



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Evaluación del efecto de IL-1 $\beta$  en cultivos 3D de células  
de mama”**

*T E S I S*

Que presenta:

**BIÓL. LUZ MARÍA SANTIAGO LÓPEZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directora de tesis: **DRA. ISAURA MEZA GÓMEZ PALACIO**

**MÉXICO, DISTRITO FEDERAL**

**AGOSTO 2015**

**Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Isaura Meza Gómez Palacio.**

**Durante el desarrollo de esta tesis, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología con el número de registro: 301091, así como del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.**

## **DEDICATORIA**

**A mi hija Natalia por ser mi mayor motivación para nunca rendirme en mis estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ella. Le agradezco por comprender mi trabajo y soportar mis largas horas de ausencia. Pero sobre todo le agradezco la dicha de ser su madre y alimentar mi alma con cada una de sus sonrisas.**

**A mi madre por los abrazos que me da cuando más lo necesito y por sostenerme cuando los obstáculos amenazan con derrumbarme. Le agradezco por sus deliciosos platillos que me recuerdan siempre el sabor a mi hogar.**

**A mi padre porque me enseñó a ser fuerte y siempre me remarco que lo que realmente vale la pena es lo que más cuesta alcanzar. Le agradezco por protegerme siempre y por enseñarme a nunca dejar de sonreír.**

**A mi hermano porque a pesar de ser como dos ramas de un árbol y crecer en diferentes direcciones, nuestra raíz sigue siendo una sola, así la vida de cada uno ha sido parte esencial de la vida del otro.**

**A toda mi familia y amigos, porque con su cariño y apoyo han contribuido a alcanzar cada una de mis metas.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

- **A la Dra. Isaura Meza Gómez Palacio, por la oportunidad de integrarme a su laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia. Por dedicar una parte de su vida en mi formación y desarrollo profesional, siempre con entusiasmo y rigor académico.**
- **A mi Comité Tutorial: Dr. Jorge Tonatiuh Ayala Sumuano, Dr. Michael Schnoor y José Eduardo Pérez Salazar, por su disposición en todo momento, por sus sugerencias y comentarios siempre acertados y valiosos que contribuyeron al desarrollo de este proyecto.**
- **A Mari Carmen Domínguez, Elizabeth Franco y Alejandro Trejo por su apoyo en la fase experimental y por contribuir para que siempre hubiera el material necesario para cada uno de mis experimentos. Pero sobre todo por la amistad brindada.**
- **A Eloy Pérez Yépez, Haruki Arévalo Romero, Aura Jiménez y Daniel Urrutia por compartir conmigo sus conocimientos, sus experiencias y por sus ideas, las cuales ayudaron a enriquecer este proyecto. Les agradezco los momentos de esparcimiento, su apoyo en los momentos de frustración y todo el cariño que me mostraron durante mi estancia en el laboratorio.**
- **A mis compañeros de generación Samuel, Korina, Rosalia, Sandra, Alfredo, Marcos, Carolina, Omar, Eduardo, Denisse, Araceli, Monse y Jordi por su amistad y apoyo en cada momento de esta gran experiencia. Por permitirme ser parte de sus vidas y convertirse en una parte de la mía.**
- **A mis amigos Carmen, Grace, Alejandra, Vincent, Pedro, Heriberto, Gaby y Elizabeth, por su apoyo incondicional, su amistad y aportes académicos para la realización de este trabajo.**
- **Al Departamento de Biomedicina Molecular y al CINVESTAV, por otorgarme la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional al realizar una Maestría en Ciencias.**

**¡MUCHAS GRACIAS!**

## Contenido

Lista de abreviaturas.....	I
Lista de esquemas y figuras .....	III
I. Resumen.....	1
II. Abstract .....	2
III. Introducción .....	3
III.1. Cáncer de mama.....	3
III.1.1. Epidemiología del cáncer de mama.....	3
III.1.3. Patogénesis y progresión del cáncer de mama.....	4
III.2. Metástasis y Transición Epitelio Mesénquima.....	5
III.2.1. Transición Epitelio Mesénquima en la progresión del cáncer.....	7
III.3. Cáncer e Inflamación.....	9
III.3.1. Interleucina-1 $\beta$ en la progresión del cáncer de mama.....	10
III.4. Expresión de S100A7 en la progresión del cáncer.....	13
IV. Justificación.....	15
V. Hipótesis.....	16
VI. Objetivo.....	17
VI.1. Objetivo General.....	17
VI.2. Objetivos Particulares.....	18
VII. Metodología.....	19
VII.1. Cultivo 3D de células MCF-7(6D).....	19
VII.2. Estimulación con IL-1 $\beta$ .....	19
VII.3. Ensayo de viabilidad con Calceína AM.....	20
VII.4. Inmunofluorescencia confocal.....	20
VII.5. Western Blot.....	21
VII.6. Zimografía.....	22
VII.7. PCR tiempo-real.....	23
VIII. Resultados .....	25
VIII.1. Estandarización de cultivos tridimensionales de células MCF-7(6D) .....	25

VIII.2. Interleucina-1 $\beta$ induce dispersión en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.....	28
VIII.3. La exposición de células MCF-7(6D) a IL-1 $\beta$ en cultivos 3D induce la pérdida de los niveles de la proteína E-cadherina.....	31
VIII.4. La IL-1 $\beta$ induce translocación de $\beta$ -catenina en el núcleo de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.....	34
VIII.5. La IL-1 $\beta$ induce un aumento en la capacidad invasiva de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.....	36
IX. Discusión .....	39
X. Conclusiones.....	45
XI. Perspectivas .....	47
XII. Bibliografía .....	48

## Lista de abreviaturas

Cultivo bidimensional	Cultivo 2D
Cultivo trimensional	Cultivo 3D
Transición Epitelio Mesénquima	TEM
Interleucina 1 $\beta$	IL-1 $\beta$
Gen p53	<i>TP53</i>
Gen cáncer de mama 1	<i>BRCA1</i>
Gen cáncer de mama 2	<i>BCRA2</i>
Gen receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano	<i>HER2</i>
Gen ciclina D1	<i>CDH1</i>
Gen cinasa serina/treonina 11	<i>STK11</i>
Gen punto de control cinasa 2	<i>CHEK2</i>
Gen homólogo de la fosfatasa y tensina	<i>PTEN</i>
Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	CDIS
Carcinoma Ductal invasivo	CDI
Transición Mesenquima Epitelio	TME
Metaloproteínasa de Matriz	MMP
Interleucina 6	IL-6
Interleucina 8	IL-8
Factor de Necrosis Tumoral alfa	TNF- $\alpha$
3- metilcolantreno	3-MCA
Macrófagos Asociados al Tumor	MAT
Factor de Crecimiento de Fibroblastos 7	FGF7



Factor de crecimiento epidermal vascular	VEGF
Factor de transcripción nuclear kappa B	NFκB
Matriz extracelular	MEC
Activador de la transcripción y transductor de señales 3	STAT3
Cinasa fosfatidilinositol-3	PI3K
Glucogeno sintetasa cinasa 3 beta	GSK3-β
Receptor tipo 4 de quimiocina CXC	CXCR-4
Oncostatina	OSM
Negativo al Receptor de estrógeno negativo	(RE-)

## Lista de esquemas y figuras

<b>Esquema 1:</b> Etapas necesarias para el desarrollo de la metástasis.....	15
<b>Esquema 2:</b> Eventos celulares que ocurren durante la TEM.....	17
<b>Esquema 3:</b> Representación de los efectos de IL-1 $\beta$ en las células MCF-7 en el inicio de la TEM.....	21
<b>Figura 1:</b> Formación de esferoides de células MCF-7(6D) cultivadas en condiciones 3D.....	36
<b>Figura 2:</b> Evaluación del efecto de la IL-1 $\beta$ en cultivos 3D de células MCF-7(6D).....	38
<b>Figura 3:</b> Efecto de la IL-1 $\beta$ sobre la localización y niveles de expresión de la proteína E-cadherina en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.....	42
<b>Figura 4:</b> Efecto de la IL-1 $\beta$ sobre la localización de $\beta$ -catenina en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.....	44
<b>Figura 5:</b> Efecto de la IL-1 $\beta$ sobre la capacidad invasiva de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.....	47

## I. Resumen

**Introducción:** Los cultivos en monocapa han permitido obtener información valiosa sobre los eventos que ocurren durante la progresión del tumor. En estos cultivos, la exposición de células MCF-7 a IL-1 $\beta$  induce Transición Epitelio Mesénquima (TEM), un evento fundamental para el desarrollo de metástasis. Las células MCF-7 derivadas de cáncer de mama, se consideran no invasivas pero bajo el estímulo de IL-1 $\beta$  muestran una alta capacidad de proliferación, migración e invasión. Los modelos 3D podrían ampliar el conocimiento de los eventos celulares y moleculares que ocurren durante esta transición, dado que permiten la interacción con una matriz extracelular y la arquitectura 3D, características de un modelo *in vivo*. **Metodología:** En el presente trabajo se evaluó el efecto de IL-1 $\beta$  en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D. Se determinaron los niveles traduccionales de E-cadherina y la localización de la proteína  $\beta$ -catenina, proteínas involucradas en la TEM. Se evaluó la actividad de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y la expresión transcripcional del gen *S100A7*, relacionado con el desarrollo de invasión. Finalmente se analizó la capacidad invasiva de estas células en un ensayo tridimensional. **Resultados:** La exposición a IL-1 $\beta$  de células MCF-7(6D) en cultivos 3D indujo dispersión celular, disminución de los niveles de la proteína E-cadherina, y el cambio de localización de  $\beta$ -catenina al núcleo. Además incrementó la actividad proteolítica de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y provocó un incremento en la expresión del gen *S100A7*. Estas características correlacionaron con un incremento en la capacidad de invasión de estas células. **Conclusión:** Nuestros resultados muestran que IL-1 $\beta$  induce TEM en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D y sugieren que en un modelo *in vivo* IL-1 $\beta$  también podría inducir TEM y promover el desarrollo de metástasis.

## II. Abstract

**Introduction:** Monolayer cultures have provided valuable information about events that occur during tumor progression. In these cultures, exposure of MCF-7 cells to IL-1 $\beta$  induces Epithelial Mesenchymal Transition (EMT), a key event to the development of metastases. MCF-7 cells derive from breast cancer and have low invasive potential under the stimulus of IL-1 $\beta$  these cells show a higher proliferation, migration and invasion capacity. 3D models could expand the knowledge of the cellular and molecular events that occur during this transition, since they allow interaction with an extracellular matrix and a 3D architecture, features also that are found in an *in vivo* model. **Methodology:** In the present work we used MCF-7(6D) cells, a cell clone derived from MCF-7 cells. These cells present a uniform response to the stimulation with IL-1 $\beta$  and were used to standardize the 3D cultures, where the effect of IL-1 $\beta$  was evaluated. Cellular localization of  $\beta$ -catenin and protein levels of E-cadherin were analyzed since they represent key factors in the EMT. We also determined the activity of the metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and the transcriptional levels of the *S100A7* gene. Finally the invasive capacity of these cells was also analyzed through 3D migration assays. **Results:** Exposure to IL-1 $\beta$  of MCF-7(6D) cells in 3D cultures induced cellular dispersion, decrease of the levels of the E-cadherin protein, and the relocalization of  $\beta$ -catenin to the nucleus. We also found an increase in the proteolytic activity of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and higher expression levels of the *S100A7* gene. These characteristics correlated with an increase in the capacity of invasion of the cells. **Conclusion:** Our results show that IL-1 $\beta$  is able to induce EMT in MCF-7(6D) cells in a 3D-model, which suggests that it is highly probable that the effects of IL-1 $\beta$  are reproducible in an *in vivo* model.

### **III. Introducción**

#### **III.1. Cáncer de mama**

##### **III.1.1. Epidemiología del cáncer de mama**

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres a nivel mundial. Durante el 2012 se presentaron 1,67 millones de nuevos casos de cáncer de mama, lo que represento el 25% de todos los tipos de cáncer. En este mismo periodo en las regiones de mediano desarrollo, en donde se ubica a nuestro país, el cáncer de mama se clasificó como la quinta causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres con 522 000 muertes. En este mismo año el cáncer de mama fue la primera causa de muerte por cáncer en la población femenina con 324,000 muertes, lo que representó el 14,3% del total de muertes por enfermedades oncogénicas. (GLOBOCAN, 2012). En México el cáncer de mama también es el cáncer más común en la población femenina y representa la primera causa de mortalidad por tumores malignos en esta población. En el 2012 la incidencia de este cáncer en mujeres mayores de 20 años fue del 30.9% y la mortalidad del 15% (INEGI, 2012).

##### **III.1.2. Etiología del cáncer de mama**

El desarrollo de cáncer de mama se ha asociado con múltiples factores como son la edad, el consumo de alcohol y cigarro, un elevado consumo de grasas, el número de embarazos, edad del primer embarazo, predisposición familiar, alteraciones genéticas, el uso de anticonceptivos orales, entre otros. [1-3]. Actualmente la incidencia de cáncer de mama es más alta en las mujeres mayores de 40 años, lo que ha sugerido que los estrógenos son uno de los agentes involucrados en el desarrollo de esta neoplasia. La exposición a estrógenos *in vitro* sobre células epiteliales mamarias ha mostrado inducir la

transcripción y la secreción de múltiples factores mitogénicos que favorecen el crecimiento de las células epiteliales [4]. Además se han reportado mutaciones en genes que participan en la regulación del ciclo celular, regulación de la proliferación, reparación del DNA y estabilidad del genoma como *TP53*, *BRCA1*, *BCRA2*, *HER2*, *CDH1*, *STK11*, *CHEK2* y *PTEN*. Mutaciones en el gen de *BRCA1* o *BRCA2* predisponen al desarrollo de este cáncer hasta en un 80%. Sin embargo estas mutaciones solo explican del 5 al 10% de total de casos de cáncer de mama [5, 6].

