



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**EVIDENCIA DE TRANSMISIÓN LATERAL DE CARACTERÍSTICAS
AGRESIVAS ENTRE DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS DE CÁNCER
DE MAMA.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
NANCY ADRIANA ESPINOZA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN VIROLOGÍA Y CÁNCER-HIMFG

COMITÉ TUTOR
DRA. MAHARA ANGÉLICA VALVERDE RAMÍREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA

Ciudad de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer del Hospital Infantil de México Federico Gómez y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Oncología, del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

El desarrollo del proyecto fue apoyado económicamente por CONACyT FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE No. 233061 y por Fondo de Apoyo a la investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez (Proyecto no. HIM-2014-053).

La alumna fue becaria por CONACYT (231663) y por el IMSS (2010-017).

INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	vi
ABSTRACT.	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Cáncer de mama	1
I.2. Heterogeneidad Inter e Intra-tumoral	2
I.3. El microambiente tumoral	3
I.4. Evidencia de cooperación clonal	5
I.5. Modelos de Heterogeneidad Intra-tumoral	6
I.5.1 Modelo de Evolución clonal o Estocástico	6
I.5.2 Modelo Jerárquico o de Células Troncales Cancerosas	7
I.5.3 Modelo de Plasticidad Celular/Transición Epitelio-Mesénquima	10
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS	14
V. OBJETIVOS	15
VI. ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO	16
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	17
VII.1 Cultivo celular	17
VII.2 Suero de pacientes con Cáncer de mama	17
VII.3 Inducción del fenotipo invasivo/troncal	18
VII.4 Inhibición de la vía de NF κ B e inhibición de la Inducción del fenotipo invasivo/troncal	18
VII.5 Inmunofluorescencia	20
VII.6 Citometría de Flujo	20

VII.7 Experimento de Invasión	20
VII.8 Análisis de TGF-β y perfil de citocinas	21
VII.9 Formación de Tumoresferas	21
VII.10 qRT-PCR del arreglo Células Troncales Cancerosas	21
VII.11 Análisis de agrupación (Mapa de calor y Clustergrama)	22
VII.12 Análisis Bioinformáticos y estadísticos y representación de la red	22
VII.13 Análisis Estadísticos	23
VIII. RESULTADOS	24
VIII.1 Células agresivas de cáncer de mama promueven características mesenquimales e invasivas en células no agresivas.	24
VIII.2 El papel del eje CXCL12-CXCR4/CXCR7 en el fenotipo invasivo-inducido	26
VIII.3 Respuesta independiente a TGF-β pero dependiente a G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1	27
VIII.4 CD44, Oct-4 y Sox-2 son regulados al alta en las células invasivas-inducidas.	34
VIII.5 Las vía de NFκB como regulador del fenotipo invasivo/troncal-inducido	37
VIII.6 Inhibición del fenotipo invasivo/troncal inducido	44
IX. DISCUSION	46
X. CONCLUSIONES	50
XI. MODELO PROPUESTO	51
XII. REFERENCIAS	53
XIII. APÉNDICE 1	60

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Heterogeneidad Inter e Intra-tumoral	3
Figura 2. Modelos de Heterogeneidad Intra-tumoral	10
Figura 3. Modelo de Plasticidad Celular/Transición Epitelio-Mesénquima	12
Figura 4. Células de CaM agresivas promueven características mesenquimales e invasivas a células no agresivas.	25
Figura 5. El eje CXCL12-CXCR4/CXCR7 en el fenotipo invasivo-inducido.	28
Figura 6. El fenotipo invasivo-inducido es independiente de TGF-β	29
Figura 7. El papel de mediadores pro-inflamatorios en el fenotipo invasivo-inducido.	32
Figura 8. El fenotipo invasivo-inducido correlaciona con la adquisición de marcadores de troncalidad.	37
Figura 9. Análisis de la expresión de genes asociados a CSC	38
Figura 10. Inferencia de factores de transcripción y redes de interacción proteína-proteína	43
Figura 11. El fenotipo invasivo/troncal inducido depende de NFκB.	45
Figura 12. Modelo propuesto.	52

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características clínicas de las pacientes	33
Tabla 2. Firma de expresión génica combinada de las células MCF-7 y T47D inducidas después del análisis de agrupación supervisada	39
Tabla 3. Inferencia del factor de transcripción mediante el análisis de enriquecimiento de ChiP-X.	41

ABREVIATURAS

	ESPAÑOL	INGLÉS
AR	Receptor de andrógeno	Androgen receptor
ATXN1	Ataxina 1	Ataxin 1
BSCS	Células troncales cancerosas de mama	Breast Cancer Stem Cells
CaM	Cáncer de mama	Breast Cancer
CaM-AA	Cáncer de mama-Altamente Agresiva	High-Aggressive Breast Cancer
CaM-NA	Cáncer de mama-No Agresiva	Non-Aggressive Breast Cancer
CCR7	Receptor 7 de Quimiocina (motivo C-C)	C-C chemokine receptor type 7
CD44	Receptor de ácido hialurónico	Hyaluran Receptor
CHEK1	Punto de control 1	<i>Checkpoint 1</i>
CSC	Célula Troncal Cancerosa	Cancer Stem Cell
CXCL12	Quimiocina (motivo C-X-C) Ligando 12 también denominada Factor derivado de células estromales o SDF-1	C-X-C motif chemokine ligand 12 or SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1)
CXCR3	Quimiocina receptora de tipo 3 (motivo C-X-C)	C-X-C chemokine receptor type 3
CXCR4	Quimiocina receptora de tipo 4 (motivo C-X-C) o CD184	C-X-C chemokine receptor type 4 or CD184 (<i>Cluster Differentiation 184</i>)
CXCR7	Quimiocina receptora de tipo 7 (motivo C-X-C)	C-X-C chemokine receptor type 7
DACH1	Factor de Transcripción de la familia Dachshund	<i>Dachshund Family Transcription Factor 1</i>
DOI	Densidad óptica integrada	Integrated Optical Density
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico	Epidermal Growth Factor

GATA3	Proteína de unión GATA 3	<i>GATA Binding Protein 3,</i>
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GSK3B	Glucógeno Sintasa Cinasa β	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta
HDAC3	Deacetilasa de histona 3	Histone deacetylase 3
IKBKB	Inhibidor del Factor Nuclear de la cinasa kappa B, sub unidad beta	Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta
IL-8	Interleucina-8	Interleukin-8
INF-α2	Interferón-alfa2	Interferon-α2
JUN	Proto-oncogen JUN	JUN Prot-oncogene
LYN	Proto-oncogen LYN, miembro de la familia de tirocina cinasa Src	LYN Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase
MC (-AA, -NA)	Medio Condicionado (altamente agresivo, no agresivo)	Conditioned Media (highly aggressive, non-aggressive)
MCP-1	Proteína quimio-atrayente de monocitos	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEC	Matriz Extracelular	Extracellular Matrix
MMP	Metaloproteasas de matriz extracelular	Matrix Metalloproteinases
-NA o -AA	No Agresivo o Altamente Agresivo	Non-aggressive or Highly Aggressive
NFKB1	Factor Nuclear kappa B sub unidad1	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1
NFkB	<i>Factor</i> nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Oct-4	Factor de Transcripción 4 de unión a octamero	Octamer-binding transcription factor 4
PLAT	<i>Activador</i> Tisular del Plasminógeno	Plasminogen Activator, Tissue Type

RANTES	Regulada en la Activación, Expresión de células T normales y Secretada; también conocida como CCR5, C-C quimiocina receptora de tipo 5	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted or C-C chemokine receptor type 5
RE	Receptor de estrógeno	Estrogen Receptor
RELA	El factor de transcripción p65 de NFκB	Nuclear Factor NF-kappa-B p65 subunit
seg/min/h	segundos/minutos/horas	<i>seconds/minutes/hours</i>
SFB	Suero Fetal Bovino	Fetal Bovine Serum
SIRT1	Sirtuina 1	Sirtuin 1
Sox-2	SRY (region Y determinante del sexo)-caja 2	SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT3	Transductor de la Señal y activador de la Transcripción 3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TEM	Transición Epitelio Mesénquima	Epithelial-Mesenchymal Transition
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta	Transforming Growth Factor-β
TME	Microambiente Tumoral	Tumor Microenvironment
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	Tumor Necrosis Factor- α
UB21	Ubiquitina 21	Ubiquitin 21
UBC	Ubiquitina C	Ubiquitin C
uPA	Activador de plasminógeno tipo urocinasa	urokinase-Plasminogen Activator
VEGF	Factor de crecimiento vascular-endotelial	Vascular Endothelial Growth Factor
WEE1	Cinasa del punto de control WEE1 G2	<i>WEE1 G2 Checkpoint Kinase</i>

RESUMEN

El cáncer de mama (CaM), es un problema muy importante de salud pública en todo el mundo. La heterogeneidad intra-tumoral y la plasticidad de las células tumorales contribuyen de manera importante a la progresión de la enfermedad y al fracaso del tratamiento. Sin embargo, las interacciones dinámicas entre las diferentes clonas tumorales, así como, su contribución a la agresividad del tumor aún no es del todo entendido. En este estudio, evidenciamos la transmisión lateral de características agresivas entre células tumorales agresivas y no agresivas, consistiendo en ganancia de características mesenquimales y de troncalidad, aumento de la expresión de los receptores para CXCL12; CXCR4 y CXCR7 así como, un aumento en la invasividad en respuesta a CXCL12 que correlacionó con altos niveles de secreción de los mediadores pro-inflamatorios G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-8 y las metaloproteinasas 1 y 2 por las células altamente agresivas. Notablemente, las células inducidas-agresivas exhiben una firma de señalización caracterizada por la activación de NF κ B pero sin evidencia de la participación de TGF- β . En conjunto, nuestros resultados proporcionan una evidencia de la comunicación entre las células tumorales con diferentes potencialidades de agresividad, lo que podría influir en la dinámica de la población intra-tumoral promoviendo la aparición de clonas con nuevas funciones. Comprender estas interacciones proporcionará mejores blancos para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

ABSTRACT

Breast Cancer (BrC) is a major public health problem worldwide. The intra-tumoral heterogeneity and tumor cell plasticity importantly contribute to disease progression and treatment failure. However, the dynamic interactions between different tumor clones, as well as their contribution to tumor aggressiveness are still poorly understood. In this study, we provide evidence of a lateral transmission of aggressive features between aggressive and non-aggressive tumor cells, consisting of gain of expression of EMT and cancer stem cell markers, increased expression of CXCL12 receptors CXCR4 and CXCR7 and increased invasiveness in response to CXCL12, which correlated with high levels of secretion of proinflammatory mediators G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-8 and metalloproteinases 1 and 2 by the aggressive cells. Noteworthy, induced-aggressive cells exhibit a signaling signature characterized by NF κ B activation but with no evidence of TGF- β activation. Altogether, our results provide evidence of communication between tumor cells with different potentials for aggressiveness, which could influence intra-tumoral population dynamics promoting the emergence of clones with novel functions. Understanding these interactions will provide better targets for diagnosis, prognosis and therapeutic strategies.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud humana en todo el mundo. Debido a que el término incluye una amplia variedad de diferentes enfermedades, todavía hay muchos tipos de cáncer con un pronóstico desfavorable. En la actualidad, un gran porcentaje de los tipos de cáncer en el adulto son carcinomas, una masa de tumor sólido de origen epitelial.

Un carcinoma no es sólo un bulto formado por células transformadas altamente heterogéneas sino también, por células del sistema inmune, matriz extracelular (MEC), células del tejido conectivo, así como vasos sanguíneos y linfáticos, formando lo que se conoce como el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés); la comunicación que se establece entre las diferentes clonas tumorales y entre éstas y su TME, es de gran importancia en las diferentes etapas de la progresión tumoral.

I.1. Cáncer de mama

La glándula mamaria está formada por lóbulos de tejido glandular del tipo túbulo-alveolar, tejido conectivo que conecta y sostiene a los lóbulos y grasa que ocupa los espacios interlobulares. Los lóbulos están formados por lobulillos y éstos a su vez formados por acinos los cuales, tienen un conducto secretor. Los conductos están revestidos por tejido epitelial que muestra una transición de células epiteliales escamosas hacia una capa única de células epiteliales cúbicas. De manera importante, para su desarrollo la glándula mamaria depende de hormonas ováricas (1).

Aproximadamente, el 80% del cáncer de mama (CaM) se origina en los conductos o alveolos glandulares y el 20% restante en otros sitios de la mama. Al igual que otros tipos de cáncer, el riesgo de desarrollar CaM es multifactorial pero del total de las pacientes con CaM sólo del 5-10% están asociadas a CaM hereditario por mutaciones en los genes BRCA1/2, CDH1, p53, entre otros (2).

El CaM es la causa más común de mortalidad por cáncer en mujeres en edad reproductiva. A pesar de que el riesgo de padecer este tipo de cáncer es mayor en países desarrollados, la mortalidad es más alta en países en vías de desarrollo en donde la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas, debido a que existe menos acceso a los servicios de salud para el diagnóstico temprano, tratamiento y control (3, 4).

En México, de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEGI) para el año 2015, se observó una incidencia del CaM de 14.89 de casos nuevos por cada 100,000 personas en mujeres entre 20 años de edad y más, mientras que en mujeres de 60 a 64 años de edad se alcanzó la mayor incidencia de 68.05 por cada 100,000 personas de ese grupo de edad. Con respecto a la mortalidad se observó que, a mayor edad mayor riesgo de fallecer por esta enfermedad; para el grupo de mujeres de 20 a 29 años se presenta un fallecimiento por cada 100,000 mujeres, de 50 a 59 años 28 muertes y para el grupo de 80 años y más 65 muertes (5).

I.2. Heterogeneidad Inter e Intra-tumoral

Uno de los mayores desafíos terapéuticos relacionados con el cáncer en general y con el CaM en particular, es que es una enfermedad altamente inter e intra-heterogénea. Inter-tumoralmente ya que consta de muchos tipos y sub-tipos clasificados de acuerdo a la célula de origen, a patrones histológicos, a perfiles de expresión de receptores hormonales y de factores de crecimiento y de citoqueratinas, y composición del microambiente, principalmente; cada sub-tipo tiene características patológicas y biológicas distintas, con implicaciones médicas importantes ya que presentan diferentes cursos clínicos. Además, tumores que al diagnóstico fueron catalogados como no agresivos, son a menudo resistentes al tratamiento o presentan recaídas con características altamente agresivas (6, 7). Intra-tumoralmente porque las células de CaM presentan una gran heterogeneidad fenotípica: basada en su morfología, marcadores de superficie y patrones inmunohistoquímicos; así como también distintos patrones genéticos y epigenéticos, que en conjunto hacen que en el tumor co-existan clonas neoplásicas con características específicas e individuales de inmunosupresión, proliferación, supervivencia, metabólicas e invasivas; éstas clonas tumorales presentan distintas capacidades de diseminación y resistencia al tratamiento (**Figura 1**) (8, 9).

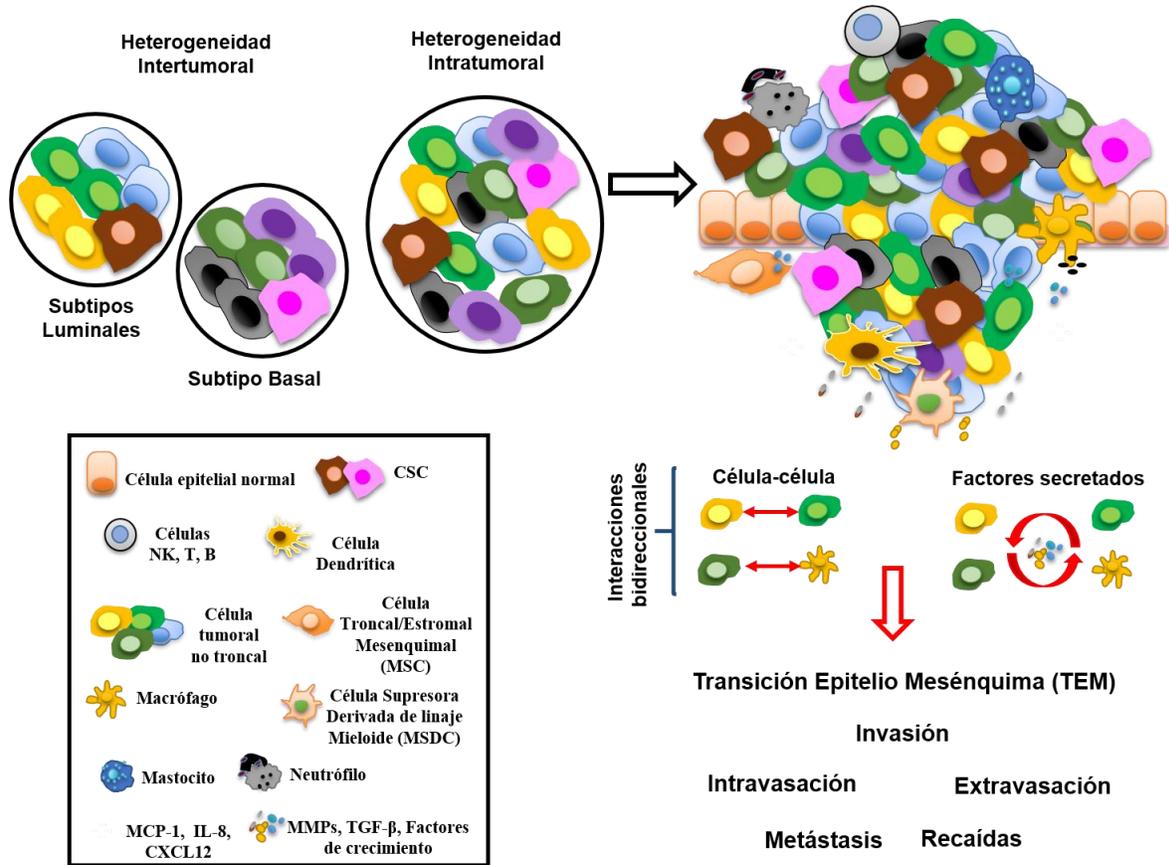


Fig. 1. Heterogeneidad Inter e Intra-tumoral. La Heterogeneidad Inter e Intra-tumoral además de las interacciones bidireccionales con el microambiente, favorecen la progresión del tumor. CSC = célula troncal cancerosa, MMPs = metaloproteasas. Modificado de: Mei Zhanng y Jeffrey M. Rosen. Trends in Cancer. December 2015, Vol. 1, No. 4. Chimal-Ramírez, Espinoza-Sánchez y Fuentes-Pananá. Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(7):837-55. Polyak. J Clin Invest. 2011;121(10):3786-3788.

I.3. El microambiente tumoral

Además de la gran heterogeneidad presente entre las células cancerosas en una misma masa tumoral, las clonas tumorales están rodeadas por un microambiente altamente dinámico, el cual está formado por macrófagos asociados a tumor, neutrófilos, linfocitos T y B, células NK, fibroblastos, entre otros tipos celulares (lo que se conoce como TME, del inglés *tumor microenvironment*). El vínculo entre la inflamación crónica y la carcinogénesis fue propuesto por primera vez en 1863 por Rudolf Virchow, él observó que la infiltración de leucocitos era una característica muy importante de los tumores (10). Desde hace algunos años se ha documentado ampliamente la comunicación bidireccional, ya sea directa (contacto célula-

célula) o indirecta (factores secretados), que existe entre las clonas tumorales y su TME como un factor crítico en la agresividad de un tumor debido a su influencia en la iniciación, progresión y pronóstico del paciente (11, 12) **(Figura 1)**. Actualmente, se reconoce que muchas de las características de agresión que presenta un tumor no están dadas por rasgos intrínsecos de la célula tumoral, si no que están principalmente influenciados por cómo se comunica ésta con su microambiente. Procesos biológicos que ocurren en el seno del cáncer y que influyen el curso de la enfermedad como: una proliferación y supervivencia incrementada, mecanismos de evasión de la respuesta inmune anti-tumoral, angiogénesis, secreción de proteasas que degradan la MEC, la transición epitelio-mesénquima (TEM) e invasión, son promovidos por citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos, etc, secretados por las células del estroma del tumor.

El TME está constantemente cambiando a lo largo del curso de la enfermedad en respuesta a las distintas condiciones microambientales y a las señales intrínsecas de las células tumorales, pero, aún se desconoce cómo las células tumorales construyen su propio nicho constituido por distintos compartimentos estromales y cómo estos influyen no solo en el desarrollo del tumor primario sino también en la metástasis y en la resistencia al tratamiento (11). En la actualidad, debido al amplio estudio de las interacciones entre el tumor y su TME se ha favorecido la emergencia de terapias dirigidas contra el TME (por ejemplo la inmunoterapia), pero a pesar de ello las células neoplásicas aún cuentan con la capacidad de desarrollar mecanismos de evasión que finalmente llevan a la muerte del paciente.

A la fecha nos falta mucho por entender la complejidad de las interacciones que existen entre las distintas clonas tumorales con diferentes grados de agresividad y el impacto que tiene ésta comunicación en la progresión y pronóstico del CaM. Se ha sugerido que las interacciones entre las distintas clonas juegan un papel muy importante en la evolución del tumor presentándose diferentes escenarios. Por un lado estas interacciones pudieran favorecer la supervivencia y proliferación de las células neoplásicas hasta que un tipo específico logre la dominancia clonal. Por otro lado, estas interacciones pudieran promover una cooperación mutua entre las distintas clonas favoreciendo la existencia de todas ellas (13). Sin embargo, hasta donde se ha descrito, las interacciones entre las distintas poblaciones tumorales clonales no han sido ampliamente documentadas experimentalmente.

