser cruciales para favorecer el establecimiento de un estado de inmunotolerancia, ya que la sobreexpresión de estos genes inmunorreguladores correlacionan con un mal pronóstico y generalmente, están presentes en estadios tumorales avanzados ¹⁰⁰⁻¹⁰⁴.

En los ensayos realizados observamos una marcada sobreexpresión de *IDO*, *TGF-β* e *IL-10* en células MDA-MB-231 en presencia del hBM-MSC-cm, lo que

podría mejorar la capacidad inmunorreguladora, debido al poderoso efecto supresor de estos productos génicos como se ha descrito en estudios previos ^{28,105}. De hecho, estas moléculas pueden promover la protección de las células tumorales de la respuesta antitumoral mediante la generación de células Treg ¹⁰⁶. En las células BT-474 se encontraron bajos niveles de expresión de estos genes. En el caso de *IDO*, su baja expresión en estas células se ha relacionado con la presencia de receptores de estrógenos, lo que podría inducir una hipermetilación del promotor del gen *IDO* ¹⁰⁷.

El microambiente tumoral se caracteriza por la promoción de una disfunción generalizada en las células T y a través de algunos mecanismos, puede bloquear su activación y función ¹⁰⁸. Por este motivo, cuantificamos la proliferación de las MNCs (linfocitos CD3⁺) como un efecto establecido por la interacción que se produce entre los factores solubles presentes en la hBM-*MSC-cm* y ambas células cancerosas. Los resultados mostraron que las células BT-474 fueron incapaces de inhibir la proliferación de las MNCs, mientras que en las células MDA-MB-231 observamos un poderoso efecto inmunosupresor, el cual podría estar asociado con la expresión observada de *TGF-β*, *IDO* e *IL-10*.

Curiosamente, se observó que el hBM-*MSC-cm* adicionado a las células MDA-MB-231 (pero no en las células BT-474) favoreció sinérgicamente su capacidad inmunomoduladora, ya que encontramos niveles reducidos de proliferación de las MNCs (linfocitos CD3⁺) en relación con aquella observada en presencia de las células MDA-MB-231 solas. Así mismo, los valores de proliferación de las MNCs en presencia del hBM-*MSC-cm* sólo no cambiaron significativamente, posiblemente debido a la falta de contacto célula-célula (MNC-*MSC*), como se reportó anteriormente en otros estudios ^{109,110}.

Debido a la disminución observada en la proporción de MNCs proliferantes (linfocitos CD3⁺) en algunos de los cocultivos con las células tumorales en presencia del hBM-*MSC-cm*, decidimos evaluar los niveles de algunas citocinas presentes en los sobrenadantes de los grupos analizados, ya que el balance entre las citocinas proinflamatorias (TNF) y antiinflamatorias (IL-4, IL-

10 y TGF- β) es clave para la regulación de la respuesta inmune ¹¹¹. Esta disminución en la proliferación de las MNCs puede estar asociada a la presencia de citocinas inmunosupresoras de tipo Th2, como IL-4, IL-10 y TGF- β las cuales son las principales responsables de la inmunosupresión en diferentes tipos de cáncer ²². Como se observó en los resultados, las células MDA-MB-231 tienen una capacidad intrínseca para disminuir la proliferación de las MNCs y se observó al mismo tiempo, una disminución de los niveles de TNF un aumentó en los niveles de IL-10 y TGF- β ; y algunos de estos efectos se vieron potenciados por la presencia de hBM-MSC-cm. Este resultado es relevante, dado que la sobreexpresión de las citocinas IL-10 y TGF- β en cáncer es clave en la generación de un estado inmunotolerante, el cual afecta la proliferación de células T y evita el mantenimiento de la función antitumoral ^{28,106,112,113}. Por otro lado, en las células BT-474 no se encontró evidencia de efecto sobre la proliferación de las MNCs; asimismo, no se encontraron cambios significativos en la concentración de TNF, IL-4 e IL-10 pero curiosamente se observó una disminución en los niveles de TGF- β .

También analizamos la expresión de la proteína IDO en células tumorales (MDA-MB-231 y BT-474), ya que IDO es considerado como una de los principales contribuyentes a la supresión inmunitaria inducida por el tumor y es un regulador negativo del sistema inmunitario que modula la proliferación de células T y la inmunotolerancia asociada con células T reguladoras FoxP3⁺ en el cáncer de mama ³³. Este resultado es interesante, ya que la sobreexpresión de IDO se ha asociado a tumores agresivos como el triple negativo. Al mismo tiempo, IDO está relacionado con la expresión de otros genes de respuesta inmune como IL-10 ¹¹⁴.

Como las MSC, las células tumorales tienen la capacidad de promover la generación de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) a través de mecanismos que pueden involucrar o no el contacto celular entre los linfocitos T y las células tumorales o MSC ^{28,115-117}, por esta razón evaluamos la población de células Treg en todos los grupos experimentales. Se observó que las células MDA-MB-231 tienen una capacidad intrínseca para aumentar la proporción de

células Treg, la cual se ve aumentada por la presencia del hBM-MSC-cm, lo que podría indicar un mayor poder inmunosupresor de las células MDA-MB-231 en un contexto tumoral, en comparación con las células BT-474 cuyos niveles de células Treg no cambiaron significativamente.

Se sabe que los tumores generados por las células BT-474 en modelos animales son tumores fríos que se caracterizan por presentar una baja tasa de infiltración de células inmunes¹¹⁸. Posiblemente, por este motivo los tumores generados por las células BT-474 no necesariamente requieren la capacidad de modular drásticamente la respuesta inmune antitumoral. A diferencia de los tumores triple negativos como los generados por las células MDA-MB-231, que son susceptibles de ser atacados por el sistema inmunitario ¹¹⁹.

El microambiente que rodea a cada subtipo de cáncer de mama está constituido por una alta proporción de tejido estromal que posee diferentes propiedades biológicas determinadas por la heterogeneidad celular del tejido en cuestión. De hecho, se sabe que cada subtipo de cáncer de mama puede adquirir características particulares que pueden ser determinadas por el microambiente tumoral ^{120,121}.

Así mismo, algunos reportes indican que el subtipo basal o triple negativo está rodeado por un entorno inflamatorio ¹¹⁵ en el que pueden coexistir las MSC ¹²². Sin embargo, la identificación de las células responsables de la sobreexpresión de moléculas mediadoras inflamatorias ha resultado un desafío ¹²³. En este contexto, los resultados podrían sugerir que las moléculas inmunosupresoras son producidas por las células MDA-MB-231, posiblemente siendo asistidas por MSC a través de moléculas solubles.

En el microambiente tumoral donde las MSC son educadas, Sepehr et al. describieron un mayor potencial inmunomodulador del medio acondicionado de las MSC derivadas de tumores de mama, en comparación al medio acondicionado de MSC derivadas de tejido adiposo de mama normal; estas diferencias dependen del contexto patológico o fisiológico del que fueron aislados. Interesantemente, observamos que el hBM-MSC-cm utilizado en este trabajo no promovió un efecto inhibitor sobre los niveles de proliferación

de linfocitos, como Sepehr et al. reportaron previamente ⁵¹. A pesar de que las hBM-MSC utilizadas en los experimentos de este trabajo no se educaron en un entorno tumoral, se observó que los agentes solubles secretados por hBM-MSC influyen en las propiedades inmunorreguladoras de las células MDA-MB-231. Por lo tanto, es importante estudiar los mecanismos inmunorreguladores en los que las MSC pueden influir en el cáncer, especialmente las MSC que se reclutan de la médula ósea al microambiente tumoral, puesto que células malignas metastatizan principalmente en el tejido óseo en el cáncer de mama avanzado ^{6,124,125}.

Aunque varios estudios han descrito las propiedades inmunosupresoras de las MSC, su capacidad para secretar un cóctel de proteínas que modulan la respuesta inmunitaria in vitro puede ser cuestionable ya que este perfil de proteínas secretadas podría verse modificado por las condiciones de cultivo o incluso por factores inherentes al donante ¹²⁶. Por lo que el estudio de las moléculas secretadas por las MSC podría ser decisivo en la respuesta inmunomoduladora del microambiente tumoral y en consecuencia sigue siendo un enorme reto.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un modelo que sugiere un efecto diferencial en algunas propiedades tumorigénicas e inmunorregulatorias de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-474, interactuando con las hBM-MSC a través de factores solubles presentes en su medio condicionado.

Sin embargo, es necesario que futuros estudios consideren los otros mecanismos inmunorreguladores que las diferentes células de cáncer de mama pueden tener bajo la influencia de MSC normales y MSC tumorales, ya sea por señalización paracrina o contacto celular y determinar si la participación de las MSC dentro del microambiente tumoral es clave para el comportamiento agresivo en el cáncer de mama. Asimismo, es necesario dilucidar en detalle las vías de señalización involucradas en los efectos inmunorreguladores observados.

En conclusión, los ensayos realizados en este trabajo demostraron que el hBM-MS-CM puede inducir un efecto diferencial en las propiedades inmunorreguladoras de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 del subtipo basal, pero no en las células BT-474 del subtipo luminal.

Finalmente, comprender la respuesta inmune en el contexto tumoral utilizando un panel más amplio de líneas celulares tumorales y muestras clínicas podría ayudar a correlacionar el subtipo de cáncer de mama con una posible respuesta inmune, lo que daría ventaja para diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

8 Conclusiones

- El hBM-MS-CM promueve la proliferación, la capacidad migratoria y el crecimiento con independencia de anclaje de las células BT-474 pero no en las MDA-MB-231.
- El hBM-MS-CM promueve la sobreexpresión de los genes TGF- β , IDO e IL-10 y la proteína IDO en las células triple negativo MDA-MB-231.
- El hBM-MS-CM potencia la capacidad de las células MDA-MB-231 para inhibir la proliferación de las MNCs, al promoverse una disminución de TNF y un aumento de IL-10 y TGF- β , que consecuentemente aumenta la población de células Treg.
- Por lo tanto, el hBM-MS-CM puede inducir un efecto diferencial de las propiedades inmunoreguladoras en las células MDA-MB-231, pero no en las BT-474.

9 Perspectivas

En trabajos futuros será necesario estudiar estos y otros posibles mecanismos inmunoreguladores presentes en diferentes líneas celulares de cáncer de mama y muestras clínicas que nos ayude a comprender de mejor manera la

agresividad celular asociada al subtipo tumoral. Sin dejar de lado, el efecto que las MSC podrían tener sobre la inmunomodulación de las células tumorales, ya sea a través de factores solubles o vía contacto celular y si la participación de las MSC resulta clave para el microambiente tumoral.

10 Bibliografía

1. Wu, S., Zhu, W., Thompson, P. & Hannun, Y. A. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. doi:10.1038/s41467-018-05467-z
2. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).
3. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 7–33 (2021).
4. H, S. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
5. Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* **5**, 2929–2943 (2015).
6. Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 1–31 (2019).
7. Dai, X. *et al.* Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am. J. Cancer Res.* **5**, 2929–43 (2015).
8. Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
9. Desantis, C., Siegel, R. & Jemal, A. Breast Cancer Facts & Figures 2015–2016. *Am. Cancer Soc.* **44** (2015). doi:10.1016/B978-1-4377-1757-0.00028-7
10. Yersal, O. & Barutca, S. Ozlem Yersal, Sabri Barutca. *World J Clin Oncol* **5**, (2014).
11. Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* (2020). doi:10.1016/j.cub.2020.06.081
12. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803> **22**, 329–360 (2004).
13. Tie, Y., Tang, F., Wei, Y. & Wei, X. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *J. Hematol. Oncol.* **2022 151** **15**, 1–33 (2022).
14. Kohli, K., Pillarisetty, V. G. & Kim, T. S. Key chemokines direct migration of immune cells in solid tumors. *Cancer Gene Ther.* **2021 291** **29**, 10–21 (2021).
15. Lorenzo-Sanz, L. & Muñoz, P. Tumor-Infiltrating Immunosuppressive Cells in Cancer-Cell Plasticity, Tumor Progression and Therapy Response. *Cancer Microenviron.* **12**, 119–132 (2019).
16. Hiam-Galvez, K. J., Allen, B. M. & Spitzer, M. H. Systemic immunity in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2021 216** **21**, 345–359 (2021).
17. Gabrilovich, D. I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**,

- 1096–1103 (1996).
18. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 2005 **5**, 263–274 (2005).
 19. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nat.* 1998 3926673 **392**, 245–252 (1998).
 20. Li, Y.-L., Zhao, H. & Ren, X.-B. Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? (2016). doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2015.0070
 21. Jarnicki, A. G., Lysaght, J., Todryk, S. & Mills, K. H. G. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **177**, 896–904 (2006).
 22. Mirlekar, B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE open Med.* **10**, 205031212110690 (2022).
 23. Berti, F. C. B., Oliveira, K. B. de, Berti, F. C. B. & Oliveira, K. B. de. IL-10 in cancer: Just a classical immunosuppressive factor or also an immunostimulating one? *AIMS Allergy Immunol.* 2018 288 **2**, 88–97 (2018).
 24. Parveen, S. *et al.* IL-4 receptor targeting as an effective immunotherapy against triple-negative breast cancer. *bioRxiv* 2020.08.05.238824 (2020). doi:10.1101/2020.08.05.238824
 25. Li, Z., Chen, L. & Qin, Z. Paradoxical Roles of IL-4 in Tumor Immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **6**, 415 (2009).
 26. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells - PubMed. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10201996/>. (Accessed: 3rd July 2022)
 27. Paluskievicz, C. M. *et al.* T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
 28. Battle, E. & Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **50**, 924–940 (2019).
 29. Meireson, A., Devos, M. & Brochez, L. IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? *Front. Immunol.* **11**, 2340 (2020).
 30. Moon, Y. W., Hajjar, J., Hwu, P. & Naing, A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. (2015). doi:10.1186/s40425-015-0094-9
 31. Finetti, F. *et al.* Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology (Basel)*. **9**, 1–26 (2020).
 32. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ - PubMed. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11912139/>. (Accessed: 3rd July 2022)
 33. Zhai, L. *et al.* Immunosuppressive IDO in Cancer: Mechanisms of Action, Animal Models, and Targeting Strategies. *Front. Immunol.* **11**, 1185 (2020).
 34. Barriga, V., Kuol, N., Nurgali, K. & Apostolopoulos, V. The Complex Interaction between the Tumor Micro-Environment and Immune Checkpoints in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 35. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **39**, 98–106 (2016).
 36. Yu, H. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* **64**, 853–860 (2015).