El desarrollo del cáncer de mama también ha sido asociado con el tiempo de exposición a hormonas sexuales endógenas durante la vida [7] y a hábitos alimenticios como el consumo de grasas [8-10]. Hasta el momento, ninguno de estos factores ha mostrado ser determinante para el desarrollo de esta enfermedad.

### **III.1.3. Patogénesis y progresión del cáncer de mama**

El cáncer de mama se origina principalmente en las estructuras ductales y glandulares del tejido mamario. Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales y el resto son lobulares [11]. La patogénesis de un carcinoma ductal mamario puede iniciar como resultado de alteraciones en las células epiteliales que recubren los conductos mamarios. Estas alteraciones a su vez inducen la inhibición de crecimiento por contacto y las células proliferan de manera descontrolada, generando una hiperplasia ductal benigna. Una vez que estas células adquieren además, alteraciones que permiten rearrreglos en el citoesqueleto y cambios morfológicos, la hiperplasia ductal benigna progresa a una hiperplasia ductal atípica. El siguiente estadio es el carcinoma ductal *in situ* (CDIS), también llamado carcinoma intraductal, el cual se caracteriza porque el tumor no ha salido del conducto ni ha invadido a otros tejidos que rodean al seno, sin embargo, la proliferación de estas células continúa incrementando. Posterior a la formación del CDIS, el tumor puede adquirir características que le permitan invadir el tejido circundante y convertirse en un carcinoma ductal invasivo (CDI), también denominado carcinoma ductal infiltrante. Finalmente este tumor puede

adquirir la capacidad de migrar y expandirse a otras partes del cuerpo, entonces se convierte en un tumor que ha desarrollado metástasis [12].

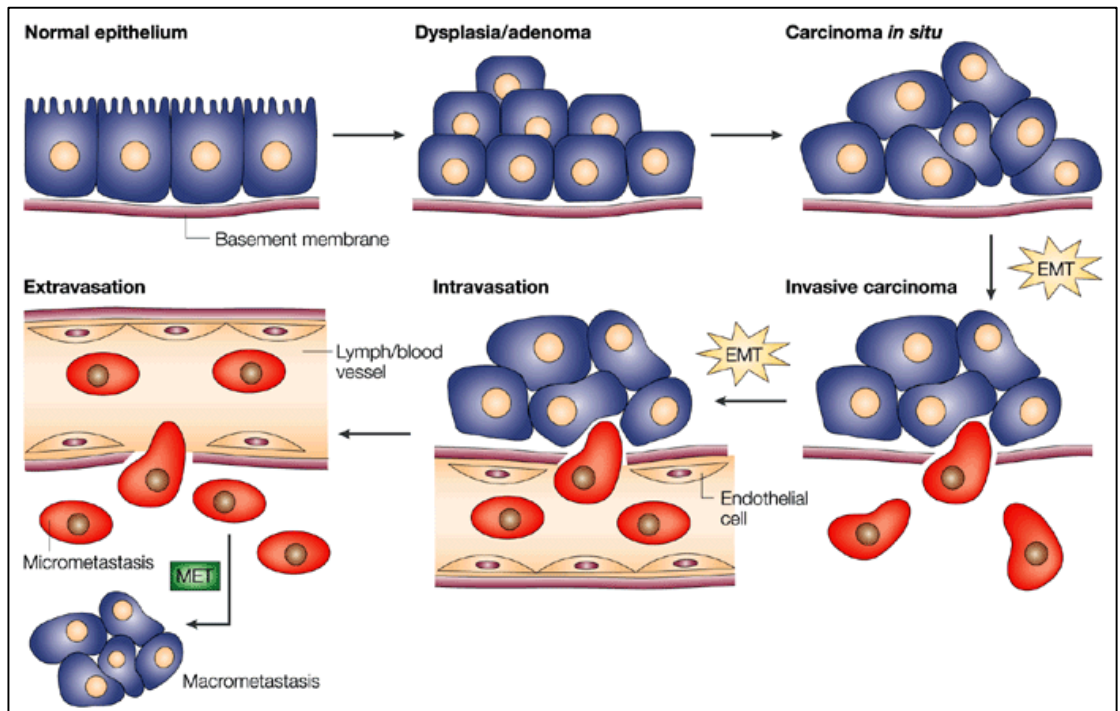
El cáncer de mama es un cáncer de evolución lenta, sin embargo, el problema clínico de este cáncer al igual que el de otros tipos de neoplasias, son los procesos de invasión y metástasis, que implican la alteración del tejido normal que rodea a la neoplasia y que conducen finalmente a la muerte del paciente. En el cáncer de mama, los órganos blancos principales de metástasis son el hueso, el hígado, los pulmones y el cerebro[13, 14].

### **III.2. Metástasis y Transición Epitelio Mesénquima**

La metástasis es el fenómeno por medio del cual, las células neoplásicas se dispersan desde el sitio primario del tumor a un sitio secundario a través de los tejidos del cuerpo humano [15]. Esta diseminación celular es la principal causa de muerte ocasionada por neoplasias, por lo que el estudio de los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de este evento celular ha sido objeto de estudio en los últimos años [16].

En la metástasis se pueden distinguir diversas etapas: (1) la separación de las células neoplásicas del tumor primario, (2) la invasión del tejido circundante, (3) la entrada a los vasos sanguíneos o linfáticos (intravasación) (4) la diseminación en el torrente sanguíneo o linfático y (5) la salida de los vasos sanguíneos o linfáticos (extravasación) y la multiplicación celular en un sitio secundario (Esquema 1).[15, 17, 18]

Durante las etapas iniciales de la metástasis ocurre un proceso determinante denominado Transición Epitelio Mesénquima (TEM), el cual induce que las células neoplásicas adquieran un cambio fenotípico que les permita migrar e invadir [18].



**Esquema 1: Etapas necesarias para el desarrollo de metástasis.** La transición epitelio mesénquima (EMT) es un proceso fundamental para la progresión de células epiteliales normales a un carcinoma invasivo [18].



### **III.2.1. Transición Epitelio Mesénquima en la progresión del cáncer**

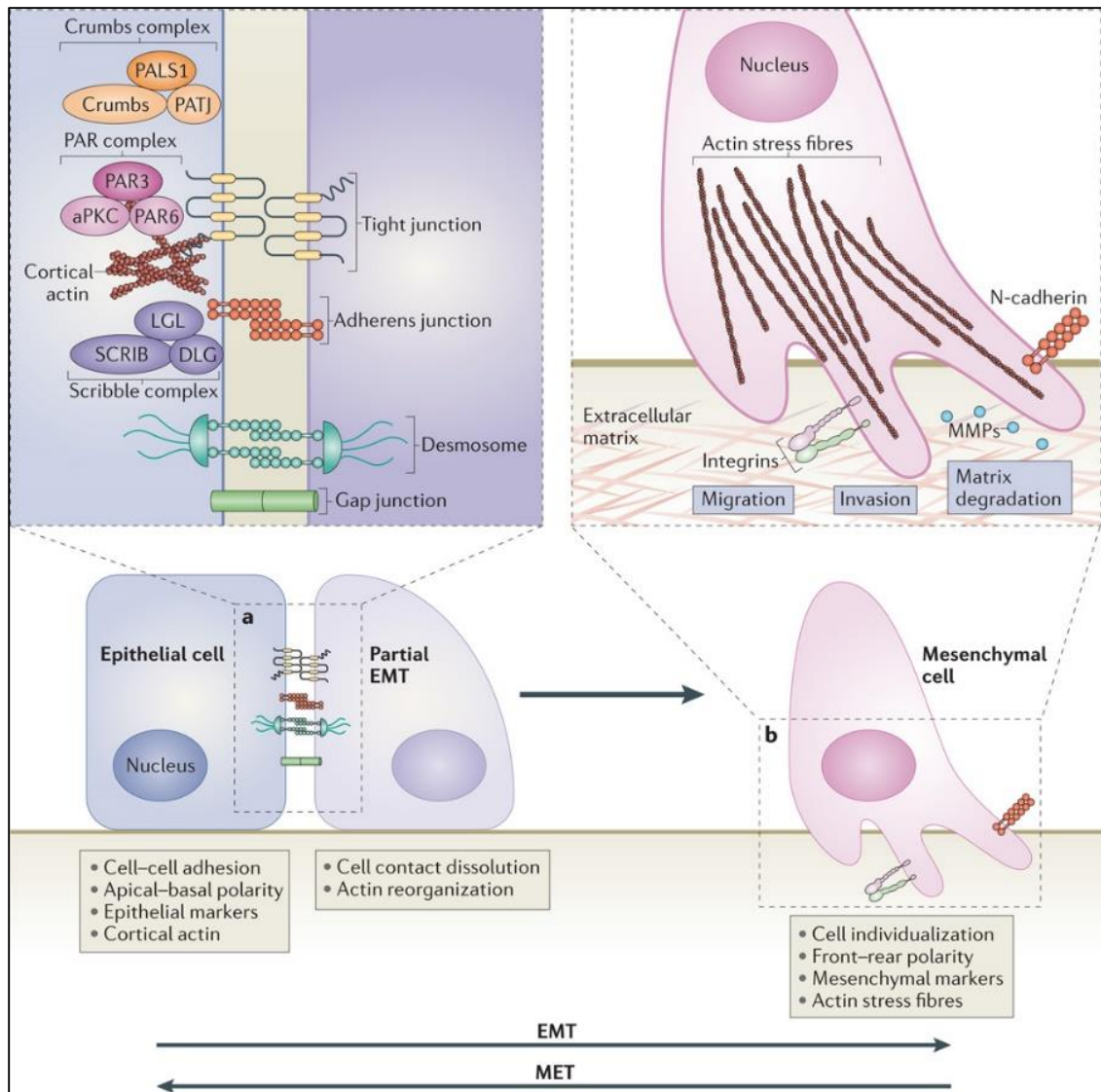
La transición epitelio mesénquima es un proceso por el cual las células epiteliales adquieren un fenotipo de células mesenquimales. Este proceso fue definido originalmente en el estudio de desarrollo embrionario, principalmente durante la gastrulación, la formación de la cresta neural y desarrollo de tejidos y órganos [19]. Estudios recientes han mostrado la asociación de la TEM y el desarrollo de metástasis en varios tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de mama, próstata, páncreas, pulmón, entre otros. [20, 21].

Durante la TEM ocurre una reprogramación de la expresión de genes así como un cambio en la expresión proteica, los cuales favorecen el desensamble de las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, la pérdida de la polaridad apicobasal, la reorganización de la arquitectura del citoesqueleto, la formación de fibras de estrés y el desarrollo de estructuras que permiten la motilidad de las células como lamelipodios (Esquema 2). [17, 22].

Durante la TEM disminuye la expresión de marcadores de células epiteliales como es E-cadherina y aumenta la expresión de marcadores de células mesenquimales tales como vimentina, fibronectina, N-cadherina y metaloproteínas de la matriz (MMPs) como MMP-2, MMP-3 y MMP-9. Este recambio en el repertorio molecular es inducido por la expresión de factores transcripcionales como Snail, Slug, Twist y Zeb, los cuales se unen a regiones específicas de sus genes blancos y reprimen su transcripción [23].

La TEM es controlada por varias vías de señalización que normalmente funcionan en el desarrollo embrionario temprano y la homeostasis del tejido. Sin embargo, su desregulación promueve la progresión de la malignidad del tumor. La activación de estas vías puede iniciar por la unión de diferentes receptores de la superficie celular con su ligando específico como: la unión de integrinas con diferentes elementos de la matriz extracelular [24], la activación de los receptores de la familia de proteínas del TGF $\beta$  (Factor de Crecimiento Tisular- $\beta$ )

[25] la activación de los receptores tirosin-cinasa [26], la unión de WNT con su receptor específico y el co-receptor Frizzled [27] y la unión de algunas citosinas proinflamatorias con su receptor [28].



**Esquema 2: Eventos celulares que ocurren durante la TEM.**

a) Los primeros eventos de la transición epitelio mesénquima (EMT) son el desmontaje de los contactos epiteliales célula-célula, la pérdida de la polaridad celular, la represión de genes epiteliales y activación de genes mesenquimales. **b)** En seguida, se produce la reorganización de la arquitectura epitelial y la expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMPs). El proceso de transición mesénquima epitelio (MET) permite que las células que han sufrido TEM puedan volver a su forma epitelial [23].

### III.3. Cáncer e Inflamación

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado una estrecha relación entre la inflamación y el desarrollo de tumores malignos como cáncer de vejiga, cérvix, esófago, estómago, intestino, ovario próstata, glándula tiroides, colon, páncreas, y mama [29]. Existen evidencias de que el uso de manera regular de antiinflamatorios no esteroideos disminuye el riesgo de desarrollar cáncer y la tasa de mortalidad de cáncer de mama y colon [30]. Se estima que entre un 15-20% del total de las muertes por cáncer alrededor del mundo, se encuentran asociadas con infecciones subyacentes [31-33].

En los carcinomas se ha caracterizado una subpoblación de macrófagos que circundan la masa tumoral. Estas células se han denominado como Macrófagos asociados al tumor (MAT), los cuales se ha propuesto que son inducidos por las células malignas para secretar citocinas proinflamatorias y promover el desarrollo del carcinoma [34]. Actualmente, la relación causa-efecto entre la inflamación, la inmunidad innata y el cáncer es bien conocida y aceptada, sin embargo muchos de los mecanismos celulares y moleculares que medían este fenómeno permanecen sin ser comprendidos a detalle [35].

Se han identificado citocinas proinflamatorias en el microambiente tumoral como es el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [36] la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [37] la interleucina-6 (IL-6) [38] y la interleucina-8 (IL-8) [39] las cuales contribuyen mediante diversos mecanismos en los procesos tumorales. Particularmente, en cáncer de mama, entre las citosinas con mayor expresión se encuentran la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  [40-44].