1.4. Evidencia de cooperación clonal

Uno de los primeros grupos en estudiar la cooperación clonal en la progresión tumoral fue Miller FR et al. en 1983, demostrando la cooperación entre clonas tumorales metastásicas y no metastásicas. Este grupo reportó en un modelo de ratón singénico que la presencia de una subpoblación metastásica favorece la metástasis de una sub-población no migratoria (14). 10 años más tarde en 1993, Baban y colaboradores demostraron que la inoculación subcutánea de clonas metastásicas y no metastásicas provenientes del mismo modelo de ratón singénico de fibrosarcoma no solo resultaba en la formación de un tumor primario ampliamente heterogéneo sino también en una gran cantidad de metástasis formadas únicamente por clonas no metastásicas (15). En el 2011, Calbo y colaboradores observaron que los tumores de pulmón están compuestos por diferentes tipos celulares con un fenotipo neuroendocrino o mesenquimal y que éstas poblaciones tienen un origen común ya que presentan las mismas aberraciones genómicas. Ellos observaron que cuando inoculaban en ratones inmunocomprometidos estos tipos de células ya sea de manera individual (fenotipo neuroendocrino o mesenquimal) o una mezcla de ellas (fenotipo neuroendocrino + mesenquimal) no hubo diferencias en cuanto al crecimiento tumoral, pero de manera sorprendente ellos demostraron que las células con fenotipo mesenquimal confieren la capacidad de metastatizar a las células con un fenotipo neuroendocrino (16). Experimentos usando la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* en los cuales células inducidas a expresar mutaciones oncogénicas comunes, en *RAS^{V12}* o en *scrib-*, mostraron que la cooperación intra-clonal promovía el crecimiento tumoral y la invasión (17). Similarmente, en un modelo murino de CaM se observó que para la formación de un tumor en un ratón nuevo, era necesario la inoculación de dos clonas diferentes, una con mutación en el gen *Hras* y otra con la capacidad de secretar altos niveles de la proteína Wnt1 pero manteniendo la expresión silvestre del gen *Hras* (18).

En otros estudios, se demostró que los factores secretados por distintas clonas tumorales tienen un impacto en la biología de las células vecinas. En 2011, Bose y colaboradores observaron que los factores secretados por clonas tumorales quimioresistentes, incluso aquellos secretados por Células Troncales Cancerosas (CSCs, por sus siglas en inglés) promueven la resistencia a células neoplásicas quimiosensibles (19). Recientemente, Mukherjee *et al* mostraron que una subpoblación no migratoria de CSCs a través de una

comunicación paracrina mediada por factores pro-migratorios, inducen en células tumorales no troncales un potencial metastásico y con fenotipo troncal (20). En resumen, los estudios mencionados apoyan la existencia de una gran heterogeneidad intratumoral que influye de manera importante en el comportamiento agresivo del tumor. Sin embargo, distamos de entender los mecanismos de cooperación intraclonal, las moléculas y vías de señalización activadas en respuesta a esta comunicación. Por la importancia clínica que conlleva, es necesario entender cómo se llevan a cabo las interacciones entre las distintas clonas tumorales y entre ellas y su microambiente, cuál es el origen de la heterogeneidad intra-tumoral, si este es principalmente genético e irreversible o por lo contrario es altamente plástico en el cual la inter-comunicación en el seno del tumor influye la capacidad de adaptación y supervivencia de la célula tumoral ante diferentes desafíos de la respuesta inmune propias del huésped o terapéuticos.

I.5. Modelos de Heterogeneidad Intra-tumoral

Tradicionalmente hemos pensado que los tumores siguen un modelo de evolución clonal en donde los distintos tipos celulares genéticamente diferentes, compiten entre sí y sólo aquellos con ventajas específicas y bajo una presión selectiva sobreviven, favoreciendo la evolución progresiva del tumor en una especie de competencia Darwiniana (21). Esta heterogeneidad genética es correlativa con una heterogeneidad fenotípica, sin embargo, en un tumor existe una fracción de heterogeneidad fenotípica que no proviene de la herencia sino de la plasticidad celular (dada por la influencia que el TME tiene sobre la célula tumoral) y la diferenciación de las CSCs.

I.5.1 Modelo de Evolución clonal o Estocástico

Este modelo fue propuesto por primera vez en 1976 por Peter Nowell (22), en el se describe que las células neoplásicas son al inicio genéticamente equivalentes debido a que tienen un mismo origen, pero, gracias a su gran inestabilidad genómica y aunado a factores como: la tasa de mutación, eventos epigenéticos, el microambiente y presiones selectivas que afectan la evolución clonal, permiten la selección de clonas durante la progresión tumoral favoreciendo la emergencia de subclonas con ventajas biológicamente importantes como proliferación y supervivencia, haciéndolas más agresivas; cada subpoblación muta de manera independiente contribuyendo así a la heterogeneidad intra-tumoral (**Figura 2A**) (23). Respecto al CaM, hay

evidencia que en un mismo tumor, varias poblaciones subclonales existen en distintas regiones geográficas del tumor (heterogeneidad espacial); como un ejemplo, tumores HER-2 positivos con distintos patrones de expresión en diferentes regiones de tumor (24). También que durante el curso de la progresión de la neoplasia del tumor primario hacia la metástasis, las clonas siguen rutas evolutivas independientes (heterogeneidad temporal) (25); por ejemplo, lesiones metastásicas comparten ciertas aberraciones genéticas con su tumor primario pero también difieren, esto sugiere que las metástasis provienen de clonas con características específicas o incluso de clonas presentes en otros sitios metastásicos más que del tumor primario (26). El tratamiento contra el cáncer es un factor muy importante de selección contribuyendo en la evolución clonal mediante la emergencia de clonas resistentes a algún tipo de fármaco, estas clonas van ocupando una proporción muy importante de la masa tumoral desplazando a clonas fármaco-sensibles (27). En CaM un estudio realizado por Miller *et al*, describió que el uso de Letrozole, un inhibidor de aromatasas aplicado como tratamiento neoadjuvante, indujo cambios en la proliferación celular y en los patrones de expresión de genes estrógeno-dependientes (28). Por lo tanto, aunque la mayoría de las células dentro de un tumor tienen un origen clonal, la inestabilidad genómica y la naturaleza dinámica de la presión selectiva favorecen distintas rutas de diversificación genética dentro de ecosistemas adaptables que resultan en tumores genética, epigenética y fenotípicamente distintos.

I.5.2 Modelo Jerárquico o de Células Troncales Cancerosas

Las células troncales (SCs, del inglés *Stem Cells*) son definidas como células que tienen la capacidad de dar origen a ellas mismas a través de su capacidad de autorenovación (cuando la SC se divide, por lo menos una de las dos células hijas presenta las características biológicas de la célula de origen), y pueden generar células maduras especializadas y con funciones específicas a partir de su diferenciación (**Figura 2B, panel izquierdo**). En la mayoría de los tejidos las SCs se encuentran en una muy baja frecuencia (29, 30). Las SCs no tienen características morfológicas que permitan identificarlas, para ello se deben de caracterizar a través de marcadores de superficie o intracelulares (el marcador dependerá del tipo de tejido), sin embargo, el método estándar de oro para identificar a las SCs es a través de su funcionalidad, es decir, su capacidad de repoblar el tejido al cual pertenecen. Por ejemplo, en modelos murinos irradiados en donde sus células hematopoyéticas se encuentran

abatidas, el trasplante de Células Troncales Hematopoyéticas (o HSCs, del inglés Hematopoietic Stem Cells) permite la reconstitución de todo el sistema hematopoyético (30).

Los cánceres están formados por células derivadas de tejidos que contienen células troncales y células maduras. Se ha propuesto que en el cáncer la capacidad de auto-renovación está desbloqueada o constantemente activa para una fracción de células malignas, que son capaces de dar origen a células con sus mismas características pero también de dar origen a la gran mayoría de la heterogeneidad fenotípica de células cancerosas que constituyen a la neoplasia. Lo anterior, es debido a su capacidad de diferenciación multipotencial, dando lugar a diversos tipos de células con funciones distintas, lo que sugiere un alto grado de jerarquización en las neoplasias (31). Debido a que estas características son normalmente expresadas en las SCs, a ésta fracción pequeña de células tumorales se les conoce como Células troncales Cancerosas (CSCs, del inglés Cancer Stem Cells). Diferentes mecanismos moleculares activados en las SCs están implicados en la autorenovación de las CSCs, tal es el caso de la expresión de los factores de pluripotencia *Oct-4*, *Sox-2*, y *Nanog* así como, las vías de señalización de Notch, Wnt y Sonic Hedgehog (Shh) (29, 32).

Aún se desconoce cómo se originan las CSCs aunque se propone lo siguiente: 1) que las SCs adquieren eventos mutagénicos que desencadenan su transformación oncogénica conservando así sus características de troncalidad y 2) que dichos eventos oncogénicos ocurren en células más comprometidas como en células progenitoras y/o en células maduras confiriéndoles características de troncalidad (a lo que más adelante citaremos como modelo de plasticidad celular) (**Figura 2B, panel izquierdo**) (33). La importancia de las CSCs es que evidencia experimental y clínica apoyan que la densidad de CSCs en un tumor son indicativos del curso clínico de la enfermedad. Esto es debido a que las CSC exhiben mecanismos de quimioresistencia y son las responsables de las recaídas de la enfermedad por la sobreexpresión de proteínas de membrana de multirresistencia a drogas (MDR, por sus siglas en inglés) y a la enzima Aldehído deshidrogenasas (ALDH, por sus siglas en inglés) o de manera muy importante, por su capacidad de mantenerse en un estado de quiescencia (34, 35). Además, la metástasis es responsable de más del 90% de los casos asociados con la mortalidad por cáncer y existe una fuerte evidencia que las CSCs son responsables de las metástasis (36) debido a que estas células poseen independencia al sustrato y características de movilidad asociadas a la adquisición de un fenotipo mesenquimal por la TEM. A diferencia

de las células epiteliales terminalmente diferenciadas, las células con fenotipo mesenquimal no necesitan del contacto célula-célula o célula-MEC para su supervivencia, esta característica favorece la diseminación del tumor primario hacia la MEC y posteriormente hacia los órganos secundarios metastásicos. Debido a su capacidad de autorenovación, diferenciación y plasticidad, las CSC pueden reconstituir la gran heterogeneidad tumoral en los sitios metastásicos (**Figura 2B, panel derecho**) (37). Para algunos tipos de cáncer, las CSC representan una población distinta del resto de las células tumorales y pueden ser aisladas por marcadores específicos de membrana; en el caso del CaM en un estudio pionero realizado por Al-Hajj se demostró que, las CSCs de mama (BCSCs, por sus siglas en inglés) presentan un fenotipo CD44+CD24-/low con un alto potencial tumorigénico en modelos animales (38). A partir de ese estudio, se han descrito marcadores específicos para CSCs en otro tipo de tumores sólidos (35).

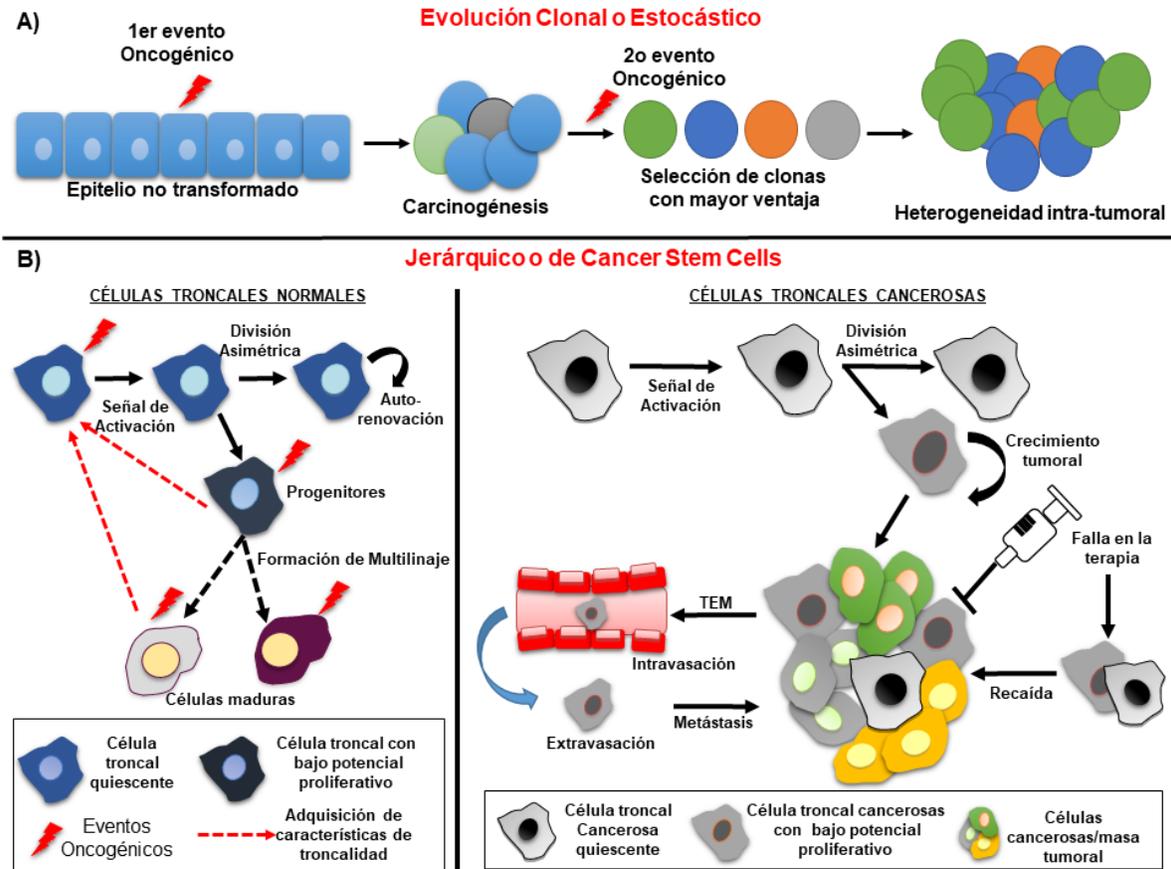


Fig. 2. Modelos de Heterogeneidad Intra-tumoral. El modelo de la Evolución Clonal (A) y el Jerárquico o de CSCs (B) se ha propuesto como orquestadores de la heterogeneidad intra-tumoral. Modificado de: Jeremy N. Rich. *Medicine (Baltimore)* 2016 Sep;95(1 Suppl 1):S2-7. Chimal-Ramírez, Espinoza-Sánchez and Fuentes-Panán. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015;15(7):837-55.

I.5.3 Modelo de Plasticidad Celular/Transición Epitelio-Mesénquima.

Aunque el modelo de la evolución clonal y de las CSCs no son mutuamente excluyentes, hay un modelo alternativo que une los 2 modelos anteriormente descritos; el modelo de la Plasticidad Celular (**Figura 3**). Existen varias evidencias que apoyan que tanto estímulos microambientales como cambios genéticos y epigenéticos favorecen la plasticidad de las células tumorales. Se ha descrito que células tumorales diferenciadas son capaces de adquirir propiedades de CSC, y las CSC pueden perder troncalidad y formar poblaciones más diferenciadas (39). Esta bi-direccionalidad entre células, evidencia una gran adaptabilidad y una alta organización del tumor que directamente influye la evolución y el pronóstico de la enfermedad (40, 41).

En general, las células tumorales se caracterizan por una gran plasticidad tanto intrínseca como inducida; el mecanismo más asociado a plasticidad e inducción de troncalidad es la TEM (42). La TEM es un proceso biológico de plasticidad celular que opera principalmente durante el desarrollo embrionario, pero que se ha propuesto que también ocurre en el cáncer, en el cual es responsable de los procesos de invasión y metástasis. La TEM es caracterizada por la disrupción de los contactos célula-célula, pérdida de polaridad ápico-basal, reorganización del citoesqueleto, pérdida de la expresión de genes asociados a células epiteliales como *CDH1* que codifica para Caderina-E y la ganancia de genes asociados con un fenotipo mesenquimal como Vimentina y *CDH2* (Caderina-N). El switch entre la expresión de los genes mencionados anteriormente, facilita el desprendimiento y la movilidad celular (37). La molécula más estudiada y conocida asociada con la inducción de la TEM es TGF- β (Transforming Growth Factor- β , por sus siglas en inglés). Datos experimentales demuestran que TGF- β contribuye a la plasticidad de las células tumorales y tiene un papel crítico en la invasión, metástasis, quimioresistencia y recaída de las células neoplásicas (**Figura 3**) (43). En un estudio pionero en el 2008, Mani *et al* demostraron que la adquisición de la TEM correlaciona con la adquisición de un fenotipo de CSCs (44). Células inmortalizadas y transformadas de mama transitan entre estados troncales y no troncales de acuerdo a la modulación de la concentración de ZEB1, un factor de transcripción maestro para la inducción de la TEM (39). Se describió también que estas CSCs inducidas se encuentran en el borde invasivo del tumor en donde son capaces de entrar a la circulación y formar micrometástasis en sitios secundarios en donde el proceso inverso de la TEM, la transición de mesénquima a epitelio es de vital importancia para la colonización metastásica (20, 45). De manera importante, células neoplásicas que co-expresan marcadores de TEM y CSCs han sido detectadas en circulación en pacientes con CaM (46, 47), cuando las células son aisladas y posteriormente inoculadas en ratones inmunodeficientes generan metástasis a hueso, hígado y pulmón (48). Se ha observado que las BCSCs son altamente plásticas y se mantienen en una transición entre dos distintos estados funcionales: un estado más proliferativo y epitelial caracterizado por la expresión de ALDH y un estado más invasivo y mesenquimal, caracterizado por el fenotipo CD44+CD24- (49). Estos estudios y otros demuestran que bajo ciertas condiciones el microambiente tumoral y la plasticidad celular regulan la iniciación de programas tipo troncales en células tumorales no troncales y que esto correlaciona con la adquisición de agresividad

en células que antes no la tenían como: invasión y diseminación a órganos distantes (metástasis). La plasticidad celular es también evidenciada por la capacidad de la célula metastásica de revertir el fenotipo mesenquimal/troncal para poder reconstituir el tumor primario en sitios secundarios.

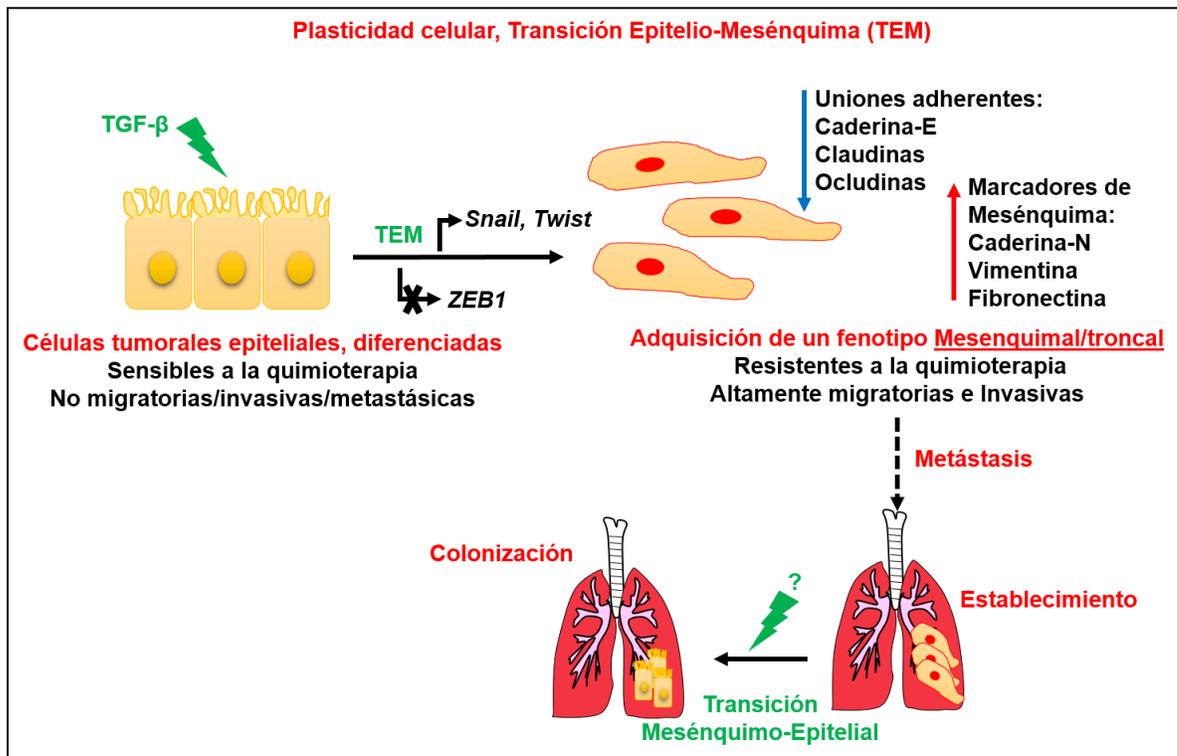


Figura 3: Modelo de Plasticidad Celular/Transición Epitelio-Mesénquima. El microambiente tumoral y la plasticidad celular regulan la iniciación de programas tipo troncales en células tumorales no troncales y esto correlaciona con la adquisición de agresividad en células que antes no la tenían como: invasión y diseminación a órganos distantes (metástasis) a través de la TEM. TEM (Transición Epitelio-Mesénquima), la Transición Mesénquima-Epitelio es el proceso reverso de TEM en el cual la célula invasiva en el sitio metastásico revierte a su fenotipo epitelial para poder colonizar el tejido, TGF- β (Transforming Growth Factor, por sus siglas en inglés). Modificado de: Dave *et al.* Breast Cancer Research 2012, 14:202. Espinoza-Sánchez *et al.* Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(7):837-55. Scheel. Seminars in Cancer Biology 22 (2012) 396– 403.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este estudio tratamos de comprender las interacciones dinámicas entre diferentes poblaciones de células de CaM y cómo estas interacciones contribuyen con la aparición de características agresivas del cáncer, por ejemplo con la inducción de un fenotipo TEM/Troncal con capacidades invasivas. Para ello, se utilizaron cuatro líneas celulares de CaM, dos caracterizadas por su fenotipo epitelial y su incapacidad para inducir metástasis en modelos murinos [las líneas MCF-7 y T47D derivadas de CaM subtipo luminal A (receptor de estrógeno positivas o RE) de buen pronóstico general, identificadas como células no agresivas o CaM-NA) y dos con un fenotipo mesenquimal y un potencial altamente metastásico (las líneas HS578T y MDA-MB-231 derivadas de CaM subtipo triple negativo de mal pronóstico, identificados como células altamente agresivas o CaM-AA). Encontramos que las células agresivas fueron capaces de transmitir lateralmente características agresivas en células no agresivas, que consistió en la adquisición de un fenotipo semejante al mesenquimal/CSC e invasión. Un microarreglo de expresión troncal reveló que Ataxina 1 (ATXN1, por sus siglas en inglés), CD24, Glucógeno Sintasa Cinasa β (GSK3 β , por sus siglas en inglés), NANOG, el Factor Nuclear κ B subunidad 1 (NF κ B1, por sus siglas en inglés), el Activador del Plasminógeno Tipo Tejido (PLAT, por sus siglas en inglés), Sirtuina 1 (SIRT1, por sus siglas en inglés) y el Transductor de la Señal y activador de la Transcripción 3 (STAT3, por sus siglas en inglés) fueron los genes que más se regularon diferencialmente y que permitieron distinguir entre células sin y con un fenotipo TEM/Troncal e invasión (fenotipo invasivo-inducido). En conjunto, nuestras observaciones experimentales encajan dentro de una red reguladora molecular en la cual las células CaM-NA inducidas/invasivas aumentan la actividad de las vía NF κ B.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama (CaM) es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en nuestro país y en el mundo. Preocupantemente, en los últimos años se ha observado un incremento en la mortalidad en pacientes muy jóvenes, a partir de los 20 años. Como otros tipos de cáncer, el CaM es una enfermedad altamente heterogénea y la heterogeneidad intra-tumoral confiere diferentes capacidades proliferativas, de supervivencia, metabólicas e invasivas a las células que conforman un tumor, contribuyendo a la diseminación del tumor, la falla al tratamiento y recaída de la enfermedad. Por lo tanto, en este proyecto se propone estudiar los mecanismos que favorecen la heterogeneidad intra-tumoral, la plasticidad y la agresividad de un tumor a través de la comunicación mediada por contacto indirecto (factores secretados) entre células de CaM con diferentes grados de agresividad. Existen pocos reportes de la comunicación entre las distintas clonas tumorales y cómo impacta en la progresión del CaM. El resultado de ésta interacción, nos podrían proporcionar mejores blancos para el diagnóstico, pronóstico y estrategias terapéuticas.

