



SOCIEDAD MEXICANA DE ONCOLOGÍA, A.C.

GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA

www.gamo-smeo.com



ARTÍCULO ORIGINAL

La interleucina 6 induce transición epitelio-mesénquima en células de cáncer de mama

Juan Francisco Alvarado-Muñoz^{1,#}, José Esparza-López^{2,4,#}, Elizabeth Escobar-Arriaga³, Eliseo Neftali De la Cruz-Escobar¹, Eucario León-Rodríguez¹ y María de Jesús Ibarra-Sánchez^{2,4,*}

¹Departamento de Hematología y Oncología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; ²Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; ³Centro Oncológico, Hospital Ángeles del Pedregal; ⁴Red de Apoyo a la Investigación, Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México-Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, México

Recibido el 25 de octubre de 2016; aceptado el 25 de febrero de 2017
 Disponible en Internet el 4 de agosto de 2017

PALABRAS CLAVE

Cáncer de mama;
 Interleucina 6;
 Transición epitelio-
 mesénquima

Resumen Antecedentes: El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en México. La mayoría de las muertes se relacionan con la forma de presentación de la enfermedad como localmente avanzada o metastásica. La transición epitelio-mesénquima (TEM) es uno de los pasos indispensables para la metástasis. Diversos factores desencadenan la TEM, entre los que destacan el factor de crecimiento transformante beta, el factor de crecimiento epidérmico y la interleucina 6 (IL-6), entre otros. La TEM se caracteriza por la pérdida de la expresión de E-cadherina y la expresión de N-cadherina y vimentina. En este estudio investigamos el papel de la IL-6 sobre la inducción de TEM. **Método:** Se utilizaron los cultivos primarios MBCDF y MBCD17. Se midió la expresión de E-cadherina mediante *Western blot*. Se estimularon las células con IL-6 para inducir la TEM. Se midió la activación de STAT3 mediante anticuerpos fosfoespecíficos y la expresión de E-cadherina como marcador de TEM. **Resultados:** La estimulación con IL-6 de los cultivos primarios MBCDF y MBCD17 indujo la fosforilación de STAT3-Tyr705 sin alteración de sus valores totales; además, se demostró que la estimulación con IL-6 en las células induce una TEM evidenciada por la pérdida de E-cadherina. **Conclusiones:** Los resultados del presente trabajo sugieren que la IL-6 induce TEM en cultivos primarios de cáncer de mama a través de la fosforilación de STAT3. (creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

*E-mail para correspondencia: mibarra.innsz@gmail.com (M.J. Ibarra-Sánchez) #Los autores contribuyeron por igual a este trabajo.

doi:10.24875/GAMO.17000044

1665-9201 / © 2017 Sociedad Mexicana de Oncología. Publicado por Permanyer México. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama representa globalmente el 25% de todas neoplasias malignas en las mujeres, situándose como la más frecuente en este grupo. En México representa desde el año 2006 la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres^{1,2}. En 2012 se reportó un incremento en la incidencia de cáncer de mama, siendo del 2% en 1980 y reportándose para el año 2010 un 5%². El sistema de vigilancia epidemiológica de México público en 2009 una incidencia nacional de 15 casos por 100,000 habitantes, notándose las mayores incidencias en Ciudad de México, Coahuila y Nuevo León, con 17, 18 y 14 casos por 100,000 habitantes, respectivamente, y el Estado con menor incidencia documentada fue Chiapas, con 1.5 casos por 100,000 habitantes. De los datos anteriores hay que hacer notar que en México no existe un registro nacional de cáncer, por lo que lo reportado solo hace un estimado de la situación real del cáncer de mama en el país.