37. Lan, G. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 expression predicts poor prognosis in luminal B HER2-negative breast cancer. *Oncol. Lett.* **15**, 5093 (2018).
38. Rattigan, Y., Hsu, J. M., Mishra, P. J., Glod, J. & Banerjee, D. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp. Cell Res.* **316**, 3417–3424 (2010).
39. Tu, S. *et al.* Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell* **14**, 408–419 (2008).
40. Quante, M. *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* **19**, 257–272 (2011).
41. Gao, H., Priebe, W., Glod, J. & Banerjee, D. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium. *Stem Cells* **27**, 857–865 (2009).
42. Ponte, A. L. *et al.* The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* **25**, 1737–1745 (2007).
43. Hall, B., Andreeff, M. & Marini, F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb. Exp. Pharmacol.* **180**, 263–283 (2007).
44. Leuning, D. G. *et al.* The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. *Sci. Reports* **2018** **8**, 1–9 (2018).
45. Wang, Y., Chen, X., Cao, W. & Shi, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology* **15**, 1009–1016 (2014).
46. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
47. Han, Z. *et al.* Immunosuppressive effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironment favours the growth of B16 melanoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 2343–2352 (2011).
48. Cheng, J. *et al.* Interleukin-1 α induces immunosuppression by mesenchymal stem cells promoting the growth of prostate cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **6**, 955–960 (2012).
49. Zachar, L., Bačenková, D. & Rosocha, J. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J. Inflamm. Res.* **9**, 231–240 (2016).
50. Beldi, G. *et al.* TNF α /TNFR2 signaling pathway: an active immune checkpoint for mesenchymal stem cell immunoregulatory function. *Stem Cell Res. Ther.* **2020** **11**, 1–15 (2020).
51. Sepehr, K. S. *et al.* Comparative immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from human breast tumor and normal breast adipose tissue. *Cancer Immunol. Immunother.* **2020** **69**, 1841–1854 (2020).
52. Rivera-Cruz, C. M., Shearer, J. J., Figueiredo Neto, M. & Figueiredo, M. L. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell polarization within the tumor microenvironment niche. *Stem Cells International* (2017). doi:10.1155/2017/4015039

53. Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J. & Allison, J. P. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* (2009). doi:10.1084/jem.20082492
54. Roychoudhuri, R. *et al.* BACH2 represses effector programs to stabilize T regulated immune homeostasis. *Nature* (2013). doi:10.1038/nature12199
55. Spaggiari, G. M. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* (2008). doi:10.1182/blood-2007-02-074997
56. Karnoub, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557–563 (2007).
57. Prantl, L. *et al.* Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth. *Prostate* **70**, 1709–1715 (2010).
58. Zhu, W. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp. Mol. Pathol.* **80**, 267–274 (2006).
59. Martin, F. T. *et al.* Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res. Treat.* **124**, 317–326 (2010).
60. Amé-Thomas, P. *et al.* Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* **109**, 693–702 (2007).
61. Kansy, B. A. *et al.* The bidirectional tumor - Mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 1–10 (2014).
62. Lis, R. *et al.* Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties. *PLoS One* **7**, (2012).
63. Houthuijzen, J. M., Daenen, L. G. M., Roodhart, J. M. L. & Voest, E. E. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br. J. Cancer* 2012 10612 **106**, 1901–1906 (2012).
64. Klopp, A. H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M. & Marini, F. Concise Review: Dissecting a Discrepancy in the Literature: Do Mesenchymal Stem Cells Support or Suppress Tumor Growth? *Stem Cells* **29**, 11–19 (2011).
65. Li, H. J., Reinhardt, F., Herschman, H. R. & Weinberg, R. A. Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov.* **2**, 840–855 (2012).
66. Jing, Y., Liang, W., Zhang, L., Tang, J. & Huang, Z. The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Induction of Cancer-Stem Cell Phenotype. *Front. Oncol.* **12**, 308 (2022).
67. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420 (2009).
68. Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–142 (2006).
69. Klopp, A. H. *et al.* Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. *PLoS One* **5**, (2010).
70. Ye, H. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced tgfbeta contributes to progression and metastasis of prostate cancer. *Cancer Invest.* (2012). doi:10.3109/07357907.2012.692171
71. Gu, J. J., Hoj, J., Rouse, C. & Pendergast, A. M. Mesenchymal stem cells

- promote metastasis through activation of an ABL-MMP9 signaling axis in lung cancer cells. *PLoS One* **15**, (2020).
72. Rhodes, L. V. *et al.* Effects of human mesenchymal stem cells on ER-positive human breast carcinoma cells mediated through ER-SDF-1/CXCR4 crosstalk. *Mol. Cancer* **9**, (2010).
 73. Halpern, J. L., Kilbarger, A. & Lynch, C. C. Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor. *Cancer Lett.* **308**, 91–99 (2011).
 74. Mi, Z. *et al.* Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* **32**, 477–487 (2011).
 75. Suzuki, K. *et al.* Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol. Med.* **17**, 579–87 (2011).
 76. Beckermann, B. M. *et al.* VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br. J. Cancer* **99**, 622–631 (2008).
 77. Suzuki, K. *et al.* Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol. Med.* **17**, 579–587 (2011).
 78. Xuan, X., Tian, C., Zhao, M., Sun, Y. & Huang, C. Mesenchymal stem cells in cancer progression and anticancer therapeutic resistance. *Cancer Cell Int.* **21**, 1–16 (2021).
 79. Balakrishnan, K. *et al.* Influence of bone marrow stromal microenvironment on forodesine-induced responses in CLL primary cells. *Blood* **116**, 1083–1091 (2010).
 80. Scherzed, A. *et al.* BMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells in vitro. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 349–357 (2011).
 81. Roodhart, J. M. L. *et al.* Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* **20**, 370–383 (2011).
 82. Ryu, H. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- β and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **352**, 220–227 (2014).
 83. Trivanović, D. *et al.* Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Cell Biol. Int.* **38**, 254–265 (2014).
 84. Razmkhah, M., Mansourabadi, Z., Mohtasebi, M. S., Talei, A. R. & Ghaderi, A. Cancer and normal adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs): Do they have differential effects on tumor and immune cells? *Cell Biol. Int.* **42**, 334–343 (2018).
 85. Li, P. *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned medium promotes MDA-MB-231 cell migration and inhibits A549 cell migration by regulating insulin receptor and human epidermal growth factor receptor 3 phosphorylation. *Oncol. Lett.* **13**, 1581–1586 (2017).
 86. Cavallari, C. *et al.* Role of Lefty in the anti tumor activity of human adult liver stem cells. *Oncogene* **2013 327** **32**, 819–826 (2012).
 87. Li, T. *et al.* Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and migration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of the ERK pathway. *Oncol. Rep.* **34**, 1469–1477 (2015).
 88. He, N. *et al.* MSCs inhibit tumor progression and enhance radiosensitivity of breast cancer cells by down-regulating Stat3 signaling pathway. doi:10.1038/s41419-018-0949-3

89. Eiró, N. *et al.* Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget* **5**, 10692–10708 (2014).
90. Wang, M. L. *et al.* Oncostatin m modulates the mesenchymal-epithelial transition of lung adenocarcinoma cells by a mesenchymal stem cell-mediated paracrine effect. *Cancer Res.* **72**, 6051–6064 (2012).
91. Tsuji, W. *et al.* An Animal Model of Local Breast Cancer Recurrence in the Setting of Autologous Fat Grafting for Breast Reconstruction. *Stem Cells Transl. Med.* **7**, 125–134 (2018).
92. Sepehr, K. S. *et al.* Comparative immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from human breast tumor and normal breast adipose tissue. *Cancer Immunol. Immunother.* **2020** **69**, 1841–1854 (2020).
93. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* (2001). doi:10.1006/meth.2001.1262
94. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
95. Saphner, T., Tormey, D. C. & Gray, R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J. Clin. Oncol.* **14**, 2738–2746 (1996).
96. McGowan, E. M., Saad, S., Bendall, L. J., Bradstock, K. F. & Clarke, C. L. Effect of progesterone receptor A predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. *Breast Cancer Res. Treat.* (2004). doi:10.1023/B:BREA.0000014041.58977.80
97. Kennecke, H. *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* (2010). doi:10.1200/JCO.2009.25.9820
98. Wang, Y. *et al.* Effects of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells on breast cancer cells with differing hormone receptor status. *Oncol. Lett.* (2017). doi:10.3892/ol.2017.7130
99. Buonomo, O. C. *et al.* New insights into the metastatic behavior after breast cancer surgery, according to well-established clinicopathological variables and molecular subtypes. *PLoS One* (2017). doi:10.1371/journal.pone.0184680
100. L, W. *et al.* High Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Correlated With Microvessel Density and Worse Prognosis in Breast Cancer. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
101. Llanes-Fernández, L. *et al.* Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. *The Breast* **15**, 482–489 (2006).
102. Zarzynska, J. M. Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* **2014**, (2014).
103. Lewis, A. M., Varghese, S., Xu, H. & Alexander, H. R. Interleukin-1 and cancer progression: The emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine* **4**, (2006).
104. Massagué, J. TGF β in Cancer. *Cell* **134**, 215–230 (2008).
105. Sheikhpour, E. *et al.* A survey on the role of interleukin-10 in breast cancer: A narrative. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology* **7**, 30–37 (2017).
106. Levings, M. K., Bacchetta, R., Schulz, U. & Roncarolo, M. G. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *International archives of allergy and immunology* (2002). doi:10.1159/000067596
107. Dewi, D. L. *et al.* Suppression of indoleamine-2,3-dioxygenase 1 expression by

- promoter hypermethylation in ER-positive breast cancer. *Oncoimmunology* **6**, (2017).
108. Xia, A., Zhang, Y., Xu, J., Yin, T. & Lu, X.-J. T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, 1719 (2019).
 109. Özgül Özdemir, R. B. *et al.* The effects of mesenchymal stem cells on the IDO, HLA-G and PD-L1 expression of breast tumor cells MDA-MB-231 and MCF-7. *Arch. Clin. Exp. Med.* (2019). doi:10.25000/ACEM.601633
 110. Y, Z., YC, F. & J, L. PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity. *Oncol. Lett.* **18**, 5399–5407 (2019).
 111. Qu, X., Tang, Y. & Hua, S. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. *Front. Immunol.* **0**, 563 (2018).
 112. Dennis, K. L., Blatner, N. R., Gounari, F. & Khazaie, K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Current Opinion in Oncology* (2013). doi:10.1097/CCO.0000000000000006
 113. S, F., K, S., T, S. & MT, L. Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ. *Blood* **98**, 2143–2151 (2001).
 114. Isla Larrain, M. T. *et al.* IDO is highly expressed in breast cancer and breast cancer-derived circulating microvesicles and associated to aggressive types of tumors by in silico analysis. doi:10.1007/s13277-014-1859-3
 115. Razmkhah, M. *et al.* Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- β 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: Do they protect breast cancer cells from the immune response? *Cell. Immunol.* **266**, 116–122 (2011).
 116. Abumaree, M. H., Abomaray, F. M., Alshabibi, M. A., AlAskar, A. S. & Kalionis, B. Immunomodulatory properties of human placental mesenchymal stem/stromal cells. *Placenta* **59**, 87–95 (2017).
 117. Yuan, X. L. *et al.* Gastric cancer cells induce human CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells through the production of TGF- β 1. *World J. Gastroenterol.* **17**, 2019 (2011).
 118. Kähkönen, T. E. *et al.* Human immune system increases breast cancer-induced osteoblastic bone growth in a humanized mouse model without affecting normal bone. *J. Immunol. Res.* **2019**, (2019).
 119. M, S. *et al.* Patterns and incidence of chromosomal instability and their prognostic relevance in breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res. Treat.* **128**, 23–30 (2011).
 120. Yu, T. & Di, G. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chinese Journal of Cancer Research* (2017). doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2017.03.10
 121. Soysal, S. D., Tzankov, A. & Muenst, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* **82**, 142–152 (2015).
 122. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2010** **125** **12**, 1–18 (2010).
 123. Casbas-Hernandez, P. *et al.* Tumor intrinsic subtype is reflected in cancer-adjacent tissue. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2015). doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0934
 124. Coleman, R. E. *et al.* Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin. Cancer Res.* **12**, (2006).
 125. Hess, K. R. *et al.* Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* **106**, 1624–1633 (2006).