IV. HIPÓTESIS

Las interacciones dinámicas entre diferentes poblaciones de células de CaM favorecen la transmisión lateral de características agresivas induciendo la adquisición de un fenotipo semejante al mesenquimal/CSC e invasión en células no agresivas.

V. OBJETIVOS

General

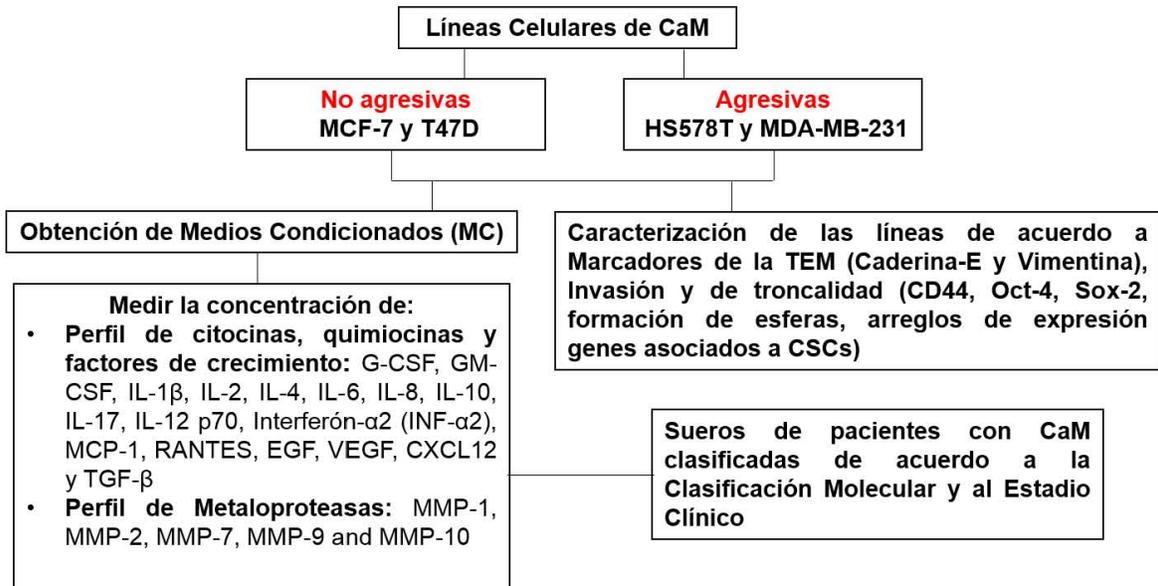
Entender la dinámica de las interacciones entre distintas poblaciones de células de cáncer de mama y cómo estas interacciones contribuye a la formación de clonas tumorales agresivas.

Específicos

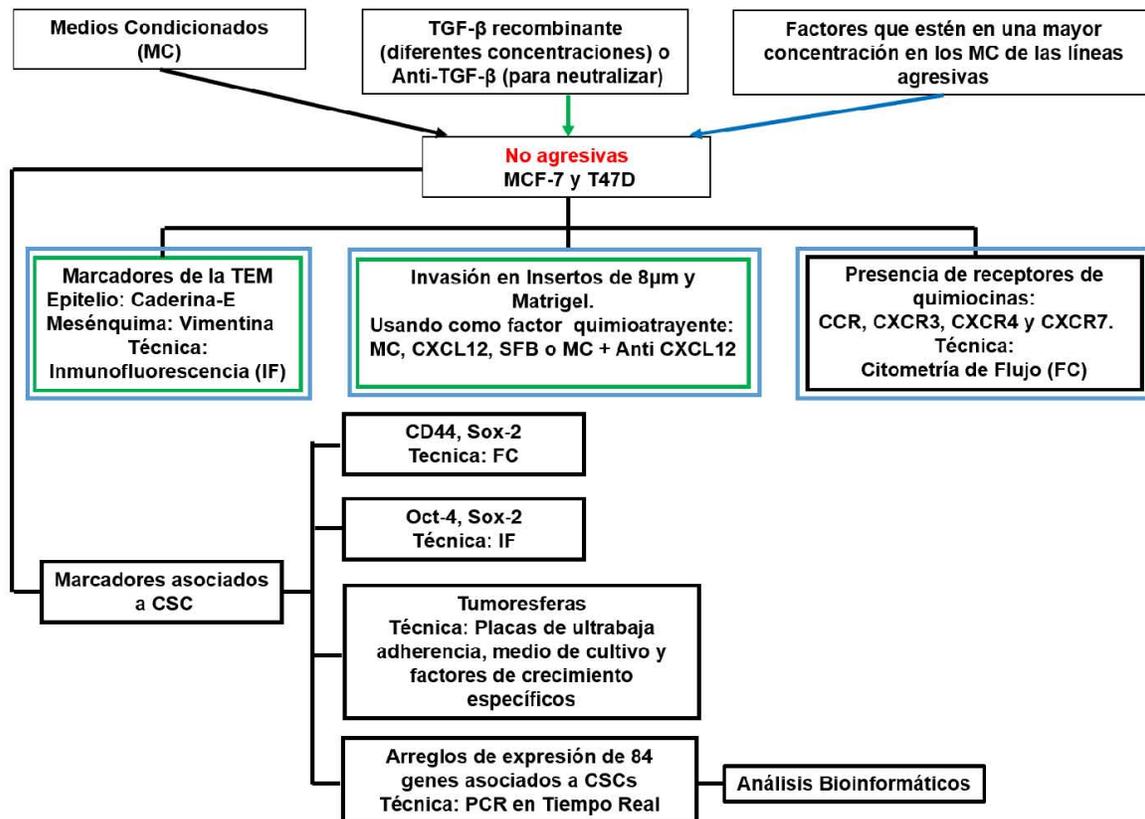
- 1.- Analizar la inducción de características de agresividad en líneas celulares de CaM no agresivas (MCF-7 y T47D, CaM-NA) en presencia de los sobrenadantes de las líneas celulares de CaM altamente agresivas (HS578T y MDA-MB-231, CaM-AA). Procesos a evaluar: marcadores de transición epitelio-mesénquima, invasión e inducción de receptores de quimiocinas.
- 2.- Conocer qué factores asociados a inflamación y proteólisis presentes en los sobrenadantes de las líneas de CaM-AA que pudieran inducir el fenotipo invasivo.
- 3.- Analizar si la inducción del fenotipo invasivo correlaciona con la adquisición de características asociadas a células troncales cancerosas.
- 4.- Analizar mediante arreglos de expresión las vías de señalización asociadas a la adquisición del fenotipo invasivo-inducido.
- 4.- Determinar mediante análisis bioinformáticos, las probables vías de señalización que podrían ser activadas en las líneas de CaM-NA por efecto de los sobrenadantes de las líneas de CaM-AA e inducir el fenotipo invasivo/troncal.

VI. ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO

FASE 1



FASE 2



VII. MATERIAL Y MÉTODOS

VII.1 Cultivo celular

Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés). Los medios de cultivo y los suplementos se obtuvieron de GIBCO BRL Life Technologies. Las líneas celulares de CaM fueron receptor de estrógeno (RE) positivo para MCF-7 y T47D, y triple negativo para HS578T y MDA-MB-231. MCF-7 (HTB-22) y HS578T (HTB-126) se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) alto en glucosa (4,5 g/L), T47D (HTB-133) se cultivó medio RPMI 1640 y MDA-MB-231 (CRM-HTB-26) en medio Eagle modificado de Dulbecco con la mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12, por sus siglas en inglés), todos los medios se suplementaron con SFB (Suero Fetal Bovino) al 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y Fungizona 0,25 µg/mL. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Todas las líneas celulares de CaM se sometieron a análisis corto de repetición en tándem para verificar la autenticidad de cada línea celular. Para obtener los medios condicionados (MCs) se cultivaron 2X10⁶ células de cada línea de CaM en una botella de 182 cm² en medio de cultivo estándar (descrito anteriormente). Cuando llegaron a un 80% de confluencia, se retiró el sobrenadante y posteriormente, se lavaron con 10 mL de una solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS, del inglés Phosphate Buffered Saline), después se agregaron 30 mL de medio de cultivo correspondiente a cada línea sin SFB y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 48 h; transcurrido el tiempo se retiró el medio, se centrifugó a 1500 rpm/5 min y el sobrenadante fue alicuotado y congelado a -20°C hasta su uso.

VII.2 Suero de pacientes con Cáncer de mama

Los sueros de las pacientes con CaM y donadores de sangre sanos (controles) fueron obtenidos del banco de tejidos y sueros de la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México Federico Gómez. Este estudio fue aprobado por los Comités de Investigación, de Ética en Investigación y de Bioseguridad del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Todos los pacientes y controles sanos fueron prospectivamente reclutados y fueron informados sobre la naturaleza del estudio. Aquellas pacientes que estuvieron dispuestas a participar, firmaron un consentimiento informado por escrito antes de la recolección de las muestras y fueron tratadas de acuerdo con las normas éticas y la mejor

práctica clínica de nuestra institución. La identidad de los nombres de las participantes se mantuvo en el anonimato durante la duración de este estudio. Las pacientes tenían un promedio de edad de 55.5 años (rango 37 a 88), 22 fueron diagnosticadas con carcinoma ductal invasivo, 2 con carcinoma lobular y 4 con carcinoma mixto y no recibieron tratamiento neoadyuvante previo al tiempo de la colección de la muestra. Todas las pacientes fueron clasificadas de acuerdo a la clasificación molecular (Luminal A, Luminal B, Her-2 positivo o triple negativo), así como de acuerdo a los estadios clínicos I, II y III, excepto para 4 pacientes de las cuales no pudimos obtener esta información. A las muestras se les asignó números consecutivos conforme fueron recolectadas.

VII.3 Inducción del fenotipo invasivo/troncal

Todas las líneas de CaM fueron cultivadas a una densidad de 3×10^5 células/mL/pozo en una placa para cultivo de 6 pozos. Una vez que éstas se adhirieron, el sobrenadante fue desechado y se lavaron con 2 mL de PBS 1X posteriormente, todas las líneas fueron cultivadas con 3 mL de MC o con su respectivo medio suplementado con 5, 10 o 20 ng/mL de TGF- β 1 recombinante humano de PeproTech o con 100ng/mL de las siguientes citocinas: G-CSF (del inglés, granulocyte-colony-stimulating factor), GM-CSF (del inglés, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor), IL-8 (del inglés, interleukin-8) o MCP-1 (del inglés, monocyte chemoattractant protein-1, conocido también como CCL2) de manera individual o el coctel (todos de PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Después de 72 h de incubación, las células fueron cosechadas para su análisis. Para la neutralización de la actividad biológica de TGF- β presente en los MCs altamente agresivos (MC-AA), 2 μ g/mL del anticuerpo neutralizante específico Anti-humano TGF- β 1, - β 2, y - β 3 hecho en conejo de RyD Systems, fue agregado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

VII.4 Inhibición de la vía de NF κ B e inhibición de la Inducción del fenotipo invasivo/troncal

Para inhibir la vía NF κ B en las células altamente agresivas de CaM HS578T y MDA-MB-231 se usó el inhibidor selectivo de IKK α e IKK β ACHP de la marca Tocris a Bio-technie (REF 4547) el cual, inhibe la actividad de unión a ADN de NF κ B [4]. Se preparó una solución stock de ACHP a 20 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenó a -70°C hasta su uso. Se colocaron 2×10^6 células de cada línea celular en botellas de cultivo de 182 cm² en su medio de cultivo

estándar, 24 h después se descartaron los sobrenadantes y se lavaron con PBS 1X posteriormente, se agregaron 30 ml de sus respectivos medios de cultivo sin FBS más 16 nM/mL de AHP durante 24 h. Después de ese tiempo, los MCs se colectaron y se centrifugaron a 1500 rpm/5 min, se alicuotaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Como controles se obtuvieron MC de células no tratadas con AHP.

Para inhibir la inducción del fenotipo invasivo/troncal, las células MCF-7 y T47D fueron cultivadas con 3 mL del MC proveniente de las células agresivas HS578T y MDA-MB-231 en las cuales se les inhibió la vía NFκB más 16 nM/mL de AHP y controles (sin inhibir NFκB). Después de 72 h de cultivo las células fueron cosechadas para su análisis.

VII.5 Inmunofluorescencia

3×10^4 células fueron sembradas sobre laminillas cargadas durante 24 h, el fenotipo invasivo/troncal fue inducido experimentalmente como se explicó anteriormente después de lo cual, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% en PBS durante 20 minutos. Las células se bloquearon con una solución de bloqueo (suero de cabra al 10%, BSA al 1% (Bovine Serum Albumin, por sus siglas en inglés), Triton X-100 al 0.2% y PBS 1X) durante 1 h y posteriormente, se tiñeron con los anticuerpos primarios: monoclonal anti-E-Caderina hecho en ratón (1:100, Clona: 36/E-cadherin, BD Biosciences), monoclonal anti-Vimentina hecho en conejo acoplado a Alexa Fluor-594 (rojo) (1:1000, Clona: EPR3776), policlonal anti-Oct4 hecho en conejo (1:100) o policlonal anti-Sox2 hecho en conejo (1:100) durante la noche a 4°C. Todos los anticuerpos fueron de Abcam. Después de eso, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-ratón IgG acoplado a FITC hecho en cabra (1:500, Sigma Aldrich) o anti-conejo acoplado a FITC hecho en burro (1:500, Jackson ImmunoResearch) durante 30 min. Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI (4', 6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidrocloruro, ThermoFisher Scientific) durante 25 min. En el caso de la inhibición de NFκB en las células agresivas se usó el anticuerpo primario anti-humano NFκB-p65 (1:100, clona C-20, Santa Cruz Biotechnology). Las células se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 y las imágenes se adquirieron con una cámara digital (Camedia C4040, Olympus). La intensidad de tinción de FITC se cuantificó usando el software Image Pro Plus, obteniendo la densidad óptica integrada (DOI) de las células de color verde.

VII.6 Citometría de Flujo

Para la tinción extracelular se bloquearon 3×10^5 células usando un anticuerpo IgG inespecífico diluido 1:100 en PBS 1X suplementado con SFB al 3% durante 15 minutos posteriormente, se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos CXCR3 acoplado a PE-Cy7 (1:50, Clona 1C6/CXCR3), CXCR4 acoplado a PE-Cy7 (1:50, Clona: 12G5), CXCR7 acoplado a APC (1:50, Clona: 10D1-J16), CCR7 acoplado a Alexa flúor 647 (1:50, Clone: 150503), CD44 acoplado a PE (1:50, Clone: G44-26) (todos los anticuerpos son monoclonales y hechos en ratón antihumano, proceden de BD Biosciences; excepto para anti-CXCR7 que fue de Biolegend). Finalmente, las células se incubaron con 7AAD (7-amino-actinomicina, BD Biosciences). Para la tinción intracelular, las células se bloquearon con un anticuerpo IgG inespecífico diluido 1:100 en PBS 1X suplementado con SFB al 3% posteriormente, se realizó un lavado con Phosflow Perm/Wash Buffer I (1X) (PWB 1X; BD Biosciences), se fijaron y permeabilizaron usando la solución de Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences). Para bloquear los receptores intracelulares de Fc, las células se incubaron de nuevo con el anticuerpo IgG inespecífico diluido 1:100 con PWB 1X y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo monoclonal Sox-2 acoplado a Alexa flúor 488 hecho en ratón anti humano (Clona: 245610, BD Biosciences). Todas las adquisiciones se realizaron en el citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson), excepto cuando se analizó Sox-2 en la inhibición de la inducción del fenotipo invasivo/troncal en las células MCF-7 y T47D, en estos casos las adquisiciones de realizaron en el citómetro Guava EasyCyte 8 (Merck Millipore). El análisis de los datos de la citometría se realizó a partir de células viables 7-AAD negativas (excepto para la tinción con Sox-2) utilizando el software FlowJo V10 (TreeStar Inc).

VII.7 Experimento de Invasión

Se resuspendieron 2×10^4 células en 200 μ L de su respectivos medios de cultivo con o sin SFB, se colocaron en un inserto de 6,5 mm de diámetro y cuyo poro es de 8 μ m, el cuál contenía una capa de matrigel posteriormente, el inserto se colocó placa de cultivo de 24 pozos conteniendo 800 μ L de su respectivo medio de cultivo suplementado con cualquiera de los siguientes quimioatrayentes: SFB al 10%, los diferentes MCs o 100 ng/mL de CXCL12 (del inglés C-X-C motif ligand 12, también conocido como SDF-1 α , PeproTech). Para neutralizar la actividad biológica de CXCL12 presente en los MC-AA, se agregó 0.5 μ g/mL del anticuerpo

neutralizante cabra anti humano CXCL12/SDF-1 (R&D Systems, Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de 24 h de incubación a 37°C, las células invasivas se tiñeron con cristal violeta y se observaron usando el microscopio Motic AE31 y las imágenes se adquirieron con una cámara digital (Moticam 5.0 MP). Cuando las células invadieron en grupos nos fue imposible contarlas, en estos casos se cuantificó la intensidad de la tinción del cristal violeta utilizando el software Image Pro Plus y la DOI de células invasoras fue obtenida.

VII.8 Análisis de TGF- β y perfil de citocinas

La concentración de TGF- β en los MCs de las líneas de CaM fue analizado a través del Kit TGF- β Quantikine ELISA (R&D Systems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para determinar el perfil de citocinas en los MCs y sueros de pacientes con CaM, la concentración en pgs/mL de G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-12 p70, Interferon- α 2 (INF- α 2), MCP-1, RANTES, EGF, VEGF, CXCL12 y las metaloproteasas MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 and MMP-10 se determinaron con el Kit comercial Milliplex HCYTOMAG-60K (Merck Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los datos se realizó en el programa xPONENT®.

VII.9 Formación de Tumoresferas

Después de la inducción del fenotipo invasivo/troncal, se sembraron suspensiones de una sola célula a una concentración de 100 células/100 μ L en placas de 96 pozos de ultrabaja adherencia (Corning Costar) utilizando el medio MammoCult más factores de crecimiento (StemCell Technologies). Los cultivos se monitorearon durante 7 días. Las tumoresferas se observaron y fotografiaron usando un microscopio Motic AE31 y con una cámara digital (Moticam 5.0 MP). Esferas > 50 μ m fueron contadas y representadas gráficamente.