### III.3.1. Interleucina-1 $\beta$ en la progresión del cáncer de mama

La interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) es un importante mediador de la inflamación relacionada con el cáncer que puede ser secretada por células del sistema inmunológico, estromales y tumorales [45]. La IL-1 $\beta$  promueve diversos eventos importantes para el desarrollo y progresión del cáncer como la proliferación, la migración, la angiogénesis, la TEM y la metástasis [46-48]. La IL-1 $\beta$  puede inducir la secreción de otras otras citocinas proinflamatorias [49] metaloproteinasas de matriz (MMPs) [50], factores de crecimiento [51] y factores angiogénicos [52] y a través de estos, favorece el desarrollo del cáncer.

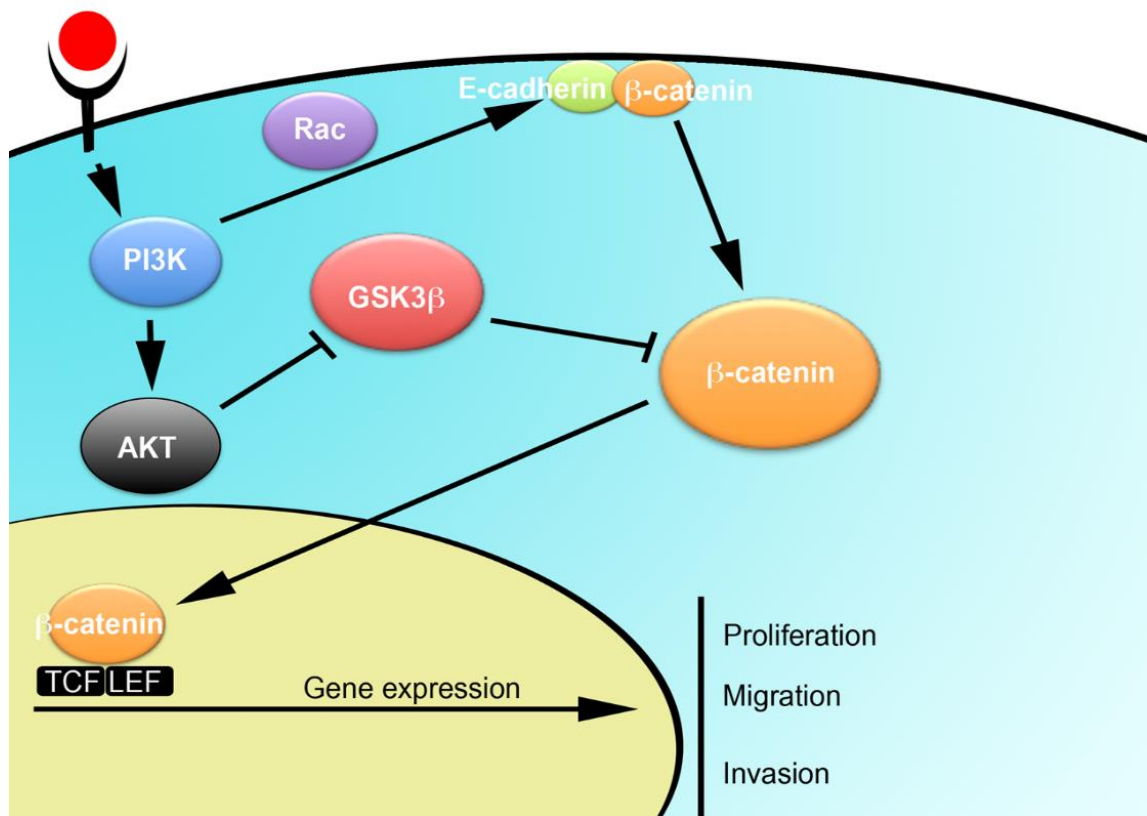
La inducción de tumores con el agente químico 3-metilcolantreno (3-MCA) en ratones deficientes de la IL-1 $\beta$  mostró que en comparación con el grupo de ratones control, un porcentaje menor de ratones deficientes desarrollo tumores. Este resultado muestra el papel de la IL-1 $\beta$  en la carcinogénesis [53]. El uso del modelo de ratón deficiente de IL-1 $\beta$ , también demostró que IL-1 $\beta$  es responsable de la angiogénesis tumoral *in vivo* y la invasión de células de melanoma B16; la angiogénesis fue menor en los ratones deficientes de IL-1 $\beta$  comparada con la observada en ratones control. La inoculación de IL-1 $\beta$  recombinante en los ratones deficientes de esta citocina restauró la capacidad angiogénica [54].

Interleucina 1 $\beta$  está presente en las lesiones benignas y los CDIS y su expresión es incrementada en los carcinomas de mama invasivos [138]. Los altos niveles de IL-1 $\beta$  correlacionan con marcadores de mal pronóstico en el cáncer de mama como son la pérdida en la expresión de receptores de estrógenos, la presencia de p53, la ausencia de bcl-2 y la expresión de otras citocinas pro-inflamatorias [55].

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que las células MCF-7 derivadas de cáncer de mama, que carecen de características invasivas, cuando se exponen a la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  sufren cambios

morfológicos y reordenamientos del citoesqueleto de actina los cuales conducen a un fenotipo invasivo. La IL-1 $\beta$  activa vías de señalización mediadas por PI3K y la GTPasa Rac. Además, se encontró que la IL1- $\beta$  induce la expresión del receptor CXCR4 y la quimiotaxis a la quimiocina CXCL12, e incrementa los niveles de la MMP-2 y la MMP-9. Aunque en estos estudios la respuesta de las células a la estimulación de IL-1 $\beta$  no fue homogénea ya que sólo 20% de la población mostró los cambios mencionados, los resultados sugirieron que la IL-1 $\beta$  era capaz de inducir la aparición de una TEM [47].

En células MCF-7(6D), una clona derivada de células MCF-7 que responde de manera homogénea a IL-1 $\beta$ , se determinó que esta citocina induce la disminución de E-cadherina uno de los primeros marcadores de transición epitelio mesénquima [56]. La IL-1 $\beta$ , además aumenta la expresión y la translocación al núcleo de  $\beta$ -catenina y favorece la expresión de genes como c-MYC, CCDN1 y SNAIL1. Estos resultados demostraron que la IL-1 $\beta$  induce TEM en células de cáncer de mama, a través de la activación de la vía IL-1 $\beta$ /IL-1RI/ $\beta$ -catenina. La unión de esta citosina proinflamatoria a su receptor IL-1RI induce reordenamiento del citoesqueleto de actina a través de la vía de señalización PI3K-AKT, lo que favorece el desensamble de las uniones celulares y la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma. Por otro lado, la activación de la vía de señalización de PI3K también induce la actividad de Akt mediante la cual se inhibe a la cinasa GSK3. La cinasa GSK3 se encarga de marcar a  $\beta$ -catenina para inducir su degradación, por ello la inhibición de su actividad permite que  $\beta$ -catenina se acumule en el citoplasma y se transloque al núcleo, donde regula la expresión de genes que participan en la proliferación, invasión y migración (Esquema 3) [48].



**Esquema 3: Representación de los efectos de IL-1 $\beta$  en las células MCF-7 en el inicio de la TEM.** IL-1 $\beta$  induce reordenamientos del citoesqueleto a través de la vía de Rac, induciendo la deslocalización de  $\beta$ -catenina de las uniones celulares, lo que permite su localización en el citoplasma. De forma paralela, la señalización de IL-1 $\beta$  induce la inhibición de la actividad de GSK3 $\beta$ , resultando en la translocación al núcleo de  $\beta$ -catenina donde regula de forma positiva la expresión de genes implicados en la proliferación celular, la migración y la invasión [48].

### **III.4. Expresión de S100A7 en la progresión del cáncer**

Las proteínas de la familia S100 han sido implicadas en el desarrollo de migración e invasión en células de cáncer de mama cultivadas *in vitro* [52]. Se ha reportado que algunos miembros de esta familia como S100A4 y S100A7 presentan una expresión elevada en carcinomas de mama invasivos. [53]. En células de mama que no expresan el receptor de estrógenos RE(-), la expresión de S100A7 correlaciona con el aumento de la migración e invasión [55]. La expresión de S100A7 también se ha asociado con un aumento en la infiltración de células inflamatorias en los tumores invasivos de mama y diversos trastornos inflamatorios [52]. Algunas citocinas, incluyendo la OSM (oncostatina) y la IL-6 han demostrado inducir la expresión de S100A7 a través de las vías de STAT3, PI3K, AKT y NFκB [55].

La estimulación de células MCF-7 con la IL-1β induce la expresión de la proteína S100A4 y la expresión de características que aumentan la capacidad de migración e invasiva de estas células, a través de la vía PI3K-Rac [44]. Sin embargo, la IL-1β podría además inducir la expresión de otros miembros de la familia de S100, como S100A7.

### **III.5. Modelos *in vitro* utilizados para el estudio del cáncer de mama**

Estudios *in vitro* de células de cáncer de mama, cultivadas en monocapa, han sido fundamentales para la comprensión de los eventos celulares, los eventos moleculares y las vías de señalización implicadas que llevan a la alteración de la proliferación, resistencia a la muerte celular, desregulaciones del ciclo celular, desarrollo de metástasis, y otras alteraciones que caracterizan a las células neoplásicas [57]. Las líneas celulares de cáncer de mama, al igual que otras líneas celulares, presentan una alta heterogeneidad celular que genera variaciones en la respuesta a un estímulo y dificulta la interpretación de



resultados. La generación de clonas celulares puede reducir la heterogeneidad de las líneas celulares y facilitar el análisis de los eventos inducidos por un estímulo específico [56].

En nuestro laboratorio se estableció la clona celular MCF-7(6D) a partir de células MCF-7 seleccionadas bajo el estímulo de IL-1 $\beta$  y utilizando como marcador de selección el aumento en la expresión del receptor CXCR4, asociado con el desarrollo de metástasis. La comparación entre las células MCF-7(6D) y las células MCF-7 no seleccionadas, demostró que las células MCF-7(6D) responden de manera homogénea al estímulo de IL-1 $\beta$  y conservan la expresión del receptor IL-1R1 por mayor tiempo [56]. Las células MCF-7(6D) presentaron incremento en su capacidad de migración e invasión respecto a las células MCF-7. Además la estimulación de estas células mostró otras características no observadas previamente, como la disminución de los niveles de la proteína E-cadherina y la translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo. Este modelo permitió caracterizar los eventos moleculares y celulares inducidos por IL-1 $\beta$  [48].

Las células epiteliales glandulares, como las que forman una glándula mamaria, presentan varias características distintivas que incluyen: a) una morfología polarizada, b) contactos célula-célula especializados y c) el anclaje a una lámina basal [58]; dichas características están ausentes en los modelos 2D. Debido a estas limitaciones, han sido empleados para el estudio del cáncer de mama los cultivos tridimensionales o 3D [16]. Se ha observado que un mismo tipo celular cultivado en 2D o 3D muestra diferencias en la expresión génica así como en la expresión proteica como respuesta a un estímulo [59]. El cultivo de células MCF-7(6D) en un contexto tridimensional podría ampliar el conocimiento sobre los eventos celulares y moleculares inducidos por la IL-1 $\beta$  en células de mama.



## IV. Justificación

Datos experimentales y epidemiológicos han mostrado que IL-1 $\beta$  participa en el desarrollo de la metástasis, la cual es el principal problema clínico del cáncer. Los mecanismos moleculares y celulares que favorecen el desarrollo de la metástasis continúan siendo definidos.

En células MCF-7 cultivadas en 2D la señalización de IL-1 $\beta$  induce Transición Epitelio Mesénquima, un proceso esencial para el desarrollo de metástasis. Sin embargo, a pesar de que el uso de este modelo ha proporcionado información importante sobre la participación del microambiente inflamatorio en la progresión del cáncer, éste posee la desventaja de no representar las características de un tumor *in vivo*.

El uso de modelos, que proporcionen un contexto estructural y funcional más apropiado para examinar las actividades biológicas, podría ampliar el conocimiento de los eventos inducidos por IL-1 $\beta$  en células de cáncer de mama. Los cultivos 3D han mostrado conservar algunas características importantes de un tumor *in vivo* como son: el anclaje a la lámina basal y principalmente la arquitectura 3D. Dichas características tienen un papel importante en las vías de señalización celular que regulan la migración celular.

## V. Hipótesis

La exposición de células MCF-7(6D) al estímulo de la citocina IL-1 $\beta$  en cultivos tridimensionales inducirá eventos relacionados con la Transición Epitelio Mesénquima, como el desensamble de las uniones celulares, incremento en la expresión de las metaloproteínas de matriz, y el aumento de la capacidad invasiva de estas células, como se ha observado en cultivos 2D. Además la IL-1 $\beta$  incrementará los niveles de expresión del gen *S100A7*, otro marcador asociado con el desarrollo de invasión.

## **VI. Objetivo**

### **VI.1. Objetivo General**

Evaluar en células de cáncer de mama en cultivos 3D los eventos celulares y moleculares relacionados con la transición hacia la malignidad inducida por el estímulo inflamatorio de la IL-1 $\beta$ .

## VI.2. Objetivos Particulares

1.- Estandarizar el cultivo 3D de células MCF-7(6D) en ausencia y presencia de la IL-1 $\beta$ .

a) Caracterizar la formación de estructuras 3D de células MCF-7(6D).

b) Evaluar el efecto de la IL-1 $\beta$  sobre la arquitectura de estructuras 3D de células MCF-7(6D).

2.- Evaluar el papel de la IL-1 $\beta$  en la Transición Epitelio Mesénquima en un modelo 3D de células MCF-7(6D).

a) Determinar los niveles de la proteína y la localización de E-cadherina en cultivos 3D de células MCF-7(6D) en presencia y ausencia de la IL-1 $\beta$ .

b) Determinar la localización de  $\beta$ -catenina en cultivos 3D de células MCF-7(6D) en presencia y ausencia de la IL-1 $\beta$ .