El estudio molecular del cáncer de mama ha permitido clasificar la enfermedad en diferentes subtipos, con el fin de traducir dicha información en terapias dirigidas y definir grupos pronósticos. En las últimas décadas, dicha clasificación ha sufrido modificaciones que representan los avances en investigación y las adaptaciones para la global interpretación de los criterios de clasificación, eliminando un valor en específico del Ki67 y agregando parámetros clínicos y marcadores moleculares multiparamétricos como principales modificaciones. Así, ahora se reconocen como subtipos los luminales, caracterizados por la expresión de receptores hormonales y la no expresión de HER2; estos se subdividen en el tipo luminal A, como aquellos tumores en los que el análisis de inmunohistoquímica evidencia una alta expresión del receptor de estrógenos y del receptor de progesterona, una determinación claramente baja del Ki67, y tumores clasificados por tamaño como T1 y T2 y una afección de ninguno a tres ganglios linfáticos. Si se dispone de acceso a una determinación de marcadores moleculares multiparamétricos (Oncotype DX®, MammaPrint®), el resultado debe ser una valoración de riesgo favorable. Este subtipo representa el 40% de los cánceres de mama y se relaciona con un pronóstico favorable. El subtipo luminal B lo caracteriza la baja expresión de receptores hormonales, un Ki67 claramente alto, la afección nodal mayor de tres ganglios, un grado histológico 3 (tumor poco diferenciado), invasión linfática vascular extensa y tumores voluminosos (T3); estos representan el 20% de los cánceres de mama y se relacionan con un riesgo de muerte de 1.96 (intervalo de confianza del 95% [IC 95%]: 1.08-3.54). La sobreexpresión de HER2 (25% de los tumores) o la ausencia de expresión del receptor de estrógenos, del receptor de progesterona y de HER2 se define como «triple negativo» (15-20% de los cánceres de mama). Ambos grupos se consideran de mal pronóstico, con un riesgo de muerte de 7.39 (IC 95%: 1.72-31.77) y 12.41 (IC 95%: 5.82-26.49), respectivamente. Cabe destacar que en las mujeres menores de 40 años con cáncer de mama los factores que más influyen negativamente en la supervivencia global son la infiltración ganglionar o ser del subtipo molecular triple negativo^{3,4}. La introducción de agentes dirigidos a blancos moleculares específicos, como el receptor de crecimiento epidérmico (trastuzumab, TDM-1, pertuzumab), han logrado respuestas objetivas en los tumores hasta de un 70% cuando son combinados con quimioterapia, y han mejorado la

supervivencia global. Esto solo es efectivo para un grupo seleccionado de pacientes; sin embargo, se ha visto que con el tiempo la enfermedad logra progresar y adquirir la capacidad de generar metástasis en otros sitios⁵.

Uno de los primeros eventos en la diseminación de las células tumorales es la pérdida de la mayoría de las características epiteliales, a través de cambios drásticos en el citoesqueleto. Esta serie de eventos se conoce como transición epitelio-mesénquima (TEM), un proceso en el que las células epiteliales sufren cambios bioquímicos para transformarse en células mesenquimatosas, se pierden las uniones intercelulares y, por lo tanto, se vuelven alargadas y no polarizadas, lo que les permite moverse a través de la matriz extracelular, con lo cual generan un nuevo tejido con una polaridad diferente al epitelio que le dio origen^{6,7}. La TEM no es un proceso exclusivo de las células tumorales; se ha descrito en tres diferentes escenarios biológicos: la TEM tipo 1 participa en la implantación del embrión, la embriogénesis y la organogénesis; la TEM tipo 2 se asocia a la cicatrización de heridas, la regeneración tisular y la fibrosis en órganos como el riñón; y la TEM tipo 3 es la que se encuentra implicada en la tumorigénesis, explicando la progresión de un carcinoma *in situ* a uno invasor⁸, y también se ha asociado con la resistencia a la apoptosis y a fármacos de quimioterapia⁹. El papel de la TEM en el cáncer ya está bien establecido, y se asume que es un componente indispensable para la metástasis¹⁰. Una vez que las células tumorales alcanzan el sitio de metástasis distante, retoman el fenotipo de tumor primario a través de un proceso llamado transición mesénquima-epitelio. Por lo tanto, los pasos de la TEM parecen ser reversibles, indicando la existencia de componentes dinámicos en la progresión tumoral¹¹.

Se han descrito diversos marcadores implicados en la TEM. Uno de los más estudiados es la disminución de la expresión de E-cadherina, proteína involucrada en las uniones célula-célula, la cual baja sus valores al mínimo, con un intercambio por N-cadherina. Existen otros marcadores que son regulados positivamente en la TEM, como son la vimentina, la fibronectina y la actina de músculo liso, y factores de transcripción como Snail, Twist, Slug y ZEB, además de factores de crecimiento como el factor derivado de plaquetas¹²⁻¹⁵. Otras moléculas de adhesión célula-célula, como las claudinas 3, 4 y 7, la α -catenina, la γ -catenina y las ocludinas, son reguladas negativamente en células con fenotipo mesenquimatoso^{13,15}. La TEM es un proceso dinámico y es activado por diversos estímulos del microambiente tumoral que incluyen factores de crecimiento, interacciones célula-tumoral-estroma e hipoxia¹⁶. Dentro de las señales que activan la TEM se encuentran factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , *transforming growth factor-beta*), el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF, *hepatocyte growth factor*), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, *insulin growth factor*) 1 y 2, y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*)¹⁷.