VII.10 qRT-PCR del arreglo Células Troncales Cancerosas

Para identificar los genes responsables del fenotipo invasivo/troncal inducido, se analizó la expresión de 84 genes asociados a Células Troncales Cancerosas utilizando el arreglo RT² profiler Células Troncales Cancerosas humanas (Qiagen, REF PAHS-176Z). Se extrajo ARN total de 1X10⁶ células inducidas y controles usando el Mini Kit RNeasy®. La pureza y la calidad del ARN aislado se determinaron midiendo la relación de los valores de absorbancia a 260 y 280 nm. El ADNc se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN total usando el Kit RT² First Strand el

cual, incluye un paso adicional de eliminación de ADN genómico presente en la muestra y un control específico para la transcripción reversa. La qRT-PCR se realizó utilizando el PCR Array y una Master Mix RT2 SYBR Green ROX FAST Master Mix. Las muestras se corrieron en el equipo Rotor Gene Q (Qiagen). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). El valor $\Delta\Delta CT$ de cada gen se normalizó a los genes expresados constitutivamente e incluidos en el arreglo. Los genes con cambios de expresión más de 2 veces después de la normalización se consideraron significativos. El análisis de datos se realizó en el portal de Qiagen de análisis de datos disponible en <http://www.qiagen.com/mx/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>. Se analizaron tres repeticiones biológicas.

VII.11 Análisis de agrupación (Mapa de calor y Clustergrama)

Las muestras y condiciones analizadas fueron las siguientes: células MCF-7 y T47D cultivadas con sus medios de cultivo habituales (condiciones: MCF-7 y T47D) o con su propio MC (condiciones: MCF-7 + M7, MCF-7 + T4, T47D + M7, T47D + T4) o el MC de las células de CaM-AA (condiciones: MCF-7 + HS, MCF-7 + 231, T47D + HS, T47D + 231). El clustergrama jerárquico y el mapa de calor no supervisado se construyeron usando el portal de internet de análisis de datos de la PCR de los arreglos RT² Profiler de Quiagen. La expresión de los 84 genes relacionados con CSCs se representó como un gráfico de mapa de calor y las muestras se agruparon de acuerdo a sus patrones de expresión génica.

VII.12 Análisis Bioinformáticos y estadísticos y representación de la red.

Con el fin de identificar los genes que se expresaron diferencialmente en el arreglo de CSC entre las líneas celulares de CaM cultivadas en medios acondicionados -NA y -AA, se analizaron los datos de veces de regulación mediante la prueba t de dos colas impar y se consideraron estadísticamente significativos con un valor de $p < 0.05$. La prueba t se realizó con el paquete R 'stats', versión de software 3.3.3 (50). Se generó una lista de genes potenciales regulados en líneas celulares de CaM cultivadas con los MCs fusionando los genes expresados diferencialmente del arreglo de CSC con las moléculas encontradas experimentalmente y que participaron en la inducción del fenotipo agresivo. La lista de genes expresados diferencialmente se introdujo en el módulo de inferencia del factor de transcripción del motor de búsqueda X2K versión 1.6 (<http://www.maayanlab.net/X2K/>) para identificar

elementos que probablemente sean reguladores río arriba. La inferencia del factor de transcripción se realizó utilizando la base de datos ChEA que contiene información de los estudios CHIP-X del factor de transcripción (CHIP-chip, CHIP-seq, CHIP-PET) extraídos de las publicaciones (51). El organismo de fondo se configuró como "humano". Se generó una nueva lista de genes que incluía los genes expresados diferencialmente, los principales 10 factores transcripcionales ordenados por el valor p y los genes de las moléculas encontradas experimentalmente y que participaron en la inducción del fenotipo agresivo. Se generó una red de interacción funcional (InFu) utilizando la nueva lista de genes como entrada de la herramienta de análisis de conjunto de genes del plugin de Reactome FI (52) implementado en Cytoscape. La red de InFu se fusionó con las interacciones transcripcionales del análisis de ChEA para obtener una red más completa y analizar las medidas de centralidad (por ejemplo, centralidad de cercanía y centralidad entre las redes). Las mediciones de visualización y centralidad se realizaron utilizando el software Cytoscape versión 3.5 (53).

VII.13 Análisis Estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Prisma, versión 5.01 (GraphPad) usando la pruebas: t de Student, para más de dos grupos de datos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de Tukey como prueba post hoc o la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con Dunnett como prueba post hoc cuando los datos perdieron normalidad y/o homogeneidad en las varianzas. Los valores significativos de $P \leq 0.05$ se indicó con un asterisco *, ≤ 0.01 se indicó con dos asteriscos ** y ≤ 0.001 se indicó con tres asteriscos ***.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Células agresivas de cáncer de mama promueven características mesenquimales e invasivas en células no agresivas.

Definimos a las células RE positivo MCF-7 y T47D como CaM-NA y a las células triple negativas HS578T y MDA-MB-231 como CaM-AA basado en la expresión de los marcadores de la TEM Caderina-E y Vimentina así como, por sus propiedades invasivas (**Figura 4A y B**). En modelos murinos se describió que las CaM-NA no metastatizan mientras que las CaM-AA son altamente metastásicas (54). Debido a que durante la metástasis la comunicación celular es importantemente mediada por los factores secretados (55), evaluamos si las células de CaM-NA cultivadas con el MC proveniente de las células de CaM-AA, y viceversa, modifican una a la otra sus características de agresividad. La **Figura 4C** muestra que las células MCF-7 redujeron sus niveles de Caderina-E cuando fueron cultivadas con el MC de HS578T, con DOI basal de 22.000 a una DOI de 8.000, mientras que con el MC de las células MDA-MB-231, los niveles de Caderina-E fueron indetectables. Esta reducción de Caderina-E correlaciona con la adquisición de la capacidad de las células para invadir, observando un promedio de 10 y 30 células/campo de MCF-7 que invadieron cuando se cultivaron en los MC de HS578T y MDA-MB-231, respectivamente. Lo mismo ocurrió para las células T47D, observándose una reducción del DOI de Caderina-E de 50,000 a menos de 500 y de 15 a 20 células invasoras/campo tras el cultivo con el MC de las líneas agresivas (**Figura 4D**). Por el contrario, no se observaron cambios significativos en las células de CaM-AA cuando fueron cultivadas con el MC derivados de células de CaM-NA (dato no mostrado). Por lo tanto, estos resultados apoyan la capacidad de las células tumorales agresivas para transmitir lateralmente características de agresividad a células no agresivas, caracterizado por un fenotipo parcial de TEM con una reducción en los niveles de Caderina-E pero no inducción significativa de Vimentina y aumento en su capacidad de Invasión.

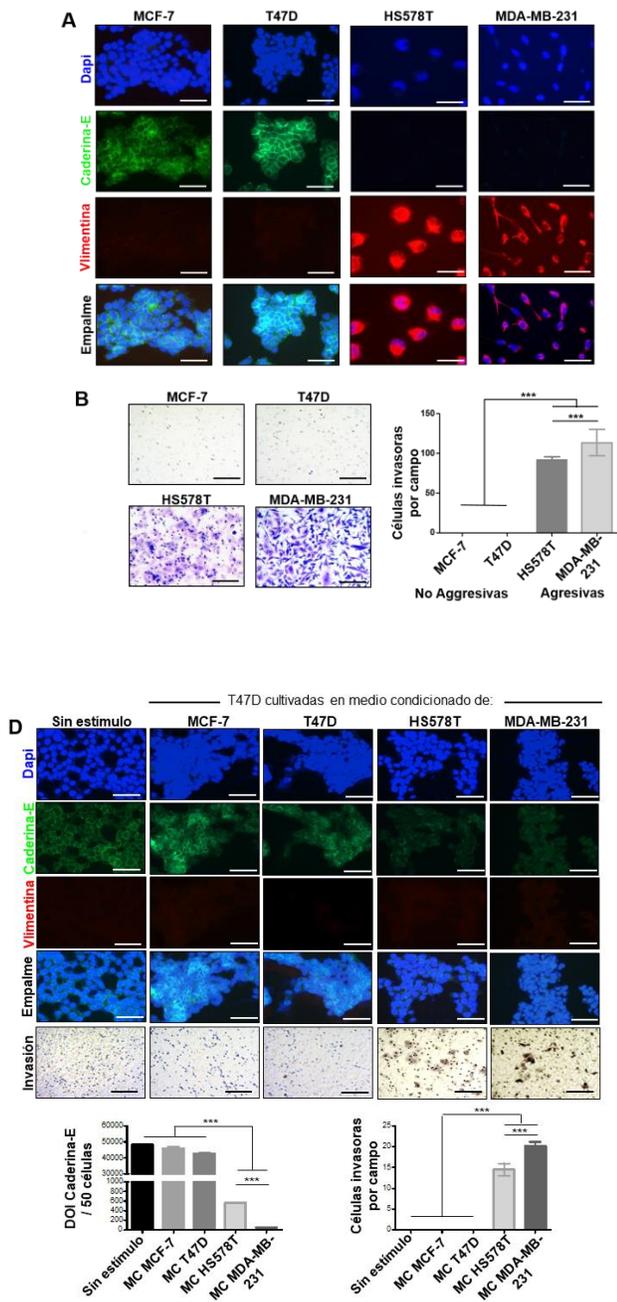


Fig 4. Células de CaM agresivas promueven características mesenquimales e invasivas a células no agresivas. A) Análisis de la expresión basal de los marcadores de la TEM, Caderina-E (verde) y Vimentina (rojo), núcleos marcados con DAPI (azul) por inmunofluorescencia (IF). B) Experimentos de invasión. Células C) MCF-7 y D) T47D se cultivaron con MC proveniente de las líneas celulares de CaM-AA HS578T y MDA-MB-231 durante 72 h. Como controles, las células MCF-7 y T47D fueron cultivadas con los MCs de CaM-NA o cultivadas en sus medios habituales (sin estímulo). El panel superior muestra imágenes representativas de IF de marcadores de la TEM e imágenes ópticas de experimentos de invasión. El panel inferior muestra gráficas del DOI (Densidad Óptica Integrada) de los niveles de Caderina-E y el número de células invasivas. Los datos representan la media \pm SEM (Error estándar de la media o SEM por sus siglas en inglés) de 3 experimentos independientes; *** $P < 0.001$. La escala de las barras indica 100 μ m. Ampliación 400X para las imágenes de IF y 100X para las imágenes ópticas.

VIII.2 El papel del eje CXCL12-CXCR4/CXCR7 en el fenotipo invasivo-inducido

CXCL12 es una quimiocina esencial frecuentemente involucrada en la migración de células de CaM (56), similarmente los receptores de CXCL12, CXCR4 y CXCR7 y también CXCR3 y CCR7 son receptores de quimiocinas conocidos por mediar la metástasis de células de CaM (57). Para explorar más a fondo el mecanismo por el cual las células de CaM-AA inducen la invasión de las células de CaM-NA, analizamos la concentración de CXCL12 en el MC de todas las líneas de CaM y los niveles de expresión de los receptores de quimiocinas en las células de CaM-NA tratadas con el MC de las células de CaM-AA. Aunque se encontraron altos niveles de CXCL12 en el MC de todas las líneas celulares de CaM, no se encontraron diferencias significativas entre las células agresivas y no agresivas (**Figura 5A**). De los receptores de quimiocinas, se encontró un resultado discreto y más heterogéneo con CXCR3, con respecto a CXCR4, CXCR7 y CCR7, éstas incrementaron significativamente su expresión sólo en respuesta al MC de las CaM-AA; CXCR4 y CXCR7 cambiaron su expresión en ambas células de CaM-NA, mientras que CCR7 sólo cambió en las T47D inducidas (**Figura 5B**). Debido a que CXCR4 y CXCR7 son los receptores para CXCL12, CXCL12 fue usada como factor quimioatrayente en los experimentos de invasión. Interesantemente, encontramos que ambas líneas de CaM-NA inducidas-invasivas migran en respuesta a esta quimiocina (**Figura 5C**). Para conocer si el MC de las células de CaM-AA también podría atraer a las células, se cultivaron las células de CaM-NA con los MC de CaM-AA como se describió anteriormente, y posterior se sometieron a un experimento de invasión en el que los mismos MC que se utilizaron para estimular, se usaron como factor quimioatrayente. Observamos las células MCF-7 y T47D inducidas-invasivas invadieron también en respuesta a los MC de las líneas de CaM-AA, siendo las MCF-7 más responsivas que las T47D. Además, el MC de las células MDA-MB-231 dió una respuesta más potente que el MC de las células HS578T, con una media de DOI/campo de células invasoras de 900,000 para MCF-7 y 320,000 para T47D (**Figura 5D**). Las células no invaden en ausencia de quimioatrayente (datos no mostrados). Para confirmar que CXCL12 tiene un papel importante en el fenotipo invasivo, se realizaron experimentos de invasión en las células MCF-7 y T47D inducidas usando como factor quimioatrayente el MC de las células de CaM, solo o conteniendo un anticuerpo neutralizante para CXCL12. Observamos que las células NA-CaM disminuyen su capacidad de invasión en presencia del anticuerpo inhibitorio de CXCL12 (**Figura 5E**). Estos resultados apoyan que el

MC proveniente de las células de CaM-AA induce propiedades invasivas a las células de CaM-NA junto con la regulación a la alta de CXCR4 y CXCR7 y que estas células de CaM-NA inducidas-invasivas se mueven en respuesta a CXCL12.

VIII.3 Respuesta independiente a TGF- β pero dependiente a G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1

Nos preguntamos si TGF- β era responsable del fenotipo invasivo-inducido. Cuando cuantificamos los niveles de TGF- β en el MC de las líneas celulares de CaM, encontramos un mayor concentración de este factor en el MC de las líneas celulares de CaM-AA (media de 343 y 377 pgs/mL en las células HS578T y MDA-MB-231, respectivamente) que en el MC de las CaM-NA (80 y 14 pgs/mL en las células T47D y MCF-7, respectivamente) (**Figura 6A**). Posteriormente, usamos un anticuerpo neutralizante anti-TGF- β para evaluar si esta citocina era responsable del fenotipo invasivo-inducido de las células de CaM-NA. Para ello, se estimularon las células de CaM-NA durante 72 h con los MC de las células de CaM-AA en presencia del anticuerpo neutralizante anti-TGF- β . Sorprendentemente, se siguió observado una reducción del DOI de Caderina-E promovida por el MC de las células de CaM-AA (**Figura 6B**). Del mismo modo, la células de CaM-NA estimuladas mantuvieron su capacidad invasiva a pesar de la presencia del anticuerpo neutralizante (**Figura 6C**). Adicionalmente, añadimos a las MCF-7 y T47D TGF- β exógeno a diversas concentraciones durante 72 h, y no observamos variaciones en la expresión de Caderina-E y Vimentina. Por lo consiguiente, tampoco observamos inducción de características invasivas por TGF- β (**Figura 6D**). TGF- β induce su propia expresión en las células de cáncer cervical Caski (58). TGF- β exógeno aumentó su propia expresión génica en las células Caski y el anticuerpo neutralizante abolió esta inducción, lo que indica que tanto el TGF- β recombinante como el anti-TGF- β fueron funcionales (datos nos mostrados).

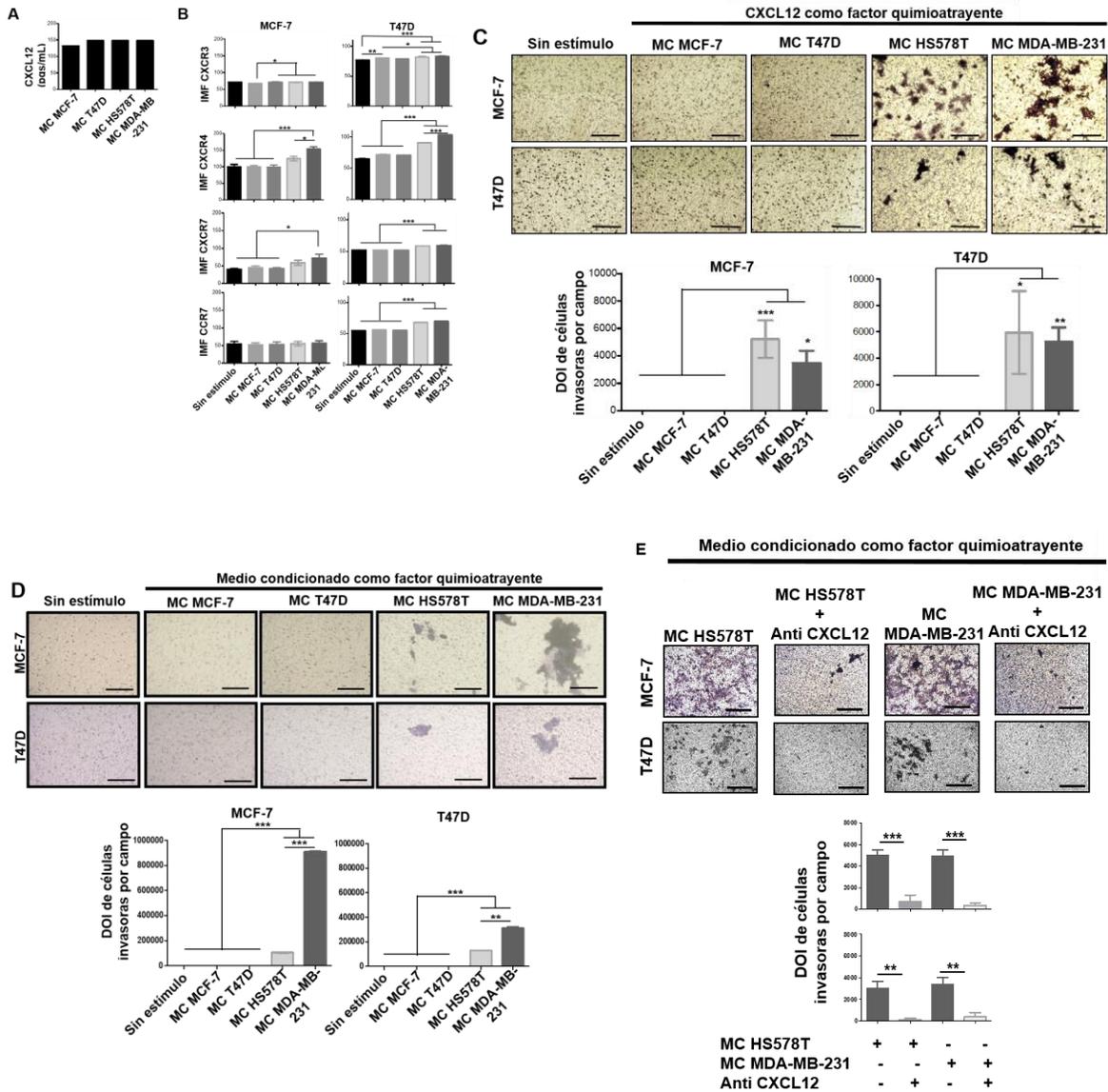


Fig. 5. El eje CXCL12-CXCR4/CXCR7 en el fenotipo invasivo-inducido. A) Niveles de CXCL12, expresados en pgs/mL en los MCs de las líneas celulares de CaM. B) Células MCF-7 y T47D se cultivaron con los MC provenientes de líneas celulares de CaM-AA y controles, se midió la expresión de los receptores de quimiocinas por citometría de flujo. Se realizaron experimentos de invasión utilizando C) CXCL12 o D) MCs como quimioatrayentes. Para E), MCs provenientes de células de CaM-AA fueron usados como quimioatrayentes y 0.5 µg/mL de un anticuerpo neutralizante para CXCL12 fue agregado a los MCs. Las células invasivas se cuantificaron después de 24 h. Se muestran imágenes representativas (100X ampliación) y se cuantificaron los valores de DOI de las células invasoras. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. La escala de las barras indica 100 µm.

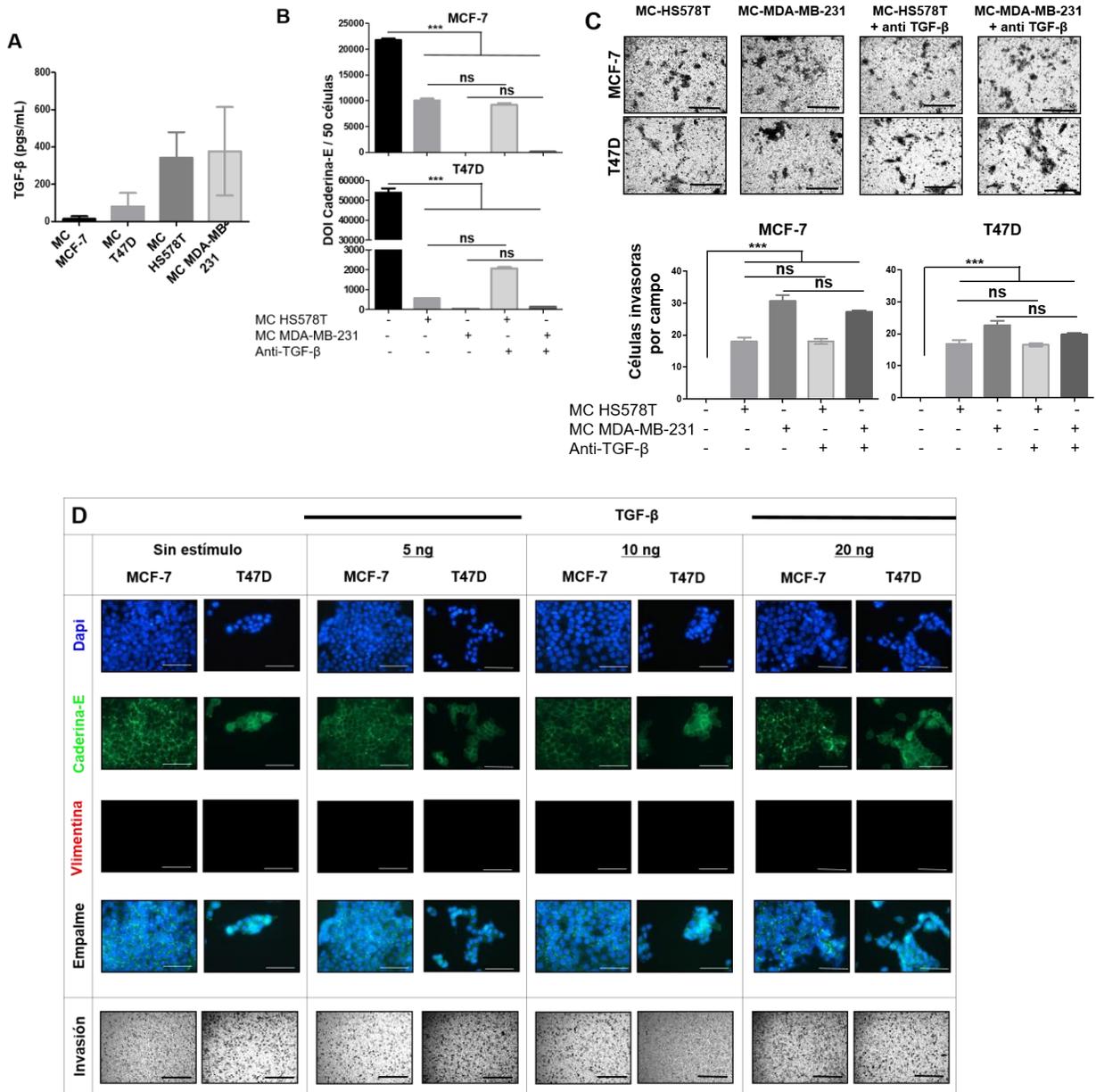


Fig. 6. El fenotipo invasivo-inducido es independiente de TGF-β. A) Se midió la concentración de TGF-β expresada en pgs/mL en los MCs de todas las líneas de CaM, los datos fueron graficados. El fenotipo invasivo-inducido fue activado con los MCs de las de CaM-AA en presencia de 2 μg/mL de un anticuerpo neutralizante anti-TGF-β. Después de 72 h de cultivo, B) Marcadores de la TEM fueron analizados por IF y los DOI de la expresión de Caderina-E fueron cuantificados y graficados, y C) se realizaron experimentos de invasión. D) Análisis de los marcadores de la EMT y experimentos de invasión de las células de CaM-NA tratadas con concentraciones incrementadas de TGF-β. Se muestran imágenes representativas. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. *** $P < 0.001$, ns= no significativo. La escala de las barras indica 100 μm. La ampliación es 400X para IF y 100X para los experimentos de invasión.