3.- Analizar la capacidad de invasión de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D, inducida por la IL-1 $\beta$ .

a) Medir la secreción de MMP-2 y MMP-9 en cultivos 3D de células MCF-7(6D) en presencia y ausencia de la IL-1 $\beta$

b) Evaluar la expresión del gen *S100A7* en cultivos 3D de células MCF-7(6D) en presencia y ausencia de la IL-1 $\beta$ .

c) Determinar la capacidad invasiva de las células MCF-7(6D) cultivadas en 3D en presencia y ausencia de la IL-1 $\beta$ .

## **VII. Metodología**

### **VII.1. Cultivo 3D de células MCF-7(6D)**

Monocapas de una clona de células MCF-7 previamente obtenida y que ha mostrado presentar una respuesta homogénea al estímulo de IL-1 $\beta$  (MCF-7,6D) se utilizaron para este estudio (Pérez-Yépez et al, 2012). Las células MCF-7(6D) fueron crecidas en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino) y 1% de antibiótico en solución. Estos cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos subconfluentes de monocapas de células MCF-7(6D) fueron desprendidos con EDTA al 0.1% y con Tripsina al 0.25% durante 5 minutos, respectivamente. Posteriormente las células fueron resuspendidas en medio con suero y contadas.

Las células MCF-7 (6D), a una densidad de 7000 cel/cm<sup>2</sup>, se sembraron sobre una capa de Matrigel™ Basement Membrane Matrix (Becton & Dickinson Biosciences, USA) de 75 $\mu$ l/cm<sup>2</sup> previamente adicionada sobre la superficie de cultivo y solidificada a 37 °C, durante 20 minutos. Estas células fueron crecidas en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 10%, más 2% de Matrigel®. El cultivo se mantuvo en incubación a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 2 días.

### **VII.2. Estimulación con IL-1 $\beta$**

Las células MCF-7(6D) sembradas en condiciones 3D se crecieron durante 6 días. Después de este periodo, los cultivos 3D se lavaron con PBS y se cambiaron a medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con únicamente 1% de SFB, 1% de antibiótico y 2% de Matrigel® por un periodo de 18h. Transcurrido este periodo, las células se estimularon con la IL-1 $\beta$  (Reprotech; Rocky Hill, NJ USA) a una concentración de 60 ng/ml, en medio DMEM/F-12 suplementado con

1% de SFB, 1% de antibiótico y 2% de Matrigel® durante 12 días. Cada 48 horas se realizó el recambio de medio y de la IL-1.

### **VII.3. Ensayo de viabilidad con Calceína AM**

Cultivos tridimensionales de células MCF-7(6D) sembrados en placas de 96 pozos se crecieron durante 6 días. Después de estos 6 días, las células se cambiaron a medio DMEM/F-12 suplementado con 1% de SFB durante 18 horas y finalmente, se estimularon por 12 días con 60ng/μl de IL-1β, haciendo un recambio de la citocina cada 48 horas. Para determinar la viabilidad de estos cultivos, después del periodo de estimulación, los cultivos se lavaron con PBS, y se incubaron con 1 mg/ml de Calceína AM® y 1 mg/ml de yoduro de propidio durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Posteriormente, las células se observaron mediante microscopia de epifluorescencia, se tomaron imágenes de 10 campos tomados al azar, y se determinó el porcentaje de células vivas y muertas.

### **VII.4. Inmunofluorescencia confocal**

Las células MCF-7(6D) se crecieron en condiciones tridimensionales sobre cubreobjetos con cámara de 8 pozos, durante 6 días. Después se cambiaron a medio DMEM/F-12 con 1% de SFB durante 18 horas y a continuación se estimularon con 60 ng/ml de IL-1β durante 12 días. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3.7% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con una solución Triton X-100 al 0.5% durante 15 minutos a TA y se bloquearon con BSA al 0.5% durante 1h a TA.

Para realizar la inmunodetección específica de las proteínas analizadas, las células, se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra E-cadherina (BD PharMingen, San Diego, CA; 1:100) o un anticuerpo monoclonal contra β-catenina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; 1:100) durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron con PBS-Tween al 0.05% y se

incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG correspondiente, marcado con Alexa Fluor 488 ® en una dilución 1:100, durante 60 min a 37 °C en cámara húmeda. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con PBS-Tween al 0.05% a temperatura ambiente, se expusieron durante 5 minutos a una dilución 1:4000 del colorante DAPI y se lavaron nuevamente con PBS y agua desionizada. Finalmente, las células, se montaron con Vectashield® (Vector Laboratories, USA) y se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia.

## **VII.5. Western Blot**

Células MCF-7(6D) se cultivaron en placas de 24 pozos en condiciones 3D y se estimularon o no, con IL-1 $\beta$  durante 12 días para realizar extractos celulares. Para obtener los extractos celulares a partir de los cultivos 3D, estimulados y no estimulados, fue necesario remover el Matrigel® que rodea a las células en estos cultivos incubando con una mezcla 1:1 de una solución de Tripsina al 0.25 % y EDTA al 0.1% durante 1h. Después de este tiempo se inactivó la tripsina y las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se lavaron con PBS. A continuación se hizo la extracción de proteínas totales con una solución de lisis que contiene Tris-HCl 50mM pH 7.5, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM Tritón X-100al 1%, mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), fluoruro de sodio 1 mM y ortovanadato de sodio 1mM. El botón celular obtenido después de lavar con PBS, se resuspendió en 50 $\mu$ L de Buffer de Lisis y se incubó en hielo durante 15 minutos. Después de este periodo las células se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y la concentración de proteínas de los extractos se determinó por el método de Bradford.

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) a 350 mAmp de corriente constante durante 2h. Las

membranas se bloquearon con BSA en solución de Buffer Salino de Tris (TBS, Tris 50 mM, NaCl 150mM pH 7.6) adicionado con 0.1% de Tween 20 (TBST), durante 1 hora. Para la detección específica de la proteína E-cadherina se utilizó el anticuerpo monoclonal contra E-cadherina (BD PharMingen, San Diego, CA; 1:5000). En seguida la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse acoplado a peroxidasa a una dilución 1:5000, por 1h a temperatura ambiente. Finalmente los complejos inmunoproteicos se revelaron por quimioluminiscencia.

## **VII.6. Zimografía**

Después de la estimulación de los cultivos tridimensionales con IL-1 $\beta$ , sembrados en placas de 24 pozos, se recuperaron los medios condicionados y se concentraron utilizando el sistema Amicon® (Millipore, USA). La actividad proteolítica de estos medios de cultivo, se determinó mediante geles de sustrato de gelatina empleando un buffer de muestras compuesto por 2.5% de SDS, 1% de sucrosa y 4 $\mu$ g/ml de rojo fenol, sin agentes reductores.

Las muestras se corrieron en geles al 8% de poliacrilamida copolimerizados con gelatina (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Después de la electroforesis a 70 V durante 2.5 h en frío, el gel se lavó tres veces con buffer de lavado renaturalizante, compuesto de: PBS-Triton X-100 2.5% para eliminar el SDS de las proteínas. Enseguida los geles se incubaron sumergidos en un buffer compuesto por 50mM Tris/HCl a pH 7.4 y 5mM CaCl<sub>2</sub> a 37 °C, durante 24-36 h para restituir la actividad proteolítica que estuviera presente en los extractos proteicos de las células. Los geles se tiñeron con una solución de 0.25% de Azul Brillante de Coomasie G-250 en 10% de ácido acético y 30% de metanol y se determinó la actividad de metaloproteasas, observando las zonas claras en los geles en donde la gelatina había sido degradada.



## VII.7. PCR tiempo-real

Cultivos 3D de células MCF-7(6D), estimulados y no estimulados, se incubaron con una mezcla de 1:1 de una solución de Tripsina al 0.25 % y EDTA al 0.1% durante 1h, para degradar el Matrigel®. Después de inactivar la tripsina, las células se lavaron con PBS y posteriormente se realizó la extracción de RNA total por el método de Trizol®. Posteriormente se cuantificó la concentración del RNA total utilizando el NanoDrop y se utilizó 2.5 µg de RNA total para generar el cDNA por medio de la transcriptasa reversa (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un µl de cDNA fue utilizado para realizar las mezclas de PCR con la utilización del Kit FastStart SYBR Green Master (Roche Applied Science; Mannheim, Alemania). La formación de los productos fue visualizada por medio de la incorporación de SybrGreen® y la reacción de amplificación se llevó a cabo durante 50 ciclos (95°C por 10 min, 94°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto). En cada reacción se utilizó un par de cebadores específicos para el gen *S100A7*. La secuencia del cebador forward fue: ACGTGATGACAAGATTGACAAGC y la secuencia del cebador reverse fue: GCGAGGTAATTTGTGCCCTTT. La expresión del gen *S100A7* fue normalizada respecto a la expresión del gen constitutiva *rpl0*. Curvas de disociación para cada par de cebadores indicaron un solo producto amplificado. Los valores de expresión génica están definidos como el número de incrementos con respecto al tiempo cero y fueron determinados por medio de las fórmulas:

$$\Delta CT0 = CT0 - CTH0$$

$$\Delta CT1 = CT1 - CTH1$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT1 - \Delta CT0$$

$$F = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Donde, CT0 es el número de ciclo en el cual se obtuvo un incremento significativo en la amplificación del producto de PCR del gen problema cuantificado al tiempo

cero; CTH0 es el número de ciclo en el cual se obtuvo un incremento significativo en la amplificación del producto de PCR del gen constitutivo cuantificado al tiempo cero; CT1 es el número de ciclo en el cual se obtuvo un incremento significativo en la amplificación del producto de PCR del gen problema cuantificado al tiempo t; CTH1 es el número de ciclo en el cual se obtuvo un incremento significativo en la amplificación del producto de PCR del gen constitutivo cuantificado al tiempo t; y, F es el número de veces que un gen se sobre- o sub-expresa con respecto al tiempo cero.

## **VII.8. Ensayo de Invasión 3D**

Células MCF-7(6D) se crecieron en la parte superior de cámaras Transwell® en condiciones 3D, como ya se ha descrito en la sección de cultivo 3D. Después de 6 días de cultivo, las células se cambiaron a medio con 1% de SFB y se mantuvieron con este medio durante 18 horas, posteriormente se estimularon durante 12 días con IL-1 $\beta$ . Después de los 12 días, en la parte inferior de la cámara se colocó, por 48 horas, medio DMEM/F-12 suplementado con 100ng/ml de la quimocina CXCL12, utilizada en este ensayo como quimioatrayente de células que expresan el receptor CXCR4, característico de células invasoras y que se encuentra expresado en las células MCF-7(6D).

Después de las 48 horas, el medio de cultivo de la cámara superior y las células que no migraron fueron removidos de la cara superior de los filtros. Las células que migraron a través del filtro y quedaron adheridas a la parte inferior del mismo fueron fijadas con paraformaldehído al 3.4% por 30 minutos, permeabilizadas con PBS-Triton X-100 al 0.5 % y teñidas con DAPI. Los filtros fueron montados con Vectashield® sobre portaobjetos de vidrio y se determinó el número de células que atravesaron la capa de Matrigel® contando los núcleos fluorescentes en 10 campos ópticos elegidos al azar para calcular cada una de las condiciones analizadas.

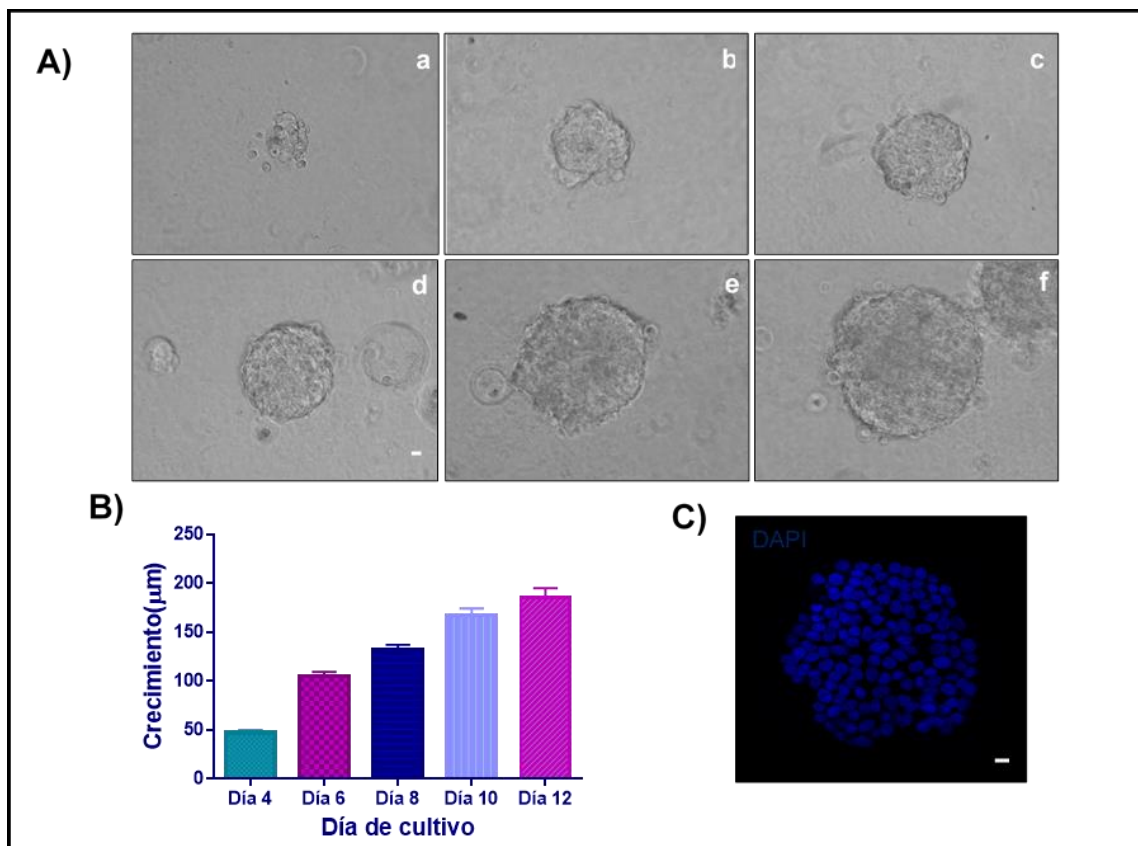
## **VIII. Resultados**

### **VIII.1. Estandarización de cultivos tridimensionales de células MCF-7(6D)**

Las células MCF-7(6D) son una clona de células MCF-7 que tienen la capacidad de responder de forma homogénea al estímulo de IL-1 $\beta$ . En cultivos 2D, esta clona, muestra características de células cancerosas invasivas como es una alta capacidad de proliferación, migración e invasión [56]. Utilizando el método de cultivo tridimensional (3D) reportado por Mina Bisell [58] se cultivaron células MCF-7(6D) y se observó el crecimiento celular durante doce días.