126. Czapla, J. *et al.* The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, (2019).

11 Anexos



Article

In Vitro Evidence of Differential Immunoregulatory Response between MDA-MB-231 and BT-474 Breast Cancer Cells Induced by Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Conditioned Medium

Víctor M. Arenas-Luna ^{1,2}, Juan J. Montesinos ³ , Víctor A. Cortés-Morales ³ , José R. Navarro-Betancourt ¹, Janneth Peralta-Ildefonso ¹, Bulmaro Cisneros ² and Salomón Hernández-Gutiérrez ^{1,*}

¹ Molecular Biology Laboratory, School of Medicine, Panamerican University, Mexico City 03920, Mexico
² Department of Genetics and Molecular Biology, Center of Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), Mexico City 04740, Mexico
³ Mesenchymal Stem Cells Laboratory, Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City 06720, Mexico
* Correspondence: shernand@up.edu.mx



Citation: Arenas-Luna, V.M.; Montesinos, J.J.; Cortés-Morales, V.A.; Navarro-Betancourt, J.R.; Peralta-Ildefonso, J.; Cisneros, B.; Hernández-Gutiérrez, S. In Vitro Evidence of Differential Immunoregulatory Response between MDA-MB-231 and BT-474 Breast Cancer Cells Induced by Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Conditioned Medium. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2023**, *45*, 268–285. <https://doi.org/10.3390/cimb45010020>

Academic Editors: Ming-Wei Lin and Cheng-Che Lee

Received: 9 December 2022
Revised: 22 December 2022
Accepted: 22 December 2022
Published: 30 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Inside tumors, cancer cells display several mechanisms to create an immunosuppressive environment. On the other hand, by migration processes, mesenchymal stromal cells (MSCs) can be recruited by different cancer tumor types from tissues as distant as bone marrow and contribute to tumor pathogenesis. However, the impact of the immunoregulatory role of MSCs associated with the aggressiveness of breast cancer cells by soluble molecules has not been fully elucidated. Therefore, this in vitro work aimed to study the effect of the conditioned medium of human bone marrow-derived-MSCs (hBM-MSC-cm) on the immunoregulatory capability of MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cells. The hBM-MSC-cm on MDA-MB-231 cells induced the overexpression of *TGF-β*, *IDO*, and *IL-10* genes. Additionally, immunoregulation assays of mononuclear cells (MNCs) in co-culture with MDA-MB-231 and hBM-MSC-cm decreased lymphocyte proliferation, and increased proteins *IL-10*, *TGF-β*, and *IDO* while also reducing TNF levels, shooting the proportion of regulatory T cells. Conversely, the hBM-MSC-cm did not affect the immunomodulatory capacity of BT-474 cells. Thus, a differential immunoregulatory effect was observed between both representative breast cancer cell lines from different origins. Thus, understanding the immune response in a broader tumor context could help to design therapeutic strategies based on the aggressive behavior of tumor cells.

Keywords: breast cancer; mesenchymal stromal cells; immunoregulation; cytokines; conditioned medium

1. Introduction

Worldwide, breast cancer is the most common malignancy in women and is considered the second leading cause of cancer-related death in women over 25 years of age. In 2020, 2.3 million new cases were diagnosed, representing 24.5% of all cancer types affecting the female population [1].

Breast cancer is considered a multifactorial disease with great cellular heterogeneity; diverse types of cells within the tumor engage in highly complex molecular interactions, with wide-ranging clinical implications [2]. Breast cancer is classified into various subtypes according to histopathology and at the molecular level, considering the expression of cell surface markers such as the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2), among others, whose expression help to predict possible treatment responses [3–5]. Luminal and basal subtypes are highly prevalent, and the basal subtype is commonly referred to as triple-negative; the absence of these receptors determines their classification [3,6].

The tumor microenvironment is a dynamic and complex system in which cellular and non-cellular elements interact to regulate cancer progression. These elements include a wide range of soluble factors, such as cytokines, growth factors, chemokines, and cellular elements, such as immune cells, fibroblasts, endothelial cells, and mesenchymal stromal cells (MSCs), among others.

In breast cancer, as in other types of cancers, a high proportion of MSCs present in the tumor is recruited through migration processes from various tissues, the most common of which is the bone marrow [7,8]. MSCs are attracted to the tumor microenvironment through a chemotactic gradient comprised of soluble factors that include growth factors (e.g., *TGF- β* , EGF, PDGF, SCF, HGF, IGF-1 y GF, β FGF, HIF1 α y VEGF) and some chemokine ligands (e.g., CCL2, CCL5, CCL22 y SDF-1 α) secreted by tumoral cells [8–17]. In such a context, MSCs can promote and facilitate tumor growth, angiogenesis, metastasis, and chemoresistance and can modulate the antitumoral immune response [18,19].

In vitro, MSCs have an inhibitory effect on the proliferation of T lymphocytes [20]. MSCs under inflammatory conditions promote the differentiation of T lymphocytes towards a regulatory immunophenotype (Treg). In addition, other studies indicate that MSCs induce a protective effect on breast cancer cells by Treg cell promotion [21], thereby inhibiting the function of immune cells such as NK cells and lymphocytes, among others, through the expression of immunosuppressive factors including *IL-4*, *IL-10*, and *TGF- β* [22], whose presence could be a determinant in tumor pathogenesis and generate an immunosuppressive environment [23,24].

On the other hand, it is well known that cancer cells display either by cell contact or via paracrine a number of mechanisms to evade the immune system, which include the secretion of soluble molecules such as cytokines and growth factors; modifications to cell surface membrane-molecules expression [25], an increase in resistance to cell death pathways or creating an immunosuppressive environment through the induction and expansion of immunosuppressive Treg lymphocytes, which create a microenvironment that blocks the antitumor immune response [26] and could be a determinant factor in tumor pathogenesis [23,24].

Due to the serious technical and methodological difficulties, few studies to date have comprehensively analyzed the variety of molecular interactions that occur among different cell types within tumors. Thus, the use of breast cancer cell lines as an in vitro study model is important to understand the heterogeneity that characterizes breast cancer at the molecular and cellular levels [27]. For this reason, the selection of molecular markers representing each cell line from different subtypes is a key factor in breast cancer studies. On the other hand, it is known that each subtype of breast cancer can acquire particular characteristics that can be determined by the tumor microenvironment [28,29]. Although, multiple studies have been undertaken with the aim of understanding tumor cell biology the immunomodulatory effect that breast cancer cells with different aggressiveness characteristics may exert via interaction with MSCs has not been fully studied. Therefore, as a first approach to show a possible differential immunoregulatory response between breast cancer cell lines, we decided to evaluate using in vitro assays, the effect of human bone marrow-derived MSCs conditioned medium (hBM-MSC-cm) on the immunoregulatory properties of two breast cancer cell lines: the breast adenocarcinoma cell line with high-growing and highly metastatic potential MDA-MB-231(basal origin) triple-negative PR⁻, ER⁻ and ERBB2⁻ profile and the ductal breast cancer cell line with slow-growing and the weakly invasive BT- 474 (luminal origin) triple positive PR⁺, ER⁺ and ERBB2⁺ profile [30]. Our results indicate that MDA-MB-231 cells in co-culture with MNCs (lymphocytes) have an intrinsic capacity to increase the proportion of immunosuppressive molecules and Treg cells, which is enhanced by the presence of the hBM-MSC-cm, showing major immunosuppressive activity in vitro relative to BT-474 cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures

The MSC were isolated from human bone marrow by aspiration from the iliac crest of three hematologically healthy adult donors, according to the procedure established in the Traumatology and Orthopedics Hospital of the Mexican Institute of Social Security (protocol 1411) and were characterized according to the criteria established by the International Society of Cell Therapy (ISCT) [31]. Once obtained, each bone marrow sample was placed in 50 mL conical tubes (Corning, New York, NY, USA) containing 15 mL of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and separated on a density gradient with Ficoll-Paque Plus at a density of 1.077 ± 0.001 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The cells were centrifuged at 1200 rpm for 30 min, and the interface was washed with PBS containing 3% FBS and 1 mM EDTA. The mononuclear cell pellet was resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; low glucose) supplemented with 15% FBS, 10 μ L/mL glutamine (200 mM), 100 U penicillin, and 100 μ g streptomycin. The number and viability of nucleated cells were determined with Turck's solution and trypan blue (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), respectively; 5×10^6 mononuclear cells were seeded onto 100 mm Petri dishes (Corning, New York, NY, USA) and incubated at 37 °C with 5% CO₂ and 90% humidity. After 4 days, the cells were washed with PBS, and the medium was replaced twice per week. When the cultures reached 80–90% confluence, the cells were harvested and seeded to be expanded. The experiments were carried out in passage ≤ 10 .

All antibodies in this work were used according to the supplier's instructions and are shown in Table 1.

Table 1. Antibodies used for protein detection by flow cytometry.

Antigen	Company	Catalog Number
CD90 PE-Cy5	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555597
CD105 eFlour450	Ebioscience, San Diego, CA, USA	48-1057-42
CD73 PE-Cy7	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	561258
HLA-A	Biologend, San Diego, CA, USA	555552
HLA-DR PE-Cy-7	Biologend, San Diego, CA, USA	307616
CD45 PE	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555483
CD31 FITC	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555445
CD34 APC	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555824
CD 14 PE	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555398
CD3 PE	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	555333
7AAD	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	559925
CD45 APC	BD Biosciences, San Diego, CA, USA	559865
IDO PE	RyD systems, Minneapolis, MN, USA	IC6030P
CD4 FITC	BD Biosciences San Diego, CA, USA	555346
CD25 PE	BD Biosciences San Diego, CA, USA	555432
FoxP3 PECy/7	Ebioscience, San Diego, CA, USA	25-4777-42

2.2. Characterization of hBM-MSC

2.2.1. Immunophenotype

hBM-MSC were characterized according to the criteria established by the ISCT [31]. Conjugated monoclonal antibodies against CD73, CD90, CD45, CD31, CD73, CD14, CD105, HLA-A and HLA-DR were used to analyze the cells by flow cytometry.

To analyze the morphology of the hBM-MSC, 0.3×10^6 hBM-MSC/cm² were seeded onto P35 Petri dishes at 40% of confluence (Corning, New York, NY, USA), after which the cells were fixed with 4% PFA, stained with toluidine blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), and observed by microscopy Axiovert, Zeiss (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Stuttgart, Germany).

2.2.2. Differentiation to Adipocytes

To evaluate the differentiation potential of hBM-MSC, 0.8×10^5 hBM-MSC were seeded in low glucose DMEM medium (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS in P35 Petri dishes (Corning, New York, NY, USA). Upon reaching 60% confluence, the cells were induced with MesenCult Adipogenic Differentiation Kit medium (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) and incubated for 21 days. The medium was replaced twice per week. To visualize lipid vacuoles, cells were stained with Oil Red O solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA).

2.2.3. Differentiation to Chondrocytes

3×10^5 hBM-MSC were placed in 15-mL tubes and resuspended in low-glucose DMEM medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS. The tubes were centrifuged at $300 \times g$ to obtain a cellular pellet. The supernatant was removed and chondrogenic differentiation medium supplemented with TGF- β (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA) was added. The pellet was incubated for 28 days. The micromass was fixed, hydrated, and embedded in Tissue-Tek (Sakura CA, USA), after which 4- μ m slices were cryosectioned and stained with Alcian Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) to evaluate the presence of chondroitin sulfate.