Posteriormente, analizamos la presencia en el MC de las líneas celulares de CaM de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y metaloproteasas (MMPs) que previamente hubieran sido asociados con invasión y/o inducción de TEM en células tumorales (37, 59). Los analitos estudiados son los siguientes: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés; también conocida como CSF-3), Factor estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés; también conocida como CSF-2), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-12p70, Interferón- α 2 (INF- α 2), Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1 (MCP-1, por sus siglas en inglés), Regulada en la Activación, Expresión de células T normales y Secretada (RANTES, por sus siglas en inglés; también conocida como CCL5), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 y MMP-10. De todos estos analitos, encontramos diferencias importantes entre los MC de las células de CaM-NA y -AA en los niveles de G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1 (**Figura 7A**). Estas citocinas son conocidas por inducir diferenciación, proliferación y activación de células mieloides reclutadas al tumor por el microambiente, pero también se ha observado que inducen activación autócrina en células tumorales (60-62). Para evaluar si estos factores participan en el fenotipo invasivo-inducido, las células MCF-7 y T47D fueron cultivadas en medio suplementado con G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1 durante 72 horas. Encontramos que las células MCF-7 fueron altamente sensibles a estas citocinas; con G-CSF y GM-CSF se indujo una pérdida parcial de Caderina-E, mientras que con IL-8 y MCP-1 se observó una pérdida casi completa en los niveles de Caderina-E (**Figura 7B**, panel izquierdo), también observamos que la expresión de CXCR4 incrementó significativamente en respuesta a todas las citocinas mientras que CXCR7 incrementó solo en respuesta a IL-8 y MCP-1 (**Figura 7C**, panel izquierdo), los resultados anteriores correlacionan con la inducción de invasión (**Figura 7D**, panel izquierdo). Estos datos muestran una correlación entre IL-8/MCP-1 con la inducción de CXCR7 y la reducción de Caderina-E y una invasión incrementada.

Los resultados obtenidos en las células T47D son más complejos. Sólo observamos una reducción muy discreta en los niveles de Caderina-E en la estimulación con IL-8 y MCP-1 (**Figura 7B**, panel derecho). También observamos que la expresión de CXCR4 incrementó en respuesta a todas las citocinas mientras que CXCR7 incrementó solo en respuesta a IL-8 y MCP-1 (**Figura 7C**, panel derecho). Sin embargo, el experimento de invasión no fue claro,

solo G-CSF, GM-CSF y MCP-1 indujeron invasión pero a niveles bajos, mientras que IL-8 no lo hizo (**Figura 7D**, panel derecho). Interesantemente, observamos que el SFB fue un quimioatrayente más potente para las células T47D activadas con las citocinas (**Figura 7E**), mientras que CXCL12 como quimioatrayente lo fue para las células MCF-7 (**Figura 7D**) aun en células estimuladas con IL-8. El cóctel con las cuatro citocinas, no promovió la pérdida de Caderina-E o el aumento de la invasión de las células de CaM-NA en mayor medida que las citocinas individuales (datos no mostrados). La expresión de Vimentina no fue inducida bajo estas condiciones experimentales tal y como hemos observado previamente con los MCs de las CaM-AA (datos no mostrados y **Figura 4C y D**). Todos estos datos dan soporte al papel de G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1 en el fenotipo invasivo-inducido de las células de CaM-NA, con una actividad predominante de IL-8 y MCP-1 sobre las células MCF-7 y un efecto más variado en las células T47D. Estos datos indican que, aunque las células MCF-7 y T47D son altamente plásticas reaccionando a las señales comunicadas por las células tumorales agresivas, existen diferencias significativas entre los mecanismos de comportamiento agresivo-inducido mostrados por cada línea celular. Después analizamos la concentración de las citocinas CXCL12, G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1 y de las metaloproteinasas MMP-1 y MMP-2 en sueros de pacientes con CaM (excepto UIVC-IDC-1, -4 y -9; ver **Tabla I** para las características clínicas de los pacientes) y controles sanos, encontrando niveles detectables de todos estos analitos. Debido a que sólo se pudo obtener cinco sueros de cada subtipo de CaM no se realizó ningún análisis estadístico (**Figura 7F**).

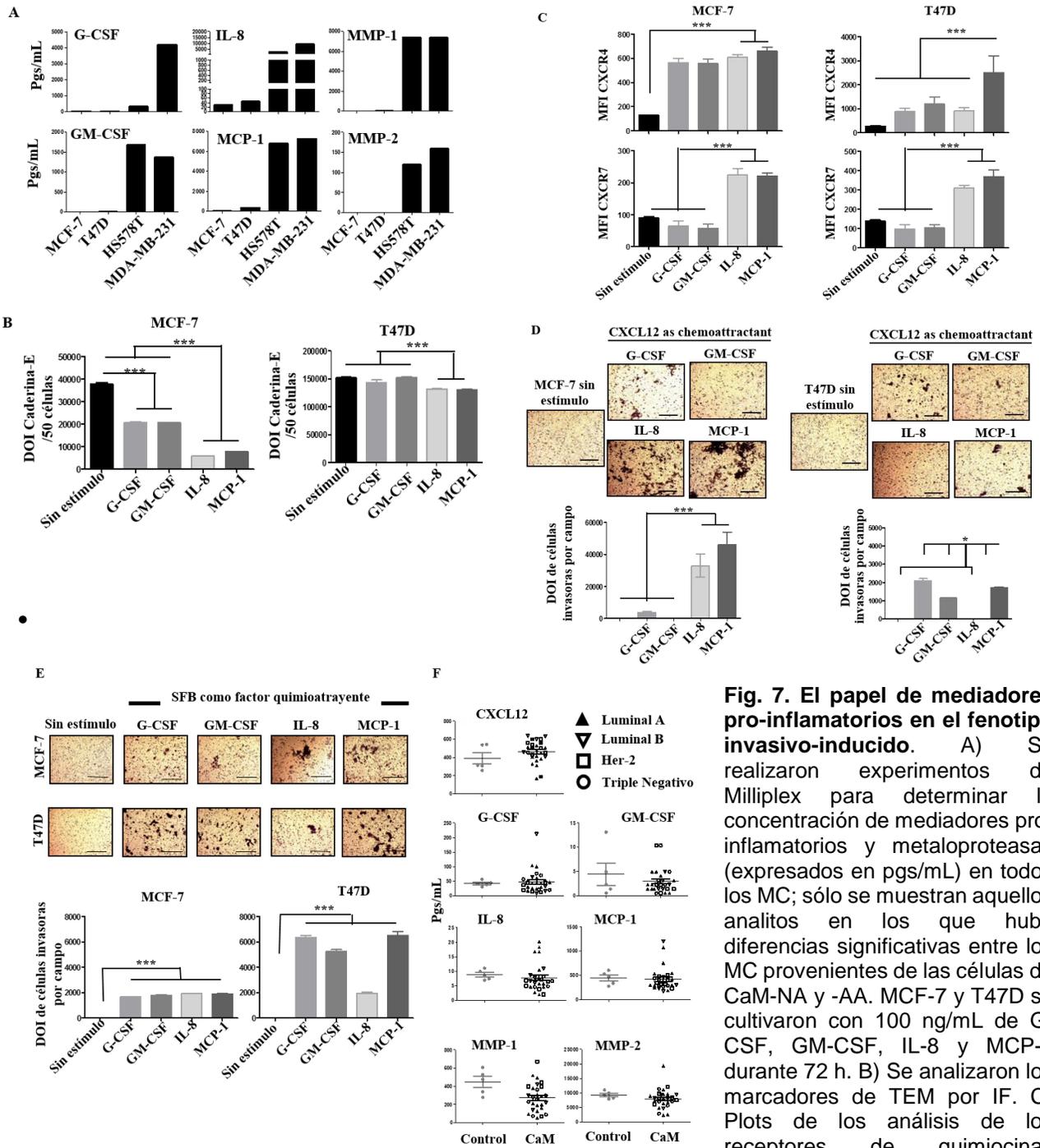


Fig. 7. El papel de mediadores pro-inflamatorios en el fenotipo invasivo-inducido. A) Se realizaron experimentos de Milliplex para determinar la concentración de mediadores pro-inflamatorios y metaloproteasas (expresados en pgs/mL) en todos los MC; sólo se muestran aquellos analitos en los que hubo diferencias significativas entre los MC provenientes de las células de CaM-NA y -AA. MCF-7 y T47D se cultivaron con 100 ng/mL de G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1 durante 72 h. B) Se analizaron los marcadores de TEM por IF. C) Plots de los análisis de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CXCR7 por citometría de flujo. Experimentos de invasión utilizando CXCL12 (D) o SFB (E) como quimioatrayente. F) Se realizó un experimento de Milliplex para determinar la concentración de los mediadores pro-inflamatorios y metaloproteasas de interés en sueros de pacientes con CaM y controles sanos. Los resultados se muestran en las imágenes representativas y las gráficas. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. Sólo dos duplicados fueron analizados para (E). En los paneles de las células T47D de (D), IL-8 fue significativamente diferente a las otras citocinas (* $P < 0.05$). La escala de las barras indica 100 μ m. La ampliación es de 100X.

CXCR4 y CXCR7 por citometría de flujo. Experimentos de invasión utilizando CXCL12 (D) o SFB (E) como quimioatrayente. F) Se realizó un experimento de Milliplex para determinar la concentración de los mediadores pro-inflamatorios y metaloproteasas de interés en sueros de pacientes con CaM y controles sanos. Los resultados se muestran en las imágenes representativas y las gráficas. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. Sólo dos duplicados fueron analizados para (E). En los paneles de las células T47D de (D), IL-8 fue significativamente diferente a las otras citocinas (* $P < 0.05$). La escala de las barras indica 100 μ m. La ampliación es de 100X.

Tabla 1. Características clínicas de las pacientes.

Sueros de pacientes	Subtipo Histológico	Estadio TNM	Estadio clínico	Clasificación Molecular
UIVC-IDC-13	IDC	T2, N0, M0	IIA	Triple Negativo
UIVC-IDC-14	IDC	T1, N0, M0	I	Luminal B
UIVC-IDC-15	IDC	T1, N0, M0	I	Luminal A
UIVC-IDC-16	IDC	T1, N0, M0	I	Triple Negativo
UIVC-IDC-17	IDC	SD	SD	Her-2
UIVC-IDC-18	IDC	SD	SD	Luminal A
UIVC-IDC-19	IDC	T2, N0, M0	IIA	Triple Negativo
UIVC-IDC-20	IDC	SD	SD	Luminal B
UIVC-IDC-21	IDC	SD	SD	Her-2
UIVC-IDC-22	IDC	T1, N0, M0	I	Luminal A
UIVC-IDC-23	IDC	T1, N1, M0	IIA	Luminal A
UIVC-IDC-24	IDC	T1, N0, M0	I	Luminal A
UIVC-IDC-25	IDC	T2, N0, M0	IIA	Triple Negativo
UIVC-IDC-26	IDC	T2, N0, M0	IIA	Her-2
UIVC-IDC-27	IDC	T2, N0, M0	IIA	Luminal A
UIVC-IDC-28	IDC	T2, N1, M0;	IIB	Her-2
UIVC-IDC-29	IDC	T1, N0, M0	I	Luminal A
UIVC-IDC-30	IDC	T3, N0, M0	IIB	Luminal A
UIVC-IDC-31	IDC	T2, N0, M0	IIA	Luminal A
UIVC-IDC-32	IDC	T1, N0, M0	I	Her-2
UIVC-IDC-33	IDC	T3, N1, M0	IIIA	Luminal A
UIVC-IDC-34	IDC	T2, N0, M0	IIA	Luminal B
UIVC-LC-2	ILC	T3, N1, M0	IIIA	Triple Negativo
UIVC-LC-3	ILC	T2, N1, M0	IIB	Luminal A
UIVC-MC-2	MC	T1, N1, M0	IIA	Luminal B
UIVC-MC-3	MC	T3, N1, M0	IIIA	Luminal B
UIVC-MC-4	MC	T2, N0, M0	IIA	Her-2
UIVC-MC-5	MC	T2, N0, M0	IIA	Luminal A

IDC: Carcinoma Ductal Invasivo, ILC: Carcinoma Lobular Invasivo, MC: Carcinoma Mixto (Lobular/Ductal), SD: sin datos.

VIII.4 CD44, Oct-4 y Sox-2 son regulados a la alta en las células invasivas-inducidas.

El receptor para el ácido hialurónico (también conocido como CD44) ha sido ampliamente asociado con un fenotipo de CSC; Oct-4 y Sox-2 son factores de transcripción esenciales involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia durante la embriogénesis, y la inducción de su expresión se ha visto en varios tipos de cáncer tras la adquisición de potencial metastásico y la inducción de la TEM (63, 64). Cuando evaluamos la expresión de estos marcadores asociados a CSC en las líneas celulares de CaM encontramos que fueron nulas (MCF-7 = 0% de las células positivas) o poco frecuente (T47D = 2.83%) CD44 positivas en las líneas de CaM-NA, mientras que estaban altamente representadas en las líneas de CaM-AA, HS578T (90.8%) y MDA-MB-231 (96.1%) (**Figura 8A**). Una observación similar encontramos para Oct-4 y Sox-2 (**Figura 8B**). Nos preguntamos si el fenotipo invasivo-inducido correlacionaría con la adquisición de estos marcadores asociados a CSCs. Encontramos que, tanto la frecuencia de células CD44 positivas como la IMF de la expresión de CD44 fueron inducidos en las células de CaM-NA tras el tratamiento con los MCs provenientes de las CaM-AA (**Figuras 8C y D, respectivamente**). Las células T47D fueron las más sensibles a la estimulación ya que más de la mitad de las células expresaron CD44 tras el tratamiento con el MC de MDA-MB-231. También observamos un incremento significativo en la expresión de Oct-4 y Sox-2 en las células MCF-7 tras la estimulación con los MCs provenientes de las células de CaM-AA (**Figura 8E**). Las células T47D cambiaron significativamente la expresión de Sox-2 tras la estimulación, mientras que los niveles de Oct-4 se mantuvieron bajos (**Figura 8F**). Un análisis más cuantitativo de la frecuencia de células que expresan Sox-2 por citometría de flujo confirmaron los resultados del análisis de inmunofluorescencia (**Figura 8G**). La formación de tumoresferas se ha utilizado ampliamente como modelo para estudiar a las CSC (65), por lo que estudiamos en las líneas celulares de CaM su potencial en la formación de esferas en su estado basal y en el fenotipo inducido. Observamos que todas las células de CaM mostraron capacidades similares de formación de tumoresferas (**Figura 8H**), la única diferencia encontrada fue la morfología de éstas, las células de CaM-AA formaron esferas menos adherentes que se asemejan a agregados celulares, típicos de líneas celulares agresivas con una baja expresión de proteínas de adhesión (66). Cuando las células de CaM-NA se trataron con el MC de las CaM-AA, la

frecuencia y morfología de las tumoresferas permanecieron sin cambios; sin embargo, se observaron esferas de mayor tamaño (**Figura 8I**). Tomando en conjunto todos estos datos se muestra que el fenotipo invasivo-inducido correlaciona con la adquisición de un fenotipo asociado a CSCs, definido por la expresión de los marcadores de troncalidad CD44, Oct-4 y Sox-2, y también con la formación de tumoresferas de mayor tamaño en placas de ultra baja adherencia.

Evidencia de transmisión lateral de características agresivas entre diferentes tipos de células de cáncer de mama.

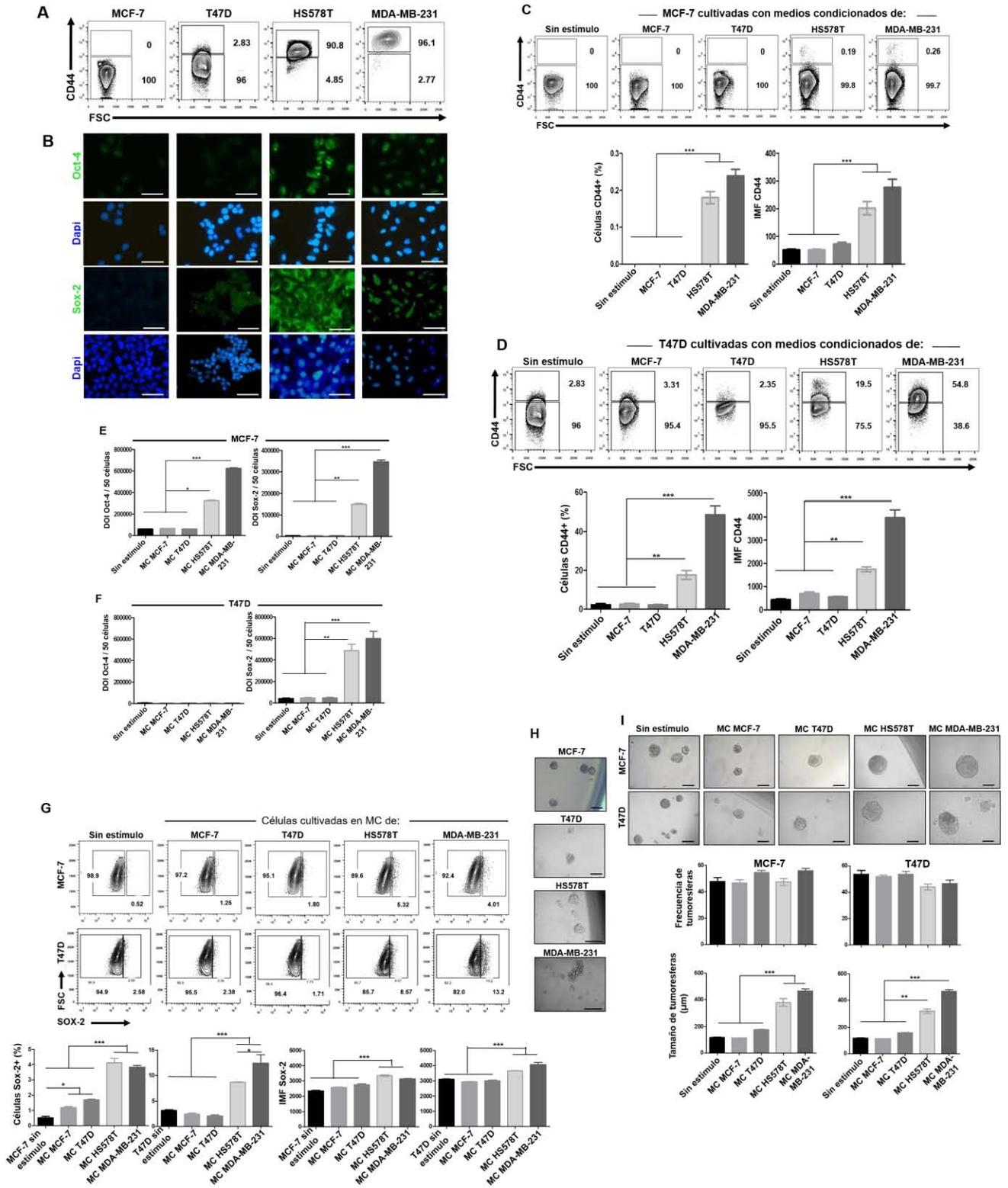


Fig. 8. El fenotipo invasivo-inducido correlaciona con la adquisición de marcadores de troncalidad.