En la figura 1Aa se muestran imágenes representativas de estas células en cultivo 3D al día 2 de crecimiento, donde se observa que las células formaron agregados de entre 6 y 8 células aproximadamente. Al cuarto día de cultivo (figura 1Ab) los agregados celulares formaron estructuras esféricas que presentaron un diámetro promedio de 47 micras. Para el sexto día la estructura incrementó su diámetro 2.25 veces respecto al día 4 y alcanzó un diámetro promedio de 106  $\mu\text{m}$  (Figura 1Ac), al día 8 (Figura 1Ad) las esferas incrementaron el diámetro 1.2 veces respecto al día 6 y presentaron un diámetro promedio de 135  $\mu\text{m}$ . Al día 10 se observó que el tamaño de la esfera incremento su tamaño 1.3 veces respecto al día 8 de cultivo y alcanzó un diámetro promedio de 176  $\mu\text{m}$  (Figura 1Ae) y finalmente, al día 12 el incremento fue de solo 1.1 veces respecto al día 10 y las estructuras alcanzaron un diámetro promedio de 194  $\mu\text{m}$  (Figura 1Af). En la figura 1B se graficaron los diámetros promedio de 50 esferas en cada día de crecimiento. Estos resultados sugieren que la tasa de proliferación de las células MCF-7(6D) en cultivos tridimensionales es mayor durante los primeros días y disminuye hacia el día 12.

Dado que al día sexto de cultivo se observó que las esferas formadas están completamente definidas para los ensayos posteriores se usaron esferas en este día de crecimiento. En la figura 1C se muestra un corte medio de una esfera formada a los 6 días de crecimiento obtenido por microscopía confocal en la cual los núcleos de las células MCF-7 6D fueron teñidos con DAPI. Se puede observar que la estructura carecía de lumen como es característico de las estructuras formadas por células cancerosas epiteliales en los cultivos tridimensionales.



**Figura 1: Formación de esferoides de células MCF-7(6D) cultivadas en condiciones 3D.** Células MCF-7(6D) se cultivaron sobre una capa de matrigel y se siguieron durante 12 días para evaluar su crecimiento. **A)** Imágenes de contraste de fase representativas de esferoides a los días (a) dos, (b) cuatro, (c) seis (d) ocho, (e) diez y (f) doce de crecimiento. **B)** Cuantificación del diámetro de las estructuras esferoides durante los doce días de crecimiento. Los datos se cuantificaron a partir de la medición de 50 esferoides en cada día de cultivo presentado. \*\*\*\* $P < 0.0001$  (prueba ANOVA). **C)** Imagen de microscopía confocal de un esferoide evaluado a los 6 días de crecimiento, en la cual los núcleos fueron teñidos con DAPI, para evaluar la ausencia del lumen. Barra=20 $\mu\text{m}$ .

## VIII.2. Interleucina-1 $\beta$ induce dispersión en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D

Se demostró previamente que la IL-1 $\beta$  induce un incremento en la invasión y metástasis de células MCF-7(6D), en condiciones bidimensionales [48]. A pesar de que este modelo ha permitido obtener información valiosa sobre los eventos que ocurren durante la progresión del tumor, otros estudios han revelado la importancia de los cultivos tridimensionales debido a que recapitulan algunas de las características de un modelo *in vivo* [57]. El contexto tridimensional puede influir en el fenotipo y comportamiento de las células, debido a la interacción con una matriz extracelular y a la arquitectura 3D que determina adhesiones célula-célula y célula-matriz especializadas [58]. Para evaluar el efecto de IL-1 $\beta$  sobre células MCF-7(6D) en un contexto tridimensional, esferoides formados a los 6 días de cultivo se expusieron a IL-1 $\beta$  durante 12 días y se hizo un seguimiento de los efectos inducidos. La estimulación de estos cultivos se hizo en presencia de 1% de suero fetal bovino.

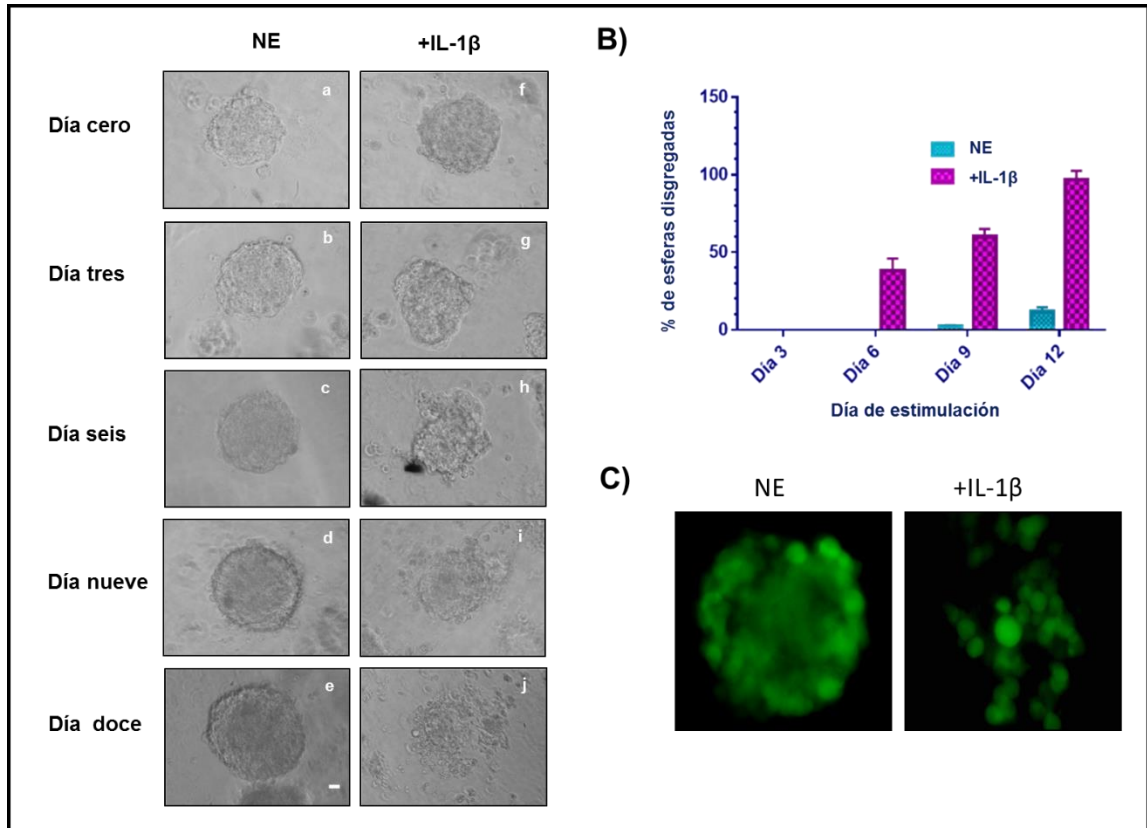
En la Figura 2A se observa la comparación entre cultivos control y cultivos estimulados durante 12 días. Se puede apreciar que previo al inicio de la estimulación, en ambas condiciones, las esferas mostraban bordes definidos (Figura 2Aa,f). Después de tres días de estimulación las esferas comenzaron a alargarse y a perder la forma esférica (Figura 2Ag). Después de seis días de estimulación, células individuales o grupos pequeños de estas células se localizaron alrededor de la estructura y las esferas mostraron una forma irregular (Figura 2Ah). En los siguientes días de estimulación, se observó que el número de células alrededor de la esfera incrementó su número y que la esfera disminuyó su tamaño progresivamente, como resultado de las células que se disgregan de la estructura por la estimulación con IL-1 $\beta$  (Figura 2Ai y 2A,j).

En la figura 2B se muestra la cuantificación del porcentaje de esferoides que se disgregaron a los días 6, 9 y 12 de estimulación, en las células cultivadas sin estimulación y en las células estimuladas. Se aprecia que al día 6 solo un 40%

de estos esferoides estimulados mostraron disgregación. Al día 9 de estimulación el porcentaje de esferas que mostraron este efecto, por la presencia de IL-1 $\beta$ , incrementó al 60%. Al día 12, el 100% de los esferoides estimulados mostraron algún grado de disgregación. Además, el 2% de esferas no estimuladas mostraron disgregación debido a la disminución del SFB durante este periodo.

Para definir si la disgregación de las células MCF-7(6D) de las esferas, en los cultivos estimulados con IL-1 $\beta$ , se debía a cambios celulares inducidos por IL-1 $\beta$  sobre las uniones celulares o a la muerte de estas células, se realizó una tinción doble con calceína AM y yoduro de propidio. La *calceína AM*, no es fluorescente, pero al ser absorbida por las células vivas se transporta a través de la membrana celular y la actividad de las esterasas transforma la calceína AM en calceína la cual emite fluorescencia verde. Siendo las esterasas únicamente activas en las células vivas el uso de la calceína AM permite la distinción de estas células de las células muertas. Por otro lado, el yoduro de propidio que no penetra en las células vivas pero si en las células muertas, al intercalarse a su DNA nos permite distinguir las de las células vivas por la emisión de fluorescencia roja.

Como se puede observar en la Figura 2C, la doble tinción con calceína AM y yoduro de propidio mostró que tanto en los cultivos no estimulados, como en los estimulados con IL-1 $\beta$ , las células son viables. En ninguna condición se encontraron células que fueran teñidas por el yoduro de propidio. Este resultado confirma que el efecto de disgregación observado en los esferoides estimulados no es debido a la pérdida de viabilidad de estas células.



**Figura 2: Efecto de la IL-1 $\beta$  en cultivos 3D de células MCF-7(6D).** Células MCF-7(6D) se cultivaron en condiciones 3D durante 6 días y después se estimularon con IL-1 $\beta$  durante 12 días. **A)** Imágenes de campo claro de cultivos 3D no estimulados (NE) y estimulados con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) al día cero (a,f), al día tres (b,g), día seis (c,h), día nueve (d,i) y doce (e,j) de estimulación. **B)** Cuantificación del porcentaje de esferoides que mostraron disgregación durante los días de estimulación indicados, de tres experimentos independientes \*\*\*\* $P < 0.0001$  (prueba U de Mann-Whitney). **C)** Ensayo de viabilidad con calceína AM (verde) en cultivos NE y cultivos estimulados durante doce días, obtenidas por epifluorescencia. Barra=20 $\mu$ m.



### **VIII.3. La exposición de células MCF-7(6D) a IL-1 $\beta$ en cultivos 3D induce la pérdida de los niveles de la proteína E-cadherina**

La proteína E-cadherina regula la adhesión entre las células epiteliales en los tejidos. Las células tumorales, que presentan un fenotipo migratorio muestran alteraciones en los niveles de esta proteína [60]. Se ha demostrado que IL-1 $\beta$  induce en células MCF-7(6D) la expresión del factor transcripcional Snail, el cual reprime la expresión de E-cadherina y disminuye sus niveles, favoreciendo el desensamble de las uniones adherentes además de la Transición Epitelio Mesénquima [48]. La disgregación de las células MCF-7(6D) mostrada en los cultivos 3D por el estímulo de IL-1 $\beta$  indicó el desensamble de las uniones adherentes.

