



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“LA INDUCCIÓN DEL PROGRAMA DE TRANSICIÓN EPITELIO-  
MESÉNQUIMA POR MEDIO DE IL-1 $\beta$  CONLLEVA LA ADQUISICIÓN DE  
QUIMIORESISTENCIA A DOXORUBICINA EN CÉLULAS DE CANCER  
MAMARIO MCF-7 6D”**

Tesis que presenta

**M. en C. Haruki Arévalo Romero**

para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

en la especialidad de

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de Tesis:

**Dra. Isaura Meza Gómez Palacio**

**Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá**

**Ciudad de México.**

**Abril del 2016**

## **DEDICATORIA**

Dedico mi trabajo de tesis doctoral

A mi hijo Haziel y mi esposa Claudia: por brindarme su cariño,  
sus consejos y su inmenso apoyo.

A mi madre Adela, a mi padre Martín, a mis hermanas Raquel y Adelita y a toda mi  
familia: por los valores, apoyo, sabias enseñanzas y su cariño.

A mis amigos: por sus valores y experiencias compartidas.

¡Muchas Gracias!

Con mucho cariño y respeto,

Haruki

## **AGRADECIMIENTOS**

De manera muy especial agradezco a la Dra. Isaura Meza Gómez Palacio, al Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá y al Dr. Jorge Tonatiuh Ayala Sumuano por la dirección de mi tesis de doctorado, por el conocimiento, el inmenso apoyo y los sabios consejos que me brindaron a lo largo de mi formación académica. ¡Muchas Gracias!

También de manera especial agradezco al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por su apoyo, tiempo compartido y consejos brindados durante mi formación académica y personal. ¡Muchas Gracias!

Agradezco a la Dra. Leticia Cedillo Barrón, Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda y Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía por las observaciones brindadas para este trabajo.

De manera especial agradezco al Dr. Moisés León Juárez y a la Dra. Gabriela Vallejo Flores por su amistad y todo el apoyo brindado de manera académica y personal. ¡Muchas Gracias!

Agradezco al M. en C. Macario Martínez Castillo y al M. en C. J. Israel García Aguiar por su amistad, el apoyo y las observaciones brindadas durante la realización de este trabajo.

A la Biol. Elizabeth Franco Martínez y a la Q.F.B. María del Carmen Domínguez Robles por la asesoría técnica brindada para la realización de este trabajo.

De manera especial agradezco al Técnico Alejandro Trejo Carmona por el tiempo compartido, su amistad y apoyo personal brindado durante este trabajo. ¡Muchas Gracias!

También de manera especial agradezco al Biol. Raúl Bonilla Moreno por el inmenso apoyo técnico brindado y en particular por su amistad y tiempo compartido. ¡Muchas Gracias!

Agradezco de igual forma a María de Jesús Maqueda Villegas por el infinito apoyo administrativo brindado durante mi estancia en este departamento. ¡Muchas Gracias!

Agradezco a mis compañeros del grupo de trabajo que colaboraron con sus conocimientos y observaciones durante la realización de este trabajo.

## **DIRECTORES**

Dra. Isaura Meza Gómez Palacio

Investigador titular del Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV-IPN

Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá

Jefe de la Unidad de Investigación en Virología y Cáncer  
Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

## **ASESORES**

Dr. Jorge Tonatiuh Ayala Sumuano

Investigador Asociado  
Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México  
Campus Juriquilla, Querétaro.

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV-IPN

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV-IPN

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV-IPN



Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Isaura Meza Gómez Palacio del  
Departamento de Biomedicina Molecular perteneciente al Centro de  
Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional  
(CINVESTAV-IPN)

Durante La realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de  
Ciencia y Tecnología (CONACYT), Proyecto 166462 otorgado a la Dra. Isaura Meza  
Gómez Palacio y Proyecto 176880 otorgado al Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá.  
El autor de este trabajo fue becario del CONACYT con el número de registro 209637  
otorgada al M. en C. Haruki Arévalo Romero.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.	I
ÍNDICE DE FIGURAS.	III
RESUMEN.	IV
ABSTRACT.	V
INTRODUCCIÓN.	1
Cáncer de mama	1
Transición Epitelio-Mesénquima.	2
La resistencia a la quimioterapia es uno de los principales problemas en la práctica clínica y se asocia con el desarrollo de TEM.	
4	
La supresión de la muerte por la anoikis es una característica asociada con el proceso de TEM y contribuye a la metástasis.	6
La IL-1 $\beta$ induce procesos asociados con el inicio de la Transición Epitelio-Mesénquima.	8
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
Objetivo general	12
Objetivos particulares	12

MATERIALES Y MÉTODOS	13
Células.	13
Medios de cultivo.	13
Estimulación de las células con IL-1 $\beta$ .	14
Secuenciación masiva del transcriptoma de células MCF-7 6D.	14
Manejo masivo de datos y análisis bioinformático.	15
Síntesis de cDNA y validación de genes por PCR punto final.	15
Cuantificación de genes por PCR Tiempo Real.	16
Ensayos Western Blot.	17
Determinación de la sensibilidad de las células a doxorubicina por tinción de citometría de flujo con el kit vivo-muerto.	19
Ensayos funcionales de resistencia a doxorubicina por medio de IL-1 $\beta$ .	20
Determinación de la viabilidad celular con calceína AM/ Ioduro de propidio.	21
Cultivos tridimensionales de superposición en matrigel (3-D).	21
Ensayos de inmunofluorescencia de los cultivos 3-D.	22
RESULTADOS	24
La IL-1 $\beta$ induce dispersión de las células MCF-7 6D así como la localización nuclear de la proteína $\beta$ -catenina.	
24	
La IL-1 $\beta$ induce el incremento en la expresión de genes de resistencia a doxorubicina.	
25	
IL-1 $\beta$ induce resistencia al tratamiento <i>in vitro</i> con doxorubicina en células MCF-7 6D.	
31	

En células MCF-10A la IL-1 $\beta$  induce la localización nuclear de  $\beta$ -catenina y la expresión de los genes *Snail* y *ZEB1*.

35

En cultivos 3-D de células MCF-10A la IL-1 $\beta$  induce alteraciones en la polaridad y resistencia a anoikis. 39

DISCUSIÓN 45

CONCLUSIONES 54

PERSPECTIVAS 55

BIBLIOGRAFÍA 56

Apéndice 1

***Helicobacter pylori* CagA Suppresses Apoptosis through Activation of AKT in a Nontransformed Epithelial Cell Model of Glandular Acini Formation.**

Apéndice 2

***Helicobacter pylori* CagA and IL-1 $\beta$  promote  $\beta$ -catenin nuclear translocation but only CagA activates an aggressive phenotype in a nontransformed epithelial cell model**

Apéndice 3

**IL-1 $\beta$  induces chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells by expressing genes involved in the control of cell cycle progression and apoptosis**

## LISTA DE ABREVIATURAS

CaM	Cáncer de mama.
MEC	Matriz extracelular.
TEM	Transición epitelio-mesénquima.
TME	Transición mesénquima a epitelio.
EGF	Factor de crecimiento epidermal.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ .
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$ .
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitogenos.
NF $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
HDAC	Complejo de des-acetiladas de histonas
H4K20 <sup>met</sup>	Histona 4 metilada en la lisina 20
CTBP	Proteína de union a la region carboxilo terminal
BRG1	Gene 1 relacionado a Brahma.
PKB/AKT	Proteína cinasa B.
Bcl-2	proto-oncogen linfoma de célula B 2.
MCF-7	Células epiteliales de cancer de mama no invasivo.
MCF-10A	Células no tranformadas de epitelio de mama
IP	Ioduro de propidio.
HGF	Factor de creciemiento hepátocítico.
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina con el dominio C-X-C
S100A4	Proteína A4 de unión a calcio S100
IL-1RI	Receptor tipo 1 para la IL-1
GSK3 $\beta$	Cinasa 3 $\beta$ de la glicogeno sintetasa

TCF/LEF	Factor de transcripción de la familia LEF
<i>MMP2</i>	Metaloproteinasa de matriz extracelular 2.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.
PFA	Paraformaldehído.
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida + dodecil-sulfato de sódio.
SFB	Suero fetal bovino.
SC	Suero de caballo.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. El estímulo de IL-1 $\beta$ induce la translocación hacia el núcleo de la proteína $\beta$ catenina en las células MCF-7/MCF-7 6D.	25
Figura 2. La IL-1 $\beta$ induce el incremento de la expresión de genes de resistencia a Doxorubicina.	27
Figura 3. Ensayo preliminar de los primers para PCR tiempo real por PCR punto final.	28
Figura 4. La IL-1 $\beta$ favorece el incremento de genes asociados con la resistencia a doxorubicina.	29
Figura 5. La IL-1 $\beta$ induce el incremento en los niveles de la proteína BIRC3.	30
Figura 6. La Doxorubicina a una concentración de 500 nM produce la muerte del 50% de células MCF-7 6D.	32
Figura 7. La IL-1 $\beta$ induce resistencia a doxorubicina en ensayos funcionales <i>in vitro</i> .	34
Figura 8. La IL-1 $\beta$ no induce cambios morfológicos en las células MCF-10A a pesar de que expresan su receptor.	36
Figura 9. La IL-1 $\beta$ induce la re-localización nuclear de $\beta$ -catenina en células MCF-10A.	38
Figura 10. En cultivos 3-D las células MCF-10A poseen un lumen central y sus células presentan polaridad apical y uniones adherentes.	41
Figura 11. La IL-1 $\beta$ altera la polaridad apical de los acinos de MCF10A e induce resistencia a anoikis.	42
Figura 12. Las células del lumen que evaden la anoikis poseen uniones adherentes de $\beta$ -catenina.	44

## RESUMEN

El cáncer de mama es la malignidad más frecuentemente diagnosticada en el mundo y la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres. La interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ha sido asociada con el desarrollo y la invasión tumoral en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama. La transición epitelio-mesénquima (TEM) facilita la invasión tumoral, la metástasis, la quimioresistencia y la recaída en pacientes y, por esto, la TEM caracteriza a los cánceres más agresivos. La TEM inducida por IL-1 $\beta$  conlleva la activación de la vía de señalización de IL-1R1- $\beta$ -catenina que promueve la expresión de los genes *Snail*, *c-Myc* y *Mmp2* implicados en la progresión de un fenotipo no invasivo hacia uno invasivo en las células MCF-7 6D, una clona altamente responsiva a IL-1 $\beta$ . Sin embargo, se desconoce si existe una asociación entre la TEM inducida por IL-1 $\beta$  y la adquisición de la quimioresistencia así como de la supresión anoikis en líneas celulares de cáncer de mama. En este estudio, analizamos el transcriptoma de células MCF-7 6D después del estímulo con IL-1 $\beta$ , encontrando un perfil de expresión de genes que correlaciona con quimioresistencia a doxorubicina. Los genes de supervivencia enriquecidos por la estimulación de IL-1 $\beta$  fueron determinados mediante el análisis *in silico* de datos de secuenciación del ARNm de las células 6D. Los genes *CDKN1A*, *TP63* y *BIRC3* fueron confirmados por PCR tiempo real, y la supervivencia celular inducida por IL-1 $\beta$  fue confirmada después de desafiar a las células MCF7 6D con doxorubicina y durante la morfogénesis de los acinos de la línea celular no transformada MCF-10A.



## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy in the world and the first cause of cancer death in women. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) has been associated with tumor development and invasiveness in different types of cancer, including breast cancer. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) facilitates tumor invasion, metastasis, chemoresistance and relapse, and thus EMT characterizes the most aggressive cancers. IL-1 $\beta$ -induced EMT triggers activation of the signaling pathway IL-1R1- $\beta$ -catenin promoting the expression of the genes *Snail*, *c-Myc* and *Mmp2* involved in the progression of non invasive to invasive phenotype in MCF-7 6D, a cell clone with a highly response to IL-1 $\beta$ . However, it is still not clear if there is an association between IL-1 $\beta$ -induced EMT and the acquisition of chemoresistance and anoikis suppression in breast cancer cell lines. In this study, we analyzed the IL-1 $\beta$ -induced transcriptome of MCF-7 6D cells finding a gene expression profile that matches doxorubicin chemoresistance. Survival genes enriched by IL-1 $\beta$  stimulation, were determinate after *in silico* analyses of an mRNA sequencing of the 6D cells. The genes *CDKN1A*, *TP63* and *BIRC3* were confirmed by real time-PCR, and IL-1 $\beta$ -induced cell survival was confirmed after challenge with doxorubicin in MCF7 6D cells and during acini morphogenesis of non-transformed MCF-10A cell line.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Cáncer de mama**

El cáncer es la principal causa de muerte en el mundo según los datos de la organización mundial para la salud. En el año 2012, se reportaron cerca de 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y esta enfermedad provocó 8.2 millones de muertes en el mundo. El cáncer de mama (CaM) ocupa el primer lugar a nivel mundial en incidencia y el primer lugar en mortalidad en mujeres y se distribuye básicamente por todos los continentes desde Asia y Europa hasta el norte, centro y sur del continente Americano. En México, el CaM también ocupa el primer lugar en mortalidad e incidencia en las mujeres seguido de cánceres como el cérvico-uterino, cáncer de colon y cáncer gástrico [1].

El CaM se presenta como una enfermedad heterogénea que muestra una amplia variedad de características histopatológicas, de diversos marcadores genéticos y de diferentes resultados de pronóstico [2]. La mayoría de las muertes en las pacientes con CaM no son ocasionadas por el tumor primario sino por la metástasis de células tumorales hacia órganos distantes como pulmón, hígado y hueso [3]. De hecho, alrededor del 20% de pacientes con CaM poseen una enfermedad agresiva y desarrollan metástasis dentro de los primeros 5 años después de la detección inicial del tumor primario [4]. La metástasis es un proceso complejo con múltiples etapas que incluye la invasión de la matriz extracelular (MEC), la intravasación hacia vasos sanguíneos o linfáticos, la extravasación hacia el órgano blanco y finalmente la formación del tumor secundario [5]. Para que se lleve a cabo este fenómeno biológico se cree que las células deben someterse al proceso de la transición epitelio-mesénquima (TEM) lo cual les permitirá a las células tumorales convertirse en células invasivas [6].