Análisis de la expresión basal de los niveles de los marcadores de troncalidad CD44 por citometría de flujo (A), y Oct-4 y Sox-2 por IF (B). Análisis de los niveles de expresión de CD44 después de la inducción del fenotipo invasivo en MCF-7 (C) y T47D (D). Los paneles superiores muestran la expresión de CD44 y los paneles inferiores muestran las gráficas de la frecuencia de las células CD44+ y la IMF de CD44. Se muestra el análisis de la DOI de Oct-4 y Sox-2 en las células MCF-7 (E) y T47D (F). G) Sox-2 fue examinado por FACS; los paneles superiores muestran imágenes representativas de las gráficas de la densidad celular, mientras que la frecuencia de células Sox-2 positivas y la expresión de la IMF de Sox-2 se representan gráficamente debajo. H) Se analizó la eficiencia intrínseca de cada línea celular de CaM para la formación de esferas en placas de ultra-baja adherencia. I) Formación de esferas después de la inducción del fenotipo invasivo en las células MCF-7 y T47D. Las gráficas muestran la frecuencia y el tamaño de las tumoresferas. Los datos representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, se muestran imágenes representativas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. La escala de las barras indica 100 μ m (B), 50 μ m para MCF-7 y T47D y 100 μ m para HS578T y MDA-MB-231 en las tumoresferas (H e I). 400X de aumento.

VIII.5 La vía de NF κ B como regulador del fenotipo invasivo/troncal-inducido

Para identificar genes que se regulan diferencialmente durante la inducción del fenotipo invasivo-inducido, se realizó un arreglo de expresión de genes asociados a CSCs. Un análisis de agrupación jerárquica no supervisada reveló que las células MCF-7 y T47D presentaron distintos perfiles transcripcionales de manera basal (sin tratamiento); aun así, observamos una clara separación entre ambas líneas celulares de CaM-NA tratadas con ambos MC-NA, que se asemejaron a cuando las células no fueron tratadas, y distinto al perfil de expresión después del tratamiento con ambos MC-AA (**Figura 9A**). Los datos de las veces de expresión diferencial de los 84 genes presentes en el arreglo se muestran en el apéndice 1. Para identificar los genes que permiten la separación entre células inducidas y no-inducidas, los resultados de expresión génica del arreglo se sometieron a un análisis de agrupamiento supervisado. Usando la prueba t de Student se identificaron 13 genes con diferencias significativas (p -value < 0.05) de los cuales, 9 fueron regulados a la alta en las células de CaM-NA cuando fueron cultivadas con los MC-AA: *ATXN1*, *CD24*, *GSK3B*, *NANOG*, *NFKB1*, *PLAT*, *SIRT1* y *STAT3*, mientras que 5 fueron regulados a la baja: *CHEK1* (*Checkpoint 1*, por su nombre en inglés), *DACH1* (*Dachshund Family Transcription Factor 1*, por su nombre en inglés), *GATA3* (*GATA Binding Protein 3*, por su nombre en inglés), *NOTCH2* y *WEE1* (*WEE1 G2 Checkpoint Kinase*, por su nombre en inglés) (**Figura 9B** y **Tabla 2**). En este grupo de genes potencialmente concurren los mecanismos por los cuales las células MCF-7 y T47D adquieren el fenotipo invasivo/troncal-inducido. Un mapa de calor basado exclusivamente en estos genes permite distinguir mejor la separación de las células inducidas de las no-inducidas

y la huella intrínseca a cada línea celular que concuerda con los mecanismos de respuesta diferentes encontrados en las células MCF-7 y T47D en los ensayos experimentales realizados (**Figura 9C**).

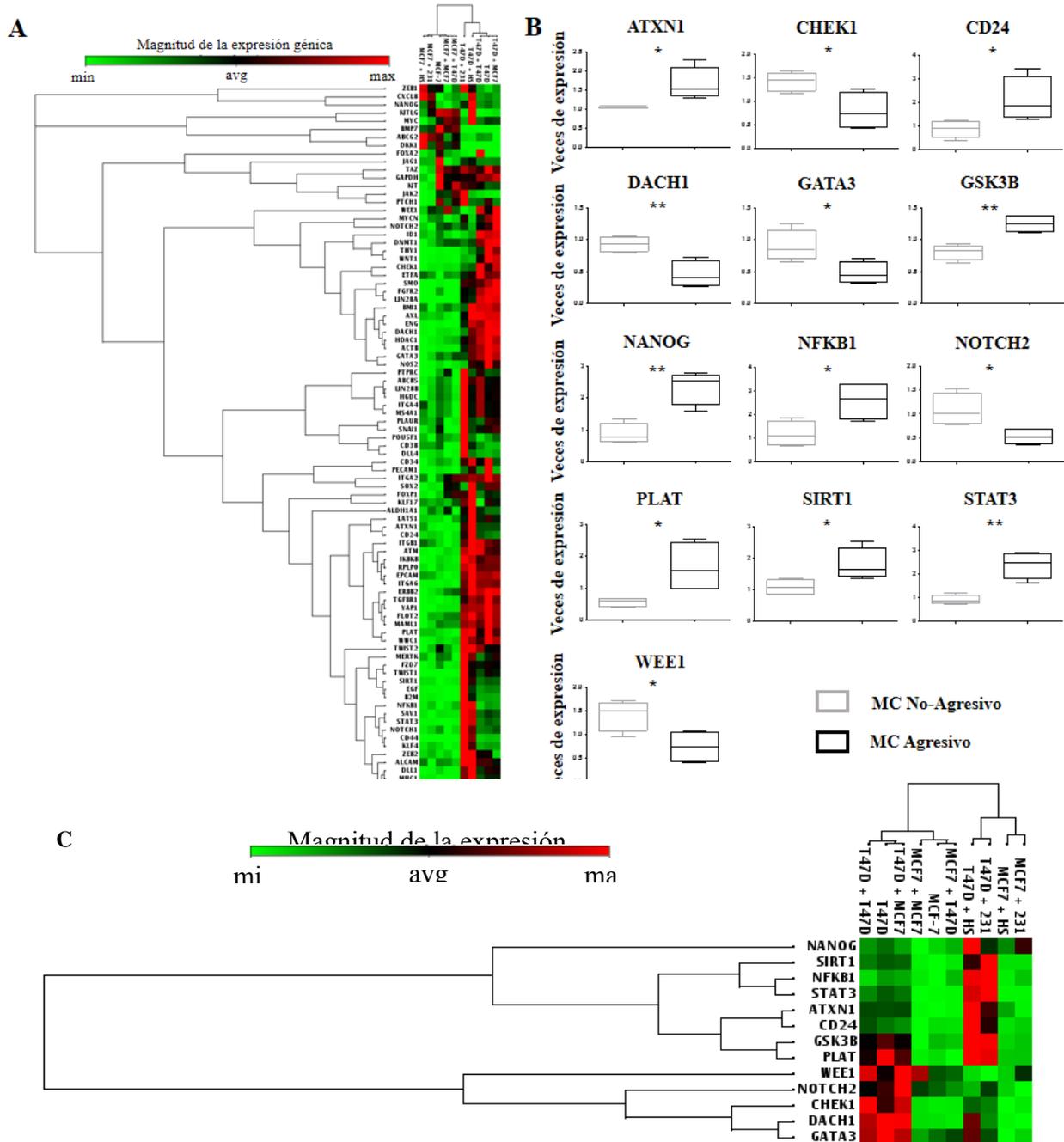


Fig. 9. Análisis de la expresión de genes asociados a CSC. El fenotipo invasivo/troncal fue inducido en las células MCF-7 y T47D y la expresión de los genes asociados a CSCs se analizaron mediante un arreglo de expresión troncal. A) Análisis de agrupación jerárquica no supervisada y diagrama de mapa de calor de acuerdo con los patrones de expresión. (B) Análisis de los genes candidatos agrupados mediante la prueba t de Student después de la estimulación con los MC-NA y MC-AA en las células de CaM-NA. C) Mapa de calor con genes relevantes a la inducción de troncalidad.

MCF7&T47D / MC-NA vs MC-A			
Prueba t no pareada (R stats)			
Gen	p	Gen	p
STAT3	0.0025	DKK1	0.3302
GSK3B	0.0031	ITGA4	0.3330
NANOG	0.0032	ABCG2	0.3516
DACH1	0.0075	POU5F1	0.3569
NFKB1	0.0245	ENG	0.3587
CHEK1	0.0277	FLOT2	0.3681
NOTCH2	0.0284	FOXA2	0.3811
GATA3	0.0291	ID1	0.3980
WEE1	0.0298	FZD7	0.4299
ATXN1	0.0311	CXCL8	0.4596
PLAT	0.0331	FGFR2	0.4803
SIRT1	0.0432	BMI1	0.4897
CD24	0.0453	JAG1	0.4909
DNMT1	0.0587	ERBB2	0.5012
CD34	0.0676	LATS1	0.5022
THY1	0.0731	ALDH1A1	0.5309
KLF4	0.0754	ETFA	0.5539
MUC1	0.0872	KITLG	0.6055
DDR1	0.0882	ZEB2	0.6156
EGF	0.0909	TAZ	0.6331
ITGB1	0.1026	JAK2	0.6371
B2M	0.1109	MYCN	0.6375
KLF17	0.1155	ABCB5	0.6385
EPCAM	0.1486	ITGA6	0.6476
SAV1	0.1488	GAPDH	0.6612
ALCAM	0.1497	SOX2	0.6700
CD44	0.1541	TGFBR1	0.6924
PLAUR	0.1576	TWIST2	0.6948
DLL1	0.1680	SMO	0.7042
NOTCH1	0.1766	HDAC1	0.7159
LIN28A	0.1805	SNAI1	0.7210
ZEB1	0.1861	PTPRC	0.7225
PROM1	0.1896	MYC	0.7246
MERTK	0.2190	NOS2	0.7387
IKBKB	0.2251	ACTB	0.7397
PTCH1	0.2307	LIN28B	0.7762
TWIST1	0.2473	MS4A1	0.7762
WNT1	0.2539	KIT	0.8061
BMP7	0.2879	WWC1	0.8102
DLL4	0.2888	AXL	0.8158
CD38	0.3001	ATM	0.8241
PECAM1	0.3106	FOXP1	0.9055
MAML1	0.3157	YAP1	0.9708
ITGA2	0.3227		

Tabla 2. Firma de expresión génica combinada de las células MCF-7 y T47D inducidas después del análisis de agrupación supervisada.

La expresión de los genes asociados a CSC se cuantificó mediante un arreglo de expresión basado en qRT-PCR. Los experimentos individuales se normalizaron contra HPRT1 y las veces de expresión se calcularon normalizando contra las respectivas células MCF-7 o T47D sin estímulo. Los valores se promediaron después del cálculo $2^{\Delta\Delta Cq}$ aplicándose la prueba t de Student después de la estimulación con los MC-NA y MC-AA en las células de CaM-NA. En gris se muestran los genes con expresión diferencial significativa (p -value < 0.05).

Con el fin de buscar posibles elementos de unión que puedan estar participando en la regulación río arriba de los genes regulados diferencialmente en las células MCF-7 y T47D cultivadas con los MCs -NA y -AA, se realizó una inferencia del factor de transcripción mediante el análisis de enriquecimiento de ChiP-X. Interesantemente, Sox-2 y Oct-4 aparecieron como posibles factores transcripcionales potenciales, que junto con el marcador de troncalidad CD44, los receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 y CCR7, y el marcador epitelial cadherina-E, demostramos su papel en la inducción del fenotipo invasivo/troncal (**Figura 10A, Tabla 3**).

TF (PMID)	Target / Input	Targets / Database	Fraction / Input	Fraction / Database	Difference	P-value	Z-score	Combined Score	Genes
POU5F1 (16153702)	4	622	0.3077	0.0207	0.2870	0.0001	-2.3553	21.3575	NANOG STAT3 DACH1 WEE1
NANOG (16153702)	5	1686	0.3846	0.0562	0.3284	0.0005	-2.4216	18.4265	GATA3 NANOG WEE1 STAT3 DACH1
MITF (21258399)	8	5578	0.6154	0.1859	0.4295	0.0008	-0.6334	4.5565	PLAT SIRT1 STAT3 DACH1 WEE1 ATXN1 NFKB1 GSK3B
SMAD3 (18955504)	5	1936	0.3846	0.0645	0.3201	0.0009	-1.4044	9.7983	GATA3 WEE1 ATXN1 NFKB1 NOTCH2
SMAD2 (18955504)	5	1936	0.3846	0.0645	0.3201	0.0009	-1.4044	9.7983	GATA3 WEE1 ATXN1 NFKB1 NOTCH2
STAT6 (20620947)	3	508	0.2308	0.0169	0.2138	0.0012	-2.0278	13.5789	STAT3 DACH1 ATXN1
SOX2 (16153702)	4	1278	0.3077	0.0426	0.2651	0.0017	-2.2538	14.3241	NANOG STAT3 GSK3B DACH1
AR (19668381)	6	3519	0.4615	0.1173	0.3443	0.0021	-1.0285	6.3185	PLAT DACH1 WEE1 ATXN1 CD24 GSK3B
RUNX1 (21571218)	7	5071	0.5385	0.1690	0.3695	0.0026	-0.1830	1.0881	PLAT SIRT1 STAT3 WEE1 ATXN1 NFKB1 NOTCH2
WT1 (19549856)	2	199	0.1538	0.0066	0.1472	0.0033	-1.8928	10.8063	STAT3 NOTCH2

Tabla 3. Inferencia del factor de transcripción mediante el análisis de enriquecimiento de ChiP-X. Potenciales factores de transcripción que regulan río arriba a los genes regulados diferencialmente en las líneas de CaM-NA cultivadas con los MC-NA vs MC-A.

Para visualizar un probable mecanismo molecular involucrado en la adquisición del fenotipo invasivo/troncal inducido en las células de CaM-NA, construimos una red de InFu usando una lista de genes de entrada que incluye: los genes expresados diferencialmente e identificados en el arreglo de CSC, los factores transcripcionales potencialmente inferidos y el conjunto de moléculas encontradas experimentalmente. La red InFu se generó con el plugin Reactome FI para Cytoscape (52, 53) que accede a la red InFu curada manualmente de Reactome y construida a partir de bases de datos de vías, lo que permite encontrar interacciones funcionales dentro de un conjunto de genes. Se encontró 5 genes que conectan la mayoría de los genes de entrada en una única red: *JUN*, *UBC*, *UB2I*, *HDAC3* y *LYN*. Parte de la red interconecta los genes regulados negativamente en la inducción del fenotipo invasivo/troncal (*CHEK1*, *DACH1*, *GATA3*, *NOTCH2* y *WEE1*; ver **Figura 9B**) a través de moléculas implicadas en la ubiquitinización (*UBC* y *UB2I*, por sus siglas en inglés), la deacetilasa de histona 3 (*HDAC3*, por sus siglas en inglés) y c-Jun (*JUN*); sin embargo, la interconexión de estos genes es principalmente a través de c-Jun, un conocido factor de transcripción río abajo de las MAP cinasas y que frecuentemente está deregulado en cáncer, incluyendo en células de CaM (67) (**Figura 10B**). Por otro lado, los nodos que representan los receptores de quimiocina y las moléculas secretadas diferencialmente entre las líneas de CaM-NA y -AA (*G-CSF*, *GM-CSF*, *IL-8*, *MCP-1*, así como las *MMPs* -1 y -2) están conectados a un regulador común altamente expresado *NFκB1* (**Figura 10B**). Para evaluar la influencia de los nodos en la red de InFu, se midió mediante el cálculo y el mapeo de los puntajes de centralidad de proximidad y de centralidad de intermediación. La centralidad de proximidad determina qué tan cerca está un nodo de todos los otros en una red y se calcula por el inverso de la suma de las distancias más cortas entre el nodo analizado y cada otro nodo en la red. Por otro lado, la centralidad de intermediación indica el control de un nodo sobre la información que pasa a través de la red y su cálculo se basa en el número de rutas más cortas que pasan a través de un nodo referido. Con este cálculo se encontró que los nodos más influyentes en la red son *NFκB1* (que pareciera regular a la alta quimiocinas, *MMPs* y factores de crecimiento secretados) *JUN* (que parece regular a la baja los 5 genes encontrados con Reactome F1), pero también el receptor de andrógenos (*AR* por sus siglas en inglés) (**Figura 10C**). Particularmente llaman la atención los genes los genes *IKBKB* y *NFκB1*, ya que las líneas celulares de CaM-AA tienen una expresión basal incrementada de ellos con respecto a las líneas celulares de CaM-NA no

inducidas. Esto apoya que la transferencia lateral de características agresivas (troncaldad/invasión) depende de la actividad de la vía de señalización de NF κ B (**Figura 10D**).

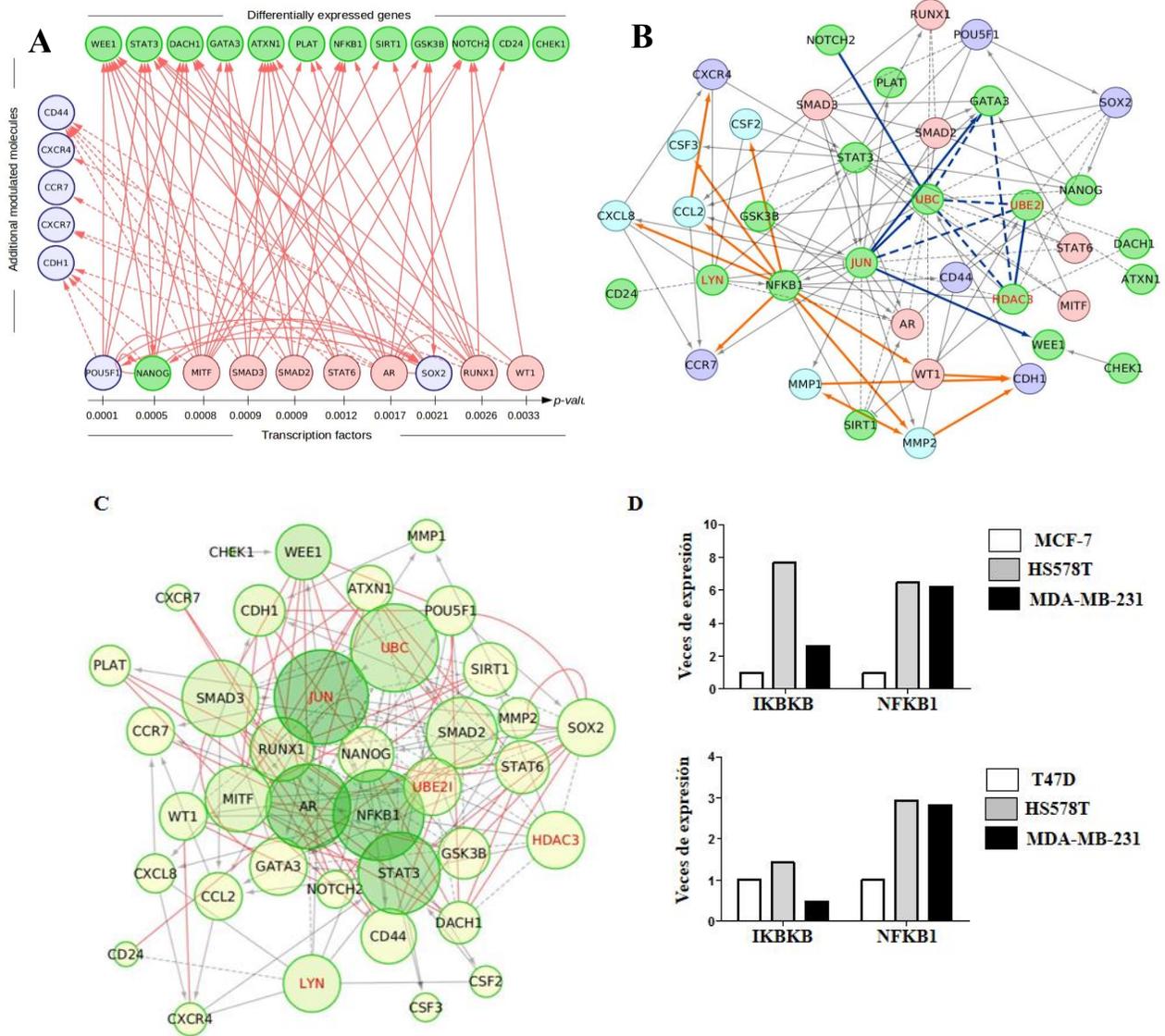


Fig. 10. Inferencia de factores de transcripción y redes de interacción proteína-proteína. A) Inferencia del factor de transcripción mediante el análisis de enriquecimiento de ChIP-X. Como referencia base se tomó a los genes que tuvieron un comportamiento diferencial en el arreglo de CSC y las biomoléculas encontradas después de las observaciones experimentales. B) Construcción de la red de interacción funcional (InFu) usando una lista de genes de entrada que incluye: los genes expresados diferencialmente e identificados en el arreglo de CSC, los factores transcripcionales potencialmente inferidos y el conjunto de moléculas encontradas experimentalmente. C) Evaluación de la influencia de los nodos en la red de InFu. D) Niveles basales de *IKBKB* y *NFKB1* encontrados en el arreglo de expresión génica. La gráfica muestra la inducción de las veces de expresión en HS578T y MDA-MB-231 con respecto a la expresión basal encontrada en las células MCF-7 (arriba) o T47D (abajo) que se fijaron arbitrariamente en 1.