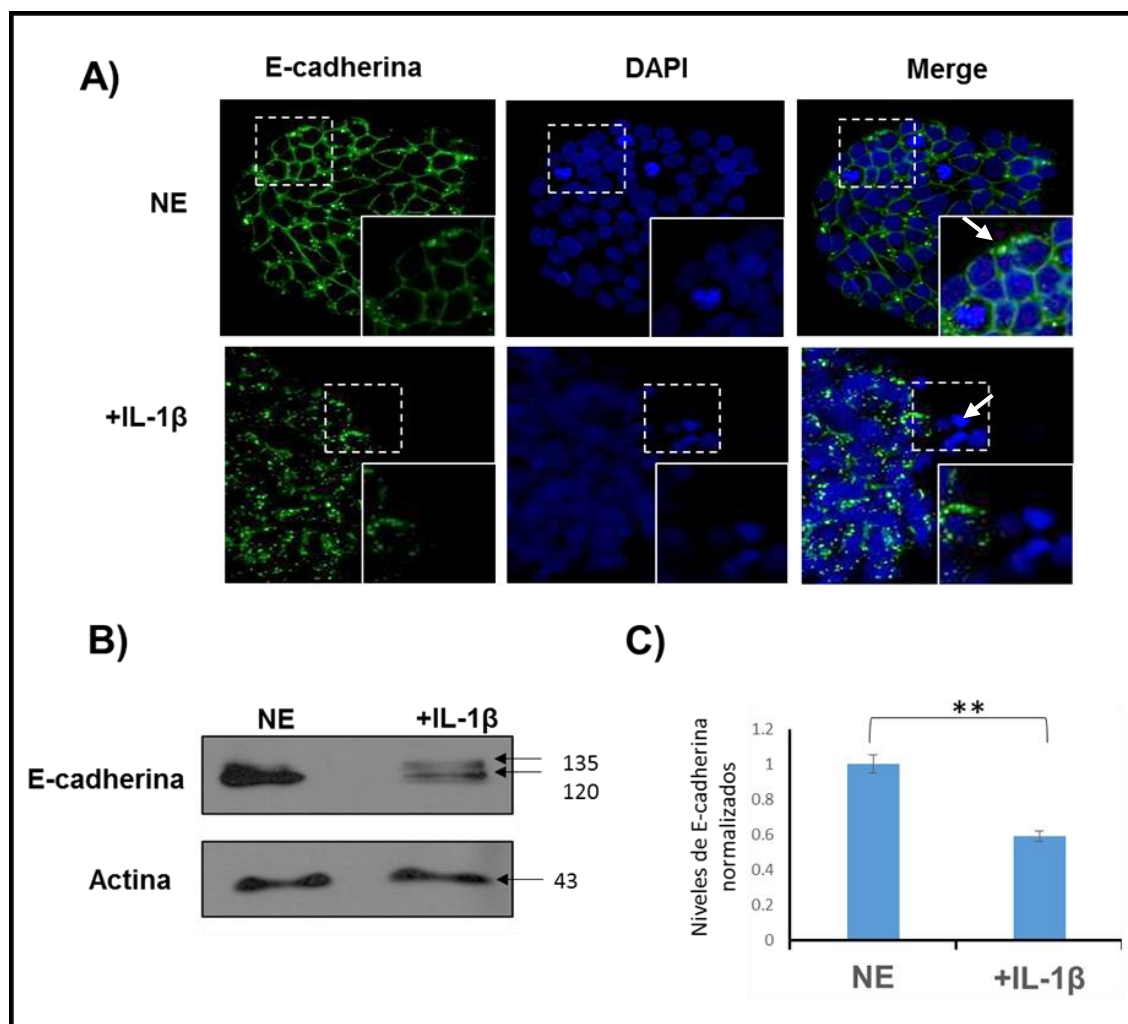
En la figura 3A se muestra la localización de E-cadherina en células no expuestas a IL-1 $\beta$  y células estimuladas con IL-1 $\beta$ . Se muestra que en los cultivos de células estimuladas, E-cadherina se ubica en la periferia de las células donde se localizan las uniones adherentes. Este patrón periférico correlaciona con la arquitectura compacta de los esferoides. En los cultivos 3D estimulados se observó que el patrón de E-cadherina no es continuo, indicando la deslocalización de la proteína de las uniones adherentes. En los cultivos estimulados, las células forman grupos dispersos donde se aprecia la pérdida de E-cadherina en la periferia de estas células. El efecto de la disminución de la proteína es mayor en las células ubicadas en la parte externa de la estructura 3D.

Los niveles de E-cadherina a partir de extractos totales de células MCF-7(6D) cultivadas en condiciones 3D estimulados o no con IL-1 $\beta$  durante 12 días confirmaron el desensamble de las uniones celulares. En la Figura 3B se observa que las células de los cultivos expuestos a IL-1 $\beta$  presentaron niveles menores de la proteína E-cadherina, respecto a los cultivos no estimulados. El análisis de western blot contra E-cadherina permitió visualizar 2 bandas, que de acuerdo al

peso, correspondieron al precursor de E-cadherina (135 kDa) y a la proteína madura (120 kDa), como algunos trabajos han reportado.

En la figura 3C se muestra la cuantificación densitométrica de la disminución de la proteína E-cadherina. Los cultivos estimulados mostraron una disminución de 0.5 veces en los niveles de E-cadherina respecto a los cultivos no estimulados.

Estos resultados demuestran que la disgregación de los esferoides formados por células MCF-7(6D) es el resultado de la apertura de las uniones intercelulares debido a la presencia de IL-1 $\beta$ , como previamente se demostró en condiciones 2D.



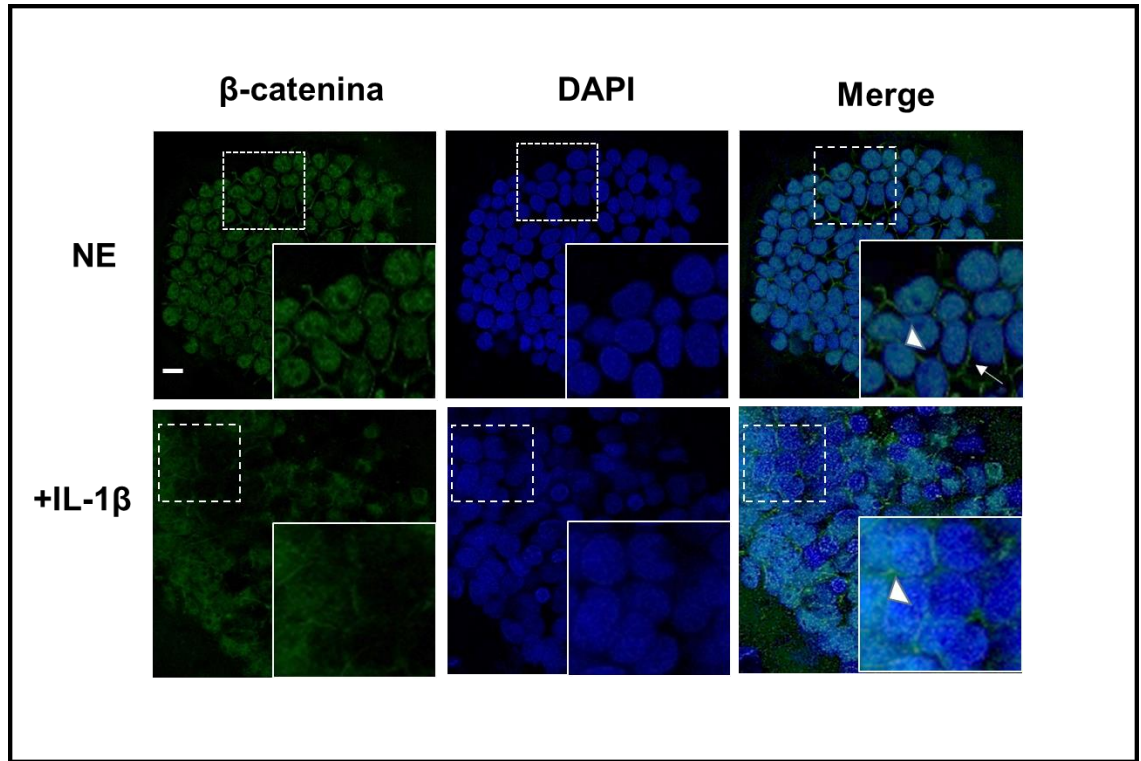
**Figura 3: Efecto de la IL-1 $\beta$  sobre la localización y niveles de la proteína E-cadherina en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D. A)** Imagen de microscopía confocal que muestran la localización de E-cadherina (verde) en cultivos tridimensionales no estimulados (NE) o estimulados con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) durante 12 días. Los recuadros de la parte inferior derecha muestran un acercamiento de la estructura observada. La flecha en la imagen del Merge señala la localización periférica de E-cadherina o la ausencia de E-cadherina. Barra=20 $\mu$ m. **B)** Western Blot representativo de extractos totales de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D y estimuladas durante 12 días. **C)** Resultados de densitometría obtenidos de tres experimentos independientes. Los niveles de la proteína E-cadherina se normalizaron con respecto a los niveles de la proteína en la condición NE y respecto a la expresión constitutiva de actina. \*\*P=0.0052 (Prueba U de Mann-Whitney)

#### **VIII.4. La IL-1 $\beta$ induce translocación de $\beta$ -catenina en el núcleo de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D**

$\beta$ -catenina forma parte del complejo de adhesión celular localizado en la zona lateral de las células epiteliales uniéndose en su extremo carboxilo terminal con E-cadherina y en el amino terminal con  $\alpha$ -catenina [61]. Cuando la unión de  $\beta$ -catenina-E-cadherina se rompe,  $\beta$ -catenina queda libre en el citoplasma y se acumula, en donde es modificada y degradada. Si no es modificada puede translocarse al núcleo e interactuar con los complejos transcripcionales TCL/LEF y participar en la activación de varios genes que promueven la progresión del cáncer. Dado el papel regulador de  $\beta$ -catenina en las uniones celulares se evaluó su localización en cultivos 3D de células MCF-7(6D) estimulados con IL-1 $\beta$  [48].

El análisis de la localización de  $\beta$ -catenina en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D (Figura 4), mostró que en las células no estimuladas,  $\beta$ -catenina se localizó en la periferia y en el núcleo de las células MCF-7(6D). El patrón periférico de  $\beta$ -catenina en estos cultivos indica su presencia en las uniones adherentes regulando la adhesión celular, como es característico en las células epiteliales. La presencia de  $\beta$ -catenina en el núcleo de estas células observada en el merge, puede explicarse si se considera que son una clona derivada de células MCF-7 estimuladas con varios ciclos de exposición a la IL-1 $\beta$  para su selección y que por lo tanto podrían mostrar una activación basal de la  $\beta$ -catenina.

En células estimuladas con IL-1 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina se localiza predominantemente en el núcleo de las células, y su localización en las uniones adherentes se pierde. Las células que mostraron la localización de  $\beta$ -catenina en el núcleo fueron principalmente las células de las capas externas de las esferas que interactúan fácilmente con la IL-1 $\beta$  presente en el medio de cultivo.



**Figura 4: Efecto de la IL-1 $\beta$  sobre la localización de  $\beta$ -catenina en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.** Imágenes de microscopía confocal que muestra la localización de  $\beta$ -catenina marcada con FITC (verde) en cultivos tridimensionales no estimulados (NE) o estimulados con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) durante 12 días. Los recuadros de la parte inferior derecha muestran un acercamiento de la estructura observada. Las puntas de flecha señalan la localización nuclear de  $\beta$ -catenina y la flecha señala la localización periférica. Barra=20 $\mu$ m. Los núcleos aparecen tenidos con DAPI (azul).

### **VIII.5. La IL-1 $\beta$ induce un aumento en la capacidad invasiva de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D**

La invasión a través de la matriz extracelular requiere de la actividad proteolítica de las células, particularmente mediada por la secreción de enzimas del tipo de las metaloproteinasas (MMPs) [62]. En cáncer de mama las enzimas MMP-2 y MMP-9 juegan un papel muy importante en el desarrollo de invasión, angiogénesis y metástasis de las células. Se ha reportado que durante la transición de células epiteliales a células invasoras hay un aumento en la secreción de estas proteínas [63].

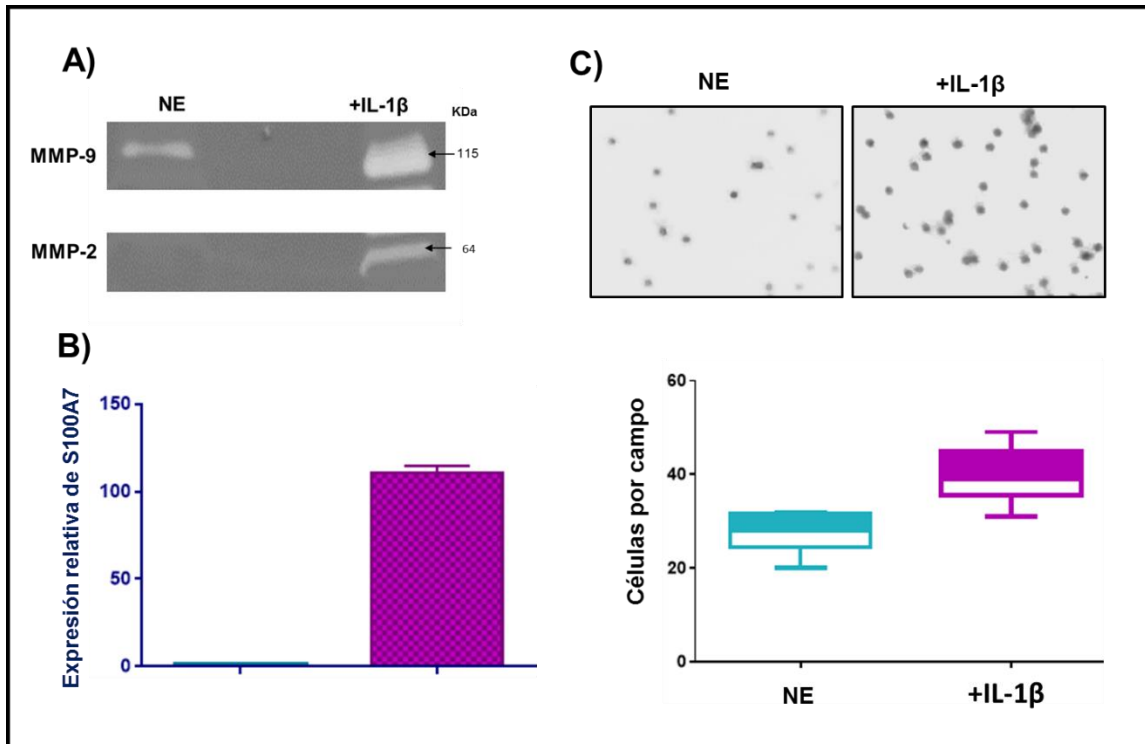
La secreción de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D estimuladas o no con la IL-1 $\beta$  se evaluó a través de su actividad en geles de acrilamida con gelatina. La Figura 5B muestra mayor secreción de MMP-2 y MMP-9, en células estimuladas con respecto a los cultivos no estimulados. Estos datos sugieren que las células estimuladas podrían invadir la matriz extracelular y desplazarse de la esfera que estaban formando en el cultivo 3D. .