## **La Transición Epitelio-Mesénquima**

La TEM es un proceso celular complejo en donde las células epiteliales pierden su organización polarizada y sus uniones intercelulares. Además las células presentan cambios en su morfología así como en la organización de su citoesqueleto, lo que las lleva a la adquisición de características mesenquimales tales como una morfología fibroblastoide y un incremento en sus capacidades de migración e invasión. Inicialmente, se describió que esta TEM ocurría en el desarrollo embrionario pero actualmente se sabe que su reactivación en la vida adulta se asocia con distintas condiciones patológicas como la inflamación, la fibrosis y el cáncer [7]. En el caso del cáncer, la activación del programa de TEM ha sido propuesto como el mecanismo crítico para la adquisición de un fenotipo agresivo por parte de las células epiteliales tumorales. Sin embargo, esta transición que ocurre en los tumores ha sido definida como transitoria ya que, los marcadores y fenotipos encontrados en las células que sufrieron TEM inicialmente, no se encuentran en los sitios de metástasis. Por ejemplo, en células de cáncer colorectal las células invasivas presentan una localización nuclear de la proteína  $\beta$ -catenina y pierden la expresión de la proteína E-caderina que se encuentra en las uniones celulares, mientras que las células que han hecho metástasis hacia el hígado se han diferenciado hacia células epiteliales mostrando características del tumor primario, proceso que se denomina transición mesénquima-epitelio (TME) [8].

Durante esta transición, se presenta la pérdida de marcadores epiteliales como son las proteínas claudinas, ocludinas, citoqueratinas y E-caderina así como el incremento concomitante de marcadores mesenquimales como N-caderina, vimentina y fibronectina. Una de las alteraciones más ampliamente observada durante el inicio de la TEM es la pérdida de E-caderina y este evento correlaciona con que en varios tipos de cáncer existe una pérdida de la función de esta proteína por mecanismos que incluyen

inactivación por mutaciones, represión transcripcional o por degradación de la proteína [9].

En varios estudios se ha mostrado el papel de E-caderina como supresor de la invasión y la metástasis. Estudios con células epiteliales cancerosas muestran que tras la expresión ectópica de E-caderina las células reducen su capacidad migratoria e invasiva [10]. Por otro lado, estudios *in vitro* usando células epiteliales e *in vivo* mediante el uso de modelos de ratón han mostrado que tras eliminar la expresión de E-caderina se observa el proceso de TEM así como la progresión tumoral hacia la metástasis [11, 12].

Durante la progresión tumoral, la TEM puede ser inducida por una gran variedad de estímulos como factores de crecimiento y citocinas. Dentro de estos se encuentran el factor de crecimiento epidermal (EGF por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) y principalmente el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) [13-16]. Todas estas señales son liberadas por las células estromales (células mioepiteliales, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, entre otros) asociadas a los tumores creando un microambiente permisivo para la progresión tumoral [17].

Las vías de señalización que inducen estos factores de crecimiento y controlan en conjunto la TEM son: la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la vía de la cinasa del fosfatidil inositol trifosfato (PI3K-AKT), la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, la vía del factor nuclear  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B), la vía de NOTCH y la vía Hippo/Warts. Todas estas vías son capaces de inducir la expresión de factores de transcripción que son esenciales para la TEM ya que actúan como represores de genes que controlan la polaridad y la integridad en las células epiteliales como son los genes de E-caderina, ocludinas y miembros de la familia de ZO-1[18]. Dentro de estos factores de transcripción se encuentran los reguladores maestros de la TEM SNAIL, TWIST y ZEB además de otros factores como FoxC2 y Gooseoid que son capaces de reprimir transcripcionalmente el gen de E-caderina mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, Snail-1 se une a los motivos E-box dentro del promotor del gen de E-caderina y recluta un complejo que contiene a las desacetilasas de histonas HDAC1/2 y Sin3A

mientras que Snail-2 usa HDAC1/3 y CTBP regulando así negativamente la transcripción del gen de E-caderina [19, 20]. En el caso de Twist está reportado que recluta a la metiltransferasa SETD8 la cual media una marca en las histonas (H4K20<sup>met</sup>) que se asocia con la represión del gen de E-caderina y que promueve la activación del promotor de N-caderina [21]. Finalmente, en el caso de ZEB se ha mostrado que la represión sobre el gen de E-caderina es mediada por el reclutamiento de CTBP así como de la proteína BRG1 [22]. Por lo anterior, estas evidencias muestran la función crítica de estos factores de transcripción en el proceso de la TEM mediante la inducción de la expresión de genes mesenquimales y reprimiendo los genes epiteliales [23].

**La resistencia a la quimioterapia es uno de los principales problemas en la práctica clínica y se asocia con el desarrollo de TEM.**

La quimioterapia es una importante opción para tratar la mayoría de los cánceres. Sin embargo, uno de los principales problemas que se presentan es la resistencia a las drogas usadas o quimioresistencia, lo que usualmente lleva a la falla en el tratamiento. Son varios los mecanismos por los cuales las células pueden generar quimioresistencia e incluyen la inducción de transportadores, mecanismos de reparación de DNA, amplificación o mutación de las proteínas blanco y cambios en las vías de supervivencia y apoptosis [24]. Una de las formas principales de quimioresistencia se asocia con la presencia de transportadores de flujo que remueven las drogas de las células y que generalmente pertenecen a la familia de transportadores llamados ABC (del inglés ATP-binding cassette) o también llamadas Glicoproteínas-P [25].

Estudios recientes han mostrado que la TEM está asociada con un fenotipo de quimioresistencia en varios tipos de tumores incluyendo el CaM [26, 27]. Estudios *in vitro* utilizando células epiteliales de CaM han mostrado que cuando las células son tratadas con adriamicina, un fármaco que daña el DNA, se observa un incremento en el número de células con características de TEM y estas expresan altos niveles de transportadores ABC y de Twist-1. De hecho al eliminar a Twist-1 de las células se

observa que estas pierden la resistencia a la apoptosis mediada por el fármaco mostrando así la asociación de la TEM en la modulación de la quimioresistencia [28]. Otros estudios utilizando células MCF-7 con resistencia a doxorubicina, paclitaxel o docetaxel, muestran que hay un incremento de genes asociados con la TEM como Snail-2, N-caderina y vimentina así como una disminución en E-caderina. De igual forma en células MCF-7 con resistencia a tamoxifen se observa un incremento en la capacidad invasiva de las células que es mediado por la translocación nuclear de la  $\beta$ -catenina así como cambios morfológicos indicativos de una TEM [29]. Además en estas células también se observó un incremento en la expresión de los marcadores mesenquimales N-caderina y vimentina [26, 30].

Para comprobar que varios de los genes que controlan la TEM tienen un efecto en inducir la quimioresistencia se han llevado a cabo ensayos de sobre-expresión o represión de algunos de ellos. En un estudio *in vitro* utilizando células de cáncer de mama en las cuales se ha reprimido el gen de E-caderina se observa que éstas adquieren una morfología mesenquimal y exhiben propiedades de células troncales ya que incrementan la expresión del perfil CD44<sup>alto</sup>/CD24<sup>bajo</sup> y poseen la capacidad de formar mamosferas en cultivos de metilcelulosa. De igual forma el análisis mostró que las células tras sufrir un proceso de TEM son más resistentes al tratamiento con paclitaxel y doxorubicina además de otras drogas como actinomicina D y camptotecina mostrando nuevamente que el incremento en la quimioresistencia es modulado por el proceso de TEM y que además existe una conexión también con la adquisición de troncalidad [31]. En otro estudio, utilizando también una línea epitelial no transformada (MCF-10A) se observó que tras sobreexpresar la transglutaminasa 2, una proteína inflamatoria, hubo también un incremento en las células con características de troncalidad además de la expresión de los represores SNAIL, TWIST y ZEB. De igual forma, éstas células mostraron ser más resistentes al tratamiento con doxorubicina [32].

Por otro lado, la sobreexpresión de Twist en células inmortalizadas de epitelio mamario favorece un incremento en las células con características de troncalidad y resistencia a tamoxifen [33]. Además, cuando ésta sobreexpresión se realizó en células

MCF-7 y MDA-MB435 hubo un incremento en la invasión de las células así como en una resistencia al tratamiento con paclitaxel [34]. En general estos estudios muestran que la resistencia a diferentes agentes quimioterapéuticos es un evento común asociado al desarrollo de un proceso de TEM y la adquisición de características de troncalidad.

Actualmente las nuevas estrategias terapéuticas están encaminadas a revertir este proceso de TEM y de esta forma restaurar la sensibilidad hacia los quimioterapéuticos. Por ejemplo, la represión de Snail y Twist en células de cáncer de pulmón A549 por medio de RNAs de interferencia induce nuevamente la sensibilidad hacia el cisplatino [35, 36].

**La supresión de la muerte por la anoikis es una característica asociada con el proceso de TEM y contribuye a la metástasis.**

La anoikis es un proceso particular de muerte celular debido a la pérdida o inapropiada adhesión de las células epiteliales a las proteínas de la matriz extracelular (MEC) quienes determinan la polaridad de las células [37]. Las células epiteliales que se desprenden de los epitelios son eliminadas eficientemente por la anoikis y de esta forma se previene el que se puedan adherir a sitios inapropiados y crecer de manera neoplásica. Por lo anterior, la anoikis es un proceso fisiológico que mantiene la homeostasis de los tejidos mientras que, en el contexto del cáncer, se ve alterado para permitir la metástasis de las células tumorales [38].

De manera fisiológica las células están protegidas de la anoikis mediante la transducción de señales a través de las integrinas y de receptores de factores de crecimiento en la superficie celular que llevan en general a la activación de la vía de PI3K/AKT [39]. La activación de esta vía promueve la supervivencia celular por medio de la inhibición del programa de la anoikis a nivel de la vía intrínseca de la apoptosis, ya sea por la inactivación de la proteína pro-apoptótica Bad o por la inhibición de la pro-caspasa 9 [40, 41]. Por otro lado, las células cancerosas desarrollan varios mecanismos para alcanzar la resistencia a la anoikis y uno de ellos es la activación constitutiva de la

vía PI3K/AKT, mientras que otro es la activación de un programa de TEM. Interesantemente, la señalización por PI3K/AKT juega un papel muy importante en la inducción y el mantenimiento de la TEM. Mediante ensayos en donde se expresó una forma constitutivamente activa de AKT en líneas celulares de carcinomas escamosos, se observó que se induce la expresión de *Snail1*, el cual, regula negativamente la expresión del gene de E-caderina promoviendo así el proceso de TEM [42].

Durante la TEM las células se desprenden del tumor primario mediante la desregulación de sus uniones celulares para dispersarse y después invadir el tejido circundante y eventualmente entrar en la circulación. Para esto, no sólo deben ser capaces de migrar e invadir sino también de sobrevivir en ausencia de las señales de la MEC. En este contexto, la inducción de la TEM resulta en la supresión de anoikis y en la generación de células con capacidad invasiva y de metástasis [43].

Existen diferentes evidencias indirectas que indican que la TEM es un proceso esencial en la adquisición de resistencia a la anoikis. Por ejemplo, se ha observado que Snail un regulador maestro de la TEM, confiere resistencia a la apoptosis por medio de inhibir la progresión del ciclo celular y además confiere resistencia a apoptosis en hepatocitos de rata [44, 45]. Por otro lado, Twist quien también promueve la TEM, regula la anoikis al incrementar la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y cuando se apaga su expresión en células tumorales se observa que las células son sensibles a la anoikis y a la apoptosis inducida por TNF $\alpha$  [46]. En el caso de ZEB se ha mostrado que a través de la desregulación de E-caderina activa la vía de señalización de AKT y de esta manera promueve la resistencia a anoikis [47]. De hecho, se ha reportado que la eliminación de E-caderina en un modelo de ratón permite el desarrollo de metástasis por medio de la resistencia a la anoikis [43]. A su vez, la adquisición de la expresión de N-caderina tras el proceso de TEM permite que se active la vía de PI3K/AKT y se promueva la resistencia a la anoikis [39].

Por otro lado, la eliminación de E-caderina induce la translocación de  $\beta$ -catenina hacia el núcleo en donde actúa promoviendo genes involucrados en la progresión



tumoral. Se ha mostrado que la activación de esta vía en hepatocitos malignos les confiere resistencia a la anoikis así como una progresión hacia la metástasis [48]. Adicionalmente, existe evidencia que indica que el HGF, otro importante inductor de TEM, induce resistencia a la anoikis en células cancerosas uterinas [49].

En conjunto, estos datos indican que la adquisición de un fenotipo mesenquimal correlaciona positivamente con la resistencia a la anoikis debido a que varias de las moléculas que juegan un papel importante en promover el proceso de TEM son capaces de modular genes anti-apoptóticos o de activar vías de supervivencia celular como la vía de PI3K/AKT.

### **La IL-1 $\beta$ induce procesos asociados con el inicio de la Transición Epitelio-Mesénquima.**

En el CaM se ha demostrado que existen títulos elevados de IL-1 $\beta$  en el microambiente de tumores invasivos [50]. Por otro lado, evidencia proveniente de ratones transgénicos ha mostrado que IL-1 $\beta$  participa en diversas etapas del desarrollo del tumor, tanto en la etapa de carcinogénesis como en la del crecimiento tumoral y la promoción de su agresividad [51].

Estudios recientes, utilizando la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama poco invasivo) y que se caracterizan por poseer un fenotipo epitelial y baja capacidad invasiva han mostrado que cuando las células son estimuladas con IL-1 $\beta$  se induce una pérdida del contacto intercelular y una dispersión de las células a partir de colonias previamente formadas. Los mecanismos que conllevan esta dispersión, son mediante la reorganización del citoesqueleto de actina para formar células fibroblastoides alargadas con la presencia de lamelas y “ruffles” periféricos que permiten el desplazamiento como lo hacen aquellas células que poseen un fenotipo migratorio [52]. Molecularmente se

observó que esta reorganización del citoesqueleto de actina y el cambio de fenotipo fueron el resultado de la activación de la vía de señalización de Rac1 y de PI3K [52]. Además, se observó que el cambio de fenotipo inducido por la IL-1 $\beta$  indujo la expresión de marcadores de migración e invasión como son el receptor CXCR4 así como la expresión de la proteína S100A4, considerada un marcador de la invasión y la metástasis en las células tumorales [52]

Por otro lado, utilizando una clona de células derivadas del tratamiento con la citocina, las células MCF-7 6D, se mostró que el estímulo con IL-1 $\beta$  induce la activación de una nueva vía de señalización la cual ha sido llamada IL1- $\beta$ / IL-1RI/ $\beta$ -catenina, debido a que dicha señalización conduce a la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma que posteriormente se transloca hacia el núcleo. El mecanismo responsable de este fenómeno fue a través de la inactivación de la proteína GSK3 $\beta$  por medio de la actividad de AKT. Debido a que la GSK3 $\beta$  es la encargada de regular de manera negativa a la  $\beta$ -catenina marcándola para su degradación, al ser inactivada por AKT permite la acumulación y la actividad nuclear de  $\beta$ -catenina. Mediante ensayos de gen reportero se observó que la  $\beta$ -catenina es capaz de formar el complejo transcripcional TCF/Lef/ $\beta$ -catenina, cuya actividad, induce posteriormente la expresión secuencial de los genes *c-MYC*, *CCDN1*, *SNAIL1* y *MMP2*. Dicha expresión de genes, conduce al aumento en las capacidades de proliferación, migración e invasión de las células y estos datos muestran que los procesos que son activados en las células cancerosas para la transición de un fenotipo no invasivo a uno invasivo también se presentan por el efecto de IL-1 $\beta$  [53].