VIII.6 Inhibición del fenotipo invasivo/troncal inducido

Nuestros resultados apoyan que los nodos más influyentes en la red son NF κ B1, JUN y AR; y que las células altamente agresivas tienen activada la vía de NF κ B de manera basal concordando con una alta producción de mediadores inflamatorios. Por lo anterior, nos preguntamos si inhibiendo a NF κ B en las células de CaM-AA, HS578T y MDA-MB-231 podríamos inhibir la inducción del fenotipo invasivo/troncal en las células de CaM-NA. Para responder lo anterior, las células de CaM-AA fueron cultivadas con el inhibidor selectivo de NF κ B, ACHP a una concentración de 16 nM/mL por 24 h. Pasadas las 24 h, recolectamos el MC y cultivamos a las células de CaM-NA con estos más 16 nM de ACHP adicionales durante 72 h. Posteriormente, a las células tratadas se les realizaron ensayos de invasión y de troncalidad medido por la frecuencia de células Sox-2 positivas. Como controles se cultivaron a las células de CaM-NA con los MC en donde no se inhibió la vía, o con MCs con DMSO, que fue el vehículo que se usó para preparar el stock de ACHP. La **Figura 11B** muestra que las células MCF-7 redujeron casi por completo su capacidad de invasión cuando se cultivaron con el MC proveniente de las células HS578T inhibidas (con un DOI promedio de 719 de células invasoras por campo) con respecto a cuando la vía no fue inhibida (con un DOI promedio de 8,200 de células invasoras por campo), mientras que con el MC de las células MDA-MB-231 inhibidas, la inducción de la invasión fue abatida completamente. Respecto a las células T47D, observamos que con ambos MC inhibidos no se indujo la invasión. Cuando evaluamos la expresión de Sox-2 por citometría de flujo en las líneas celulares de CaM-NA cultivadas con los MC inhibidos también observamos una disminución significativa en la inducción de la frecuencia de células Sox-2 positivas en ambas células con ambos MC inhibidos (**Figura 11C, panel izquierdo**). Desde el punto de vista de la IMF de Sox-2 solo observamos una disminución significativa cuando ambas líneas de CaM-NA fueron cultivadas con el MC de las células MDA-MB-231 inhibidas (**Figura 11C, panel derecho**). Por lo tanto, estos resultados apoyan que la capacidad de las células tumorales agresivas para transmitir lateralmente características de agresividad a células no agresivas, caracterizado por un fenotipo invasivo/troncal depende de manera importante de la vía de NF κ B.

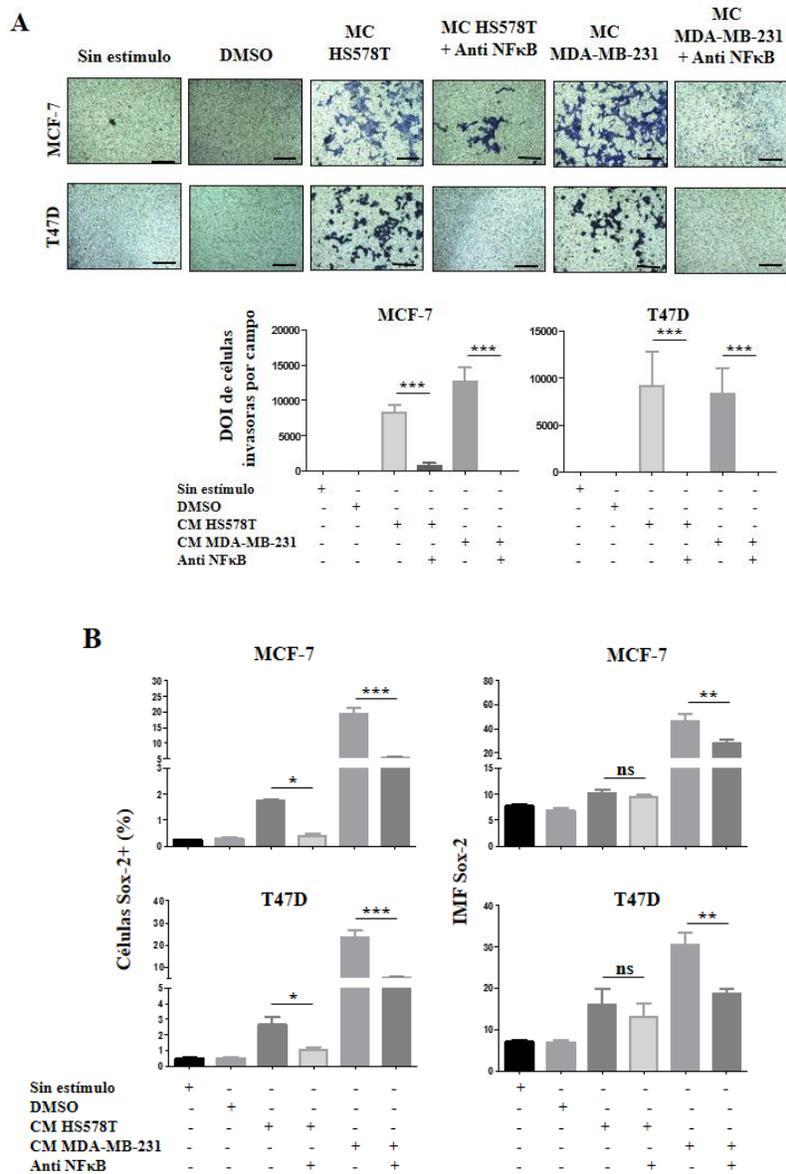


Fig. 11. El fenotipo invasivo/troncal inducido depende de NFκB. Células MCF-7 y T47D se cultivaron con MC proveniente de las líneas celulares de CaM-AA HS578T y MDA-MB-231 inhibidas con ACHP durante 72 h. B) Experimentos de invasión. C) Sox-2 fue examinado por FACS; los paneles de la izquierda muestran la frecuencia de células Sox-2 positivas y paneles de la derecha muestran la expresión de la IMF de Sox-2. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes, se muestran imágenes representativas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; ns= no significativo. La escala de las barras indica 100 μm. 100X de aumento para invasión y 400X para la IF.

IX. DISCUSION

La base conceptual tradicional sobre el inicio y progresión del cáncer destaca la importancia de la acumulación de mutaciones genéticas, particularmente en aquellos tumores que exhiben una mayor heterogeneidad genética y que muestran también un comportamiento más agresivo. Estudios más recientes, han destacado también la capacidad del tumor de comunicarse con células no tumorales dentro del microambiente tumoral como fuente de agresividad (12). En este estudio, nuestros datos apoyan que existe una comunicación parácrina entre células tumorales que resulta en la transmisión lateral de características agresivas. Estas características agresivas-inducidas consisten en la adquisición de un fenotipo parcial de TEM con la pérdida de Caderina-E sin ganancia de la expresión de Vimentina, ganancia de los marcadores de CSCs CD44, Sox-2 y Oct-4, incrementada expresión de los receptores para CXCL12 CXCR4 y CXCR7 e incremento en la capacidad de invasión en respuesta a CXCL12. Aunque las células MCF-7 y T47D inducidas mostraron claras diferencias en sus mecanismos de respuesta, las vías de señalización de NF κ B y EGF parecen ser elementos críticos en este proceso y comunes en ambas líneas celulares. En conjunto, estos mecanismos de comunicación tumoral podría facilitar la aparición de nuevas clonas con nuevas funciones, ampliando la heterogeneidad intra-clonal que diversifica la capacidad agresiva del tumor sin recaer en mutaciones genéticas irreversibles. Este estudio también apoya que clonas tumorales agresivas pueden modificar clonas tumorales no agresivas independientemente del microambiente tumoral.

El modelo de evolución clonal de los tumores señala que distintas clonas muestran características genéticas diferentes y sólo aquellas clonas con ventajas específicas y bajo presiones selectivas particulares son mantenidas favoreciendo la progresión de la enfermedad, en un tipo de competencia de evolución darwiniana (23). En el 2014, Marusyk y cols propusieron que las interacciones entre clonas presentes en el tumor con distinta función y frecuencia, favorecen la aparición de clonas con un fenotipo y funciones nuevas que permiten al tumor adaptarse a los cambios microambientales (68). Otros estudios apoyan que la comunicación y cooperación intra-clonal particularmente, entre clonas metastásicas y no metastásicas (14, 16, 20), añaden otro nivel de complejidad al origen y evolución de los tumores. La plasticidad de las células tumorales ha sido ampliamente estudiada, poniendo la

TEM en el centro de esta plasticidad. La evidencia más reciente apoya que las células cancerosas que han sufrido la TEM también aumentan la expresión de marcadores de troncalidad y los tumores en los que los programas de TEM/troncalidad están activos, también son más invasivos y metastásicos denotando cánceres con los peores desenlaces clínicos (37, 44, 47, 69, 70). De qué manera la TEM y la troncalidad favorecen la heterogeneidad tumoral y la coexistencia intra-clonal para facilitar el mantenimiento del tumor es una de las interrogantes más complejas en la biología del cáncer. Interesantemente, aunque TGF- β es una de las moléculas mejor caracterizada como inductor de la TEM (43), no encontramos ninguna evidencia de la participación de TGF- β en el fenotipo invasivo/troncal-inducido.

Mani *et al* en el 2008 describieron por primera vez una fuerte correlación entre la TEM y troncalidad (44), sentando las bases para nuestra comprensión de la plasticidad y la agresividad tumoral. Hoy en día, creciente evidencia apoya esta asociación; por ejemplo, los CaM con una alta densidad de células CD44 positivas se asocian con menor supervivencia libre de enfermedad (71). La expresión de Oct-4 y Sox-2 también se asocian con resultados clínicos desfavorables en pacientes con CaM (72, 73). Mientras trabajábamos en este proyecto, Mukherjee *et al* reportó que CSCs con diferentes capacidades de migración coexisten dentro de tumores primarios y en mamoesferas provenientes de la línea MCF-7. Las CSC presentes en el centro de la mamoesfera (o tumor) con una baja tasa de migración, tienen la capacidad de inducir características migratorias a células tumorales no troncales presentes en la periferia de la mamoesfera (o tumor) a través de la secreción parácrina de EGF, TGF- β 1, VEGF e IL-6 (20). También, y de acuerdo con nuestro estudio, células tumorales no troncales inducidas mostraron un incremento en la expresión de marcadores de TEM y de troncalidad CD44, Oct-4 y Sox-2 así como la invasión y la regulación a la alta de CXCR4. Nosotros observamos una incrementada expresión de CXCR4, CXCR7 y CCR7 en las líneas celulares de CAM-NA inducidas, promoviendo la migración celular en respuesta a CXCL12, particularmente en las células MCF-7 inducidas. En el caso de las células T47D no hay una correlación clara debido a que a diferencia de las células MCF-7, las células T47D también incrementan la expresión de CXCR3 y CCR7, como se puede observar en la **Figura 5B**. A pesar de lo anterior, el eje CXCR4/CXCR7/CXCL12 ha sido ampliamente documentado como un potente promotor de invasión y metástasis en varios tipos de cáncer y muy probablemente tiene un papel importante en la promoción de invasión en las células de CaM-NA inducidas, lo

cual también demostramos al inhibir la invasión de las células inducidas al neutralizar CXCL12 (74, 75).

Los tumores con una alta densidad de CSCs se caracterizan por una alta expresión de los mediadores inflamatorios IL-8 y CXCR4 así como de las proteasas MMP-1 y uPA (Activador de Plasminógeno tipo urocinasa) (76, 77). Nosotros encontramos que las líneas de CaM-AA secretaban altos niveles de G-CSF, GM-CSF, MCP-1 e IL-8. De ellos, MCP-1 e IL-8 fueron potentes inductores de invasividad de las células MCF-7, mientras que G-CSF, GM-CSF y MCP-1 lo fueron para las células T47D. MCP-1 e IL-8 son consideradas citocinas pro-tumorales importantes, principalmente debido a su capacidad para remodelar el microambiente atrayendo poblaciones de células inmunes (78, 79). Nosotros también observamos que células tumorales agresivas son particularmente eficientes para atraer monocitos/macrófagos a través de la secreción de GM-CSF y MCP-1 y el co-cultivo de monocitos/macrófagos con células tumorales agresivas aumenta aún más la secreción de IL-8 e IL-1 β (80). Es importante destacar que este estudio apoya funciones autócrinas de estas citosinas, las cuales promueven la TEM/troncalidad e invasión independiente del microambiente tumoral. De acuerdo con esto, otros estudios apoyan que la sobreexpresión autócrina de MCP-1 e IL-8 promueve la proliferación, migración, quimioresistencia y metástasis de las células tumorales, y que esto se traduce en un mayor riesgo de recaída de la enfermedad (61, 62, 81). En pacientes con CaM y cáncer de próstata la sobreexpresión de MCP-1 correlaciona con un mal pronóstico (82, 83) y la regulación autócrina de MCP-1 se asocia con TEM, inmunosupresión y metástasis (84). El bloqueo de MCP-1 en pacientes con CaM triple negativo disminuyó la frecuencia y el potencial de auto-renovación de las CSCs de CaM (85). Otros estudios muestran una asociación entre IL-8, MCP-1 y MMPs y la inducción de CSCs y metástasis (37, 85, 86). Cabe destacar, que también observamos altos niveles de MMP-1 y MMP-2 secretadas por las células de CaM-AA.

El análisis de los genes asociados con troncalidad nos permitió obtener una imagen más amplia de las vías de señalización que pudieran ser responsables del fenotipo invasivo-inducido. Notablemente, observamos huellas particulares de expresión basal que distinguen cada una de las células de CaM-NA, lo que probablemente refleje sus mecanismos iniciales de transformación y que también pudieran ser importantes para mantener a las células

tumorales en cultivo (**Figura 9A**), esas huellas fueron enriquecidas con oncogenes conocidos que no fueron relevantes para el fenotipo invasivo/troncal-inducido.

La red de interacción funcional nos permitió ver a c-Jun como el factor que conecta a la mayoría de los genes que fueron regulados a la baja con los MC agresivos (**Figura 10B**). c-Jun es un factor de transcripción río abajo de las MAP cinasas y de los receptores de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés) y que actúa como un co-activador transcripcional del receptor de estrógeno. Alternativamente, NOTCH2 regula positivamente la expresión de GATA3 (87) y GATA3 es también un blanco directo de represión de HDAC3 (88). Sucesivamente, GATA3 regula de manera positiva a DACH1 (89) y a WEE1 (90). Un dato muy importante es que en el ciclo celular CHEK1 regula a WEE1 y este al ser activado se arresta el ciclo celular en respuesta a daño, por lo que se ha propuesto al eje CHEK1/WEE1 como blancos terapéuticos (91, 92). Estos datos sugieren que la co-represión de estos 5 genes implicados en la transmisión de características agresivas puede ser, al menos en parte, mediado por c-Jun o como resultado de la regulación a la baja de NOTCH2 y la probable expresión o actividad aumentada de HDAC3. DACH1 ha sido reportado previamente como un regulador negativo de Sox-2, Nanog y CXCL8 en células de CaM (93, 94), datos que relacionan el conjunto de genes reprimidos con el aumento en la expresión de marcadores de pluripotencia y en metástasis. Por otro lado, encontramos la vía de señalización de NF κ B como la huella de expresión asociada con la inducción del comportamiento agresivo, con componentes individuales de estas vías siendo las responsables de las respuestas particulares de cada línea celular de CaM-NA (**Figuras 10C**). Vázquez-Santillán y colaboradores describieron que en poblaciones de CSC presentes en las líneas celulares de CaM MCF-7 y MDA-MB-231, la activación de NF κ B a través de NIK (cinasa inductora de NF κ B) fue esencial para el mantenimiento del fenotipo troncal (95). En células del sistema inmune NF κ B es central en la regulación de la expresión de citocinas y en células tumorales, MCP-1, IL-8 y CD44 son blancos transcripcionales de NF κ B1 y RELA (96, 97).

La participación de c-Jun y NF κ B en la inducción de agresividad ha sido descrita previamente en glioblastoma (98), sin embargo, su papel en las redes de señalización intracelular e intraclonal en cáncer en general y CaM en particular no ha sido estudiado.

X. CONCLUSIONES

- Las células MCF-7 y T47D son altamente plásticas y responden a las señales comunicadas por células tumorales agresivas alterando características de agresión como troncalidad e invasión.
- Existen diferencias importantes en los mecanismos de inducción de agresividad en cada línea celular, aunque de manera general la vía de NF κ B pareciera ser compartida por ambas líneas de CaM-NA.
- La vía de NF κ B se encuentra activa de forma basal en las células de CaM-AA HS578T y MDA-MB-231.
- G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1 son mediadores inflamatorios importantes en la inducción de invasión y troncalidad de las células no-agresivas.
- La vía de NF κ B en las células CaM-AA pareciera ser responsable de la producción/secreción de los mediadores inflamatorios G-CSF, GM-CSF, IL-8 y MCP-1 además de las proteasas como MMP-1 y -2.
- De manera importante, aunque TGF- β se mantiene como la señal más documentada en la inducción de la plasticidad celular, no encontramos evidencia de la participación de TGF- β en el fenotipo invasivo/troncal-inducido.
- Nuestros datos sugieren que la vía de NF κ B pudiera estar participando en la inducción del fenotipo invasivo/troncal en las líneas no agresivas.
- Nuestros datos apoyan la comunicación entre clonas agresivas y no agresivas (o troncales y no troncales) en el seno del tumor, independientemente del microambiente formado por otras células estromales como las células del sistema inmune.
- No observamos diferencias en la concentración de G-CSF, GM-CSF, IL-8, MCP-1, MMP-1 y MMP-2 cuando comparamos pacientes con sub-tipo Luminal vs Her-2 y Triple Negativo o diferencias entre estadios clínicos. Esto pudiera tener varias explicaciones: i) un efecto local más que sistémico de éstas citocinas con respecto a la transmisión lateral de características agresivas, ii) la clasificación molecular y/o el estadio clínico no refleja el potencial agresivo intrínseco de un tumor. De acuerdo con el punto 2, nuestro análisis no incluye pacientes en estadio IV, en donde ya hay presencia de metástasis, que sería

la fase en la que la transferencia de características de movilidad fuera más activa. Es importante obtener más datos clínicos como la resistencia al tratamiento, recaída o supervivencia para hacer una mejor correlación entre los datos obtenidos experimentalmente y el desenlace clínico de las pacientes.

- Entender los mecanismos que guían la heterogeneidad intra-tumoral, la plasticidad celular y su relación con la agresividad de un tumor proveería mejores blancos para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

XI. MODELO PROPUESTO

El CaM es una enfermedad heterogénea con gran diversidad clonal intra-tumoral en la que la comunicación paracrina entre diferentes clones tumorales influyen en el comportamiento agresivo del tumor. Los mediadores pro-inflamatorios, como MCP-1, IL-8, GM-CSF y G-CSF, secretados por clones tumorales altamente agresivos (AA) y con una huella intrínseca de activación de la vía de NF κ B, tienen el potencial de activar vías de señalización asociadas con la inducción de comportamiento agresivo en clones no agresivos (NA). Esta comunicación intra-clonal paracrina da como resultado la formación de poblaciones con perfiles transcripcionales particulares que favorecen procesos relacionados con la transición epitelio-mesénquima/troncalidad e invasión. Las células inducidas con la adquisición de TEM/troncal y potencial de invasión coinciden con la regulación positiva de receptores de quimiocinas, que responden a las quimiocinas secretadas por las células troncales/agresivas (u otras células del estroma tumoral). Además, la secreción paracrina de metaloproteasas (MMPs) facilitaría la invasión de las clones inducidas a través de la degradación de la matriz extracelular. Este mecanismo puede ser crítico para moldear la respuesta clínica del tumor que influiría en la metástasis, la quimioresistencia y la recaída de la enfermedad (**Figura 12**).

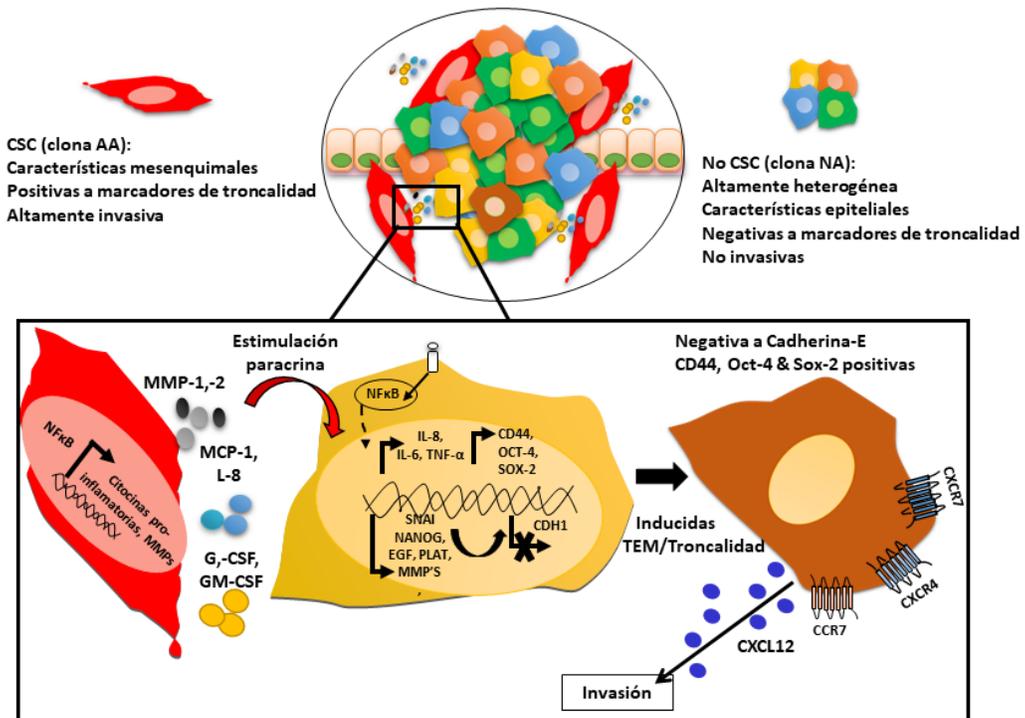


Fig. 12. Modelo propuesto

XII. REFERENCIAS

1. Copeland Ba. *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. 4th ed: Elsevier; 2009. 1712 p.
2. Cárdenas-Sánchez J, Bargalló-Rocha E, Erazo Valle A, Poitevin Chacón A, Valero Castillo V, Pérez Sánchez V. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2016;15(6):2-55.
3. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-45.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
5. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el Cáncer de mama (19 de octubre). Instituto Nacional de Estadística e Informática 2016.
6. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406.
7. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(19):10869-74.
8. Pribluda A, de la Cruz CC, Jackson EL. Intratumoral Heterogeneity: From Diversity Comes Resistance. *Clin Cancer Res*. 2015;21(13):2916-23.
9. Ng CKY, Pemberton HN, Reis-Filho JS. Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2012;12(8):1021-32.
10. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
11. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-37.
12. Chimal-Ramirez GK, Espinoza-Sanchez NA, Fuentes-Panana EM. Protumor activities of the immune response: insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. *J Oncol*. 2013;2013:835956.
13. Axelrod R, Axelrod DE, Pienta KJ. Evolution of cooperation among tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(36):13474-9.
14. Miller FR, Miller BE, Heppner GH. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis*. 1983;3(1):22-31.
15. Baban D, Matsumura Y, Kocialkowski S, Tarin D. Studies on relationships between metastatic and non-metastatic tumor cell populations using lineages labeled with dominant selectable genetic markers. *Int J Dev Biol*. 1993;37(1):237-43.
16. Calbo J, van Montfort E, Proost N, van Drunen E, Beverloo HB, Meuwissen R, et al. A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell*. 2011;19(2):244-56.