2.2.4. Differentiation to Osteocytes

0.8×10^5 hBM-MSC were seeded in P35 Petri dishes (Corning, New York, NY, USA) with low-glucose DMEM medium (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS at 60% confluence. The cells were incubated with StemPro osteogenic medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) for 21 days. The differentiation medium was replaced twice per week. Osteocyte analysis was performed with Alizarin Red staining, which detects calcium deposits (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA).

2.3. Conditioned Media Preparation

To obtain the conditioned medium, hBM-MSC were grown until they reached 70–80% confluence, after which the media were replaced with FBS-free media. After 48 h, the medium was collected and centrifuged for 5 min at 2000 rpm and filtered with a 0.22- μ m membrane (Millex GS; Millipore, MA, USA). The conditioned medium was either used immediately or frozen at -80°C until use. A 2:3 mixture of conditioned medium plus fresh medium was prepared for experimental use as Sepehr et al. previously reported [32].

2.4. Breast Cancer Cell Lines

The breast cancer cell lines MDA-MB-231 and BT-474 were purchased from ATCC and grown in RPMI 1640 medium (Biowest, Missouri, MO, USA) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 25 mM Hepes, 100 U penicillin, and 100 μ g streptomycin in a 5% CO₂ atmosphere and 90% humidity at 37 °C. The experiments were carried out in passage ≤ 13 .

2.5. qRT-PCR Assays

The breast cancer cell lines MDA-MB-231 and BT-474 were seeded onto 100 mm Petri dishes at 60–70% confluence. Subsequently, the medium was replaced with hBM-MSC-cm. After 48 h, the total RNA was extracted using TRIzol-chloroform and treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using an oligo (dT18), following the supplier's instructions (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The relative expression

levels of various genes were analyzed by qRT-PCR using the Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a normalization control. The amplification conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Finally, the relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [33]. The oligonucleotides for each analyzed gene were designed using the Oligo Analyzer Tool program and are shown in Table 2.

Table 2. Primers used for qRT-PCR gene expression.

Probe	Sequence	Amplicon Length (bp)
<i>GAPDH</i>	F FGGTGTGAACCATGAGAAGTATGA R GAGTCCTTCCACGA TACCAAAG	123
<i>IDO</i>	F AGGATTCTTCTGGTCTCTCT R GTGTCCCGTCTTGCATTG	102
<i>TGF-β</i>	F CGTGGAGCTGTACCAGAAATAC R CACAACCTCCGGTGACATCAA	112
<i>IL-10</i>	F GCTGGAGGACTTTAAGGGTTAC R GATGTCTGGGTCTTGGTTCTC	106
<i>IL-4</i>	F GTTCTACAGCCACCATGAGAA R CCGTTTCAGGAATCGGATCA	94

2.6. MNCs Proliferation Assays in Co-Cultures

To perform immunomodulation assays, peripheral blood-derived MNCs were obtained from healthy adult donors ($n = 3$). The peripheral blood was diluted with PBS (1:2), and the cells were separated in a density gradient with Ficoll-Paque Plus at a density of 1.077 ± 0.001 g/mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The cells were centrifuged at 1200 rpm for 30 min, after which the interface was collected and washed with PBS. Then, the MNCs were incubated for 2 h at 37 °C with 5% CO₂ and 90% humidity to remove monocytes. The number and viability of nucleated cells were determined with Turck's solution and Trypan Blue (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), respectively. The MNCs were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U penicillin, and 100 µg of streptomycin until use.

To evaluate the effect of hBM-MS-CM on the immunomodulation of MDA-MB-231 and BT-474 cancer cells, lymphocyte proliferation assays were performed in 48-well plates over a period of 6 days. Previously, MNCs were stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and seeded in co-cultures with breast cancer cells. The ratios are 3:1 MNC/MDA-MB-231 and 2:1 MNC/BT-474 cells with or without hBM-MS-CM growing in plates of 48 wells with a surface area of 0.95 cm². Finally, MNCs were activated with phytohemagglutinin (7.5 µg/mL). The groups analyzed were: (1) activated MNCs (positive control); (2) MNCs plus tumor cells; (3) MNCs plus tumor cells plus hBM-MS-CM and (4) MNCs plus hBM-MS-CM. The co-culture cells were seeded in the following proportions: 1×10^5 MNCs, 5×10^4 BT-474 cells, and 3×10^4 MDA-MB-231 cells.

Following the incubation period, the cells present in the co-cultures were prepared for the analysis of the proliferation of MNCs by flow cytometry. The cells were disaggregated and washed with PBS containing 1 mM EDTA and centrifuged at 1200 rpm for 5 min. Subsequently, the cells were blocked with FBS for 20 min at 4 °C and washed with PBS-EDTA. The cells were then incubated with CD3 antibody (lymphocytes T antigen) and 7AAD (exclude dead cells) in 100 µL of PBS-EDTA at 4 °C for 20 min. The proliferation of MNCs (lymphocytes CD3⁺) was analyzed on a FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), acquiring 10,000 events per sample. The cells obtained in the proliferation assays were normalized using activated MNCs as a proliferation control,

whose value was considered 100%. The data were analyzed with the FlowJo™ v.10.7.1 program (Ashland, OR, USA).

2.7. Quantitative Analysis of Soluble Molecules

The supernatants from each group were collected and frozen at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. The cytokine concentration was determined according to De la Rosa et al. using a Cytometric Bead Array kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) [34]. A standard curve was developed by preparing serial dilutions for each analyzed molecule (0–500 pg/mL). Later, 10 μL of the beads that recognize the TNF, *IL-10*, and *IL-4* cytokines were added to 50 μL of each sample or standard sample. Then, the samples were incubated at room temperature and protected from light for 30 min. After three washes with 1 mL of the wash buffer, the samples were centrifuged at 1200 rpm, and the pellet was resuspended in 300 μL of the same buffer. The samples were analyzed in the FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), and the cytokine concentrations were determined with LegendPlex v7.1 software (San Diego, CA, USA).

The concentration of *TGF- β* was determined using the *TGF- β* Cytometric Bead Array Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) according to the supplier's instructions. *TGF- β* serial dilutions were used to perform a standard curve (40–10,000 pg/mL). Subsequently, 17 μL each sample was activated with 3.4 μL HCl 1 N for 10 min at room temperature. Then, the samples were neutralized with 3.4 μL NaOH 1.2 N/Hepes 0.5 M. Next, 17 μL of activated samples or standard samples were incubated with capture beads for 2 h protected from light. At end of the incubation time, 300 μL of washing buffer was added and centrifuged at 1800 rpm for 5 min. Finally, the samples were incubated with PE detector reagent at room temperature for 2 h and a second wash was performed before being analyzed in the Spectral flow cytometer Aurora (Cytek Biosciences, Fremont, CA, USA), and *TGF- β* concentration was determined with LegendPlex v7.1 software (San Diego, CA, USA).

2.8. Detection of IDO Expression in Breast Cancer Cells

The same groups assayed above were used to quantify by flow cytometry the intracellular *IDO* expression in breast cancer cells. After 6 days of co-culture, the cells were treated with Golgi Stop (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) for 5 h. The cells in co-culture were harvested and labeled with CD45 antibody for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, after which they were fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) for 1 h. Finally, the cells were labeled with anti-*IDO* for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The CD45-*IDO*⁺ cells were analyzed in a FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), 10,000 events were acquired from each sample and analyzed with the FlowJo™ v.10.7.1 software (Ashland, OR, USA).

2.9. Detection of Treg Cells

The same groups assayed above were used for flow cytometry to assess the proportion of regulatory T lymphocytes that have a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ immunophenotype. After 6 days of co-culture, MNCs were harvested and labeled with CD4 and CD25 antibodies for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, after which they were fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) for 1 h. Finally, the cells were labeled with FoxP3 for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The triple-positive cells were analyzed in a FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), 10,000 events were acquired from each sample and analyzed with the FlowJo™ v.10.7.1 software (Ashland, OR, USA).

2.10. Statistical Analyses

Nonparametric statistical tests were performed for all assays. Bonferroni-corrected pairwise comparisons were made for relative gene expression analyses. On the other hand, the assays of the relative proliferation of MNCs and the quantification of soluble factors

were analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni-corrected pairwise comparisons. Data analysis was performed using the Prism 8 program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A p -value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of hBM-MSC

Isolated primary cultures of hBM-MSC were characterized according to the criteria set forth by the ISCT [31]. The surface marker expression profile was analyzed by flow cytometry. The hBM-MSC showed a high expression of the cell-surface markers CD90, CD105, CD73, and HLA-A, whereas they did not express HLA-DR, CD45, CD34, CD14, and CD31 (Figure 1A). Afterward, their differentiation capability for the three basic lineages was evaluated, adding specific induction media (see Materials and Methods).

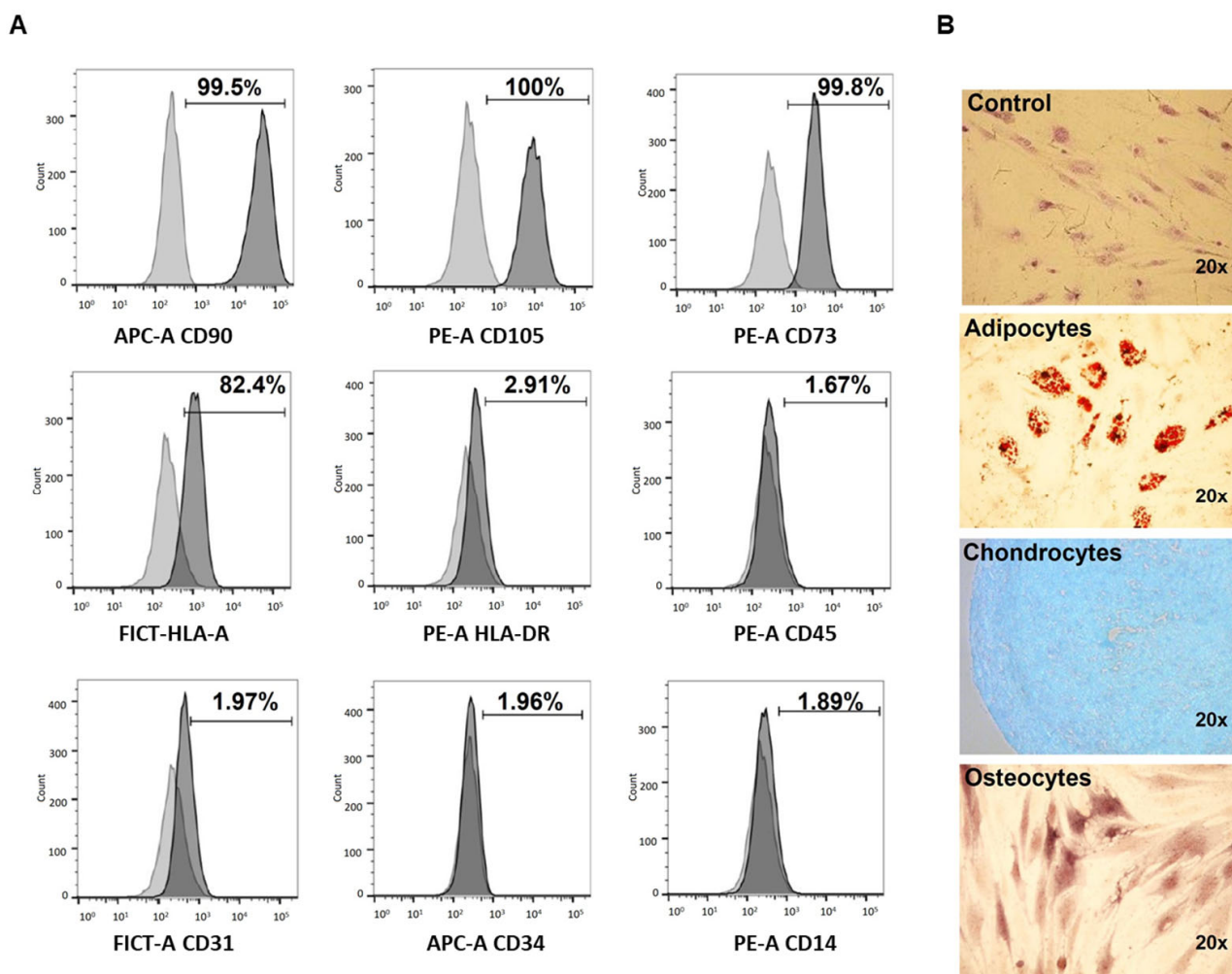


Figure 1. Characterization of human bone marrow mesenchymal stromal cell (hBM-MSC). (A) Representative histogram of immunophenotypes evaluated ($n = 3$) by flow cytometry, showing the surface markers evaluated. (B) Differentiation assay: hBM-MSC (control); adipocytes differentiated after 21 days, showing vacuoles stained with oily red; chondrocytes differentiated after 21 days, showing chondroitin sulfate staining with alician blue, and osteocytes differentiated after 28 days, showing calcium deposits stained by alizarin red.