Todos estos datos apoyan un papel crítico de la IL-1 $\beta$  en inducir cambios relacionados con la adquisición de un fenotipo invasor característico de un proceso de transición epitelio-mesénquima en cáncer en general y nuestro grupo de trabajo ha

generado evidencia de que esto también es cierto para CaM. En el presente estudio nos proponemos analizar si la IL-1 $\beta$  favorece la transición hacia un estado más cercano al mesenquimal y si esa transición correlaciona con características de quimioresistencia en células transformadas no invasivas. Finalmente, la TEM promovida por IL-1 $\beta$  se corroboró en células de epitelio de mama no transformadas.

## **JUSTIFICACIÓN**

Estudios realizados en células MCF-7 han mostrado que la IL-1 $\beta$  induce cambios morfológicos que le permiten a las células adquirir un fenotipo fibroblastoide además de adquirir una mayor capacidad invasiva mediada por la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina. Estos datos han mostrado que la citocina es capaz de inducir una transición epitelio-mesénquima y este proceso ha sido asociado a su vez con el desarrollo de quimioresistencia. Sin embargo, se desconoce si esta TEM inducida por IL-1 $\beta$  es capaz de conferir a las células la capacidad de ser resistentes al tratamiento con distintos quimioterapéuticos. Por lo anterior, en este trabajo nos hemos enfocado en analizar si IL-1 $\beta$  es capaz de conferir quimioresistencia, a que genes podría estar asociado este mecanismo y si correlaciona con una transición a un estado cercano al mesenquimal en un modelo epitelial no transformado de células MCF-10A.

## **HIPÓTESIS**

La transición epitelio-mesénquima mediada por la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) inducirá en la línea MCF-7 6D resistencia al tratamiento con quimioterapéuticos y en la línea MCF-10A resistencia a la anoikis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la IL-1 $\beta$  en la expresión de genes de resistencia a quimioterapéuticos en células MCF-7 6D y la resistencia a la anoikis en células MCF-10A.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

I. Analizar genes de resistencia a quimioterapéuticos a partir de datos de secuenciación masiva del transcriptoma de células MCF-7 6D tratadas con IL-1 $\beta$ .

II. Validar la expresión de los genes encontrados por PCR Tiempo real cuantitativo.

III. Realizar ensayos funcionales de inducción de resistencia a quimioterapéuticos por medio de IL-1 $\beta$ .

IV. Analizar el efecto de IL-1 $\beta$  sobre células no transformadas MCF-10A en cultivos celulares tridimensionales (3-D).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Células**

Se utilizaron las células MCF-7 (línea celular de un adenocarcinoma de mama poco invasivo HTB-22 ATCC, Manassas, VA, USA), la clona MCF-7 6D obtenida en nuestro grupo de trabajo mediante el enriquecimiento y clonación de células MCF-7 altamente responsivas a IL-1 $\beta$ ) y la línea celular MCF-10A (línea celular no tumorigénica CRL-10317 ATCC, Manassas, VA, USA).

### **Medios de cultivo**

Las células MCF-7 y 6D fueron cultivadas en medio DMEM-F12 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA No. 11330-032) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA No. 16000044) descomplementado, penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA No. 15240). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células MCF-10A fueron cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado con 5% de suero de caballo descomplementado (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA- No. 16050-114), 20 ng/mL de factor de crecimiento epidermal (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA. No. AF-100-15), 0.5  $\mu$ g/mL de hidrocortisona (No H-0808), 100 ng/mL de toxina de cólera (C-8052), 10  $\mu$ g/mL de insulina recombinante humana (I-1882), todos de Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO, USA y penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA No. 15240). Las células se incubaron a 37°C en presencia de 5%CO<sub>2</sub>.

### **Estimulación de las células con IL-1 $\beta$**

Las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A fueron estimuladas con IL-1 $\beta$  recombinante (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA. No. 200-1 $\beta$ ). Para ello, las células fueron cultivadas en condiciones de sub-confluencia en medio DMEM-F12 durante 48 horas hasta obtener colonias separadas en forma poligonal. Después de esto, las células fueron lavadas con la solución de buffer de fosfatos (PBS) para después ser mantenidas por periodos de entre 16-18 horas en medio DMEM-F12 suplementado con solamente 1% de suero fetal bovino para las células MCF-7 o DMEM-F12 suplementado con 1% de suero de caballo (SC) para las células MCF-10A. Una vez que transcurrió el tiempo de privación de suero de las líneas celulares, estas fueron estimuladas con IL-1 $\beta$  a 20 ng/  $\mu$ L durante un periodo de 48 hrs para el caso de los cultivos celulares convencionales o manteniendo el estímulo durante todo el tiempo del cultivo 3-D, es decir, entre 10-13 días hasta alcanzar la formación de acinos glandulares en las células MCF-10A.

### **Secuenciación masiva del transcriptoma de células MCF-7 6D.**

Los cultivos celulares fueron lisados con Qiazol (Qiagen. Venlo, Holanda) y el RNA total fue aislado con RNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un microgramo de RNA total fue utilizado para la realización de secuenciación masiva en la Duke University Genome Sequencing Shared Resource (Durham, NC, EUA). La librería para secuenciación se creó con el kit Illumina Tru-Seq Stranded RNA-seq (Illumina, San Diego, CA, EUA), la cual permite el enriquecimiento del RNA mensajero basado en poli-A, con un tamaño de fragmento de 200 bp y orientación de cadena para asignar niveles de expresión en caso de traslape de genes. Las muestras fueron secuenciadas en la plataforma HiSeq2000 (Illumina) con un tamaño de lectura de 100 bp y en modo de extremo pareado.

### **Manejo masivo de datos y análisis bioinformático.**

Los archivos de secuenciación masiva fueron evaluados por índice de calidad con el programa FastQC en su versión 0.11.5 (URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) y eliminamos las secuencias de baja calidad con Trimmomatic versión 0.35 (URL: <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>). Las secuencias que pasaron el filtro de calidad fueron mapeadas con TopHat versión 2.1.1 [54] contra la versión hg38 del genoma humano (URL: <http://hgdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html#human>). La frecuencia de expresión génica fue determinada con htseq-count [55]. Para evaluar estadísticamente la expresión génica diferencial la frecuencia de expresión entre las distintas condiciones experimentales utilizamos una prueba basada en distribución binomial negativa por medio del paquete EdgeR [56, 57]. Para determinar los genes que cambiaron significativamente sus niveles de expresión tomamos como base dos parámetros: un incremento de al menos el doble de su expresión o una disminución de por lo menos la mitad con respecto a la condición control y un valor de FDR de por lo menos 0.05 [58].

### **Síntesis de cDNA y validación de genes por PCR punto final.**

La síntesis de DNA complementario se realizó utilizando 2.5 µg de RNA total en una mezcla de reacción del kit SuperScript VILO MasterMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No. 11755-050) que contenía lo siguiente: transcriptasa reversa (Superscript<sup>®</sup>III RT), RNaseOUT<sup>™</sup> inhibidor recombinante de ribonucleasa, primers aleatorios, MgCl<sub>2</sub> y deoxinucleotidos 4 µL de la mezcla 5x, RNA c.b.p. 2.5 µg, y agua libre de nucleasas c.b.p 20 µL. Los tubos se colocaron en el termociclador a una temperatura de 25°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se sometieron a un ciclo de 42°C durante 60 minutos seguidos de un ciclo de 85°C por 5 minutos más para terminar la reacción.



Una vez obtenidos los cDNAs totales se procedió a realizar la amplificación específica del cDNA del gen *CDKN1* utilizando los pares de oligonucleótidos sentido 5'-TGT CCG TCA GAA CCC ATG C-3' y anti-sentido 5'-AAA GTC GAA GTT CCA TCG CTC-3', los cuales, flanquean una región de la secuencia codificante de *CDKN1*. De la misma manera, se realizó la amplificación del gen *TP63* usando los oligonucleótidos sentido 5'-GTC ATT TGA TTC GAG TAG AGG GG-3' y anti-sentido 5'-CTG GGG TGG CTC ATA AGG T-3'. Para el caso del gen *BIRC3/c-IAP2*, se utilizaron los oligonucleótidos sentido 5'-TT CCG TGG CTC TTA TTC AAA CT-3' y anti-sentido 5'-GCA CAG TGG TAG GAA CTT CTC AT-3'. Finalmente, para el gen *SFN* se utilizaron los oligonucleótidos sentido 5'-TGA CGA CAA GAA GCG CAT CAT-3' y anti-sentido 5'-GTA GTG GAA GAC GGA AAA GTT CA-3'. Para la normalización de los datos se utilizó el gen constitutivo *RPLP0* con los oligonucleótidos sentido 5'-CAG ATT GGC TAC CCA ACT G-3' y anti-sentido 5'-GGG AAG GTG TAA TCC GTC T-3'. En dichos ensayos se usó la enzima *Taq polimerasa* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No. 11615-010) en reacciones de PCR que comprendieron de ciclos con dos temperaturas diferentes de alineamiento (60°C y 65°C) con la finalidad de evaluar la mejor amplificación de los productos de PCR. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 30 ciclos de 94°C 30 segundos, 60°C y 65°C 30 segundos, 68°C 2 minutos y 68°C 7 minutos. La amplificación fue comprobada visualizando los productos de PCR por medio de geles de agarosa al 1.5%.

### **Cuantificación de genes por PCR Tiempo Real**

Después de la obtención de los cDNAs totales y de la validación de los genes por ensayos de PCR punto final, se procedió a realizar ensayos de PCR Tiempo Real cuantitativa. Para ello, se utilizaron mezclas de reacción que contenían lo siguiente: 5 µL del Kit FastStart SYBR Green MasterMix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA No 4309165), oligonucleótidos sentido y anti-sentido 0.4 µL (10 µM), cDNA 1 µL (1 µg) y agua libre de nucleasas c.b.p 10 µL. Las mezclas de reacción se hicieron por

triplicado y fueron colocadas en el termociclador 7,500 de Applied Biosystems en reacciones que comprendieron de 1 ciclo de 95°C 10 minutos, 50 ciclos de 94°C 15 segundos, 60° por 1 minuto y finalmente ciclos de curvas de disociación con la finalidad de verificar un solo producto de amplificación. La expresión de los genes fue normalizada con respecto a la expresión del gen de expresión constitutiva *RPLP0* y la cuantificación se hizo mediante el uso de los valores de CT en la ecuación de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **Ensayos Western blot**

Las células MCF-7 fueron cultivadas, privadas de suero y estimuladas con IL-1 $\beta$  como se explicó anteriormente. Después del estímulo, las células fueron lavadas con PBS y se adicionaron 100  $\mu$ L de amortiguador de lisis RIPA (Millipore, Billerica, MA, USA No. 20-188) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science Mannheim, Germany No. 04693116001) a cada una de las placas, las cuales, fueron incubadas durante 10 minutos en hielo. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante; la concentración de proteínas fue cuantificada mediante el uso del kit micro-Bradford protein assay (Bio-rad Hercules, CA, USA No. 500-0205). Cincuenta microgramos de proteína total se disolvieron en 10  $\mu$ L de amortiguador de Laemmli 2x y las muestras se calentaron durante 5 minutos a 94°C. Posterior a esto, las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Bio-rad Hercules, CA, USA No. 162-0115).por dos horas a 90 volts y las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en TBS-Tween al 0.1% (50mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 0.1% de Tween 20, pH 7.5) durante una hora en agitación constante.

Para la detección de la proteína BIRC3/c-IAP2 se utilizó el anticuerpo anti-c-IAP2 (Cell Signaling Technology, Danvers MA U.S.A No. 3130) a una dilución 1:1000. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C y después de este tiempo, fueron lavadas tres en ocasiones con TBS-Tween 0.1% para después ser incubadas

durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a HRP diluido 1:5000 en TBS-Tween 0.1%. Finalmente, las membranas fueron lavadas en tres ocasiones más y fueron reveladas por quimioluminiscencia mediante el uso del agente SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA No.30094) en el equipo ChemiDoc MP (Bio-rad Hercules, CA, USA) por periodos de exposición de 1 minuto. El anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina, donado amablemente por el Dr. J.M. Hernández del Departamento de Biología celular del CINVESTAV-IPN, fue utilizado como control de carga. Las bandas detectadas fueron analizadas por densitometría mediante el uso del software ImageJ del Instituto Nacional de salud de los Estados Unidos de América.

### **Determinación de la sensibilidad de las células a doxorubicina por tinción de citometría de flujo con el kit vivo-muerto.**

Con el objetivo de analizar la concentración de DL50 de la doxorubicina se hizo una curva de sensibilidad usando distintas concentraciones de la misma. Inicialmente, se reconstituyó el fármaco Zytokil (PiSA, Guadalajara, México) añadiendo 50 mL de agua inyectable estéril para llevarlo a una concentración de 1.7 mM (1 mg/mL). A continuación, se tomaron 5.8  $\mu$ L de esta solución y se llevó a 1 mL para obtener una solución a una concentración de 10  $\mu$ M, la cual se tomó como solución de trabajo. De ambas soluciones se tomaron alícuotas, las cuales fueron almacenadas a -20°C protegidas de la luz. Posterior a la obtención de las alícuotas de trabajo de la doxorubicina se procedió a analizar la DL50 por medio de citometría de flujo.

La DL50 del fármaco doxorubicina se analizó mediante tinciones de citometría de las células MCF-7 6D incubadas con distintas concentraciones (150nM, 250nM, 500nM y 750nM) del mismo. Las células fueron cultivadas en medio DMEM-F12 durante 48 hrs y a continuación fueron lavadas con 1 mL de PBS estéril (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Después de este paso, las células fueron incubadas con las distintas concentraciones del fármaco en 3 mL de medio DMEM-F12 durante 24 horas a 37°C. Después del periodo de incubación, se recuperó el sobrenadante de las células ya que en el proceso de muerte las células se desprenden de la caja de cultivo. Dicho sobrenadante, fue transferido a un tubo de 15 mL y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 0.1 mL de PBS y almacenado en hielo para ser incluido en los ensayos posteriores con sus respectivas células de origen.