17. Wu M, Pastor-Pareja JC, Xu T. Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature*. 2010;463(7280):545-8.
18. Cleary AS, Leonard TL, Gestl SA, Gunther EJ. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature*. 2014;508(7494):113-7.
19. Bose D, Zimmerman LJ, Pierobon M, Petricoin E, Tozzi F, Parikh A, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells and cancer stem cells mediate growth and survival of bystander cells. *Br J Cancer*. 2011;105(11):1759-67.
20. Mukherjee S, Manna A, Bhattacharjee P, Mazumdar M, Saha S, Chakraborty S, et al. Non-migratory tumorigenic intrinsic cancer stem cells ensure breast cancer metastasis by generation of CXCR4(+) migrating cancer stem cells. *Oncogene*. 2016;35(37):4937-48.
21. Korolev KS, Xavier JB, Gore J. Turning ecology and evolution against cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):371-80.
22. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8.
23. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
24. Geyer FC, Weigelt B, Natrajan R, Lambros MB, de Biase D, Vatcheva R, et al. Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas. *J Pathol*. 2010;220(5):562-73.
25. Martelotto LG, Ng CK, Piscuoglio S, Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast cancer research : BCR*. 2014;16(3):210.
26. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-92.
27. Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, Swanton C. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol*. 2014;15(8):453.
28. Miller WR, Larionov A. Changes in expression of oestrogen regulated and proliferation genes with neoadjuvant treatment highlight heterogeneity of clinical resistance to the aromatase inhibitor, letrozole. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(4):R52.
29. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414.
30. Mayani H. Células troncales y medicina regenerativa: conceptos básicos, estado actual y perspectivas futuras. In: Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I, editors. *Células troncales y medicina regenerativa*. 1. México: Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS); 2011. p. 35-56.
31. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(2):133-43.
32. Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, Arampatzi P, Papamatheakis J, Kretsovali A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 2015;7(9):1150-84.
33. Aguirre-Alvarado C, Velasco-Velázquez M. Células Troncales en Tumores Sólidos. In: Chávez-Gonzalez M, Chimal-Monroy J, Flores-Figueroa E, Lamas M,

editors. *Células Troncales Biología y Aplicaciones en Biomedicina*. 2. 1a. Edición ed: Porrúa; 2017. p. 15-37.

34. O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol*. 2009;19(2):71-7.

35. Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(2):77-84.

36. Patel P, Chen EI. Cancer stem cells, tumor dormancy, and metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:125.

37. Chimal-Ramirez GK, Espinoza-Sanchez NA, Fuentes-Panana EM. A Role for the Inflammatory Mediators Cox-2 and Metalloproteinases in Cancer Stemness. *J Immunol Res*. 2015;15(7):837-55.

38. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8.

39. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*. 2013;154(1):61-74.

40. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275-91.

41. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 2009;138(5):822-9.

42. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(5-6):396-403.

43. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.

44. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.

45. Stankic M, Pavlovic S, Chin Y, Brogi E, Padua D, Norton L, et al. TGF-beta-1 signaling opposes Twist1 and promotes metastatic colonization via a mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Rep*. 2013;5(5):1228-42.

46. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 2009;11(4):R46.

47. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast cancer research : BCR*. 2012;14(1):R15.

48. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013;31(6):539-44.

49. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*. 2014;2(1):78-91.

50. Team RDC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. . Vienna, Austria: Computing RfS. 2008.
51. Lachmann A, Xu H, Krishnan J, Berger SI, Mazloom AR, Ma'ayan A. ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010;26(19):2438-44.
52. Haw R, Hermjakob H, D'Eustachio P, Stein L. Reactome pathway analysis to enrich biological discovery in proteomics data sets. *Proteomics*. 2011;11(18):3598-613.
53. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003;13(11):2498-504.
54. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;83(3):249-89.
55. McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(8):717-27.
56. Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett*. 2006;238(1):30-41.
57. Ali S, Lazennec G. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):401-20.
58. Garcia-Rocha R, Moreno-Lafont M, Mora-Garcia ML, Weiss-Steider B, Montesinos JJ, Pina-Sanchez P, et al. Mesenchymal stromal cells derived from cervical cancer tumors induce TGF-beta1 expression and IL-10 expression and secretion in the cervical cancer cells, resulting in protection from cytotoxic T cell activity. *Cytokine*. 2015;76(2):382-90.
59. Mukaida N, Sasaki S, Baba T. Chemokines in cancer development and progression and their potential as targeting molecules for cancer treatment. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:170381.
60. Aliper AM, Frieden-Korovkina VP, Buzdin A, Roumiantsev SA, Zhavoronkov A. A role for G-CSF and GM-CSF in nonmyeloid cancers. *Cancer Med*. 2014;3(4):737-46.
61. Soria G, Ofri-Shahak M, Haas I, Yaal-Hahoshen N, Leider-Trejo L, Leibovich-Rivkin T, et al. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNFalpha & IL-1beta with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2011;11:130.
62. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol*. 1993;151(5):2667-75.
63. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100.
64. Schoenhals M, Kassambara A, Vos JD, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;383(2):157-62.
65. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1-15.

66. Manuel Iglesias J, Beloqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguiara A, et al. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PloS one*. 2013;8(10):e77281.
67. Smith LM, Wise SC, Hendricks DT, Sabichi AL, Bos T, Reddy P, et al. cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*. 1999;18(44):6063-70.
68. Marusyk A, Tabassum DP, Altmann PM, Almendro V, Michor F, Polyak K. Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature*. 2014;514(7520):54-8.
69. Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, et al. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer research*. 2009;69(7):2887-95.
70. Oon ML, Thike AA, Tan SY, Tan PH. Cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers predict worse outcome in metaplastic carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;150(1):31-41.
71. McFarlane S, Coulter JA, Tibbits P, O'Grady A, McFarlane C, Montgomery N, et al. CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6(13):11465-76.
72. Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014;5(21):10803-15.
73. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008;40(5):499-507.
74. Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, et al. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(1):41-9.
75. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*. 2016;35(7):816-26.
76. Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(42):18115-20.
77. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research*. 2006;8(5):R59.
78. Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol*. 2012;8(6):713-22.
79. Chen W, Gao Q, Han S, Pan F, Fan W. The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling. *Tumour Biol*. 2015;36(2):973-81.
80. Espinoza-Sánchez N, Chimal-Ramírez G, Mantilla A, Fuentes-Pananá E. IL-1 β , IL-8 and matrix metalloproteinases -1, -2 and -10 are enriched upon monocyte-

breast cancer cell co-cultivation in a Matrigel-based three dimensional system. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(205).

81. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011;128(9):2038-49.

82. Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer*. 2001;92(5):1085-91.

83. Lu Y, Cai Z, Xiao G, Liu Y, Keller ET, Yao Z, et al. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J Cell Biochem*. 2007;101(3):676-85.

84. Kudo-Saito C, Shirako H, Ohike M, Tsukamoto N, Kawakami Y. CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(4):393-405.

85. Fang WB, Yao M, Brummer G, Acevedo D, Alhakamy N, Berkland C, et al. Targeted gene silencing of CCL2 inhibits triple negative breast cancer progression by blocking cancer stem cell renewal and M2 macrophage recruitment. *Oncotarget*. 2016.

86. Velasco-Velazquez MA, Popov VM, Lisanti MP, Pestell RG. The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 2011;179(1):2-11.

87. Sakata-Yanagimoto M, Nakagami-Yamaguchi E, Saito T, Kumano K, Yasutomo K, Ogawa S, et al. Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(22):7839-44.

88. Yashiro T, Kubo M, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C. PU.1 Suppresses Th2 Cytokine Expression via Silencing of GATA3 Transcription in Dendritic Cells. *PloS one*. 2015;10(9):e0137699.

89. Cohen H, Ben-Hamo R, Gidoni M, Yitzhaki I, Kozol R, Zilberberg A, et al. Shift in GATA3 functions, and GATA3 mutations, control progression and clinical presentation in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2014;16(6):464.

90. Shen JP, Zhao D, Sasik R, Luebeck J, Birmingham A, Bojorquez-Gomez A, et al. Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for de novo mapping of genetic interactions. 2017;14(6):573-6.

91. Patil M, Pabla N, Dong Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2013;70(21):4009-21.

92. Benada J, Macurek L. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules*. 2015;5(3):1912-37.

93. Wu K, Jiao X, Li Z, Katiyar S, Casimiro MC, Yang W, et al. Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(3):2132-42.

94. Wu K, Katiyar S, Li A, Liu M, Ju X, Popov VM, et al. Dachshund inhibits oncogene-induced breast cancer cellular migration and invasion through

suppression of interleukin-8. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(19):6924-9.

95. Vazquez-Santillan K, Melendez-Zajgla J, Jimenez-Hernandez LE, Gaytan-Cervantes J, Munoz-Galindo L, Pina-Sanchez P, et al. NF-kappaBeta-inducing kinase regulates stem cell phenotype in breast cancer. Sci Rep. 2016;6:37340.

96. Liu-Mares W, Sun Z, Bamlet WR, Atkinson EJ, Fridley BL, Slager SL, et al. Analysis of variation in NF-kappaB genes and expression levels of NF-kappaB-regulated molecules. BMC Proc. 2007;1 Suppl 1:S126.

97. Kochupurakkal BS, Wang ZC, Hua T, Culhane AC, Rodig SJ, Rajkovic-Molek K, et al. RelA-Induced Interferon Response Negatively Regulates Proliferation. PLoS one. 2015;10(10):e0140243.

98. Galardi S, Mercatelli N, Farace MG, Ciafre SA. NF-kB and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. Nucleic acids research. 2011;39(9):3892-902.

XIII. APÉNDICE 1

Símbolo del Gen	Normalizado a MCF-7 no inducida				Normalizado a T47D no inducida			
	MCF7+ MCF7 MC	MCF7 + T47D MC	MCF7 + HS578T MC *	MCF7 + MDA-MB-231 MC *	T47D+ MCF7 MC	T47D + T47D MC	T47D + HS578T MC *	T47D + MDA-MB-231 MC *
ABCB5	-1.31	-2.77	-1.51	-1.73	1.06	1.52	1.00	-0.57
ABCG2	-1.56	-1.13	1.35	-1.44	-1.28	1.03	-1.26	-1.21
ALCAM	-1.04	-1.23	1.10	-1.08	-1.18	-1.01	1.25	-0.66
ALDH1A1	2.39	-2.20	-1.38	-1.73	-1.01	1.41	2.67	-0.36
ATM	1.39	1.16	1.44	-1.04	-1.06	1.39	1.56	1.69
ATXN1	1.05	1.08	1.38	1.47	1.01	1.01	2.25	2.06
AXL	-2.45	-4.76	-3.17	-2.37	1.01	1.06	-1.04	-1.12
BMI1	1.21	-1.01	1.28	-1.46	-1.07	-1.01	1.01	-1.21
BMP7	-1.58	-1.40	-1.32	-2.78	-1.01	-1.09	3.27	1.91
CD24	-2.46	-1.07	1.23	1.70	-1.18	1.26	3.19	2.33
CD34	-1.31	-2.77	-1.65	-1.73	-2.68	-1.88	-1.16	-1.53
CD38	-3.78	-3.63	-2.18	-2.38	1.06	1.52	2.22	3.32
CD44	1.89	1.27	-1.57	1.31	-1.09	-1.39	5.92	9.20
CHEK1	1.40	1.16	1.18	-1.10	1.47	1.64	-2.01	-2.06
DACH1	1.06	-1.25	-1.56	-4.11	-1.01	-1.16	-1.46	-1.72
DDR1	-2.30	-1.60	-1.41	-1.40	-1.06	-1.22	1.37	1.39
DKK1	-1.78	-1.20	-1.08	-1.58	2.11	1.23	1.11	-1.03
DLL1	-2.20	-2.22	-1.60	-1.78	-1.05	-1.39	1.73	1.85
DLL4	-4.08	-2.62	-3.27	-1.14	1.41	1.17	1.71	8.17
DNMT1	1.25	1.26	1.03	-1.94	1.02	-1.25	-2.47	-2.86
EGF	-2.95	-2.75	1.17	1.13	-1.05	-1.31	1.65	4.72
ENG	-9.78	-3.46	-1.08	1.26	-1.04	-1.25	-1.21	-1.98
EPCAM	-1.09	-1.04	1.23	-1.01	1.06	1.01	1.17	1.09
ERBB2	1.61	1.93	1.35	1.44	-1.03	-1.13	-1.09	-1.16
ETFA	1.60	1.47	1.57	1.38	1.05	1.28	-1.18	-1.15
FGFR2	-50.21	-29.86	-17.63	-34.36	1.02	-1.16	-2.21	-1.87
FLOT2	1.25	1.30	1.60	1.47	-1.16	-1.22	-1.09	-1.08
FOXA2	-3.18	-4.86	-2.49	-2.25	1.06	29.65	-1.13	1.75
FOXP1	1.51	1.77	1.31	-1.11	-1.04	-1.26	1.48	1.27
FZD7	-4.72	-3.41	-2.64	-3.65	-1.08	-1.16	-1.06	1.74

Símbolo del Gen	Normalizado a MCF-7 no inducida				Normalizado a T47D no inducida			
	MCF7+ MCF7 MC	MCF7 + T47D MC	MCF7 + HS578T MC *	MCF7 + MDA-MB-231 MC *	T47D+ MCF7 MC	T47D + T47D MC	T47D + HS578T MC *	T47D + MDA-MB-231 MC *
GATA3	-1.53	1.25	-1.91	-3.57	-1.16	-1.19	-1.49	-2.31
GSK3B	-1.56	-1.08	1.05	-1.06	-1.19	-1.21	1.34	1.41
HDAC1	1.37	1.56	1.60	1.11	-1.15	-1.11	-1.55	-1.68
ID1	-1.84	-2.77	1.06	-1.74	1.04	1.09	-2.86	-3.44
IKBKB	-1.27	-1.58	-1.20	-1.51	1.00	-1.17	1.16	1.38
CXCL8	5.94	10.34	9.33	32.61	-1.40	-1.28	4.44	-1.25
ITGA2	1.48	1.79	1.33	-1.96	-1.21	-1.21	1.45	1.16
ITGA4	-1.31	-2.77	1.68	-1.73	1.06	1.52	-1.13	1.75
ITGA6	2.57	-1.53	1.57	-0.51	-1.06	1.00	1.49	1.27
ITGB1	-1.21	-1.03	1.43	-0.90	-1.10	1.21	1.31	1.11
JAG1	-15.67	-6.41	-5.40	-4.64	1.07	1.05	1.67	1.55
JAK2	-1.05	1.40	-2.68	-4.37	-1.03	1.09	1.56	4.20
KIT	-1.87	-1.11	-4.43	-6.72	1.06	1.52	1.21	1.75
KITLG	-1.04	-1.16	-3.32	-3.37	1.13	-1.06	4.29	2.23
KLF17	-1.29	1.39	1.25	1.09	-1.21	-4.63	1.76	1.55
KLF4	-2.13	-1.48	-1.41	1.35	-1.07	-1.25	2.68	4.29
LATS1	-1.24	1.33	1.13	-1.02	-1.26	-1.27	1.68	1.42
LIN28A	-2.57	-1.60	-1.69	-1.78	-1.05	-1.06	-2.30	-1.75
LIN28B	-1.31	-2.77	-1.95	-1.73	1.06	1.52	-1.13	1.75
MAML1	-1.17	-1.20	-1.05	-1.39	-1.21	-1.40	-1.24	-1.20
MERTK	-1.12	-2.95	1.02	-1.70	1.23	-1.55	1.41	2.00
MS4A1	-1.31	-2.77	-1.95	-1.73	1.06	1.52	-1.13	1.75
MUC1	1.28	1.51	2.67	6.14	1.00	0.76	2.15	1.84
MYC	1.34	1.23	-1.04	-1.52	-1.04	-1.21	1.75	1.02
MYCN	-7.89	-2.58	-2.47	2.39	1.26	-1.71	-2.99	1.05
NANOG	-1.68	1.34	1.62	3.22	-1.39	-1.24	5.48	6.90
NFKB1	1.23	1.85	1.60	1.91	-1.09	-1.54	3.03	3.20
NOS2	-2.77	-1.38	-1.15	1.39	-1.61	-1.80	-1.53	-3.86
NOTCH1	-3.78	-1.95	-1.54	-1.86	1.19	-1.11	2.23	3.11
NOTCH2	1.16	-1.29	-1.58	-2.07	1.54	-1.20	-2.61	1.02
PECAM1	8.51	11.79	12.07	29.67	-5.46	-3.84	-1.77	-3.32
PLAT	-1.60	-2.58	2.26	2.99	-1.48	-1.78	1.15	-1.05

Símbolo del Gen	Normalizado a MCF-7 no inducida				Normalizado a T47D no inducida			
	MCF7+ MCF7 MC	MCF7 + T47D MC	MCF7 + HS578T MC *	MCF7 + MDA-MB-231 MC *	T47D+ MCF7 MC	T47D + T47D MC	T47D + HS578T MC *	T47D + MDA-MB-231 MC *
PLAUR	-3.32	-2.69	-1.04	-1.73	-1.08	-1.84	-1.62	2.83
PO5F1	-1.36	-1.65	-1.26	-1.91	1.38	-1.49	1.28	3.81
PROM1	-2.04	1.14	1.91	39.14	-1.18	-1.58	1.81	4.03
PTCH1	-1.88	-1.25	-1.02	-2.10	-1.78	-1.56	-1.51	1.41
PTPRC	46.21	13.27	12.28	13.82	1.06	1.52	-1.13	2.01
SAV1	-1.06	-1.09	1.05	-1.25	-1.15	-1.29	1.96	2.42
SIRT1	1.17	1.35	1.60	1.35	-1.05	-1.18	1.71	2.67
SMO	-7.52	-15.14	-14.31	-7.77	1.17	-1.29	-1.62	-1.24
SNAI1	-6.02	-6.06	-3.77	-2.57	1.12	-1.20	-1.56	2.00
SOX2	3.53	3.20	13.11	7.76	1.00	-1.54	1.24	-1.60
STAT3	-1.19	1.17	1.51	2.44	-1.18	-1.36	2.44	3.27
TAZ	-1.29	-1.47	-1.66	-2.97	-1.33	-1.53	-1.45	-1.20
TGFBR1	1.33	1.60	1.32	1.10	-1.34	-1.34	-1.13	-1.33
THY1	-2.08	-1.84	-2.88	-2.75	-1.28	-2.46	-4.47	-10.63
TWIST1	-1.31	-2.77	-1.95	-1.73	-1.16	-1.53	1.06	1.87
TWIST2	-2.00	-4.23	-2.97	-2.64	1.06	1.52	1.29	1.75
WEE1	1.72	-1.06	1.38	-1.33	1.54	1.46	-2.31	-1.48
WNT1	-1.31	-2.60	-1.95	-1.73	-1.08	-1.83	-4.60	-7.03
WWC1	-1.55	-1.04	-1.38	-1.53	-1.17	-1.60	-1.32	1.09
YAP1	1.04	1.04	1.25	-1.55	-1.19	-1.18	-1.29	-1.23
ZEB1	-4.38	-1.65	-1.36	1.00	1.62	1.52	4.18	5.19
ZEB2	2.31	-2.77	1.34	1.37	-6.73	-1.02	-1.12	2.28
ACTB	-1.05	-1.11	1.10	-1.23	-1.08	-1.21	-1.53	-2.05
B2M	-2.00	-1.60	-1.42	1.62	-1.09	-1.06	2.39	5.46
GAPDH	-1.37	-1.34	1.27	-1.63	1.09	1.02	-1.27	-1.19

Perfiles de expresión de las células MCF-7 y T47D cultivadas con los medios condicionados de las líneas celulares de CaM-NA y -AA. La expresión de los genes asociados a CSC se cuantificó mediante un arreglo de qRT-PCR. Los experimentos individuales se normalizaron contra HPRT1 y las veces de expresión se calcularon normalizando contra las respectivas células MCF-7 o T47D sin estímulo. En azul se representan los valores de los genes regulados a la baja con un valor de corte = -2, y en rojo los genes regulados a la alta por encima del valor de corte = 2. (* Experimentos por duplicados, los valores se promediaron después del cálculo $2^{\Delta\Delta Cq}$).