The hBM-MSC cultures showed adherent properties with fibroblast-like morphology (control), and they showed differentiation to the three basic lineages: adipocytes that were identified by the formation of lipid vacuoles; chondrocytes that evidenced the for-

mation of the chondrogenic matrix and osteocytes by detecting the formation of calcium deposits (Figure 1B).

Once the identity of hBM-MSC was confirmed, we evaluated the influence of hBM-MSC-cm on the immunoregulatory properties of two breast cancer cell lines.

3.2. Effect of hBM-MSC-cm on the Expression of Immunomodulatory Genes in MDA-MB-231 and BT-474 Cells

It is known that cancer-derived cell lines produce a series of cytokines that can, in turn, modify the local immune response. Thus, to answer the question of whether hBM-MSC-cm can modulate the expression of some immunoregulatory genes, MDA-MB-231 and BT-474 cells were incubated with hBM-MSC-cm, and the expression levels of *TGF- β* , *IDO*, *IL-4*, and *IL-10* were evaluated by qRT-PCR (Figure 2). We observed a significant increase in the relative expression of the inflammatory genes *TGF- β* (7.1 ± 0.20), *IDO* (17.79 ± 0.61) and *IL-10* (2.19 ± 0.3) but not in *IL-4* (0.49 ± 1.02) in MDA-MB-231 cells incubated with hBM-MSC-cm compared to controls (fresh medium). In the case of BT-474 cells, no changes in the expression of the immunoregulatory genes were observed (Figure 2).

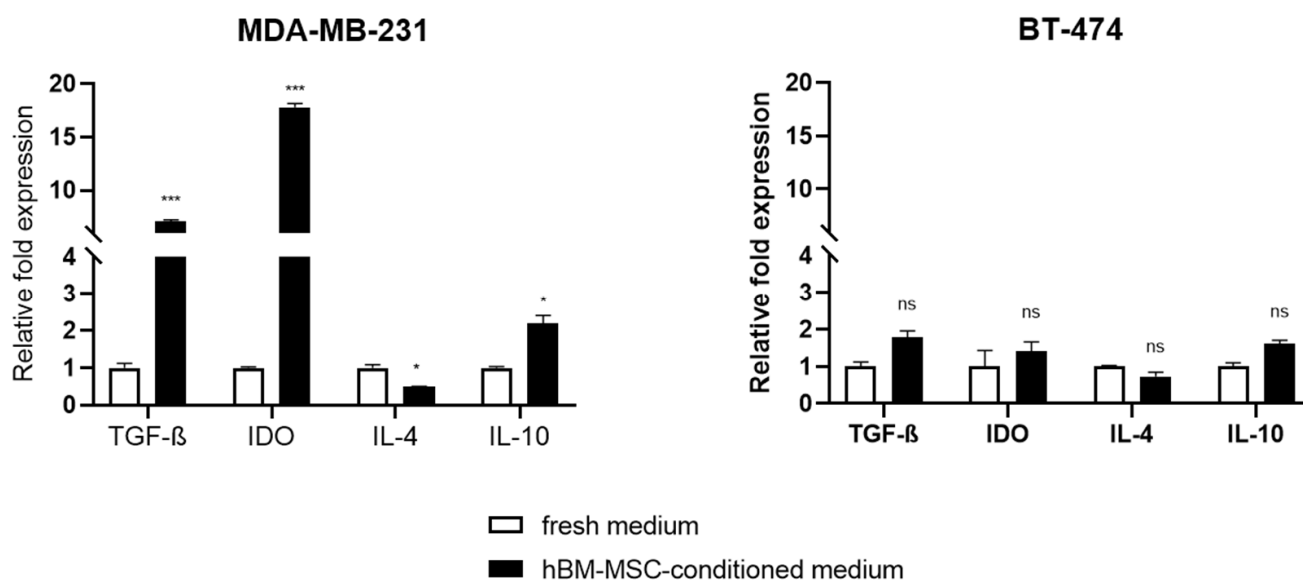


Figure 2. The hBM-MSC-cm induces the overexpression of immunomodulatory genes in MDA-MB-231 breast cancer cells. MDA-MB-231 and BT-474 cells were incubated with hBM-MSC-cm or fresh medium. After 48 h, RNA was isolated, and the expression level of *TGF- β* , *IDO*, *IL-4*, and *IL-10* was evaluated by qRT-PCR. The results are presented as the relative fold-change in expression. All values represent the average of three replicate from three independent experiments. Data are shown as mean \pm SEM; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

The modification of the expression levels of these genes induced by the hBM-MSC-cm suggests that MDA-MB-231 cells may possess a greater immunosuppressive capacity relative to BT-474 cells. Although both cell lines are derived from breast cancer, the effect exerted by the hBM-MSC-cm on each cancer cell line differed.

3.3. Proliferation Analysis of Mononuclear Cells Derived from Peripheral Blood as a Result in Co-Culture with Breast Cancer Cells Lines and hBM-MSC-cm

To analyze the effects of hBM-MSC-cm on the immunoregulatory capacity of tumor cells (MDA-MB-231 and BT-474), co-culture assays with MNCs-derived peripheral blood previously stained with CFSE and activated with phytohemagglutinin were performed. Then, the proliferation of MNCs (lymphocytes/ $CD3^+$) was evaluated. As is observed in Figure 3, in MDA-MB-231 cells, a marked decrease in the proliferation of MNCs was observed in two of the groups analyzed: (1) MNCs plus MDA-MB-23 cells and (2) MNCs

plus MDA-MB-231 cells plus hBM-MSC-cm, even in the last group, we observed a strong decrease in the proliferation rate of MNCs. However, the hBM-MSC-cm did not show a proliferative effect on MNCs alone. Conversely, BT-474 cells did not affect MNCs proliferation in the groups analyzed, which attests to the inability of BT-474 cells to regulate the proliferation of lymphocytes under these conditions. As the expression assays denoted, the hBM-MSC-cm did not influence BT-474 cells to modify the proliferation of MNCs. In addition, no changes were observed in MNCs proliferation plus hBM-MSC-cm alone. Unlike BT-474 cells, MDA-MB-231 cells showed an immunoregulatory capability on MNCs proliferation, which is amplified when the hBM-MSC-cm was present.

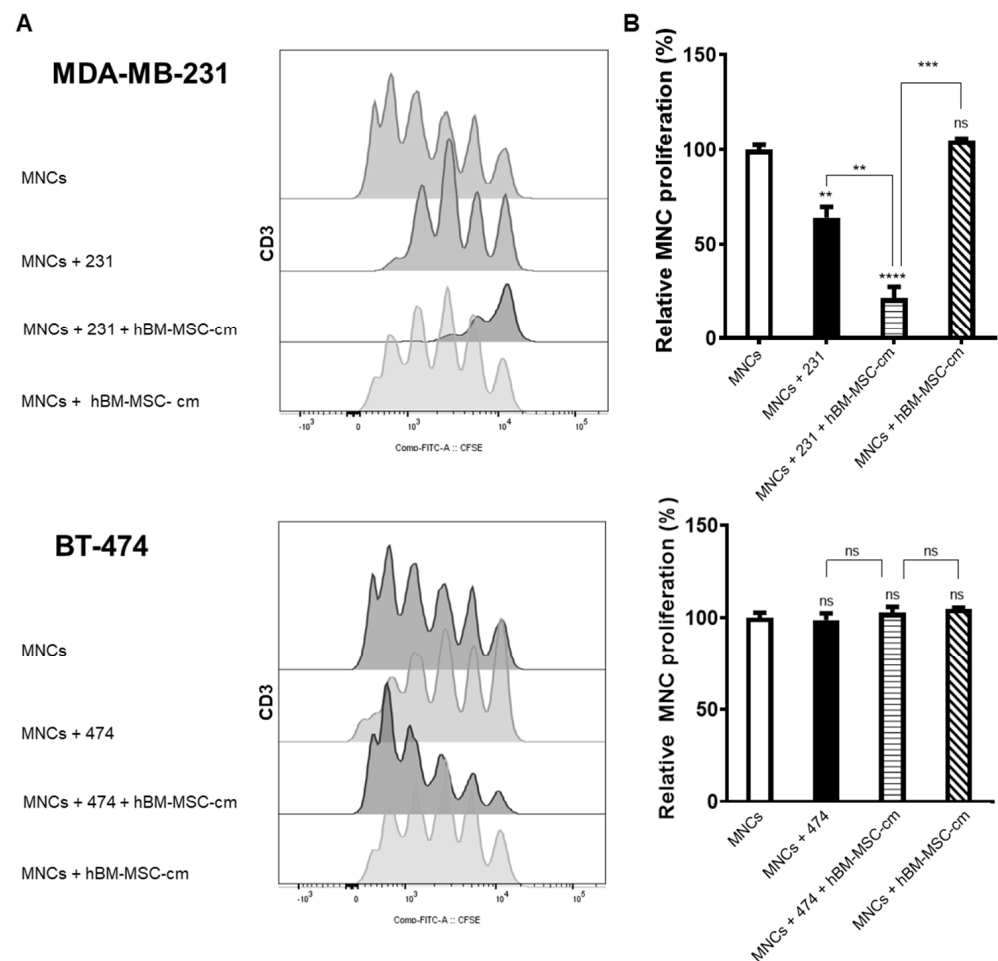


Figure 3. Immunomodulatory effect of breast cancer cells induced by hBM-MSC-cm. Mononuclear cells (MNCs) were stained with CFSE, activated with phytohemagglutinin, and co-cultured in the presence of MDA-MB-231 or BT-474, with or without hBM-MSC-cm for 6 days. The proliferation rate of activated MNCs (lymphocytes CD3⁺) was used as a positive control (100%). The figure shows (A) the histograms of a representative experiment, from three hBM-MSC-cm isolated from different donors ($n = 3$) (B) the graphs show the relative proliferation of MNCs (lymphocytes CD3⁺) from three independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.4. Evaluation of Candidate Molecules Involved in the Regulation of MNCs Proliferation

To determine which molecules may be involved in inhibiting MNCs proliferation, the supernatant of the same groups assayed in Figure 3 were collected, and TNF, IL-4, IL-10 and TGF- β were quantified (Figure 4A).