Por otro lado, las células adheridas se lavaron con PBS y se obtuvo una suspensión celular mediante el tratamiento con Tripsina-EDTA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA No. 25300-054) durante 5 minutos. Después, la suspensión fue transferida a un tubo de 15 mL y éste se centrifugó durante 5 minutos a 1500

revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 5 mL de PBS. Las células fueron contabilizadas en la cámara de Newbauer utilizando una dilución 1:10 con azul tripano (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA No.15250-061)

A continuación, se colocaron  $1.5 \times 10^6$  de células en tubos para citometría y se lavaron con 1 mL de PBS. El botón celular fue resuspendido y se adicionaron 0.5  $\mu$ L del kit vivo-muerto (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA No. L23102) y las células se incubaron por 30 minutos en hielo protegidas de la luz. Después de este periodo, las células fueron lavadas con 1 mL de PBS. El botón celular fue resuspendido y se adicionaron 50  $\mu$ L de formaldehído al 37% diluidos en 450  $\mu$ L de PBS (concentración final de 3.7%) y las células se incubaron por 15 minutos más a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas nuevamente durante dos ocasiones y fueron resuspendidas en PBS que contenía BSA al 1%; los controles montados a la par de las células problema fueron células sin teñir, células irradiadas con luz uv (40  $\mu$ juls, 120 segundos) e incubadas con doxorubicina (control positivo) y células sin tratamiento con doxorubicina (control negativo) y teñidas con el kit. Todos los tubos fueron analizados por medio del equipo FACS calibur (BD).

### **Ensayos funcionales de resistencia a doxorubicina por medio de IL-1 $\beta$**

Con la finalidad de analizar la resistencia de las células MCF-7 6D al fármaco doxorubicina tras el estímulo con IL-1 $\beta$ , se realizaron ensayos funcionales. Para ello, las células fueron cultivadas, privadas de suero y estimuladas como se describió previamente y posterior al estímulo fueron lavadas con PBS y tratadas con doxorubicina a una concentración de 500nM en 3 mL de medio DMEM-F12 que contenía IL-1 $\beta$ , es decir, el tratamiento de doxorubicina fue hecho siempre en presencia del estímulo de la citocina. A continuación, las células fueron incubadas durante 48 horas a 37°C y una vez que se alcanzó este tiempo el medio fue sustituido por medio nuevo, con las mismas concentraciones de fármaco y citocina, para incubar las células nuevamente durante 48

horas más. Una vez que se alcanzaron los tiempos de incubación, las células fueron sometidas a tinciones con calceína AM/Ioduro de propidio (dilución 1:4000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No. C3099) así como Ioduro de propidio a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Biolegend, San Diego, CA, USA, No. 235678) para ser finalmente revisadas por microscopia de epi-fluorescencia.

### **Determinación de la viabilidad celular con calceína AM/ Ioduro de propidio**

Con la finalidad de analizar la viabilidad de las células MCF-7 6D después de ser estimuladas y tratadas con el fármaco doxorubicina, se realizaron tinciones con calceína AM/Ioduro de propidio.

Una vez que las MCF-7 fueron incubadas con la doxorubicina en las condiciones descritas previamente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con 1 mL de PBS que contenía calceína AM durante 25 minutos a 37°C. Después de este tiempo, se analizaron 5 campos aleatorios de cada condición mediante el uso del microscopio de epi-fluorescencia invertido Olympus IX50, las imágenes se registraron con la cámara digital DP72 y fueron analizadas con el software Image-Pro Plus (V7.0) de media Cybernetics (Silver Spring MD, U.S.A.). La viabilidad celular fue calculada al cuantificar por número de campos aquellas células que presentaran tinción con calceína AM y excluyendo aquellas que fueran positivas a la tinción por ioduro de propidio.

### **Cultivos tridimensionales de superposición en matrigel (3-D).**

Con la finalidad de obtener acinos glandulares de células MCF-10A en cultivos en 3-D las células fueron cultivadas sobre una capa sólida de Matrigel que consiste en una matriz de membrana basal derivada del tumor Engelbreth-Holm-Swarm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, No.354230). Para comenzar con el cultivo, se colocaron 40  $\mu\text{L}$  de Matrigel a cada pozo de una cámara de placa de 8 pocillos (Lab-Tek Chamber Slide System, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA No. 177402) y se

expandió por todo el pozo con la ayuda de una punta de micropipeta de 20  $\mu$ L teniendo cuidado de no generar burbujas. La placa fue colocada en la incubadora de células durante 30 minutos para permitir la solidificación del Matrigel.

Mientras el Matrigel se encontraba solidificando, se obtuvo una suspensión celular de células MCF-10A mediante tratamiento con Tripsina-EDTA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA No. 25300-054) durante 15 minutos y 5 minutos respectivamente. Después, las suspensiones fueron transferidas a tubos de 15 mL y centrifugadas durante 5 minutos a 1500 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el sobrenadante y los botones celulares fueron resuspendidos en 5 mL de PBS. Las células fueron contabilizadas en la cámara de Neubauer utilizando una dilución 1:10 con azul tripano (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA No.15250-061). Posterior a este paso, se colocaron  $2.5 \times 10^3$  por pozo, los cuales contenían el matrigel solidificado y se adicionaron 300  $\mu$ L de medio DMEM-F12 con matrigel al 2% (medio de crecimiento 3-D: 10 mL suplementado como se describió previamente para las células MCF-10A adicionando 400  $\mu$ L de Matrigel.). La cámara fue incubada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para permitir el crecimiento de las células y el medio fue sustituido cada dos días hasta alcanzar el día 12-13 de crecimiento. Para las condiciones en donde se requirió del estímulo con IL-1 $\beta$ , la citocina fue adicionada al medio de crecimiento 3-D a una concentración de 20 ng/mL.

### **Ensayos de inmunofluorescencia de los cultivos 3-D.**

Las células fueron cultivadas en condiciones de cultivo tridimensional (3-D) como se describió previamente y fueron lavadas en tres ocasiones con PBS. Después de esto, las células fueron fijadas con para-formaldehído (PFA Electron Microscopy Sciences Cat. 15713) al 3.7% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavaron en tres ocasiones con PBS y se permeabilizaron con PBS-Triton-X-100 al 0.2% durante 20 minutos más. Al término de la permeabilización, las preparaciones fueron lavadas nuevamente y se trataron con PBS-Triton al 0.02%-suero de chivo al 10%-BSA

1% (buffer de bloqueo) durante una hora para bloquear uniones inespecíficas. En el siguiente paso, las células se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti- $\beta$ -catenina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No.138400) a una dilución de 1:50 en buffer de bloqueo.

Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS-Tween durante 10 minutos en agitación y fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG marcado con Alexa-488 a una dilución de 1:100 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA No. A11008) durante una hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas nuevamente y los núcleos fueron teñidos con DAPI a una concentración de 10 ng/mL, dilución 1:2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No.D1306) por 5 minutos. Finalmente, las preparaciones fueron lavadas y se montaron en las cámaras de cultivo 3-D agregando 12  $\mu$ L de Vecta-Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, No. H-1000) para observarlas en el microscopio confocal. Las preparaciones se observaron en el microscopio Leica SP2 (leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y las imágenes fueron analizadas con el software Leica LAS-AF-Lite 2.6.0. Para el caso de las tinciones en 2-D, las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio estériles en medio de cultivo DMEM-F12 durante 48 horas. A continuación fueron privadas de suero y estimuladas durante 48 horas más como se describió previamente. Posterior a esto, fueron sometidas al proceso de tinción como se describió para las tinciones de los cultivos 3-D y finalmente, las preparaciones se montaron en portaobjetos a los cuales se les agregaron 7  $\mu$ L de Vecta-Shield para observarlas en el microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX50. Las imágenes se registraron con la cámara digital DP72 y fueron analizadas con el software Image-Pro Plus.



## **RESULTADOS**

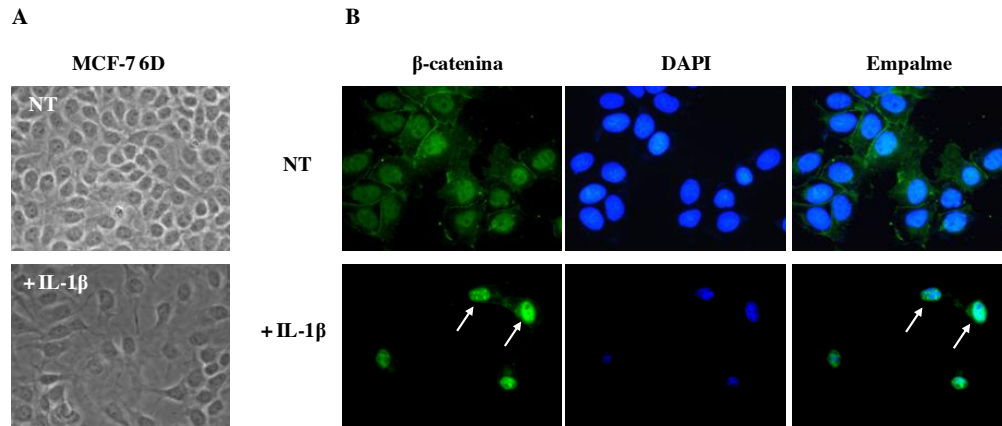
### **La IL-1 $\beta$ induce dispersión de las células MCF-7 6D así como la localización nuclear de la proteína $\beta$ -catenina.**

Las células MCF-7 presentan un fenotipo epitelial típico, son capaces de formar pequeñas colonias en forma poligonal cuando son cultivadas a densidades bajas y en modelos de ratón no son invasiva. Estudios derivados de nuestro grupo de trabajo han reportado que la IL-1 $\beta$  promueve cambios morfológicos y moleculares que sugieren una transición hacia células con mayor malignidad [52]. Uno de estos cambios es la adquisición de características más relacionadas con células mesenquimales, lo cual correlaciona con su capacidad de inducir la translocación de la proteína  $\beta$ -catenina hacia el núcleo de las células MCF-7 6D [53].

En la figura 1A (NT) se muestran las imágenes representativas de las células MCF-7 6D (obtenidas de la línea parental altamente responsiva a la IL-1 $\beta$ ) en condiciones estándar de cultivo en donde se observa que las células se encuentran en estrecho contacto formando una monocapa confluyente típica de células epiteliales. En contraste, en el panel inferior de la figura 1A (+ IL-1 $\beta$ ) se muestran células obtenidas después de la estimulación con IL-1 $\beta$  y se observa que las células adquieren una apariencia fibroblastoide y se dispersan entre sí a partir de las células con estrecho contacto inicial.

Para confirmar que la  $\beta$ -catenina se transloca hacia el núcleo por el efecto de IL-1 $\beta$  se realizaron ensayos de inmunofluorescencia tras el estímulo con la citocina. En la figura 1B (NT) se observa que en las células mantenidas en condiciones estándar de cultivo la  $\beta$ -catenina se localizó en la uniones intercelulares así como en el núcleo y tras ser estimuladas con la IL-1 $\beta$  la proteína se translocó hacia el núcleo. Estos resultados confirman el efecto de IL-1 $\beta$  sobre  $\beta$ -catenina y sugiere la transición hacia un estado

más cercano al de células mesenquimales, a la vez que permite la validación del modelo de estudio de las células MCF-7 6D.



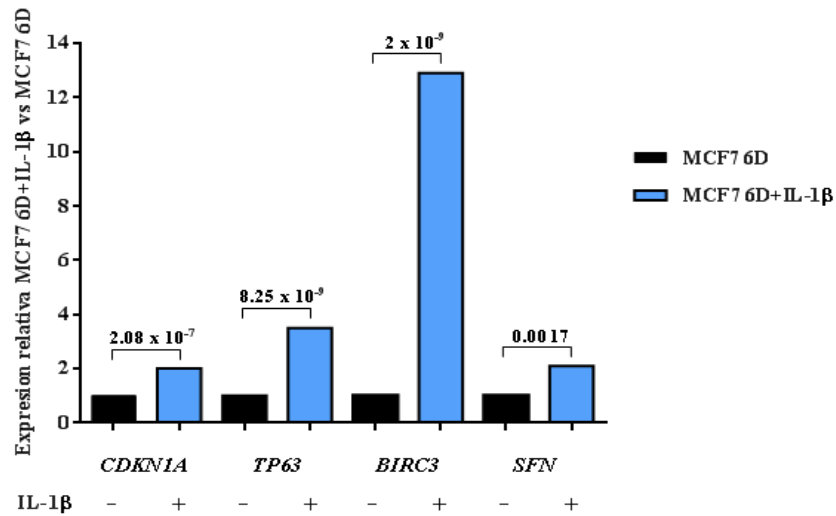
**Figura 1. El estímulo de IL-1 $\beta$  induce la translocación hacia el núcleo de la proteína  $\beta$ -catenina en las células MCF-7 6D.** Células MCF-7 6D no tratadas (NT) o estimuladas con 20 ng/mL de IL-1 $\beta$  durante 48 horas (+IL-1 $\beta$ ). A. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases. B. Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia MCF-7 que muestran la localización de la proteína  $\beta$ -catenina MCF-7. En todos los ensayos se utilizó el marcaje con DAPI para resaltar los núcleos de las células. Las flechas indican la localización nuclear de  $\beta$ -catenina en las células estimuladas.

### **La IL-1 $\beta$ induce el incremento en la expresión de genes de resistencia a doxorubicina.**

La TEM se ha asociado con la adquisición de resistencia a tratamiento por células tumorales y se cree que es responsable de la recaída de los pacientes [59] por lo cual en la búsqueda de genes de resistencia a tratamiento se evaluó el transcriptoma de las células MCF-7 6D cultivadas en presencia de IL-1 $\beta$ . Para llevar a cabo la secuenciación masiva de genes regulados positivamente por IL-1 $\beta$  se realizó una

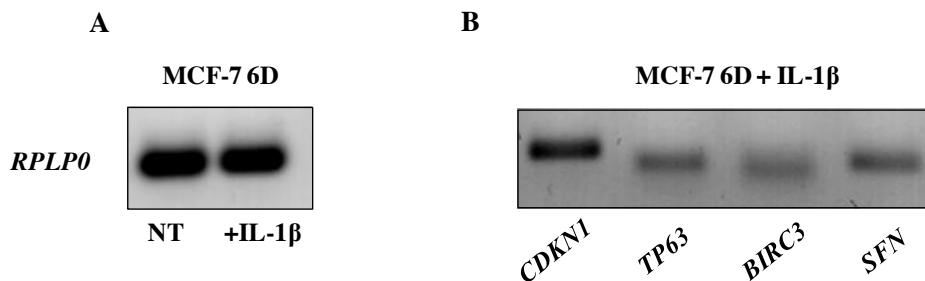
extracción de RNA total de células MCF-7 6D en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$ . Los datos obtenidos fueron analizados con el programa WEB-based Gene Set Analysis Toolkit con la finalidad de evaluar *in silico* que genes se asociaban con la resistencia a quimioterapéuticos usados de manera rutinaria en el tratamiento de cáncer de mama. Los resultados mostraron que la IL-1 $\beta$  fue capaz de inducir un incremento en genes de resistencia a distintos quimioterapéuticos como son el cisplatino y la doxorubicina. En éste trabajo, nos planteamos analizar los genes de resistencia asociados a doxorubicina debido a que es una droga que se usa de manera rutinaria en el tratamiento de varios tipos de cánceres como el mamario, pulmón, ovario, tiroides, mieloma múltiple, sarcoma y cánceres pediátricos [60].