Previamente se demostró que durante la transición epitelio mesénquima en células de cáncer de mama MCF-7, inducida por el estímulo de la IL-1 $\beta$  en cultivos en monocapa, también se induce la expresión de la proteína S100A4 que pertenece a la familia de proteínas S100 implicadas en el desarrollo de invasión y metástasis [47]. Otro miembro de esta familia es la proteína S100A7, la cual ha mostrado sobreexpresarse en cáncer de mama [64]. En células de cáncer su expresión se asocia con características de malignidad y en modelos de ratón muestra una relación con el desarrollo de metástasis. Esto sugería que la IL-1 $\beta$  también podría inducir la expresión de S100A7 [37].

A partir de extractos totales de RNA obtenidos de cultivos tridimensionales de células MCF-7(6D) estimulados o no con IL-1 $\beta$  durante 12 días, se analizó la

expresión del gen *S100A7* por PCR en tiempo real. En la Figura 5B se puede observar que la estimulación de IL-1 $\beta$  sobre las células MCF-7(6D) en cultivos 3D, incrementó la expresión del gen *S100A7* en promedio 110 veces respecto a los cultivos no estimulados (NE). Este resultado indica que *S100A7* podría estar contribuyendo en el aumento de invasión de estas células, inducido por IL-1 $\beta$ .

Para determinar la capacidad de invasión de las células MCF-7(6D) cultivadas en 3D, estas células se sembraron en una cámara Transwell, sobre el filtro de la cámara recubierto con una capa de Matrigel® y se cultivaron con las condiciones en que se forman las esferas por 6 días, después se estimularon con IL-1 $\beta$  durante 12 días y se expusieron al quimioatrayente durante 48 horas para estimular la invasión. Las células MCF-7(6D) aun sin el estímulo invadieron el filtro. Como se muestra en la Figura 5C, se observó un promedio de 24 células por campo en esta condición. La exposición a IL-1 $\beta$  indujo un aumento de aproximadamente 1.5 veces la capacidad de invasión de estas células. En promedio se observó 34 células por campo. En conjunto, estos resultados indican que a pesar de la capacidad invasiva basal de las células MCF-7(6D), la exposición a IL-1 $\beta$  en cultivos tridimensionales incrementa los niveles de invasión, a través de la expresión de *S100A7* y las metaloproteínas MMP-2 y MMP-9.



**Figura 5: Efecto de la IL-1 $\beta$  sobre la capacidad invasiva de células MCF-7(6D) cultivadas en 3D.** A) Patrón representativo de zimogramas en gelatina, a partir de medios condicionados de cultivos 3D de células MCF-7(6D) no estimulados (NE) y estimulados con IL-1 $\beta$  durante 12 días. Las metaloproteinasas 9 y 2 están indicadas por su peso molecular a la derecha del gel. B) Valores de expresión del gen *S100A7* en cultivos 3D de células MCF-7(6D) obtenidos a partir de PCR en tiempo real de 3 ensayos independientes. \*\*\*\* $P$  < 0.0001 (Prueba U de Mann-Whitney) (C) En la parte superior se muestran fotografías representativas de microscopía de epifluorescencia que muestran los núcleos teñidos con DAPI que invadieron el filtro. En la parte inferior se muestra la evaluación de la capacidad invasiva determinada por el conteo de núcleos celulares localizados en 10 campos seleccionados al azar. \*\*\*\* $P$  < 0.0001 (Prueba U de Mann-Whitney).



## IX. Discusión

La asociación entre el cáncer y la inflamación ha sido apoyada por estudios epidemiológicos en los cuales se ha observado que la inflamación crónica frecuentemente precede al desarrollo de cáncer [65]. Entre las citocinas que promueven la inflamación se encuentra IL-1 $\beta$ . Se ha demostrado que la interacción entre las células de cáncer de colon y células inmunes induce la secreción de IL-1 $\beta$  [66].

Los niveles de IL-1 $\beta$  se incrementan en una variedad de cánceres incluyendo el cáncer de colon [67], cáncer de cabeza y cuello [68], cáncer gástrico [69, 70], cáncer de pulmón [70], y cáncer de mama [48], entre otros. Los niveles de IL-1 $\beta$  en estos cánceres están asociados con la carcinogénesis, el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis [52]. Estudios en ratones deficientes para IL-1 $\beta$  han confirmado que IL-1 $\beta$  es esencial para el desarrollo de metástasis [54]. En células derivadas de cáncer de mama cultivadas en monocapa, la señalización de IL-1 $\beta$  induce cambios característicos de TEM, como son rearrreglos en el citoesqueleto de actina que inducen el desarrollo de una morfología fibroblastoide, la pérdida en los niveles de E-cadherina, el cambio de localización de  $\beta$ -catenina de la membrana al núcleo y la expresión de metaloproteinasas, que favorecen la invasión. La TEM es un proceso fundamental para el desarrollo de metástasis [48].

A pesar de que el modelo de monocapa ha proporcionado información de cómo participa el microambiente inflamatorio en la progresión del cáncer, este modelo no recapitula la arquitectura del epitelio *in vivo*. Debido a que los cultivos 3D recapitulan además de la arquitectura 3D, el anclaje a la lámina basal y otras características, su uso se ha ampliado para el análisis de procesos fisiológicos y eventos relacionados el desarrollo y progresión del cáncer. [48]. Se ha observado que un mismo tipo celular cultivado en 2D o 3D muestra diferencias en la expresión génica así como en el repertorio de proteínas, como respuesta a un

estímulo [59]. El cultivo de células MCF-7(6D) en un contexto tridimensional podría ampliar el conocimiento sobre los eventos celulares y moleculares inducidos por IL-1 $\beta$  en células de mama.

La exposición de los cultivos 3D de células MCF-7 (6D) a IL-1 $\beta$  permitió observar marcadores característicos de la TEM como: a) disrupción de la arquitectura tridimensional, b) pérdida en los niveles de E-cadherina y c) localización de  $\beta$ -catenina en el núcleo, debido al desensamble de las uniones adherente, como previamente ha sido mostrado en el modelo 2D [71].

El estímulo de IL-1 $\beta$  provocó la disrupción de la estructura esférica, indicada por la presencia de células individuales alrededor de la estructura, disminución en su tamaño y la pérdida de bordes definidos. La disgregación de estas esferas y la expresión de marcadores característicos de TEM (translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo y disminución en los niveles de E-cadherina) sugieren que la interacción de células MCF-7(6D) con IL-1 $\beta$ , en este modelo, induce la adquisición de un fenotipo migratorio. Modelos tridimensionales desarrollados a partir de las líneas celulares invasivas como BT-549, Hs578T, MDA-MB-231 y MDAMB- 436, han mostrado que estas células cultivadas en 3D desarrollan estructuras no esféricas debido a la activación constitutiva de moléculas que promueven la motilidad [11]. Weitzenfeld y colaboradores, demostraron que en cultivos tridimensionales de células MCF-7 la estimulación con TNF $\alpha$ , estrógeno y EGF, (factores también asociados a TEM) inducen migración celular, además de promover la expresión de MMPs, desarrollo de metástasis y quimioresistencia [72].

El desensamble de las uniones adherentes es necesario para que las células del cáncerosas puedan migrar a otras partes del cuerpo [73]. Una de las proteínas que forma parte de estas uniones es E-cadherina, la cual está presente en niveles bajos en células migratorias. La señalización de IL-1 $\beta$  induce la expresión de Snail, un factor transcripcional que reprime la expresión del gen de E-cadherina y favorece el desensamble de las uniones celulares [48]. El estímulo con IL-1 $\beta$  sobre células MCF-7(6D) cultivadas en un modelo 3D, mostró la disminución de los niveles de E-cadherina como ya se había caracterizado en estas células

cultivadas en 2D. En el análisis de western blot nosotros observamos dos bandas, una de 135 KDa, que corresponde al precursor de E-cadherina y la segunda de 120 KDa, que corresponde a la forma madura de esta proteína [74]. La presencia de ambas bandas indica que algunas células siguen sintetizando E-cadherina, mientras otras reprimen la expresión de este gen debido a la expresión del factor transcripcional Snail.

El modelo 3D permitió observar que en condiciones tridimensionales, la IL-1 $\beta$  puede inducir la aparición de marcadores tempranos de transición epitelio mesénquima, sin embargo no observamos la aparición de marcadores tardíos de la transición epitelio mesénquima, como la expresión de la proteína Vimentina o N-cadherina. Debido a esta evidencia se propone que la IL-1 $\beta$  induce en células MCF-7(6D) cultivadas en 3D el inicio de la transición epitelio mesénquima, como se propuso también en el modelo bidimensional de estas células. Dado que otros estímulos como TNF $\alpha$ , estrógenos y otros factores de crecimiento pueden también inducir TEM, se sugiere que en un sistema *in vivo*, IL-1 $\beta$  podría estar actuando en combinación con otros elementos del microambiente tumoral para favorecer el desarrollo de metástasis.

La metástasis requiere seguir un programa de múltiples eventos que involucran la invasión tisular a través de la matriz extracelular. Este proceso demanda la actividad proteolítica de las células, la cual está mediada en gran medida, por metaloproteinasas. En cáncer de mama, la cathepsina B (CA $t$ B), el activador del plasminogeno tipo urocinasa (uPA) y las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP9), son mediadores muy importantes para la invasión [58].

Nuestros datos muestran que la estimulación de cultivos 3D de células MCF-7(6D), con IL-1 $\beta$ , promueve la secreción de MMP-2 y MMP9. La secreción de estas metaloproteinasas correlacionó con una mayor capacidad de invasión a la matriz extracelular. El incremento en la secreción de MMPs se ha reportado en líneas celulares de cáncer de mama altamente invasivas como MDA-MB-231, MDA-MB-435 o Hs58T, también se ha encontrado una gran actividad proteolítica en células de tumores invasores [75].

Trabajos realizados en muestras de pacientes indican que la secreción de MMPs promueve la invasión de células de mama por medio de mecanismos más complejos que solo el fenómeno de degradación de la matriz extracelular. Estos datos muestran que la expresión de MMP-3 induce la expresión de una isoforma alternativa de Rac1 (Rac1b), la cual sumada a la expresión de Snail, promueve la transición epitelio mesénquima [76]. Sin embargo, nosotros únicamente observamos la secreción de la MMP-2 y MMP-9, pero no observamos la expresión de MMP-3 y la p-MMP-2 y p-MMP-9 reportadas en otros estudios [47].

La desregulación de la expresión de los miembros de la familia S100 es una característica común de varios tipos de cánceres epiteliales, entre ellos el cáncer de mama [77]. Estudios *in vivo*, indican que estas proteínas pueden contribuir en procesos tumorigénicos tal como la proliferación celular, la angiogénesis, la evasión del sistema inmune y la metástasis. Particularmente, las proteínas S100A4 y S100A7 han mostrado una expresión elevada en cáncer de mama. Ambas proteínas se encuentran ausentes en células MCF-7, sin embargo estímulos inflamatorios pueden inducir su expresión [78]. S100A7 se expresa predominantemente en carcinomas ductales *in situ* de alto grado, su expresión en tumores de mama representa un marcador de mal pronóstico y se correlaciona con la infiltración de linfocitos en la zona del tumor [79]. Aun cuando se han propuesto una serie de funciones putativas para S100A7, su función biológica en particular en cáncer de mama y otros cánceres continúa sin ser definida [80].

En el 2010 nuestro grupo de trabajo mostró que la estimulación con IL-1 $\beta$  en células MCF-7 cultivadas en monocapa indujo la expresión de S100A4, y la activación de vías que inducen el desarrollo de motilidad celular, como la vía PI3K [47], lo que nos sugería que otros miembros de la familia S100, como S100A7, podrían ser inducidos por este estímulo proinflamatorio.

Al evaluar la expresión del gen S100A7, en las células MCF-7(6D) cultivadas en 3D, se demostró que la IL-1 $\beta$  induce la expresión de S100A7.

En el 2010 West y Watson reportaron que el uso de citosinas proinflamatorias como IL-6 induce la expresión de S100A7 en las líneas celulares MCF7, T47D y MDA-MB-468. La inhibición de la expresión de S100A7 mediante ARN interferentes eliminó la migración inducida por IL-6 [81]. Existen reportes que indican que S100A7, también puede regular de manera positiva los niveles de otras citocinas, indicando la existencia de un sistema de retroalimentación [78]. Por lo que será necesario realizar experimentos que permitan esclarecer este fenómeno.

Se ha sugerido que S100A7 puede tener un papel diferencial en células positivas al receptor de estrógenos (RE+) y células negativas al receptor de estrógenos (RE-). En células de cáncer de mama RE-, la sobreexpresión de S100A7 ha mostrado mejorar el crecimiento de las células tumorales y favorecer el desarrollo de metástasis. Deol y colaboradores, reportaron recientemente que la sobreexpresión de S100A7 en células MCF-7, ER+, inhibe el crecimiento y la migración *in vitro*, así como el crecimiento del tumor *in vivo* y modula negativamente la señalización de  $\beta$ -catenina [82]. Demostrando de esta manera un papel diferencial asociado a la expresión del receptor de estrógenos.

Estos datos contrastan con los obtenidos durante nuestro trabajo, debido a que las células MCF-7(6D) derivan de células MCF-7, las cuales son positivas al receptor de estrógenos, la expresión de S100A7 debería correlacionar con la disminución de la migración. Nuestros resultados pueden deberse a que las células MCF-7(6D) presentan características agresivas por su selección a partir de la estimulación con IL-1 $\beta$ , sugiriendo que presentan alteraciones en la expresión del receptor de estrógenos o en los mecanismos que regulan su actividad, sin embargo es necesario una evaluación más profunda para aclarar otros mecanismos de señalización de S100A7 y la IL-1 $\beta$ .

Los resultados obtenidos hasta este momento confirman que S100A7 participa en el desarrollo de un fenotipo invasivo, inducido por IL-1 $\beta$ .