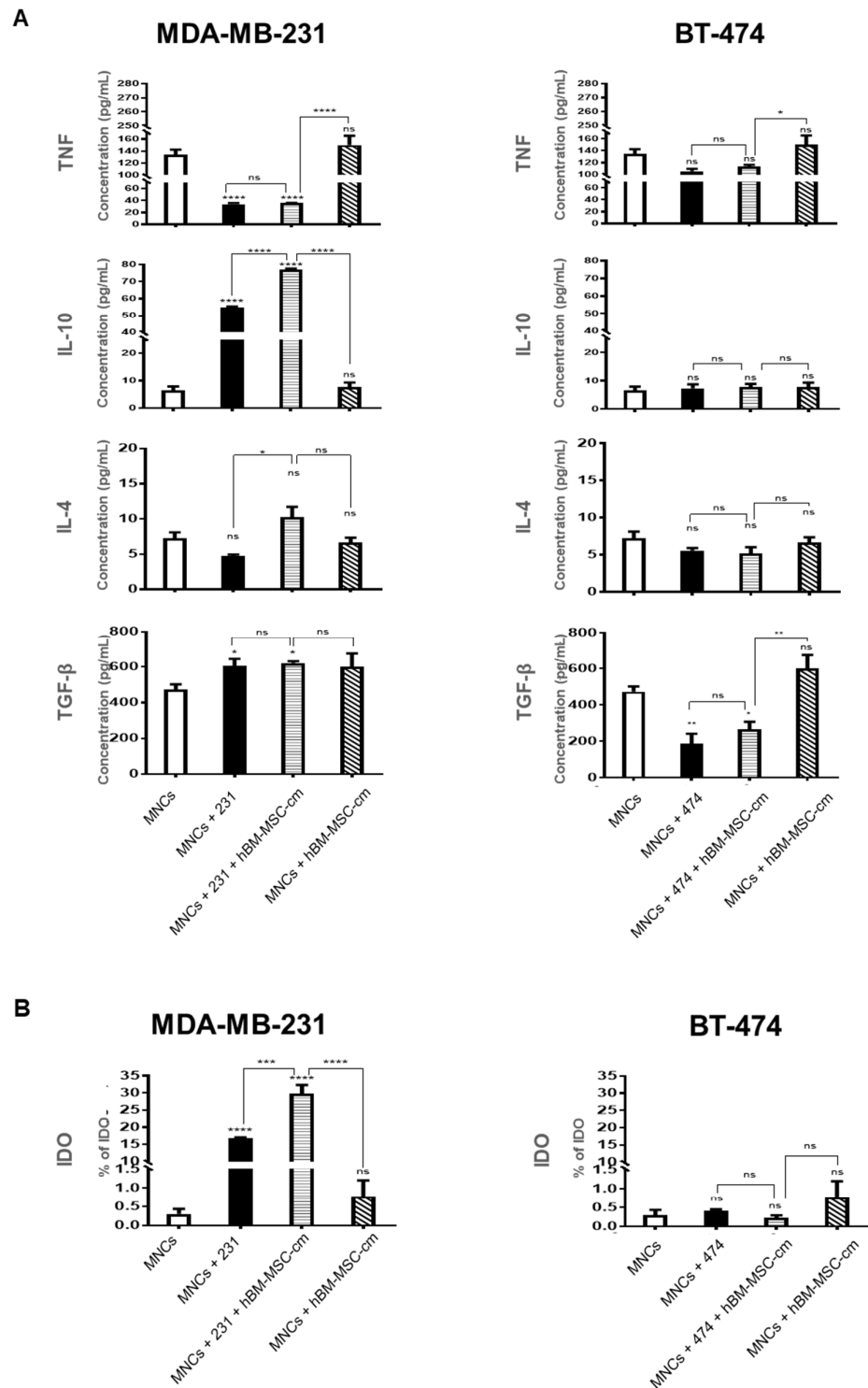


Figure 4. Quantification of cytokines and *IDO*. MNCs were activated with phytohemagglutinin and co-cultured for 6 days in the presence of MDA-MB-231 or BT-474, with or without hBM-MSC-cm ($n = 3$). (A) TNF, IL-4, IL-10, and TGF- β levels were quantified in the supernatants using cytometric bead array. The concentration of cytokines detected in the supernatant of activated MNCs ($n = 3$) was considered a basal concentration. (B) *IDO* was quantified as intracellular percentage in MDA-MB-231 and BT-474 cells by flow cytometry from three independent experiments. Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

In MDA-MB-231 cells, TNF levels decreased in the following groups: (1) MNCs plus MDA-MB-231 cells and (2) MNCs plus MDA-MB-231 cells plus hBM-MSC-cm. However, TNF levels did not change significantly in the MNCs plus hBM-MSC-cm group. Contrary to TNF, the expression of *IL-10* increased in the following groups: (1) MNCs plus MDA-MB-231 cells and (2) MNCs plus MDA-MB-231 cells plus hBM-MSC-cm, with a substantial increase in the latter group. On the other hand, no significant changes in *IL-10* expression were found in the group with the presence of MNCs plus hBM-MSC-cm compared to the control. In addition, no significant changes in *IL-4* expression levels were found in any of the groups.

In MDA-MB-231 cells, the *TGF- β* levels were significantly increased in the groups: (1) MNCs plus MDA-MB-231 cells; (2) MNCs plus MDA-MB-231 cells plus hBM-MSC-cm and (3) the MNCs plus hBM-MSC-cm. However, no differences were observed among these three groups. The lower rate of MNCs proliferation in the presence of MDA-MB-231 cells could be explained by the decreased levels of the pro-inflammatory cytokine TNF and increased levels of the anti-inflammatory cytokine *IL-10* and *TGF- β* .

With respect to experiments using BT-474 cells, TNF levels did not change significantly in the following groups: (1) MNCs plus BT-474 cells and (2) MNCs plus BT-474 cells plus hBM-MSC-cm and (3) MNCs plus hBM-MSC-cm. Similarly, Figure 4A shows the concentration levels of *IL-10* and *IL-4*. Although the concentration levels of these cytokines differ, this pair of molecules present a similar tendency. However, when each group was analyzed, no statistically significant changes were found.

TGF- β analysis showed a significant decrease in the groups: (1) MNCs plus BT-474 cells and (2) MNCs plus BT-474 cells plus hBM-MSC-cm, but without difference between these two groups. On the other hand, no statistically significant difference was found in MNCs plus hBM-MSC-cm group in comparison with the control group.

3.5. hBM-MSC-cm Differentially Induces IDO Expression on MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line

To evaluate the effect of hBM-MSC-cm on the ability of cancer cells (MDA-MB-231 and BT-474) to produce immunosuppressive molecules in co-culture with MNCs, we quantified the expression of *IDO* intracellular in tumor cells by Flow cytometry (Figure 4B). The *IDO* protein levels were increased in MDA-MB-231 cells in the groups: (1) MNCs plus MDA-MB-231 cells, and (2) MNCs plus MDA-MB-231 cells plus hBM-MSC-cm. However, it is very striking that this last group has a higher expression of *IDO*. This fact confirms that the hBM-MSC-cm can exert a synergistic effect on the immunoregulatory properties of MDA-MB-231 cells possibly by significantly increasing *IDO* levels. In contrast, none of the co-culture groups analyzed with BT-474 cells showed significant changes in *IDO* protein expression levels.

3.6. Evaluation of the Effect of hBM-MSC-cm on the Capability of MDA-MB-231 and BT-474 Breast Cancer Cells to Generate Regulatory T Lymphocytes ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$)

The influence of MSCs throughout tumor development has been associated with the establishment of an immunotolerogenic environment via the release of soluble molecules. In this sense, MSCs can promote immune cell differentiation to certain regulatory phenotypes, whose presence can facilitate tumor development, inhibiting the antitumor immune response. The gene expression profile and cytokine concentration previously described in Figures 2 and 4 showed that the immunomodulatory ability in both breast cancer cell lines could differ under the influence of hBM-MSC-cm. Therefore, we wondered whether these immunomodulatory mechanisms could involve the presence of regulatory T cells with a $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ phenotype (Figure 5). For BT-474 cells, no significant changes were found in the proportion of Treg cells in the following groups: (1) MNCs plus BT-474 cells and (2) MNCs plus BT-474 cells and hBM-MSC-cm. However, in the MNCs plus hBM-MSC-cm group, we observed an increase in the proportion of Treg cells, as expected, due to the presence of soluble factors which may be secreted by MSCs.

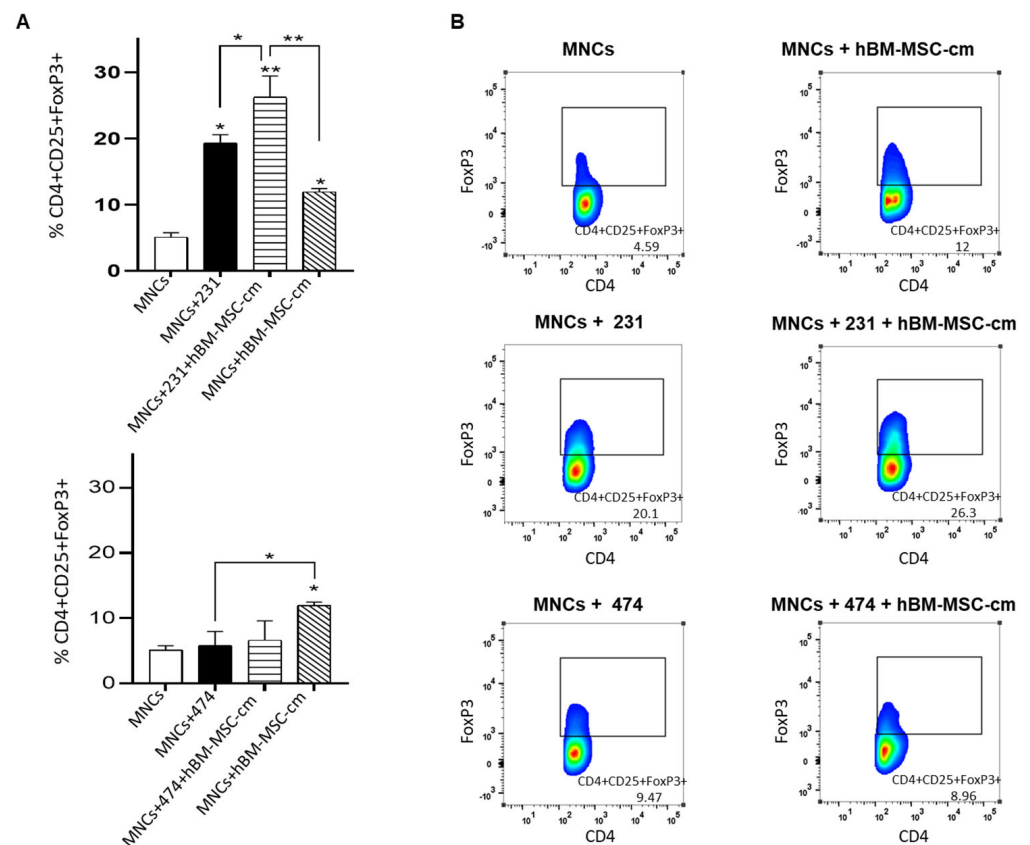


Figure 5. Capability of MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cells to generate regulatory T lymphocytes (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) under the influence of hBM-MSC-cm (*n* = 3). (A) Once MNCs activated with phytohemagglutinin and co-cultured in the presence of MDA-MB-231 or BT-474, with or without hBM-MSC-cm. The average percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells was determined by flow cytometry after 6 days of culture. The population of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ observed in the activated MNCs culture was considered as the control. (B) Plots representative of each group. The data show the mean ± SEM of the percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells from three independent experiments; * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01.

On the other hand, we observed a significantly higher proportion of Treg cells in the groups in presence of tumor cells MDA-MB-231 than those generated only in the presence of hBM-MSC-cm alone (Figure 5). However, the interaction between the hBM-MSC-cm plus MDA-MB-231 cells resulted in a significantly higher proportion of Treg cells, which did not occur with BT-474 cells. This result appears to corroborate the idea that hBM-MSC-cm could act synergistically and enhance the immunoregulatory power of MDA-MB-231 cells relative to that of BT-474 cells.

We propose a model base on our work to clarify the differential effect of hBM-MSC-cm on the immunoregulatory response of MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cells, via the secretion of soluble molecules (Figure 6). The breast cancer cell line triple-negative MDA-MB-231 exposed to hBM-MSC-cm overexpresses genes *TGF-β*, *IDO*, and *IL-10*. In immunoregulation assays of mononuclear cells (MNCs) in co-culture with MDA-MB-231 and hBM-MSC-cm, we see a reduction in lymphocyte proliferation along with increases in *IL-10* and *TGF-β* and reduced TNF levels; increases in intracellular *IDO* in MDA-MB-231 cells were also seen. Consequently, the presence of these molecules increases the proportion of regulatory T cells. In contrast, the hBM-MSC-cm does not affect the immunomodulatory capacity of luminal subtype BT-474 cells. Therefore, there is a differential immunoregulatory effect of MSCs on MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cells.

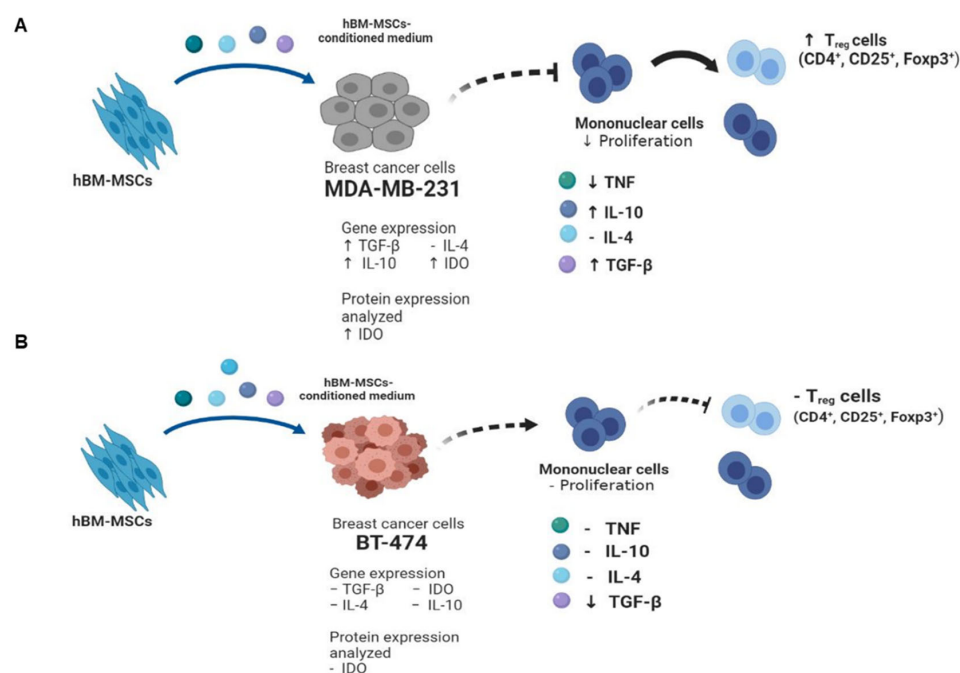


Figure 6. Proposed model of the differential effect of hBM-MSC-cm on the immunoregulatory ability of MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cells. The figure shows the possible interactions promoted by soluble factors secreted to the medium by hBM-MSC over (A) MDA-MB-231 and (B) BT-474 cells, affecting in a differential way the capability of each cell line to modulate the immune response. The MDA-MB-231 cells show a major suppressive potential relative to B-474 cells. (↑: increase; ↓: decrease; -: no modification). (Figure created with BioRender.com; December 26, 2022).