De acuerdo al análisis bioinformático, los genes enriquecidos asociados con la resistencia a doxorubicina fueron *CDKN1A* (Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A), *TP63* (Proteína tumoral p63), *BIRC3* (Proteína baculoviral con repetido 3 de IAP o *c-IAP2*) y *SFN* (Estratafina). En la figura 2 se muestra una gráfica de los datos obtenidos de la secuenciación masiva en donde se observa el incremento en la expresión de genes asociados con resistencia a doxorubicina tras el estímulo con IL-1 $\beta$ . Los genes que mostraron el mayor incremento en expresión fueron *BIRC3* con un valor de 12.9 veces más expresión después del estímulo y *TP63* con un valor de 3.5 veces más expresión. Otros genes que mostraron incrementos menores fueron *CDKN1A* con un valor de expresión relativa de 2 y *SFN* con un valor de expresión de 2.1.



**Figura 2. La IL-1 $\beta$  induce el incremento de la expresión de genes de resistencia a doxorubicina.** Grafica de expresión relativa de genes de resistencia a doxorubicina obtenida a partir de los datos de secuenciación masiva tras el estímulo con IL-1 $\beta$  en células MCF-7 6D (azul) comparados con los niveles basales (negro). Los valores indican la probabilidad ajustada de falsos positivos (FDR, False Discovery Rate).

Posteriormente se procedió a la validación de los genes por medio de ensayos de PCR en tiempo real. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos que reconocieran secuencias codificantes de los genes con amplificadores no mayores a 200 pb, los cuales fueron primero probados en reacciones de PCR punto final (figura 3). A partir del cDNA de células MCF-7 6D estimuladas con IL-1 $\beta$  se amplificaron los fragmentos correspondientes a la secuencias de los genes *CDKN1A*, *TP63*, *BIRC3* y *SFN*. La figura 3A muestra los amplificadores correspondientes al gen *RPLP0* utilizado como control de carga en células no tratadas (NT) y estimuladas con la citocina (+IL-1 $\beta$ ) en donde se observa un mismo nivel de amplificación de este gen. En la figura 3B se muestran los amplificadores correspondientes a los genes de resistencia descritos. Se observó un solo amplificado para cada gen por lo que estos resultados muestran que es factible realizar ensayos de PCR tiempo real cuantitativa.



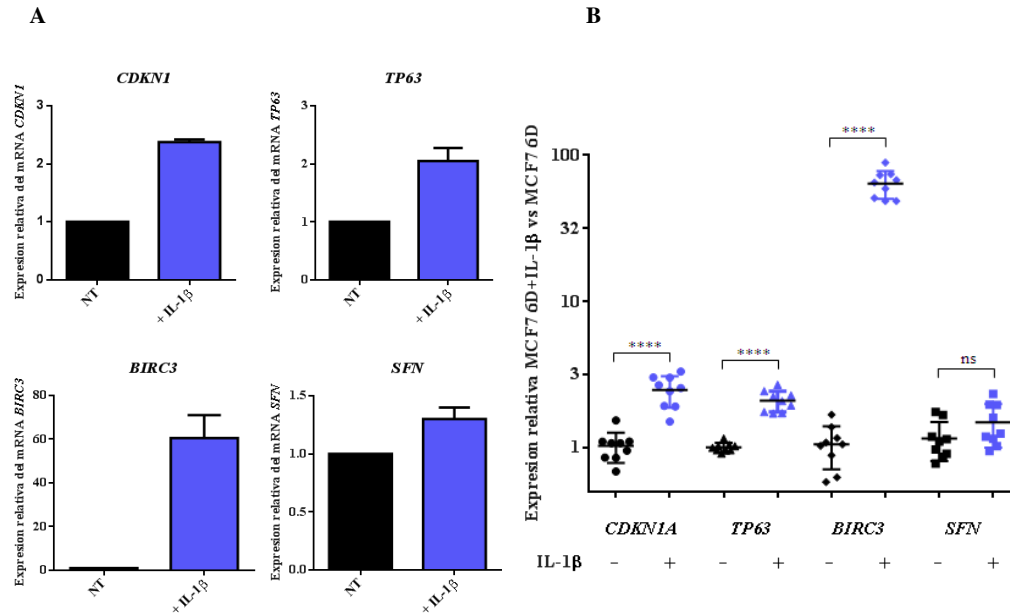
**Figura 3. Ensayo preliminar de los primers para PCR tiempo real por PCR punto final. A.** Imagen representativa de los amplificadores por RT-PCR punto final del gen *RPLP0* en células MCF-7 6D no tratadas (NT) y estimuladas con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ). **B.** Imagen representativa de los amplificadores por RT-PCR punto final de los Genes *CDKN1*, *TP63*, *BIRC3* y *SFN* en células MCF-7 6D estimuladas con IL-1 $\beta$ .

Una vez que se validaron los amplificadores de los genes de resistencia a doxorubicina por ensayos de PCR punto final, los cDNAs de las células MCF-7 6D no estimuladas y estimuladas con IL-1 $\beta$  fueron sometidos a ensayos de PCR tiempo real cuantitativo con la finalidad de conocer la expresión de los genes de resistencia a doxorubicina regulados por IL-1 $\beta$ . En La figura 4A se muestra el análisis de expresión relativa para cada gen y se observa que bajo el estímulo de IL-1 $\beta$  las células MCF-7 6D incrementaron la expresión de todos los genes mencionados.

Para el caso particular del gen *CDKN1A* se obtuvo una expresión con un valor 2.4 veces mayor comparado con el valor mostrado por las células no estimuladas. En el caso de la expresión de *TP63* en las células estimuladas se observó un incremento con un valor 2 veces mayor, mientras que bajo el estímulo de la citocina la expresión de *BIRC3* se incrementó 63.9 veces más. Por otro lado, la expresión de *SFN* incrementó escasamente, mostrando un aumento de 1.4 veces después del estímulo.

En la figura 4B, se muestra la gráfica de expresión de todos los genes comparados contra sus respectivos controles y se observa que *CDKN1A* y *TP63* se

encuentran muy cercanos en cuanto al incremento de su expresión, mientras que *BIRC3* es el gen que alcanza los valores más altos. Por lo anterior, estos resultados mostraron que tras el estímulo de IL-1 $\beta$  las células incrementan la expresión de genes involucrados en la resistencia a doxorubicina y validan los datos obtenidos a partir de la secuenciación masiva del transcriptoma.

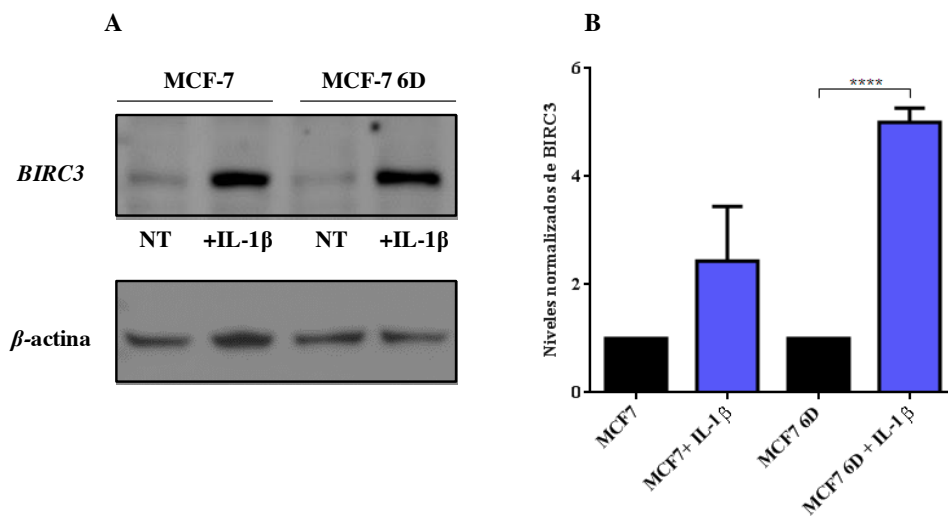


**Figura 4. La IL-1 $\beta$  favorece el incremento de genes asociados con la resistencia a doxorubicina. A.** Graficas individuales de expresión relativa de los genes *CDKN1A*, *TP63*, *BIRC3* y *SFN* obtenidas por RT-PCR tiempo real cuantitativa en células MCF-7 6D no tratadas (NT) y estimuladas con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) n=3. **B.** Grafica de expresión relativa obtenida por RT-PCR tiempo real cuantitativa en células MCF-7 6D bajo las mismas condiciones que en A. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes cada uno realizado por triplicado  $\pm$  la desviación estándar n=9. \*\*\*\*P=0.0001, ns= no significativo

Los datos obtenidos por RT-PCR tiempo real validan el incremento en la expresión de genes asociados con la resistencia a doxorubicina tras el estímulo con IL-1 $\beta$ , particularmente en la expresión del gen *BIRC3*. Para averiguar que este efecto también

se presenta a nivel de la expresión de la proteína, se realizaron ensayos de Western Blot y se cuantificó el nivel de la proteína BIRC3. En dichos ensayos, se obtuvieron extractos totales de los cultivos de células MCF-7 como de MCF-7 6D en medio normal o después de ser estimulados con la citocina.

El Western Blot de la figura 5A, muestra la presencia de una banda de aproximadamente 70 kDa que corresponde con el peso de la banda que se esperaba al ser revelada con un anticuerpo anti-BIRC3. Se observó que, tanto en las células parentales como en la clona 6D, tras ser estimuladas con IL-1 $\beta$  hubo un incremento del nivel de la proteína BIRC3 (Figura 5A paneles +IL-1 $\beta$ ). El análisis densitométrico de los ensayos de Western Blot provenientes de tres experimentos independientes (figura 5B) reveló que la estimulación con IL-1 $\beta$  incrementa los niveles de BIRC3 2.4 veces más en comparación con los niveles expresados en células MCF-7 no estimuladas (NT). Para el caso de las células MCF-7 6D se observó un incremento de 5 veces más en comparación al nivel basal de las células no estimuladas y este resultado se correlaciona en forma positiva con el hecho de que ésta clona fue seleccionada por poseer una mayor respuesta hacia la citocina. Por lo tanto, los datos muestran que la regulación positiva de la IL-1 $\beta$  sobre genes de resistencia a doxorubicina en las células MCF-7 6D se da también a nivel de proteína.



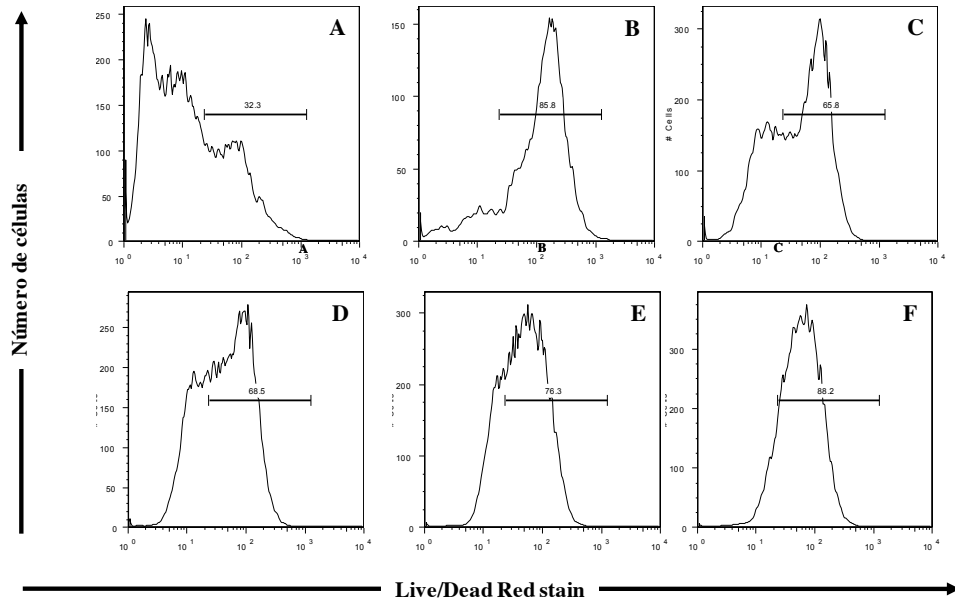
**Figura 5. La IL-1 $\beta$  induce el incremento en los niveles de la proteína BIRC3.** **A.** Western Blot representativo de extractos totales de células MCF-7 y MCF-7 6D no tratadas (NT) y estimuladas con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) revelado con el anticuerpo monoclonal anti-BIRC3. En la parte inferior, se muestra el Blot representativo de  $\beta$ -actina usado como control de carga. **B.** Gráfica del análisis densitométrico de los resultados de tres experimentos independientes + la desviación estándar, en todos ellos los niveles de BIRC3 fueron normalizados con respecto a la expresión de la proteína en células no estimuladas. \*\*\*\*P=0.0001

### **IL-1 $\beta$ induce resistencia al tratamiento *in vitro* con doxorubicina en células MCF-7 6D.**

Todos los resultados anteriores sugieren que la IL-1 $\beta$  regula positivamente la expresión de genes asociados con la resistencia hacia doxorubicina por lo que nos planteamos examinar si la citocina es capaz de conferir protección en ensayos funcionales *in vitro*. Inicialmente, establecimos la concentración óptima de trabajo de la doxorubicina montando una curva de concentración del quimioterapéutico para finalmente determinar la viabilidad celular mediante el uso del kit Live/Dead en ensayos de citometría de flujo. La curva se inició en un rango de concentración de 150 nM hasta 750 nM y las células fueron tratadas durante 96 horas. Como se muestra en la figura 6, existe una correlación entre el incremento de la concentración de la doxorubicina con el incremento de la muerte celular. En la concentración inicial (150 nM panel C) se observa un porcentaje de 65% de células muertas mientras que en la siguiente concentración (250 nM, panel D) se observó un ligero incremento alcanzado un porcentaje de 68%. Para el caso de la concentración de 500 nM (panel E) se observó un porcentaje de 76% y finalmente la concentración de 750 nM (panel F) mostró un porcentaje de muerte de 88%. En el panel B se muestra un control positivo usando células irradiadas con luz ultravioleta y se observa que la mayoría de células están en apoptosis ya que el histograma se desplazó por completo hacia la derecha, de igual



forma se incluyó un control de células sin teñir (panel A) en donde se observa un valor basal de células muertas (30%) debido a los procesos de manipulación. Por lo anterior, se determinó que la concentración de trabajo debía ser de 500 nM ya que a esta concentración obtenemos la muerte del 50% de nuestra población celular considerado el valor basal de muerte.