En los últimos años se ha empezado a tomar en cuenta la influencia del microambiente tumoral en el desarrollo y el comportamiento de los tumores. Se ha visto que existen citocinas y factores de crecimiento secretados por las células que rodean al tumor como agentes cruciales en los procesos biológicos de proliferación, migración, invasividad y metás-

tasis de las células tumorales. Debido a esto se han explorado biomarcadores sistémicos y del microambiente tumoral, que están relacionados con la respuesta inmunitaria innata y adquirida, los cuales han mostrado tener un papel importante en la respuesta antitumoral¹⁸. El microambiente tumoral está conformado por diversos tipos celulares, que incluyen fibroblastos asociados al tumor, células neuroendocrinas, adipocitos, células inflamatorias del sistema inmunitario, células endoteliales y células de la cadena linfática¹⁹. Todas estas estirpes celulares contribuyen al desarrollo del tumor secretando factores de crecimiento, metaloproteinasas y citocinas que son necesarios para el desarrollo del tumor^{20,21}.

Una de las citocinas que ha sido implicada en la progresión tumoral es la interleucina 6 (IL-6), una citocina pleiotrópica producida por las células hematopoyéticas y las células epiteliales. Desde su identificación en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares, se describió su papel en funciones biológicas como la diferenciación de los linfocitos B y la proliferación de los linfocitos T^{22,23}. En los cánceres de mama, riñón, próstata y mieloma múltiple se ha correlacionado con mal pronóstico y agresividad tumoral. Estudios recientes sitúan a la IL-6 como un regulador positivo del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*)^{24,25}. Se ha encontrado que los valores de IL-6 circulante en las pacientes con cáncer de mama son 10 veces mayores que en las mujeres sanas, existiendo una correlación entre los valores más altos de IL-6 y los estadios más avanzados del cáncer de mama^{24,26}. El estudio de la IL-6 en células de cáncer de mama *in vitro* ha arrojado resultados controversiales; por una parte, se ha demostrado su implicación en la resistencia a la doxorubicina y la promoción de la motilidad celular requerida para la metástasis^{27,28}, y por otra parte se ha visto que el tratamiento con IL-6 por 6 días a bajas dosis inhibe la proliferación *in vitro* por vía de la activación de la apoptosis por fragmentación del ADN en las células con expresión del receptor de estrógenos²⁹. La IL-6 también se ha implicado como un promotor de la TEM, induciendo la represión de la expresión de E-cadherina³⁰.

La señalización de la IL-6 se produce a través de la interacción con su receptor y la glucoproteína de unión a la membrana gp130, que se encuentra unida a las cinasas Janus (JAK) 1 y 2. Las JAK se encargan de fosforilar el dominio citoplásmico distal de la gp130, y esta fosforilación sirve para reclutar proteínas que contienen dominios SH2, como STAT3, la cual es posteriormente activada mediante la fosforilación del residuo de tirosina 705 (Tyr705)^{23,31-33}, induciendo así su dimerización. El dímero de STAT3 se transloca al núcleo, dando lugar a la transcripción de sus genes blanco. En la TEM mediada por IL-6, STAT3 induce la expresión de otros factores de transcripción como Snail, ZEB, Twist y Slug, que en común generan la represión de la E-cadherina y la transcripción de genes mesenquimales *n-cadherina*, *vimentina*, lo que genera la desintegración de las uniones celulares y la pérdida de la polaridad epitelial³⁴. Reportes recientes destacan la importancia oncogénica de la activación persistente de STAT3, proponiendo a la producción autocrina y la estimulación paracrina de IL-6 como el mecanismo de la activación constitutiva de STAT3. En el microambiente tumoral, y los frentes invasivos tumorales, se ha observado la presencia de células inflamatorias, lo que propone a IL-6 como agente tumorigénico a través de la activación de la vía de JAK/STAT^{11,35}. Lo anterior sitúa a la TEM como indis-

pensable para la generación de metástasis, observando a la vez que dicho proceso es reversible y permite a la célula tumoral retomar un fenotipo epitelial una vez alcanzado el sitio de la metástasis¹⁰.