4. Discussion

In order to understand some of the possible effects of the cellular interactions that occur among different components of the tumor microenvironment, we analyzed the effect of hBM-MSC-cm on the immunomodulatory properties in vitro of two breast cancer cell lines: MDA-MB-231 and BT-474. These cell lines were carefully chosen for this work based on their clinical relevance and the subtype to which they belong. The BT-474 cells represent luminal-type breast cancer and are slow-growing. In contrast, the MDA-MB-231 cell line represents basal-type or triple-negative breast cancer, and is highly proliferative. Interestingly, triple-negative breast cancer patients have higher rates of metastasis, cell heterogeneity, and drug resistance. They have a worse prognosis and exhibit high morbidity and mortality rates [2]. Clinically, triple-negative cancer patients tend to have a recurrence within three years after primary surgery, while luminal breast cancer patients tend to have a recurrence a long time after primary surgery [35].

For this reason, as a first approach, we questioned whether through their conditioned medium, MSCs could differentially promote the expression of immunoregulatory genes such as *IDO*, *TGF- β* , *IL-4*, and *IL-10* in MDA-MB-231 and BT-474 cells lines, which may be crucial to favor the establishment of an immunotolerant state, because the overexpression of these immuno-regulatory genes correlate with a poor prognosis and, generally, are present in advanced tumor stages [36–40].

Our study found a marked overexpression of *IDO*, *TGF- β* and *IL-10* in MDA-MB-231 cells in the presence of hBM-MSC-cm, which could enhance the immunoregulatory capability due to the powerful suppressive effect of these gene products, as described in previous studies [41,42]. In fact, these molecules can induce the protection of tumor cells through the generation of Treg cells [43]. In BT-474 cells, low expression levels of these genes were found. In the case of *IDO*, its low expression in these cells has been related to the presence of estrogen receptors, which could induce hypermethylation of the *IDO* gene promoter [44].

The tumor microenvironment is characterized by the promotion of generalized dysfunction in T cells and, through some mechanisms can block their activation and function [45]. Therefore, we quantified the proliferation of MNCs (lymphocytes CD3⁺) as an effect established by the interaction that occurs between soluble factors present in the hBM-MS-CM and both cancer cells. The results showed that BT-474 cells were unable to inhibit MNCs proliferation, whereas MDA-MB-231 cells had a powerful immunosuppressive effect, which may be associated with the observed expression of *TGF-β*, *IDO*, and *IL-10*.

Interestingly, it was observed that the hBM-MS-CM added to the MDA-MB-231 cells (but not on BT-474) synergistically favored their immunomodulatory capability, since we found decreased levels of proliferating MNCs (lymphocytes CD3⁺) relative to those observed in the presence of MDA-MB-231 alone. Similarly, the proliferation values of MNCs using hBM-MS-CM alone did not change significantly, possibly due to the lack of cell-cell contact (MNCs-MSCs), as previously reported [46,47].

Due to the decrease in the proportion of proliferating MNCs (lymphocytes CD3⁺) in some of the co-cultures with tumor cells plus hBM-MS-CM, we decided to assess the levels of some cytokines present in the supernatants of the groups studied, because the balance between pro-inflammatory (e.g., TNF) and anti-inflammatory (e.g., *IL-4*, *IL-10*, and *TGF-β*) cytokines is key to controlling the regulation of the immune response [48]. This decrease in MNCs proliferation may be associated with the presence of Th2-type immunosuppressive cytokines, such as *IL-4*, *IL-10* and *TGF-β*, which are mainly responsible for immunosuppression in different types of cancer [49]. As our results showed, MDA-MB-231 cells have an intrinsic capacity to decrease the proliferation of MNCs, decrease TNF levels, and increase *IL-10*, and *TGF-β* levels and some of these effects were enhanced by hBM-MS-CM presence. The result is relevant, given that the overexpression of *IL-10* and *TGF-β* in cancer are key cytokines in the generation of an immunotolerant status, which affects the proliferation of T cells and avoids the maintenance of antitumor function [41,43,50,51]. On the other hand, in BT-474 cells, no evidence of a proliferative effect in MNCs was found; likewise, no significant changes were found in the concentrations of TNF, *IL-4*, and *IL-10* but curiously, we observed a decrease in *TGF-β* levels.

We also analyzed *IDO*-protein expression in tumor cells (MDA-MB-231 and BT-474), since *IDO* is considered a major contributor to tumor-induced immune suppression and a negative regulator of the immune system modulating T cell proliferation and immune tolerance associated with regulatory FoxP3⁺ T-cells in breast cancer [52]. The result observed in our work is interesting because the overexpression of *IDO* has been associated with aggressive tumors such as triple negative. At the same time, *IDO* is related to the expression of other immune response genes such as *IL-10* [53].

As MSCs, tumor cells have the ability to promote the generation of Treg cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) through mechanisms that may or may not involve cellular contact between T lymphocytes and tumor cells or MSCs [22,41,54,55]. For this reason, we evaluated Treg cell populations in all experimental groups, MDA-MB-231 cells were found to have an intrinsic capacity to increase the proportion of Treg cells, which is enhanced by the presence of the hBM-MS-CM, this could indicate a major immunosuppressive power of MDA-MB-231 cells in a tumoral context, comparing BT-474 cells, whose Treg cells levels did not change significantly.

Some reports indicated that basal or triple-negative tumor subtypes are surrounded by an inflammatory environment [22] in which MSCs may co-exist [56]. However, identifying the cells responsible for the overexpression of inflammatory mediator molecules has proved challenging [57]. In this context, our results could suggest that immunosuppressive molecules are produced by MDA-MB-231, and are possibly assisted by MSCs via soluble molecules.

In the tumor microenvironment where MSC are educated, Seppehr et al. described the major immunomodulatory potential of the conditioned medium of MSCs derived from breast tumors, versus the conditioned medium of MSCs derived from normal breast adipose tissue; these differences depend on the pathological or physiological context from

which they were isolated. Interestingly, the hBM-MS-CM used in our work did not promote an inhibitory effect on proliferation lymphocyte levels, as Sepehr et al. previously reported [32]. Despite that the hBM-MS-CM used in our experiments were not educated in a tumor environment, we did observe that the soluble agents secreted by hBM-MS-CM influence the immunoregulatory properties of MDA-MB-231 cells. Thus, it is important to study the immunoregulatory mechanisms that MSCs can influence in cancer, especially MSCs that are recruited from bone marrow to the tumor microenvironment because malignant cells mainly metastasize into bone tissue in advanced breast cancer [2,58,59]. Although several studies have described the immunosuppressive properties of MSCs, their capability to secrete a cocktail of proteins that modulate the immune response *in vitro* may be questionable because this protein profile could be modified by the culture conditions or even by donor inherent factors [60]. Thus, the study of molecules secreted by the MSCs could be decisive in the immunomodulatory response of the tumor microenvironment and remains an enormous challenge.

Based on the results obtained in this work, we propose a model that suggests a differential effect in the immunoregulatory properties of MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cell lines, interacting with hBM-MS-CM through soluble factors present in their conditioned medium.

However, it is necessary that future studies consider the other immunoregulatory mechanisms that different breast cancer cells may have under the influence of normal-MS-CMs and tumor-MS-CMs, either by paracrine signaling or cellular contact and determine whether the participation of MSCs inside the tumor microenvironment is key to the aggressive behavior in breast cancer. Likewise, it is necessary to elucidate in detail, the signaling pathways involved in the immunoregulatory effects observed.

In conclusion, our results demonstrated that hBM-MS-CM may induce a differential effect on the immunoregulatory properties of MDA-MB-231 cells, but not BT-474 cells. Finally, understanding the immune response in the tumor context using a broader panel of tumor cell lines and clinical samples could help to correlate the breast cancer subtype with a possible immune response, which would be advantageous to design new therapeutic strategies.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.A.-L., S.H.-G. and B.C., Literature, V.M.A.-L. and J.R.N.-B., Investigation, V.M.A.-L. and J.R.N.-B., Methodology, V.M.A.-L., V.A.C.-M., J.P.-I., J.R.N.-B. and J.J.M., Data, V.M.A.-L. and V.A.C.-M., Formal analysis, V.M.A.-L., J.J.M. and J.P.-I., Validation, J.J.M., V.M.A.-L. and V.A.C.-M., Interpretation of data, J.J.M., V.M.A.-L., V.A.C.-M. and S.H.-G., Writing Original Draft, V.M.A.-L. and S.H.-G., Resources, B.C., S.H.-G. and J.J.M. Supervision, B.C. and S.H.-G., Project administration, S.H.-G. and B.C., Review and Editing, B.C., J.J.M. and S.H.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Health Research and Ethics Committee of the Mexican Social Security Institute (IMSS No. R2014360224) and the Institutional Ethics Committee of Faculty of Health Sciences, Panamerican University (Protocol No. E1810-December 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data supporting reported results can be found in the Molecular Biology Laboratory, Donatello 59 Cd de Mexico 03920, Panamerican University, Mexico.