De manera general los resultados mostrados en este trabajo muestran que IL-1 $\beta$  induce en células MCF-7(6D) en un modelo 3D eventos relacionados con el desarrollo de metástasis, como se ha observado en el modelo 2D.

## X. Conclusiones.

- El cultivo de células MCF-7(6D) sobre extractos de matriz extracelular permite la formación de esferoides los cuales no desarrollan lumen. La exposición a IL-1 $\beta$  induce alteraciones de la arquitectura 3D debido a la dispersión de las células MCF-7(6D). La dispersión de las células es favorecida por el desensamble de las uniones celulares.
- El cultivo 3D de las células MCF-7(6D) estimuladas con IL-1 $\beta$  mostró que la arquitectura tridimensional influye sobre la exposición de la citosina presente en el medio, produciendo una respuesta heterogénea del sistema.
- La disminución de los niveles de la proteína E-cadherina y su deslocalización de las uniones adherentes, además de la localización de  $\beta$ -catenina en el núcleo, en cultivos 3D de células MCF-7(6D) estimulados con IL-1 $\beta$  demuestran que el estímulo inflamatorio de IL-1 $\beta$  en estos cultivos induce TEM.
- IL-1 $\beta$  induce la expresión de la MMP-2 y la MMP-9 en cultivos tridimensionales de células MCF-7(6D), su expresión incrementó la invasión de estos cultivos.
- La exposición de células MCF-7(6D) a IL-1 $\beta$  indujo la expresión del gen *S100A7*, que correlacionó con un fenotipo invasivo.

## Conclusión general

El modelo 3D utilizado durante este trabajo, permitió observar que en condiciones más cercanas a el ambiente de un tumor de células poco invasoras, la citocina IL-1 $\beta$  induce la disgregación de las células del tumor y la expresión de marcadores tempranos de TEM además de otros genes como S100A7 que promueven la invasión y metástasis. Mis resultados y los obtenidos previamente sugieren que la células MCF-7(6D) estimuladas con IL-1 $\beta$  podrían desarrollar metástasis en un modelo *in vivo*.



## **XI. Perspectivas**

1.- Evaluar la expresión del receptor de estrógenos en las células MCF-7(6D) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  para determinar la relación entre la expresión del receptor de estrógenos y la función de S100A7 en células MCF-7(6D).

2.-Evaluar la capacidad de metástasis de células MCF-7(6D) en modelos de ratón para confirmar el papel de IL-1 $\beta$  en la progresión del cáncer en células de cáncer de mama.

## XII. Bibliografía

1. Aune, D., et al., *Dietary compared with blood concentrations of carotenoids and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies*. Am J Clin Nutr, 2012. **96**(2): p. 356-73.
2. Gaudet, M.M., et al., *Obesity-related markers and breast cancer in CPS-II Nutrition Cohort*. Int J Mol Epidemiol Genet, 2013. **4**(3): p. 156-66.
3. Wu, A.H., et al., *Alcohol and breast cancer risk among Asian-American women in Los Angeles County*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(6): p. R151.
4. Hamilton, N., et al., *Biologic roles of estrogen receptor-beta and insulin-like growth factor-2 in triple-negative breast cancer*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 925703.
5. Walsh, T., et al., *Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer*. JAMA, 2006. **295**(12): p. 1379-88.
6. Shiovitz, S. and L.A. Korde, *Genetics of breast cancer: a topic in evolution*. Ann Oncol, 2015. **26**(7): p. 1291-9.
7. van Gemert, W.A., et al., *The proportion of postmenopausal breast cancer cases in the Netherlands attributable to lifestyle-related risk factors*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **152**(1): p. 155-62.
8. Pariza, M.W., *Dietary fat, calorie restriction, ad libitum feeding, and cancer risk*. Nutr Rev, 1987. **45**(1): p. 1-7.
9. Navarro-Tito, N., T. Robledo, and E.P. Salazar, *Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Exp Cell Res, 2008. **314**(18): p. 3340-55.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
11. Debnath, J., S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge, *Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures*. Methods, 2003. **30**(3): p. 256-68.
12. Allred, D.C. and D. Medina, *The relevance of mouse models to understanding the development and progression of human breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008. **13**(3): p. 279-88.
13. Cavallaro, S., *CXCR4/CXCL12 in Non-Small-Cell Lung Cancer Metastasis to the Brain*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(1): p. 1713-27.
14. Liu, X., et al., *Activation of STAT3 is involved in malignancy mediated by CXCL12-CXCR4 signaling in human breast cancer*. Oncol Rep, 2014. **32**(6): p. 2760-8.
15. Steeg, P.S., *Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 895-904.
16. Bates, R.C., N.S. Edwards, and J.D. Yates, *Spheroids and cell survival*. Crit Rev Oncol Hematol, 2000. **36**(2-3): p. 61-74.
17. Zielinska, H.A., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: a role for insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3?* Breast Cancer (Dove Med Press), 2015. **7**: p. 9-19.
18. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
19. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.

20. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.
21. Lee, T.K., et al., *Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5369-76.
22. Taylor, M.A., J.G. Parvani, and W.P. Schiemann, *The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 169-90.
23. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
24. Wang, Q., et al., *Integrin beta4 in EMT: an implication of renal diseases*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(5): p. 6967-76.
25. Okayama, A., et al., *Identification of tyrosine-phosphorylated proteins upregulated during epithelial-mesenchymal transition induced with TGF-beta*. J Proteome Res, 2015.
26. Miyoshi, S., et al., *A case of EGFR mutant lung adenocarcinoma that acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors with MET amplification and epithelial-to-mesenchymal transition*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 783-7.
27. Glackin, C.A., *Targeting the Twist and Wnt signaling pathways in metastatic breast cancer*. Maturitas, 2014. **79**(1): p. 48-51.
28. Lu, X., et al., *The IL-6/STAT3 pathway via miR-21 is involved in the neoplastic and metastatic properties of arsenite-transformed human keratinocytes*. Toxicol Lett, 2015. **237**(3): p. 191-9.
29. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
30. Daugherty, S.E., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drugs and bladder cancer: a pooled analysis*. Am J Epidemiol, 2011. **173**(7): p. 721-30.
31. De Lerma Barbaro, A., et al., *Inflammatory cues acting on the adult intestinal stem cells and the early onset of cancer (review)*. Int J Oncol, 2014. **45**(3): p. 959-68.
32. Ling, S., et al., *Inflammation to cancer: The molecular biology in the pancreas (Review)*. Oncol Lett, 2014. **7**(6): p. 1747-1754.
33. Moss, S.F. and M.J. Blaser, *Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(2): p. 90-7; quiz 1 p following 113.
34. Domingues, P., et al., *Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas*. Brain Behav Immun, 2015.
35. Allavena, P., et al., *The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages*. Crit Rev Oncol Hematol, 2008. **66**(1): p. 1-9.
36. Korobeinikova, E., et al., *The prognostic value of IL10 and TNF alpha functional polymorphisms in premenopausal early-stage breast cancer patients*. BMC Genet, 2015. **16**(1): p. 70.
37. Paquette, B., H. Therriault, and J.R. Wagner, *Role of interleukin-1beta in radiation-enhancement of MDA-MB-231 breast cancer cell invasion*. Radiat Res, 2013. **180**(3): p. 292-8.
38. Rodriguez-Barrueco, R., et al., *Inhibition of the autocrine IL-6-JAK2-STAT3-calprotectin axis as targeted therapy for HR-/HER2+ breast cancers*. Genes Dev, 2015.
39. Singh, J.K., et al., *Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(4): p. 210.

40. Soria, G., 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**: p. 130.
41. Leibovich-Rivkin, T., et al., *Inflammatory factors of the tumor microenvironment induce plasticity in nontransformed breast epithelial cells: EMT, invasion, and collapse of normally organized breast textures*. Neoplasia, 2013. **15**(12): p. 1330-46.
42. Zhu, M., et al., *Oncostatin M activates STAT3 to promote endometrial cancer invasion and angiogenesis*. Oncol Rep, 2015. **34**(1): p. 129-38.
43. Lin, S., et al., *Interleukin-6 as a prognostic marker for breast cancer: a meta-analysis*. Tumori, 2015. **0**(0): p. 0.
44. Wang, L., et al., *Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2015: p. 1-11.
45. Palomo, J., et al., *The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases*. Cytokine, 2015.
46. Apte, R.N., et al., *The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 387-408.
47. Franco-Barraza, J., et al., *Actin cytoskeleton participation in the onset of IL-1beta induction of an invasive mesenchymal-like phenotype in epithelial MCF-7 cells*. Arch Med Res, 2010. **41**(3): p. 170-81.
48. Perez-Yepe, E.A., et al., *A novel beta-catenin signaling pathway activated by IL-1beta leads to the onset of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells*. Cancer Lett, 2014. **354**(1): p. 164-71.
49. Hu, D.N., et al., *Interleukin-1beta increases baseline expression and secretion of interleukin-6 by human uveal melanocytes in vitro via the p38 MAPK/NF-kappaB pathway*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(6): p. 3767-74.
50. Liang, K.C., et al., *Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells*. J Cell Physiol, 2007. **211**(3): p. 759-70.
51. Palmieri, C., et al., *Fibroblast growth factor 7, secreted by breast fibroblasts, is an interleukin-1beta-induced paracrine growth factor for human breast cells*. J Endocrinol, 2003. **177**(1): p. 65-81.
52. Voronov, E., Y. Carmi, and R.N. Apte, *The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 114.
53. Krelin, Y., et al., *Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1062-71.
54. Voronov, E., et al., *IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2645-50.
55. Premkumar, V.G., et al., *Serum cytokine levels of interleukin-1beta, -6, -8, tumour necrosis factor-alpha and vascular endothelial growth factor in breast cancer patients treated with tamoxifen and supplemented with co-enzyme Q(10), riboflavin and niacin*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007. **100**(6): p. 387-91.
56. Perez-Yepe, E.A., et al., *Selection of a MCF-7 Breast Cancer Cell Subpopulation with High Sensitivity to IL-1beta: Characterization of and Correlation between Morphological and Molecular Changes Leading to Increased Invasiveness*. Int J Breast Cancer, 2012. **2012**: p. 609148.

57. Weigelt, B., C.M. Ghajar, and M.J. Bissell, *The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014. **69-70**: p. 42-51.
58. Vidi, P.A., M.J. Bissell, and S.A. Lelievre, *Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why*. *Methods Mol Biol*, 2013. **945**: p. 193-219.
59. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. *Assay Drug Dev Technol*, 2014. **12**(4): p. 207-18.
60. Chan, K.K., et al., *Protein deregulation associated with breast cancer metastasis*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015.
61. Liu, X. and K.M. Chu, *E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 637308.
62. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2015. **20**: p. 1144-63.
63. Rahimi, Z., K. Yari, and Z. Rahimi, *Matrix metalloproteinase-9 -1562T allele and its combination with MMP-2 -735 C allele are risk factors for breast cancer*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015. **16**(3): p. 1175-9.
64. Lapeire, L., et al., *Cancer-associated adipose tissue promotes breast cancer progression by paracrine oncostatin M and Jak/STAT3 signaling*. *Cancer Res*, 2014. **74**(23): p. 6806-19.
65. Mantovani, A., *Molecular pathways linking inflammation and cancer*. *Curr Mol Med*, 2010. **10**(4): p. 369-73.
66. Bessler, H. and M. Djaldetti, *Role of the equilibrium between colon cancer and mononuclear cells in cytokine production*. *Biomed Pharmacother*, 2010. **64**(10): p. 706-11.
67. Bersudsky, M., et al., *Non-redundant properties of IL-1alpha and IL-1beta during acute colon inflammation in mice*. *Gut*, 2014. **63**(4): p. 598-609.
68. St John, M.A., et al., *Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(19): p. 6018-27.
69. Epplein, M., et al., *Circulating cytokines and gastric cancer risk*. *Cancer Causes Control*, 2013. **24**(12): p. 2245-50.
70. Wang, L., et al., *IL-1beta-mediated repression of microRNA-101 is crucial for inflammation-promoted lung tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2014. **74**(17): p. 4720-30.
71. Guarino, M., B. Rubino, and G. Ballabio, *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. *Pathology*, 2007. **39**(3): p. 305-18.
72. Weitzenfeld, P., et al., *Progression of luminal breast tumors is promoted by menage a trois between the inflammatory cytokine TNFalpha and the hormonal and growth-supporting arms of the tumor microenvironment*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 720536.
73. Kyprianou, N., *ASK-ing EMT not to spread cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(7): p. 2731-2.
74. Shore, E.M. and W.J. Nelson, *Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(29): p. 19672-80.
75. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010. **15**(2): p. 201-12.

76. Stallings-Mann, M.L., et al., *Matrix metalloproteinase induction of Rac1b, a key effector of lung cancer progression*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(142): p. 142ra95.
77. Liu, H., et al., *S100A7 enhances invasion of human breast cancer MDA-MB-468 cells through activation of nuclear factor-kappaB signaling*. *World J Surg Oncol*, 2013. **11**: p. 93.
78. Nasser, M.W., et al., *S100A7 enhances mammary tumorigenesis through upregulation of inflammatory pathways*. *Cancer Res*, 2012. **72**(3): p. 604-15.
79. Nasser, M.W., et al., *RAGE mediates S100A7-induced breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment*. *Cancer Res*, 2015. **75**(6): p. 974-85.
80. Cancemi, P., et al., *Large-scale proteomic identification of S100 proteins in breast cancer tissues*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 476.
81. West, N.R. and P.H. Watson, *S100A7 (psoriasin) is induced by the proinflammatory cytokines oncostatin-M and interleukin-6 in human breast cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(14): p. 2083-92.
82. Deol, Y.S., et al., *Tumor-suppressive effects of psoriasin (S100A7) are mediated through the beta-catenin/T cell factor 4 protein pathway in estrogen receptor-positive breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(52): p. 44845-54.