**Figura 6. La doxorubicina a una concentración de 500 nM produce la muerte del 50% de células MCF-7 6D.** Histogramas de citometría de flujo representativos de células MCF-7 6D incubadas con concentraciones crecientes de doxorubicina y que fueron teñidas con el kit Vivo/Muerto. Panel A: células sin teñir, B: células irradiadas con luz UV, C: 150nM de doxorubicina, D: 250 nM, E: 500 nM, F: 750 nM. Las barras en cada panel indican el porcentaje de células muertas.

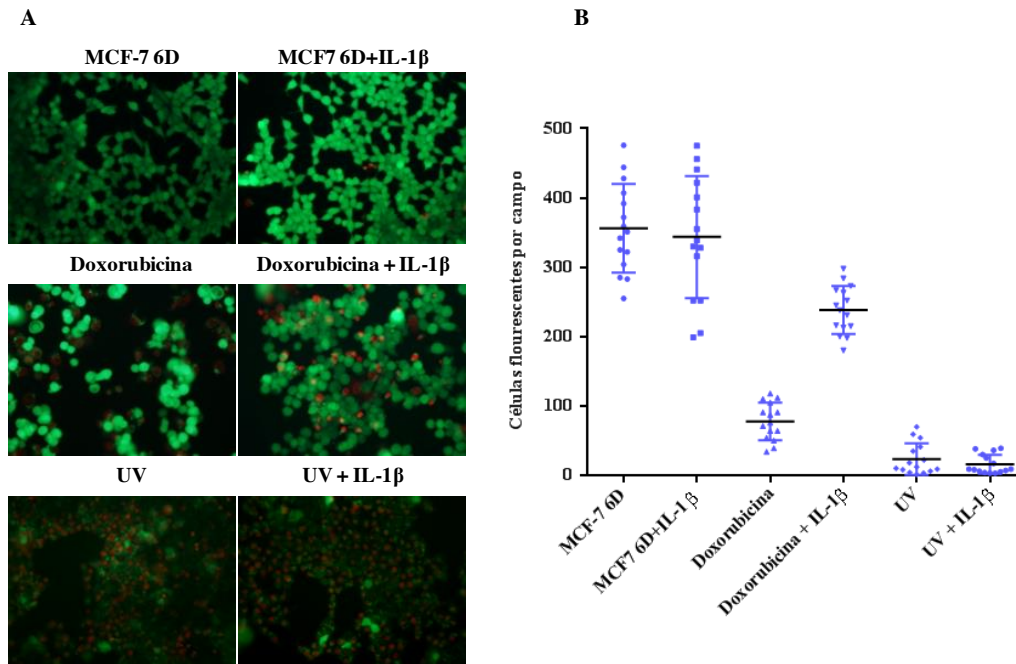
Una vez que determinamos la concentración óptima de trabajo de la doxorubicina procedimos a realizar los ensayos funcionales *in vitro*. En dichos ensayos, las células fueron cultivadas y estimuladas con IL-1 $\beta$  de manera convencional antes de la incubación con el quimio-terapéutico. A continuación, las células fueron tratadas con

doxorubicina pero siempre en presencia del estímulo de la citocina y finalmente, las células fueron sometidas a una tinción con calceína AM y a una contra tinción con Ioduro de propidio con la finalidad de analizar la viabilidad de las células. La calceína AM, es un colorante permeable a las membranas celulares que al ser absorbido por las células y procesado por la actividad de enzimas esterases se transforma en calceína la cual emite una fluorescencia de color verde. Debido a que las esterases son únicamente activas en las células vivas el uso de la calceína AM permite la distinción de las células vivas (células verdes) de las muertas. Por otro lado, el yoduro de propidio no puede penetrar e intercalarse en el DNA de las células vivas, pero si en el de las células muertas que se distinguen por la emisión de fluorescencia roja.

Como se muestra en la figura 7A (panel MCF-7 6D), partiendo de células no tratadas con doxorubicina se observó que todas ellas presentan una coloración verde y por lo tanto son viables. En estas condiciones los cultivos estuvieron compuestos de un promedio  $363 \pm 63$  células vivas por campo. De igual forma se observó que cuando las células fueron estimuladas con la citocina (panel MCF-7 6D+IL-1 $\beta$ ) el cultivo estuvo compuesto de un promedio de  $343 \pm 88$  células vivas por campo. Por el contrario, cuando se incluyeron los controles de células irradiadas con luz ultravioleta (panel U.V.) o células estimuladas e irradiadas (panel U.V.+IL-1 $\beta$ ) se observó que la mayoría de las células presentan una fluorescencia roja y por tanto son células no viables o muertas. Bajo estas condiciones los cultivos estuvieron formados por un promedio de  $23 \pm 22$  células vivas por campo y  $15 \pm 13$  células por campo respectivamente. Para el caso de las células tratadas con doxorubicina, se observó un promedio de  $77 \pm 26$  células vivas por campo mientras que en el caso de las células que fueron estimuladas y posteriormente tratadas con la doxorubicina (panel doxorubicina+IL-1 $\beta$ ) se observó un promedio de  $238 \pm 34$  células vivas por campo.

En la figura 7B se muestra la gráfica del número total de células viables para cada condición del ensayo. Al realizar los cálculos de los porcentajes se obtuvo que bajo las condiciones de tratamiento con la doxorubicina los cultivos estuvieron compuestos de un 22% células vivas con respecto al control mientras que cuando fueron estimuladas

con la citocina previo al tratamiento el porcentaje cambio a 66% de células vivas con respecto al control, por lo que el porcentaje de células que poseen resistencia al tratamiento es de 40%. Por lo tanto, los datos muestran que la IL-1 $\beta$  les confiere a las células MCF-7 6D la capacidad de ser resistentes al tratamiento con la doxorubicina en ensayos funcionales *in vitro*.



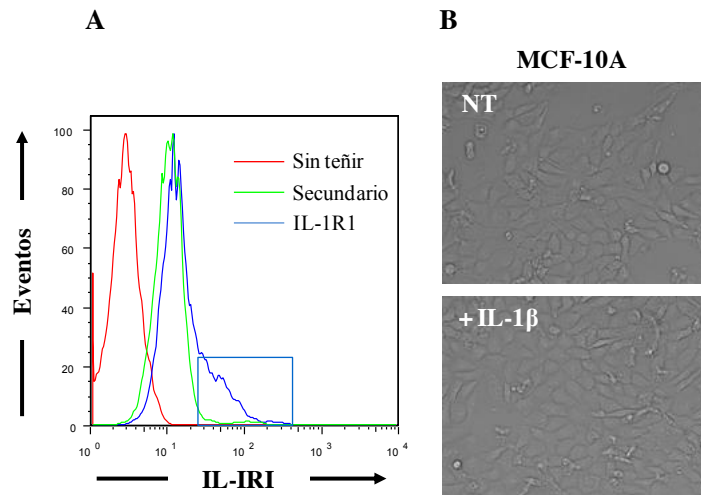
**Figura 7. La IL-1 $\beta$  induce resistencia a doxorubicina en ensayos funcionales *in vitro*.**

Imágenes representativas de epifluorescencia de tinciones con calceína AM/IP en células MCF-7 6D no estimuladas, estimuladas con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ), tratadas con doxorubicina e incubadas con ambos tratamientos (doxorubicina+IL-1 $\beta$ ). Se incluyen también células irradiadas con luz ultravioleta como control positivo. **B.** Gráfica de la cuantificación de la viabilidad de las células en las condiciones mencionadas. Se cuantificaron 5 campos aleatorios en tres experimentos independientes, los datos se presentan como el número total de células vivas por campo  $\pm$  la desviación estándar. n=15

### **En células MCF-10A la IL-1 $\beta$ induce la localización nuclear de $\beta$ -catenina y la expresión de los genes *Snail* y *ZEB1***

La línea de epitelio glandular de mama MCF-10A, es una línea celular no transformada, aislada de una paciente con fibroquistes en la mama y que ha sido ampliamente usada en estudios *in vitro* por su capacidad de reproducir la arquitectura de los acinos glandulares cuando se cultiva en un símil de la matriz extracelular. Considerando que las células MCF-7 ya están transformadas, nos preguntamos si IL-1 $\beta$  induce cambios del tipo de transición epitelio-mesénquima en una línea celular no transformada y si estos cambios correlacionan con la pérdida de la arquitectura silvestre de los acinos glandulares generados *in vitro*. Para determinar el efecto de IL-1 $\beta$  sobre estas células en cultivos tridimensionales inicialmente nos planteamos determinar la expresión del receptor y analizar el efecto sobre las células en cultivos convencionales (en dos dimensiones o monocapa). Para analizar la expresión del receptor en estas células se realizaron ensayos de citometría de flujo. Como se observa en la figura 8A (recuadro azul) se comprobó que las células MCF-10A expresan el receptor para IL-1 $\beta$  tipo 1 (IL-1R1), aunque en comparación con las células MCF-7 la cantidad de receptor expresado es 2 veces menor [61].

En el modelo de células MCF-7 la IL-1 $\beta$  induce dispersión de las células así como la adquisición de un fenotipo fibroblastoide. Para determinar el efecto IL-1 $\beta$  sobre las células MCF-10A se realizaron cultivos en monocapa en presencia de la citocina y se analizó si existían cambios similares. Estas células, al igual que las MCF-7 6D, son capaces de formar colonias poligonales en condiciones de sub-confluencia, sin embargo cuando fueron tratadas con IL-1 $\beta$  no mostraron ningún cambio fenotípico notable ni dispersión de las colonias iniciales (Figura 8B). Por lo tanto, estos datos muestran que la IL-1 $\beta$  no induce cambios morfológicos en una línea celular no transformada.



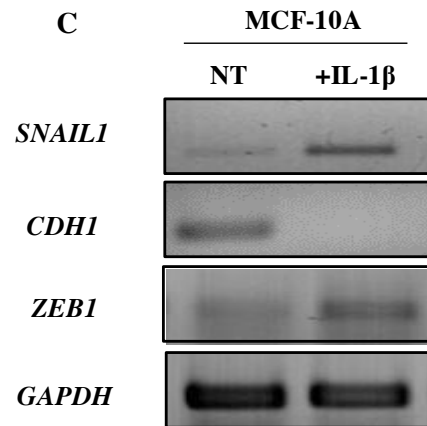
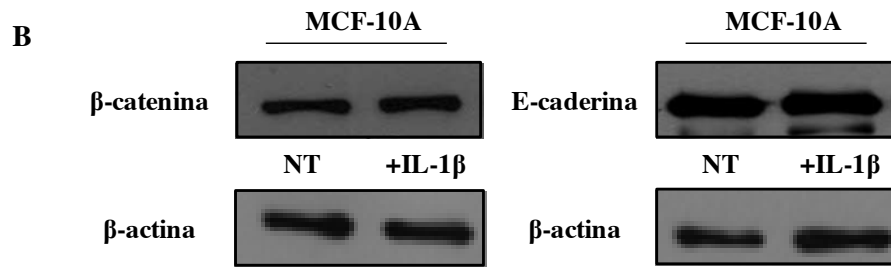
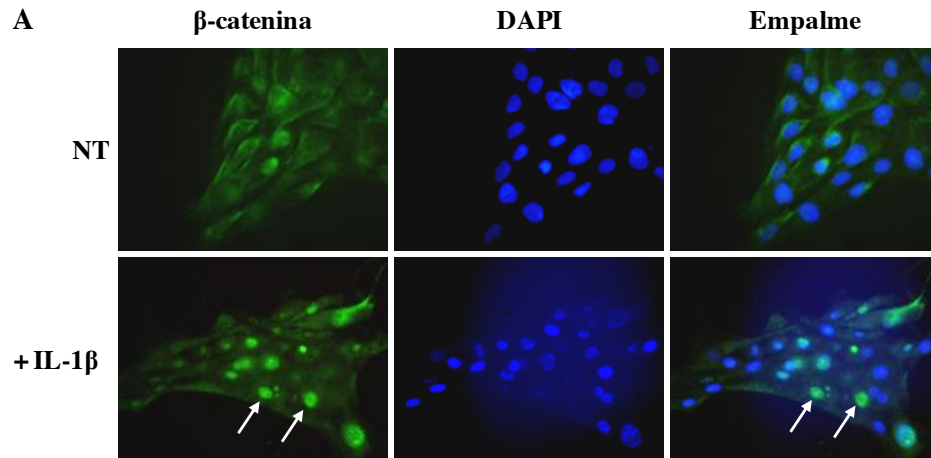
**Figura 8. La IL-1 $\beta$  no induce cambios morfológicos en las células MCF-10A a pesar de que expresan su receptor. A.** Histogramas representativos obtenidos del análisis de citometría de flujo. Las células MCF-10A fueron teñidas con el anticuerpo anti-IL-1R1 y con el anticuerpo secundario acoplado a FITC. Se muestran los histogramas de células sin teñir (rojo), control de anticuerpo secundario (verde) e IL-1R1 en azul. El recuadro azul indica la región de células con niveles de expresión más altos. **B.** Imágenes representativas de microscopia de contraste de fases de las células MCF-10A no tratadas (NT) y estimuladas con 20 ng/mL de IL-1 $\beta$  durante 48 horas (+IL-1 $\beta$ ).

Una vez que se determinó la expresión del receptor de IL-1R1 en células MCF-10A, se procedió a analizar la localización de la proteína  $\beta$ -catenina en estas células con la finalidad de determinar si la IL-1 $\beta$  puede inducir su translocación hacia el núcleo como en las células MCF-7 6D [53]. Tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , las células fueron sometidas a tinciones de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra la  $\beta$ -catenina. En dichos ensayos, las células fueron estimuladas con IL-1 $\beta$  un periodo de 48 horas previo a la tinción con el anticuerpo. En la Figura 9A panel +IL-1 $\beta$  se observó la localización nuclear de la  $\beta$ -catenina. Esta señal positiva no fue observada cuando las células no fueron estimuladas (Figura 9A panel NT) demostrando que la IL-

1 $\beta$  es capaz de inducir la localización nuclear de la  $\beta$ -catenina en las células no transformadas MCF-10A.

La translocación de  $\beta$ -catenina hacia el núcleo puede ser activada al incrementar su estabilidad para no ser degradada. Nuestros resultados de inmunofluorescencia muestran la re-localización de la  $\beta$ -catenina en el núcleo por lo que decidimos analizar si existía un incremento en su estabilidad por medio de ensayos de Western Blot. En la figura 9B se observa que la cantidad total de  $\beta$ -catenina no cambia por el estímulo de IL-1 $\beta$  (Blot  $\beta$ -catenina+IL-1 $\beta$ ). Por lo tanto, la IL-1 $\beta$  induce la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina por medio de inducir un cambio en su localización.