Acknowledgments: Víctor M Arenas-Luna is a doctoral recipient of fellowship from CONACyT (Number 289169). This work was partially supported by Fondo de Investigación No. 1010017 of Universidad Panamericana, Campus Mexico City and Escuela de Medicina Universidad Panamericana. Authors thank the Flow Cytometry core facility from “Coordinación e Investigación en Salud” at “Centro Médico Nacional, Siglo XXI” of IMSS for instrumentation.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Harbeck, N.; Penault-Llorca, F.; Cortes, J.; Gnant, M.; Houssami, N.; Poortmans, P.; Ruddy, K.; Tsang, J.; Cardoso, F. Breast Cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 1–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Waks, A.G.; Winer, E.P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2019**, *321*, 288–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zubair, M.; Wang, S.; Ali, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, 632079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dai, X.; Li, T.; Bai, Z.; Yang, Y.; Liu, X.; Zhan, J.; Shi, B. Breast Cancer Intrinsic Subtype Classification, Clinical Use and Future Trends. *Am. J. Cancer. Res.* **2015**, *5*, 2929–2943. [[PubMed](#)]
6. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2019–2020. Atlanta. 2019. Available online: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf> (accessed on 8 December 2022).
7. Noh, J.; Yu, J.; Kim, W.; Park, A.; Park, K.S. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Migrate toward Hormone-Insensitive Prostate Tumor Cells Expressing TGF- β via N-Cadherin. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1572. [[CrossRef](#)]
8. Kidd, S.; Spaeth, E.; Dembinski, J.L.; Dietrich, M.; Watson, K.; Klopp, A.; Battula, V.L.; Weil, M.; Andreeff, M.; Marini, F.C. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using in Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2614–2623. [[CrossRef](#)]
9. Ye, H.; Cheng, J.; Tang, Y.; Liu, Z.; Xu, C.; Liu, Y.; Sun, Y. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Produced TGF β Contributes to Progression and Metastasis of Prostate Cancer. *Cancer Investig.* **2012**, *30*, 513–518. [[CrossRef](#)]
10. Matsumoto, K.; Umitsu, M.; De Silva, D.M.; Roy, A.; Bottaro, D.P. Hepatocyte Growth Factor/MET in Cancer Progression and Biomarker Discovery. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 296–307. [[CrossRef](#)]
11. Farooqi, A.A.; Siddik, Z.H. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) Signalling in Cancer: Rapidly Emerging Signalling Landscape. *Cell Biochem. Funct.* **2015**, *33*, 257–265. [[CrossRef](#)]
12. Spaeth, E.; Klopp, A.; Dembinski, J.; Andreeff, M.; Marini, F. Inflammation and Tumor Microenvironments: Defining the Migratory Itinerary of Mesenchymal Stem Cells. *Gene Ther.* **2008**, *15*, 730–738. [[CrossRef](#)]
13. Wang, L.; Wang, X.; Wang, L.; Chiu, J.D.; Van De Ven, G.; Gaarde, W.A.; Deleve, L.D. Hepatic Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Recruitment of Rat Liver Sinusoidal Endothelial Cell Progenitor Cells. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 1555–1563. [[CrossRef](#)]
14. Sugihara, H.; Ishimoto, T.; Yasuda, T.; Izumi, D.; Eto, K.; Sawayama, H.; Miyake, K.; Kurashige, J.; Imamura, Y.; Hiyoshi, Y.; et al. Cancer-Associated Fibroblast-Derived CXCL12 Causes Tumor Progression in Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. *Med. Oncol.* **2015**, *32*, 618. [[CrossRef](#)]
15. Shi, Y.; Du, L.; Lin, L.; Wang, Y. Tumour-Associated Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Emerging Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *16*, 35–52. [[CrossRef](#)]
16. Direkze, N.C.; Forbes, S.J.; Brittan, M.; Hunt, T.; Jeffery, R.; Preston, S.L.; Poulson, R.; Hodivala-Dilke, K.; Alison, M.R.; Wright, N.A. Multiple Organ Engraftment by Bone-Marrow-Derived Myofibroblasts and Fibroblasts in Bone-Marrow-Transplanted Mice. *Stem Cells* **2003**, *21*, 514–520. [[CrossRef](#)]
17. AHN, S.Y. The Role of MSCs in the Tumor Microenvironment and Tumor Progression. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 3039–3047. [[CrossRef](#)]
18. Sánchez, N.; Miranda, A.; Funes, J.M.; Hevia, G.; Pérez, R.; De León, J. Oncogenic Transformation Tunes the Cross-Talk between Mesenchymal Stem Cells and T Lymphocytes. *Cell. Immunol.* **2014**, *289*, 174–184. [[CrossRef](#)]
19. O'Malley, G.; Heijltjes, M.; Houston, A.M.; Rani, S.; Ritter, T.; Egan, L.J.; Ryan, A.E. Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) and Colorectal Cancer—A Troublesome Twosome for the Anti-Tumour Immune Response? *Oncotarget* **2016**, *7*, 60752–60774. [[CrossRef](#)]
20. Weiss, A.R.R.; Dahlke, M.H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1191. [[CrossRef](#)]
21. Patel, S.A.; Meyer, J.R.; Greco, S.J.; Corcoran, K.E.; Bryan, M.; Rameshwar, P. Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells through Regulatory T Cells: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived TGF- β . *J. Immunol.* **2010**, *184*, 5885–5894. [[CrossRef](#)]
22. Razmkhah, M.; Jaberipour, M.; Erfani, N.; Habibagahi, M.; Talei, A.-R.; Ghaderi, A. Adipose Derived Stem Cells (ASCs) Isolated from Breast Cancer Tissue Express *IL-4*, *IL-10* and TGF-B1 and Upregulate Expression of Regulatory Molecules on T Cells: Do They Protect Breast Cancer Cells from the Immune Response? *Cell. Immunol.* **2011**, *266*, 116–122. [[CrossRef](#)]
23. Mansour, I.; Zayed, R.A.; Said, F.; Latif, L.A. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Regulatory T Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* **2016**, *21*, 447–453. [[CrossRef](#)]
24. Kadle, R.L.; Abdou, S.A.; Villarreal-Ponce, A.P.; Soares, M.A.; Sultan, D.L.; David, J.A.; Massie, J.; Rifkin, W.J.; Rabbani, P.; Ceradini, D.J. Microenvironmental Cues Enhance Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunomodulation and Regulatory T-Cell Expansion. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193178. [[CrossRef](#)]
25. McGranahan, N.; Rosenthal, R.; Hiley, C.T.; Rowan, A.J.; Watkins, T.B.K.; Wilson, G.A.; Birkbak, N.J.; Veeriah, S.; Van Loo, P.; Herrero, J.; et al. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* **2017**, *171*, 1259–1271. [[CrossRef](#)]
26. Mittal, D.; Gubin, M.M.; Schreiber, R.D.; Smyth, M.J. New Insights into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases—Elimination, Equilibrium and Escape. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *27*, 16–25. [[CrossRef](#)]

27. Dai, X.; Cheng, H.; Bai, Z.; Li, J. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J. Cancer* **2017**, *8*, 3131. [[CrossRef](#)]
28. Yu, T.; Di, G. Role of Tumor Microenvironment in Triple-Negative Breast Cancer and Its Prognostic Significance. *Chin. J. Cancer Res.* **2017**, *29*, 237–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Soysal, S.D.; Tzankov, A.; Muenst, S.E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* **2015**, *82*, 142–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Tsuji, W.; Valentin, J.E.; Marra, K.G.; Donnenberg, A.D.; Donnenberg, V.S.; Rubin, J.P. An Animal Model of Local Breast Cancer Recurrence in the Setting of Autologous Fat Grafting for Breast Reconstruction. *Stem Cells Transl. Med.* **2018**, *7*, 125–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sepehr, K.S.; Razavi, A.; Hassan, Z.M.; Fazel, A.; Abdollahpour-Alitappeh, M.; Mossahebi-Mohammadi, M.; Yekaninejad, M.S.; Farhadhosseinabadi, B.; Hashemi, S.M. Comparative Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Breast Tumor and Normal Breast Adipose Tissue. *Cancer Immunol. Immunother.* **2020**, *69*, 1841–1854. [[CrossRef](#)]
33. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
34. De la Rosa-Ruiz, M.D.P.; Álvarez-Pérez, M.A.; Cortés-Morales, V.A.; Monroy-García, A.; Mayani, H.; Fragoso-González, G.; Caballero-Chacón, S.; Diaz, D.; Candanedo-González, F.; Montesinos, J.J. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Dental Tissues: A Comparative In Vitro Evaluation of Their Immunoregulatory Properties Against T Cells. *Cells* **2019**, *8*, 1491. [[CrossRef](#)]
35. Saphner, T.; Tormey, D.C.; Gray, R. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer after Primary Therapy. *J. Clin. Oncol.* **1996**, *14*, 2738–2746. [[CrossRef](#)]
36. Wei, L.; Zhu, S.; Li, M.; Li, F.; Wei, F.; Liu, J.; Ren, X. High Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Correlated with Microvessel Density and Worse Prognosis in Breast Cancer. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 724. [[CrossRef](#)]
37. Llanes-Fernández, L.; Álvarez-Goyanes, R.I.; Arango-Prado, M.d.C.; Alcocer-González, J.M.; Mojarrieta, J.C.; Pérez, X.E.; López, M.O.; Odio, S.F.; Camacho-Rodríguez, R.; Guerra-Yi, M.E.; et al. Relationship between *IL-10* and Tumor Markers in Breast Cancer Patients. *Breast* **2006**, *15*, 482–489. [[CrossRef](#)]
38. Zarzynska, J.M. Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 141774. [[CrossRef](#)]
39. Lewis, A.M.; Varghese, S.; Xu, H.; Alexander, H.R. Interleukin-1 and Cancer Progression: The Emerging Role of Interleukin-1 Receptor Antagonist as a Novel Therapeutic Agent in Cancer Treatment. *J. Transl. Med.* **2006**, *4*, 48. [[CrossRef](#)]
40. Massagué, J. TGF β in Cancer. *Cell* **2008**, *134*, 215–230. [[CrossRef](#)]
41. Batlle, E.; Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50*, 924–940. [[CrossRef](#)]
42. Sheikhpour, E.; Noorbakhsh, P.; Foroughi, E.; Farahnak, S.; Nasiri, R.; Neamatzadeh, H. A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *7*, 30–37.
43. Levings, M.K.; Bacchetta, R.; Schulz, U.; Roncarolo, M.G. The Role of *IL-10* and TGF-Beta in the Differentiation and Effector Function of T Regulatory Cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2002**, *129*, 263–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dewi, D.L.; Mohapatra, S.R.; Cabañes, S.B.; Adam, I.; Patterson, L.F.S.; Berdel, B.; Kahloon, M.; Thürmann, L.; Loth, S.; Heilmann, K.; et al. Suppression of Indoleamine-2,3-Dioxygenase 1 Expression by Promoter Hypermethylation in ER-Positive Breast Cancer. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1274477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Xia, A.; Zhang, Y.; Xu, J.; Yin, T.; Lu, X.-J. T Cell Dysfunction in Cancer Immunity and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Özgül Özdemir, R.B.; Özdemir, A.T.; Kirmaz, C.; Tuğlu, M.İ.; Şenol, Ö.; Özverel, C.S.; Berdeli, A. The Effects of Mesenchymal Stem Cells on the *IDO*, *HLA-G* and *PD-L1* Expression of Breast Tumor Cells MDA-MB-231 and MCF-7. *Arch. Clin. Exp. Med.* **2019**, *4*, 132–137. [[CrossRef](#)]
47. Zheng, Y.; Fang, Y.C.; Li, J. Expression Levels on Tumor Cells Affect Their Immunosuppressive Activity. *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 5399–5407. [[CrossRef](#)]
48. Qu, X.; Tang, Y.; Hua, S. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 563. [[CrossRef](#)]
49. Mirlekar, B. Tumor Promoting Roles of *IL-10*, *TGF- β* , *IL-4*, and *IL-35*: Its Implications in Cancer Immunotherapy. *SAGE Open Med.* **2022**, *10*, 205031212110690. [[CrossRef](#)]
50. Dennis, K.L.; Blatner, N.R.; Gounari, F.; Khazaie, K. Current Status of Interleukin-10 and Regulatory T-Cells in Cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2013**, *25*, 637–645. [[CrossRef](#)]
51. Fujii, S.-I.; Shimizu, K.; Shimizu, T.; Lotze, M.T. Interleukin-10 Promotes the Maintenance of Antitumor CD8(+) T-Cell Effector Function in Situ. *Blood* **2001**, *98*, 2143–2151. [[CrossRef](#)]
52. Zhai, L.; Bell, A.; Ladomersky, E.; Lauing, K.L.; Bollu, L.; Sosman, J.A.; Zhang, B.; Wu, J.D.; Miller, S.D.; Meeks, J.J.; et al. Immunosuppressive *IDO* in Cancer: Mechanisms of Action, Animal Models, and Targeting Strategies. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1185. [[CrossRef](#)]

53. Isla Larrain, M.T.; Rabassa, M.E.; Lacunza, E.; Barbera, A.; Cretón, A.; Segal-Eiras, A.; Croce, M.V. *IDO* Is Highly Expressed in Breast Cancer and Breast Cancer-Derived Circulating Microvesicles and Associated to Aggressive Types of Tumors by in Silico Analysis. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 6511–6519. [[CrossRef](#)]
54. Abumaree, M.H.; Abomaray, F.M.; Alshabibi, M.A.; AlAskar, A.S.; Kalionis, B. Immunomodulatory Properties of Human Placental Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Placenta* **2017**, *59*, 87–95. [[CrossRef](#)]
55. Yuan, X.L.; Chen, L.; Zhang, T.T.; Ma, Y.H.; Zhou, Y.L.; Zhao, Y.; Wang, W.W.; Dong, P.; Yu, L.; Zhang, Y.Y.; et al. Gastric Cancer Cells Induce Human CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells through the Production of TGF-B1. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 2019. [[CrossRef](#)]
56. Prat, A.; Parker, J.S.; Karginova, O.; Fan, C.; Livasy, C.; Herschkowitz, J.I.; He, X.; Perou, C.M. Phenotypic and Molecular Characterization of the Claudin-Low Intrinsic Subtype of Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, 1–18. [[CrossRef](#)]
57. Casbas-Hernandez, P.; Sun, X.; Roman-Perez, E.; D’Arcy, M.; Sandhu, R.; Hishida, A.; McNaughton, K.K.; Yang, X.R.; Makowski, L.; Sherman, M.E.; et al. Tumor Intrinsic Subtype Is Reflected in Cancer-Adjacent Tissue. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2015**, *24*, 406–414. [[CrossRef](#)]
58. Coleman, R.E. Clinical Features of Metastatic Bone Disease and Risk of Skeletal Morbidity. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12 Pt 2*, 6243–6249. [[CrossRef](#)]
59. Hess, K.R.; Varadhachary, G.R.; Taylor, S.H.; Wei, W.; Raber, M.N.; Lenzi, R.; Abbruzzese, J.L. Metastatic Patterns in Adenocarcinoma. *Cancer* **2006**, *106*, 1624–1633. [[CrossRef](#)]
60. Czapla, J.; Matuszczak, S.; Kulik, K.; Wiśniewska, E.; Pilny, E.; Jarosz-Biej, M.; Smolarczyk, R.; Sirek, T.; Zembala, M.O.; Zembala, M.; et al. The Effect of Culture Media on Large-Scale Expansion and Characteristic of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 235. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.