Por otra parte, en nuestro laboratorio se encontró que el EGF induce TEM medida como la disminución de E-cadherina y la expresión de vimentina a través de la inducción del factor de transcripción Snail³⁶. Dados estos antecedentes, en el presente trabajo analizamos el efecto de la IL-6 en la inducción de TEM. Se utilizó un modelo de cultivos primarios de cáncer de mama a los cuales se indujo la TEM con IL-6, se investigó el cambio en los marcadores epiteliales (E-cadherina). Los resultados mostraron que la IL-6 induce en la TEM con la característica pérdida de E-cadherina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Se utilizaron anticuerpos primarios contra E-cadherina, tubulina, pSTAT3 (Tyr705) y STAT3 de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). La E-cadherina se obtuvo de Cell Signalling Technology (Cambridge, MA, EE.UU.). Los anticuerpos secundarios frente a ratón o conejo se adquirieron de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, EE.UU.). La IL-6 se obtuvo de PeproTech (Rocky Hill, NJ, EE.UU.).

Cultivo celular

Los cultivos celulares primarios MBCDF y MBCD17, que se derivaron a partir de una biopsia del producto de una mastectomía realizada a una paciente con cáncer de mama (protocolo aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Ref. 1549, BQO-008-06/9-1), fueron mantenidos en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, EE.UU.) a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

Estimulación celular

Se realizaron ensayos de estimulación con IL-6 para evaluar mediante *Western blot*, la fosforilación de STAT3 usando un anticuerpo fosfoespecífico contra pSTAT3 Y705 en células MBCDF y MBCD17. Para ello se sembraron 1 × 10⁶ células en platos de cultivo de 60 mm, mantenidas con medio RPMI 1640 suplementado con un 0.1% de suero fetal bovino. Las células se dejaron adherir toda la noche a 37 °C con un 5% de CO₂. Se estimuló con IL-6 1 ng/ml por los siguientes tiempos: 0, 5, 15, 30 y 60 minutos.

Para los ensayos de inducción y reversión de la TEM en células con fenotipo epitelial MBCD17 se diseñaron dos modelos experimentales; en el primero se utilizaron tiempos cortos de inducción de TEM con IL-6, de 0, 4, 8, 12 y 24 horas.

Ensayo de inmunoblot (*Western blot*)

Las células estimuladas fueron lisadas con un *buffer* de lisis que contiene HEPES 50 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, un 1% de nonidato, NaF 10 mM y 1X de inhibidores de

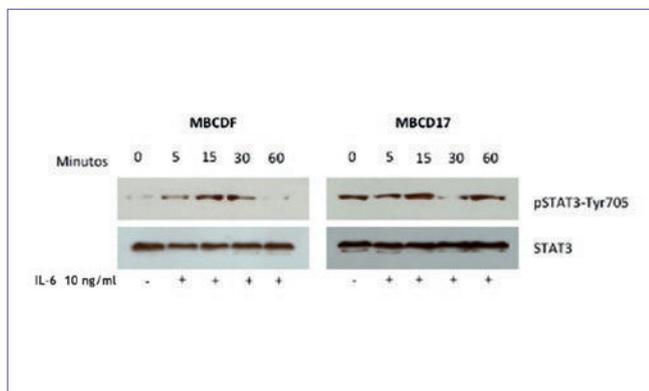


Figura 1. La IL-6 induce la fosforilación de STAT3 en células de cáncer de mama MBCDF y MBCD17. Las células fueron tratadas con 5 ng/ml de IL-6 a 0, 5, 15, 30 y 60 minutos, se realizó *Western blot* para analizar la fosforilación de STAT3 en la Tyr705, y se utilizó como control STAT3 total.

proteasas (Complete, EDTA-free, Roche). Se sometieron a electroforesis 25 μ g de proteína total en geles de poliacrilamida desnaturante y fueron transferidos a una membrana de Immobilon-P PVDF (Millipore Corp Bedford, MA, EE.UU.); estas fueron bloqueadas durante 60 minutos en leche descremada al 5% en PBS-Tween al 0.05%. Posteriormente se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios toda la noche a 4 °C en agitación. Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios contra ratón-HRP o contra conejo-HRP, según fuera el caso, por 45 minutos. La señal fue visualizada mediante quimioluminiscencia utilizando el *kit* Super Signal West Pico (Thermo, Rockford, IL, EE.UU.), y finalmente se expuso a una película radiográfica Kodak.

RESULTADOS

La interleucina 6 induce la fosforilación de STAT3 en células de cáncer de mama

Está bien establecido que la IL-6 señala a través de la activación de STAT3³¹. Para demostrar que en los cultivos primarios de cáncer de mama que utilizamos la IL-6 induce la activación de STAT3, estimulamos las células MBCDF y MBCD17 con 5 ng/ml de IL-6 por diferentes tiempos. La activación de STAT3 se midió como la fosforilación de la Tyr715 de STAT3 utilizando anticuerpos fosfoespecíficos. Los resultados demuestran que la IL-6 induce la fosforilación de STAT3. La cinética de la fosforilación en pSTAT3-Tyr705 tuvo un pico de activación en las células MBCDF entre los 15 y 30 minutos, mientras que en las células MBCD17 tuvo un pico de activación de pSTAT3-Tyr705 a los 15 minutos (Fig. 1). Estos resultados confirman que, en los cultivos, la IL-6 señala a través de la activación de STAT3.

La interleucina 6 induce la transición epitelio-mesénquima

Una vez demostrado que la IL-6 induce la fosforilación de STAT3 en células de cultivos primarios de cáncer de mama, investigamos si la estimulación con IL-6 provoca una disminu-

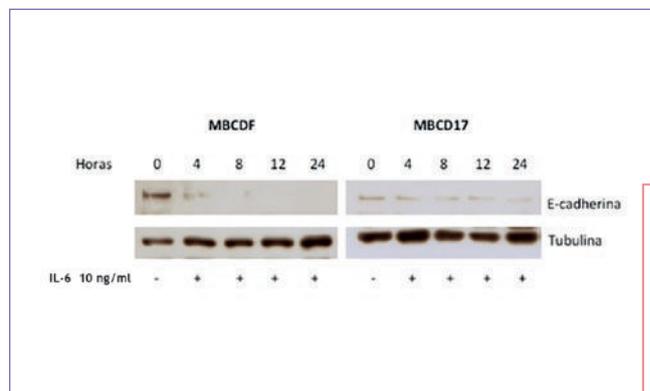


Figura 2. La IL-6 induce la pérdida de la expresión de E-cadherina en células de cáncer de mama MBCDF y MBCD17. Las células fueron tratadas con 5 ng/ml de IL-6 a 0, 4, 8, 12 y 24 horas, se realizó *Western blot* para analizar la expresión de E-cadherina (panel superior) y se utilizó un anticuerpo antitubulina como control de carga (panel inferior).

nución en la expresión de E-cadherina como marcador de TEM. Se encontró que la IL-6 induce una ligera caída en la expresión de E-cadherina a partir de las 4 horas, que se vuelve más pronunciada a partir de las 12 horas; como control de carga se utilizó un anticuerpo contra la tubulina. Estos resultados sugieren que la IL-6 induce cambios rápidos en la expresión de E-cadherina, como un marcador de que la célula tumoral entra en el proceso de TEM (Fig. 2).

DISCUSIÓN

La TEM es uno de los pasos más críticos en el desarrollo de la metástasis, y por ello la descripción de los mecanismos moleculares por los cuales se activa y el modo en que puede ser inhibida o revertida son de gran relevancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En el presente trabajo presentamos evidencia de que, en células primarias de cáncer de mama, la IL-6 induce TEM a través de la disminución de E-cadherina. Estos datos sugieren que la IL-6 es una citocina importante dentro del microambiente tumoral que participa en el proceso de metástasis en el cáncer de mama.

Una de las principales causas de muerte de las pacientes con cáncer de mama es la metástasis. En el proceso de la metástasis se incluyen diversos pasos por los que una célula transformada tiene que pasar para migrar a un sitio distante. Entre los pasos cruciales de este proceso se encuentra la TEM, que se caracteriza por la pérdida de la polaridad de la célula y la adquisición de propiedades invasivas^{9,11}. Para poder estudiar las propiedades metastásicas de una célula desarrollamos un modelo *in vitro* de TEM basado en cultivos primarios de cáncer de mama. La TEM es un proceso dinámico y es activado por diversos estímulos del microambiente tumoral que incluyen factores de crecimiento, interacciones célula tumoral-estroma e hipoxia¹⁶. Dentro de las señales que activan la TEM se encuentran factores de crecimiento, como el TGF- β , el HGF, el FGF, los IGF 1 y 2, y el EGF¹⁷. La IL-6 es una citocina inflamatoria que se ha asociado a la TEM^{30,37}. En nuestro modelo de cultivos primarios de cáncer de mama, estimulamos con IL-6 células con marcadores epiteliales (MBCDF y MBCD17) tratando de inducir TEM, y demostramos que la IL-6 induce una disminución de la ex-

presión de E-cadherina, en horas, a través de la vía de fosforilación de STAT3. Estos resultados demuestran que, en nuestro modelo *in vitro* de cultivos primarios de cáncer de mama, el tratamiento con IL-6 es capaz de inducir la TEM, como lo demuestra la pérdida de la expresión de E-cadherina.

CONCLUSIONES

En resumen, nuestro trabajo demuestra que la IL-6 es un potente inductor de la TEM a través de la activación de STAT3 en cultivos de primarios de cáncer de mama. Las implicaciones de esto sugieren que la presencia de IL-6 en el microambiente tumoral confiere un alto potencial metastásico. Estos datos apoyan el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para el cáncer de mama, como podría ser la inhibición de la IL-6 como un abordaje atractivo para interferir con la TEM.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359-86.
2. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2011;378:1461-84.
3. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*. 2015;26:1533-46.
4. Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G, et al. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21:1848-55.
5. Hortobagyi GN. Developments in chemotherapy of breast cancer. *Cancer*. 2000;88:3073-9.
6. Nantajit D, Lin D, Li JJ. The network of epithelial-mesenchymal transition: potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141:1697-713.
7. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:131-42.
8. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420-8.
9. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15:117-134.
10. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006;66:8319-26.
11. Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*. 2007;213:374-83.
12. Sethi S, Macoska J, Chen W, et al. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. *Am J Trans Res*. 2010;3:90-9.
13. Gurzu S, Turdean S, Kovacs A, et al. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: an update. *World J Clin Cases*. 2015;3:393-404.
14. Wu ZQ, Li XY, Hu CY, et al. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic breast cancer 1, early onset (BRCA1) repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:16654-9.
15. Rito M, Schmitt F, Pinto AE, et al. Fibromatosis-like metaplastic carcinoma of the breast has a claudin-low immunohistochemical phenotype. *Virchows Arch*. 2014;465:185-91.
16. Wang S, Li S, Yang X, et al. Elevated expression of T-lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance. *Eur J Cancer*. 2014;50:379-87.
17. Foroni C, Brogini M, Generali D, et al. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev*. 2012;38:689-97.
18. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;14:1014-22.
19. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21:309-22.
20. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141:52-67.
21. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008;27:5904-12.
22. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26:475-87.
23. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*. 2014;70:11-20.
24. Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, et al. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2003;88:1721-6.
25. Lippitz BE, Harris RA. Cytokine patterns in cancer patients: a review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1093722.
26. Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, et al. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Białymst*. 2003;48:82-4.
27. Conze D, Weiss L, Regen PS, et al. Autocrine production of interleukin-6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:8851-8.
28. Arihiro K, Oda H, Kaneko M, et al. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer*. 2000;7:221-30.
29. Chiu JJ, Sgagias MK, Cowan KH. Interleukin 6 acts as a paracrine growth factor in human mammary carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*. 1996;2:215-21.
30. Asgeirsson KS, Olafsdottir K, Jonasson JG, et al. The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine*. 1998;10:720-8.
31. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334:297-314.
32. Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *Biomed Res Int*. 2013;2013:421821.
33. Xiong H, Hong J, Du W, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2012;287:5819-32.
34. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:178-96.
35. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell*. 1999;98:295-303.
36. Moreno-Jaime B. La metformina induce la transición epitelio-mesenchimal inducida por EGF en células de cáncer de mama. México, D.F. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
37. Johnston PG, Rondonone CM, Voeller D, et al. Identification of a protein factor secreted by 3T3-L1 preadipocytes inhibitory for the human MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Res*. 1992;52:6860-5.