De igual forma analizamos la cantidad total de la proteína E-caderina debido a que la  $\beta$ -catenina se encuentra en la membrana celular interactuando con ella y otras proteínas para conferir estabilidad a las uniones adherentes. Como se observa en la figura 9B (Blot E-caderina+IL-1 $\beta$ ) tampoco hubo cambios significativos en los niveles de la proteína. Sin embargo, cuando analizamos el mRNA de E-caderina su expresión estaba disminuida sugiriendo una regulación negativa y que las células inician el desensamble de las uniones adherentes en el inicio de la TEM. Además que se observó un incremento en la expresión de los mRNAs de los genes de *SNAIL* y *ZEB1* lo que apoya a que las células están iniciando la TEM.



**Figura 9. La IL-1 $\beta$  induce la re-localización nuclear de  $\beta$ -catenina en células MCF-10A.**

**A.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia que muestran la localización de la proteína  $\beta$ -catenina en células MCF-10A no tratadas (NT) y estimuladas con IL-1 $\beta$ . En todos los ensayos se utilizó el marcaje con DAPI para resaltar los núcleos de las células. Las flechas indican la localización nuclear de  $\beta$ -catenina en las células estimuladas. **B.** Western Blots representativos de extractos totales de células MCF-10A no tratadas (NT) y estimuladas con IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) revelados con los anticuerpos anti- $\beta$ -catenina y anti-E-caderina. En la parte inferior, se muestran los Blots representativos de  $\beta$ -actina usados como control de carga. **C.** La expresión relativa de los genes *ZEB1*, *Snail* y *CDH1* fue determinada por RT-PCR semicuantitativa. El mRNA fue aislado de las células MCF-10A después de ser estimuladas con IL-1 $\beta$  y fue comparado con el mRNA de las células control.

**En cultivos 3-D de células MCF-10A la IL-1 $\beta$  induce alteraciones en la polaridad y resistencia a anoikis.**

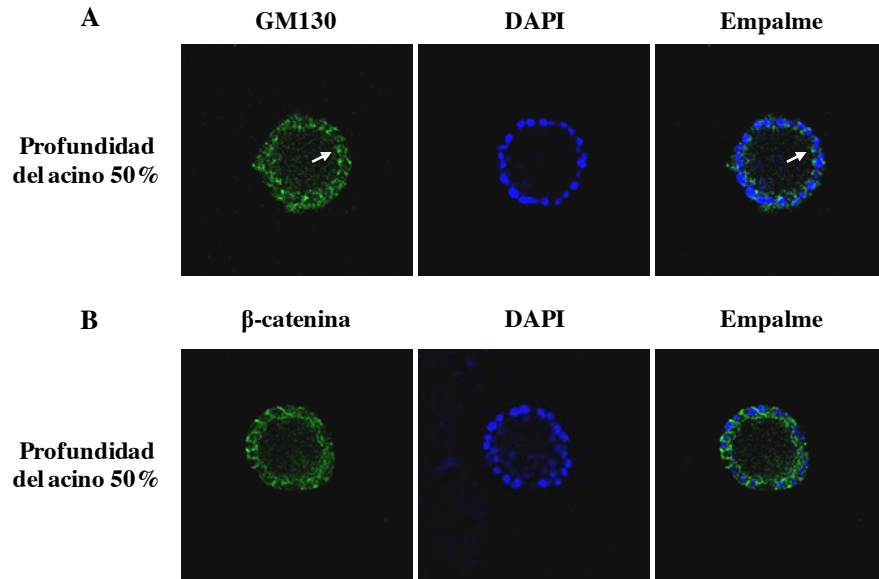
Bajo condiciones de cultivo 3-D, las células MCF-10A típicamente proliferan y se organizan en esferoides comúnmente llamados acinos por que semejan estructuras glandulares con una arquitectura definida caracterizada por la presencia de un lumen central rodeado por células polarizadas dependiendo de su orientación hacia el lumen o hacia la MEC. Durante la formación del acino, en los primeros días las células comienzan a proliferar formando un agregado, de ellas, las células del centro mueren por anoikis, un tipo de apoptosis que se presenta cuando las células pierden contacto con la MEC. El lumen del acino puede ser fácilmente observado al microscopio y la polaridad de la capa celular que lo rodea por la expresión específica de proteínas, por ejemplo GM130 la cual se orienta hacia la cara apical de las células [62].

Nuestros datos apoyan que la IL-1 $\beta$  induce una transición a un estado que tiene características mesenquimales en las células MCF-10A. Durante la TEM se da el



desensamble de uniones intercelulares y pérdida de la polaridad de las células [63]. Además la inducción de TEM resulta en la resistencia a anoikis y en la generación de células invasivas [43]. Por lo anterior, nos planteamos analizar si la IL-1 $\beta$  interfiere en la polaridad de los acinos glandulares y si les confiere resistencia a anoikis. Estos cambios son más fácilmente observables en la línea celular no transformada MCF-10A en cultivos 3-D formando acinos glandulares que en una tumoral como las MCF 7 debido a que ya tiene alterados estos procesos ya que en cultivos 3-D los acinos no tienen un lumen [64].

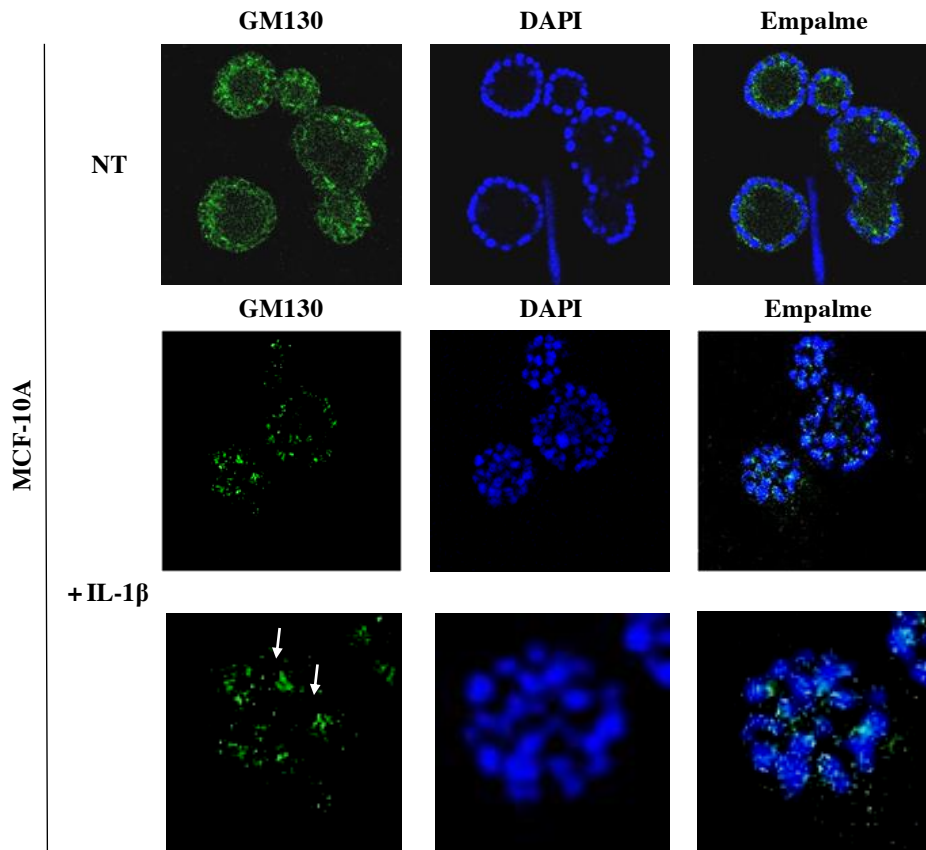
Inicialmente, decidimos analizar la polaridad apical y lateral de los acinos debido a que en la TEM es necesario el desensamble de uniones y pérdida de la polaridad de las células. Como se muestra en la figura 10A al utilizar la proteína GM130 en ensayos de inmunofluorescencia en células MCF-10A, no tratadas, fue posible observar que su localización efectivamente se dirige hacia el centro del lumen (flecha). Por otro lado cuando usamos el anticuerpo anti- $\beta$ -catenina logramos observar las uniones celulares (polaridad lateral) de esta capa que rodea al lumen (Figura 10B). En estos paneles se muestran los cortes ecuatoriales (50% de profundidad) de las imágenes de microscopia confocal ya que así es como se hace evidente el lumen de los acinos.



**Figura 10.** En cultivos 3-D las células MCF-10A poseen un lumen central y sus células presentan polaridad apical y uniones adherentes. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran la localización de la proteína GM130 en células MCF-10A no tratadas. La flecha indica la localización apical de la proteína. **B.** Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran la localización de la proteína  $\beta$ -catenina en células MCF-10A no tratadas. En todos los ensayos se utilizó el marcaje con DAPI para resaltar los núcleos de las células. Todos los cortes confocales mostrados son al 50% de profundidad del acino y hacen evidente la presencia del lumen central por medio de la tinción con DAPI.

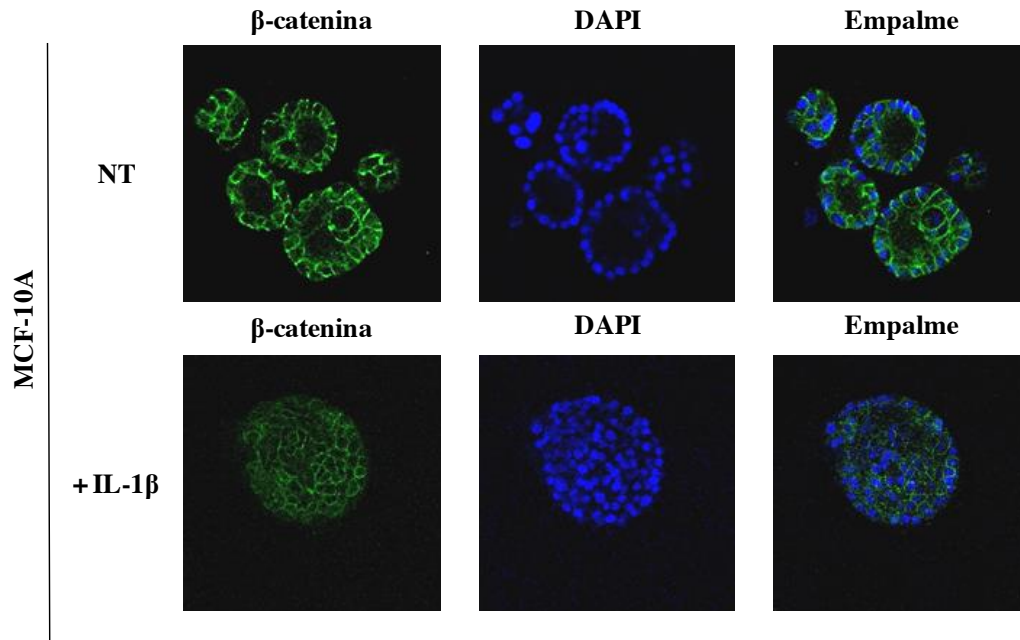
Una vez que montamos nuestro sistema 3-D, analizamos el efecto de la IL-1 $\beta$  sobre estas estructuras acinares. Como se observa en la figura 11, las células que no fueron estimuladas con IL-1 $\beta$  (NT) presentan el lumen central característico de la apoptosis por anoikis (Panel DAPI) y la proteína GM130 se dirige en la célula epitelial orientada hacia la zona central del lumen indicativo de la parte apical de las células (Panel GM130 y Empalme). En contraste, cuando las células estuvieron en contacto con la IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) durante la morfogénesis se observa que las células se encuentran evadiendo

la anoikis ya que los acinos no presentan un lumen central (panel DAPI) además de que la distribución de la proteína GM130 está alterada. (Panel GM130 y Empalme). En la parte inferior de la figura se incluye un aumento y en donde se puede observar la alteración en la localización de la proteína GM130 debido a la IL-1 $\beta$  (Panel inferior con flechas).



**Figura 11. La IL-1 $\beta$  altera la polaridad apical de los acinos de MCF10A e induce resistencia a anoikis.** A. Imágenes representativas de microscopia confocal que muestran la localización de la proteína GM130 en células MCF-10A no tratadas (NT, panel superior) y estimuladas con IL-1 $\beta$  durante la morfogénesis (panel de en medio e inferior, +IL-1 $\beta$ ). En la parte inferior (aumento) las flechas indican la alteración de la localización apical de GM130. En todos los ensayos se utilizó el marcaje con DAPI para resaltar los núcleos de las células. Todos los cortes confocales mostrados son al 50% de profundidad y hacen evidente la presencia del lumen central por medio de la tinción con DAPI.

Una vez que determinamos que la IL-1 $\beta$  altera la polaridad celular e induce resistencia a anoikis, nos planteamos analizar la localización de la proteína  $\beta$ -catenina en las uniones celulares de las células que están evadiendo esta apoptosis. Como se muestra en la figura 12, cuando las células no fueron tratadas con la citocina (panel NT), nuevamente se observa la formación del lumen central indicativo de la muerte por anoikis (panel superior DAPI). Además, la localización de  $\beta$ -catenina se encontró en los contactos célula-célula sobre aquellas células que rodean el lumen central (panel  $\beta$ -catenina y Empalme). Por otro lado, cuando las células estuvieron en presencia de la IL-1 $\beta$  se observó nuevamente la resistencia a anoikis por medio de la tinción de los núcleos de las células (panel inferior DAPI). La tinción de  $\beta$ -catenina confirmó que la IL-1 $\beta$  les confiere a las células la capacidad de evadir anoikis, ya que la proteína se localizó en las uniones adherentes de las células que llenaron el lumen central de los acinos. Por lo tanto, los datos muestran que la IL-1 $\beta$  es capaz de inducir cambios morfológicos significativos en los acinos glandulares alterando la polaridad celular e induciendo resistencia a anoikis en un modelo de epitelio no transformado. Estos datos apoyan la capacidad de IL-1 $\beta$  de favorecer la transición de células epiteliales a estadios más cercanos al mesenquimal debido a que se observaron estructuras acinares desarregladas y con células que tienen la capacidad de sobrevivir a pesar de la falta de las señales que resultan de la pérdida de los contactos intercelulares y de los contactos con la MEC. Esta capacidad de supervivencia incrementada no solo explica porque en cáncer la TEM se asocia con tumores invasivos si no también explica la resistencia incrementada al tratamiento de doxorubicina, como se observó en las células MCF-7 6D.



**Figura 12. Las células del lumen que evaden la anoikis poseen uniones adherentes de  $\beta$ -catenina.** Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran la localización de la proteína  $\beta$ -catenina en células MCF-10A no tratadas (NT) y estimuladas con IL-1 $\beta$  durante toda la morfogénesis. En todos los ensayos se utilizó el marcaje con DAPI para resaltar los núcleos de las células. Todos los cortes confocales mostrados son al 50% de profundidad y hacen evidente la presencia del lumen central por medio de la tinción con DAPI.

## DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad que afecta a millones de mujeres en el mundo. Se ha propuesto que las células estromales que rodean a las células cancerosas juegan un papel activo durante la progresión hacia la malignidad creando un microambiente favorable para el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis [65]. Dentro de este microambiente, las células del sistema inmune están íntimamente relacionadas con el proceso de progresión tumoral. Inicialmente, la respuesta hacia el desarrollo del tumor se manifiesta como una inflamación local por medio del reclutamiento de leucocitos. Los mediadores de esta respuesta inflamatoria son las citocinas pro-inflamatorias  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  que son secretadas por macrófagos para iniciar la expresión de genes pro-inflamatorios además de promover la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y leucocitos para permitir su infiltración hacia los tejidos. Estos leucocitos reclutados hacia el tejido dañado apoyan el remodelado y la reparación tisular mediante la secreción de distintos factores de crecimiento y otras citocinas. En condiciones normales, esta respuesta inflamatoria es detenida una vez que el tejido ha sido reparado sin embargo, durante la transformación tumoral esta respuesta es persistentemente activada formando así un microambiente de inflamación crónica que promueve la progresión del tumor [66]. En el caso particular de la  $IL-1\beta$ , se ha mostrado que de manera fisiológica regula la activación de la respuesta inflamatoria pero un exceso en sus niveles han sido también implicados en diferentes enfermedades incluyendo el cáncer [51].

Estudios *in vivo* derivados de distintos modelos soportan una relación de la  $IL-1\beta$  como promotor de la progresión tumoral. Por ejemplo, la expresión dirigida de la  $IL-1\beta$  de humano en el estómago de ratón provoca en la mucosa gástrica una inflamación crónica y el desarrollo local de tumores. En otro estudio, se observó que al expresar el receptor tipo 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1) sobre células de epitelio de mama se induce el desarrollo de cáncer. Este proceso oncogénico estuvo asociado a una producción local de  $IL-1\beta$  y pudo ser inhibido mediante la administración

sistémica un anticuerpo neutralizante para la IL-1 $\beta$ , mostrando así, su interrelación. Otro estudio, utilizando ratones deficientes del gen de IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>) mostraron que la inducción de carcinogénesis química se ve disminuida en estos ratones comparados con los ratones de camadas silvestres. Por lo anterior, estos resultados muestran la estrecha relación de la carcinogénesis con la inflamación local mediada por IL-1 $\beta$ .

Además en el modelo del ratón transgénico para IL-1 $\beta$ , se observó que esta carcinogénesis local estuvo ligada al reclutamiento de células supresoras derivadas de linaje mielóide (MDCS por sus siglas en inglés), las cuales inhiben las acciones anti-proliferativas de los linfocitos T en los tumores. Por el contrario, los ratones deficientes en el receptor de IL-1 (IL-1R<sup>-/-</sup>) muestran una reducción en la inflamación y en el reclutamiento de las MDCS y esto limita la progresión tumoral. Por lo anterior, estos datos indican que la IL-1 $\beta$  puede actuar como un inductor de la carcinogénesis o como supresor de los mecanismos de la inmunovigilancia contra el cáncer facilitando así la progresión tumoral [67-70].

Recientemente, usando un modelo de células de cáncer de mama poco invasivo (MCF-7), se ha mostrado que cuando las células son expuestas a la citocina pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  se inducen cambios moleculares característicos del inicio de una progresión hacia la metástasis en la cual las células expresan moléculas involucradas en la proliferación, migración, invasión que participan en la TEM tales como c-MYC, ciclina D1, CXCR4, MMP2 y SNAIL. Se ha reportado por nuestro grupo que estos cambios son mediados por la vía de señalización de PI3K, así como por una nueva vía de señalización llamada IL-1- $\beta$ -catenina [52, 53]. Por otro lado, existen estudios que han mostrado que estas moléculas, y las vías de señalización que inducen, controlan el proceso de TEM. De igual forma, éstas se asocian con un fenotipo de resistencia a quimioterapéuticos y además promueven la resistencia a la muerte celular llamada anoikis, la cual, se presenta por la pérdida del contacto de las células con la MEC [71].

En el presente trabajo se tomaron como modelo de estudio la línea celular MCF-7 6D y la línea celular MCF-10A y observamos que la IL-1 $\beta$  induce la resistencia a la

doxorubicina en las células MCF-7 6D mientras que favorece la supresión de la muerte celular por anoikis en células MCF-10A.

Estudios previos por nuestro grupo, con las células MCF-7 6D, han mostrado que la IL-1 $\beta$  induce el desensamble de las uniones celulares y esto induce la translocación hacia el núcleo de la proteína  $\beta$ -catenina. De manera fisiológica la proteína  $\beta$ -catenina posee dos funciones dentro de las células epiteliales. Una de sus funciones es proporcionar el enlace entre distintas proteínas y el citoesqueleto de actina para fortalecer las uniones adherentes. Esta función está regulada por medio de fosforilaciones en residuos de tirosina, que son realizadas por la actividad receptores de factores de crecimiento como el EGFR lo que conlleva al desensamble de las uniones adherentes entre E-caderina y  $\beta$ -catenina. Este mecanismo de desensamble es utilizado por varios tipos de cánceres invasivos en los cuales se ha observado un incremento en esta forma fosforilada de la proteína [72].

Por otro lado, la  $\beta$ -catenina está implicada en la transducción de señales y la regulación transcripcional. Esto se da a través de actuar como coactivador transcripcional con las proteínas TCF/LEF. En condiciones normales, la  $\beta$ -catenina es marcada para degradación por medio de fosforilaciones en residuos de serina y treonina por la acción del complejo GSK3 $\beta$ /APC/Axina. Sin embargo, la inhibición de GSK3 $\beta$  resulta en la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo en donde eventualmente actúa como coactivador transcripcional. En varios sistemas se ha reportado esta localización nuclear de  $\beta$ -catenina, la cual es considerada un marcador de mal pronóstico en varios tipos de cáncer ya que induce la transcripción de genes involucrados en la progresión tumoral y en la TEM [73].

De manera similar a lo reportado, cuando nosotros analizamos la proteína  $\beta$ -catenina en la línea MCF-10A, observamos que la IL-1 $\beta$  induce una localización nuclear de la proteína y esto correlacionó positivamente con un incremento en la expresión de los genes Snail1 y ZEB1, los cuales están involucrados en la desregulación de las uniones adherentes por medio de reprimir transcripcionalmente el promotor del



gen de E-caderina. Estos resultados también están en concordancia con la pérdida de la expresión del transcrito de E-caderina después del estímulo con IL-1 $\beta$ .

Por otro lado, en varios estudios se ha mostrado que la inducción del proceso de TEM se encuentra relacionado con la adquisición de resistencia al tratamiento con distintos agentes quimioterapéuticos [26]. A partir de los resultados de secuenciación masiva de genes del transcriptoma de células MCF-7 6D estimuladas con IL-1 $\beta$ , que se obtuvieron en colaboración con el Dr. Ayala-Sumuano, sabemos ahora que la IL-1 $\beta$  es capaz de regular positivamente la expresión de una variedad de genes implicados en la resistencia a distintos quimioterapéuticos como lo son cisplatino, doxorubicina, daunorubicina y paclitaxel. Este fenómeno, a la fecha, no había sido descrito.

Los mecanismos para desarrollar la quimioresistencia en células de cáncer han sido clasificados en distintas categorías que incluyen la inducción de transportadores, regulación de proteínas que regulan del ciclo celular, incremento en mecanismos de reparación del DNA y regulación del proceso de apoptosis. Nuestros resultados mostraron que las células MCF-7 6D estimuladas con IL-1 $\beta$  poseen un incremento en la expresión de genes que regulan algunos de estos procesos. Por ejemplo, el análisis de los datos de secuenciación mostró un incremento en la expresión del gen *ABCC3* (un transportador de la familia ABC, datos no mostrados), del gen *CDKN1A* (un regulador del ciclo celular), de los genes *TP63* y *BIRC3* (reguladores de la apoptosis) los cuales se asociaron a la resistencia a doxorubicina por medio de nuestro análisis bioinformático.

La regulación del ciclo celular asegura la transmisión correcta del material genético durante la división celular. El orden de estos eventos para la progresión del ciclo celular está regulado por la actividad de los complejos de cinasas dependientes de ciclinas (de sus siglas en inglés CDK's) con sus respectivas subunidades reguladoras de ciclinas. El primer punto de regulación del ciclo es durante la transición G1/S por la actividad de los complejos Cdk2/ciclina E, Cdk4/ciclina D y Cdk6/ciclina D. A su vez, el segundo punto de regulación se da durante la transición G2/M y en este caso, es mediado por los complejos Cdk1/ciclina A y Cdk2/ciclina B. Estos complejos se encuentran regulados de manera negativa por medio de fosforilaciones por lo que, para

que se activen y el ciclo pueda progresar, se requiere la actividad de la fosfatasa cdc25. Sin embargo, en respuesta a daño en el DNA se activan cinasas que conllevan al arresto del ciclo celular. Además de estos mecanismos, existe un nivel de regulación adicional mediado por moléculas pequeñas llamadas inhibidores de los complejos Cdk's (CdkIs) los cuales, se unen e inhiben las actividades de los complejos Cdk-ciclinas. Los CdkIs más potentes son p21, p27 y p57 [74].

Estudios hechos en células MCF-7 resistentes a doxorubicina han mostrado que existe un incremento en la expresión del regulador del ciclo celular *CDKN1A* [75]. El gen de *CDKN1A* codifica a la proteína p21, la cual, es una CdkI que actualmente se sabe que controla la transición de la fase G2/M y G1/S del ciclo celular [76, 77]. Otros estudios, realizados en líneas celulares de CaM y de cáncer de páncreas (CaPan) mostraron que esta inducción de *CDKN1A* es un mecanismo común para conferir resistencia a distintos agentes; además estudios *in vivo* realizados con muestras de pacientes de CaM apoyan estas observaciones [78-80]. De manera similar a esos estudios, cuando nosotros analizamos el gen de *CDKN1A* en células MCF7 6D que poseen resistencia a doxorubicina también observamos un incremento significativo del nivel de expresión del gen de *CDKN1A*; este fenómeno se observó después de que las células fueron estimuladas con IL-1 $\beta$ .

El mecanismo de acción propuesto para la proteína p21 en un modelo de células de CaM, es que los niveles incrementados de p21, evitan que las células puedan entrar en apoptosis a través de la unión e inactivación del complejo Cdk1-ciclina B arrojando las células en la transición G2/M [81]. Este mecanismo es congruente con el hecho de que después del daño al DNA el arresto en ciclo celular les confiere a las células la oportunidad de activar mecanismos de reparación antes de progresar a la siguiente etapa del ciclo [74]. Por lo tanto, debido a su actividad, p21 se ha implicado en la respuesta a distintos quimioterapéuticos en cánceres como el de cabeza, cuello, hepático, próstata y pancreático [82].

Otro mecanismo que desarrollan las células resistentes a distintos quimioterapéuticos es la regulación del proceso de apoptosis. La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso diseñado para eliminar células dañadas en distintos lugares del organismo.

Las principales vías de la apoptosis son la vía intrínseca y la vía extrínseca. La primera es iniciada por la permeabilización de la membrana mitocondrial por medio de la formación de poros inducidos por la polimerización de las proteínas Bax o Bak. Esto conlleva a la liberación del citocromo C, el cual a su vez, con las proteínas pro-caspasa 9 y Apaf-1 para formar el apoptosoma. Este complejo corta a la pro-caspasa 9 para su forma activa corte a las caspasas 3, 6 y 7 lo que finalmente resulta en la apoptosis. Por otro lado, la vía extrínseca es llevada a cabo por la unión de los ligando de muerte Fas, TNF $\alpha$ , Apo2L y Apo3L con sus respectivos receptores. Esto resulta en el reclutamiento del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que a su vez, recluta a la pro-caspasa 8 lo que la lleva a su autoactivación. La caspasa 8 posteriormente corta a la caspasa 3 y 7 llevando finalmente a la apoptosis [83].

La apoptosis es regulada a diferentes niveles. Por ejemplo, se regula a nivel de la expresión de proteínas que favorecen la apoptosis como Bax, Bim, PUMA, entre otras o mediante la expresión de proteínas que inhiben la apoptosis como Bcl-2. Adicionalmente, el proceso puede ser regulado a través de la actividad de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (del inglés IAPs), que regulan ambas vías de la apoptosis. Por ejemplo, XIAP se une e inactiva a las caspasas 3, 7 y 9 inhibiendo de esa forma ambas vías. Por otro lado, BIRC3/cIAP2 inhiben de manera indirecta la caspasa 8, aunque también se ha mostrado que puede inhibir a las caspasas 3, 7 y 9 lo que también lleva a la inhibición de ambas vías [84]. Por lo anterior, la alteración del proceso se ha observado en diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer. De hecho, la evasión de la apoptosis es considerada un capacidad característica del cáncer [85].

Estudios en células de cáncer hepático han mostrado que la isoforma  $\Delta p63$  les confiere resistencia a doxorubicina al inhibir la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bim y NOXA [86]. La proteína TP63 pertenece a la familia de factores de

transcripción de P53. La transcripción de la proteína en distintos promotores resulta en la expresión de las isoformas TAp63 que contiene su dominio trans-activador así como de la isoforma  $\Delta p63$ , la cual lo pierde [87]. Otro estudio en donde se analizó la función de la isoforma  $\Delta p63$  en líneas celulares de CaM, CaPan y melanoma también mostró que las células tienen resistencia a al tratamiento con cisplatino al inactivar la apoptosis inducida por P53 y TAp73 mostrando que la regulación de la apoptosis es un mecanismo común desarrollado para adquirir quimioresistencia [88-90]. En correlación con estos estudios, cuando analizamos la expresión del gen *TP63* observamos un incremento en su expresión en las células resistentes a doxorubicina en forma similar a lo reportado anteriormente. Además, en concordancia con esta regulación de la apoptosis por medio de las células quimioresistentes, nosotros encontramos también en nuestro modelo un incremento de la expresión del gen y de los niveles de la proteína BIRC3. Esta proteína pertenece a la familia de las IAPs ya que como se mencionó anteriormente, actúa a través de unirse e inactivar la cascada de las caspasas [91]. Este mecanismo de inhibición de caspasas ha sido observado en líneas celulares de cánceres de ovario y próstata que son resistentes a cisplatino [92, 93]. De hecho, en varios tipos de cáncer se ha mostrado que los miembros de esta familia de IAPs están sobre-expresados y confieren resistencia a una amplia variedad de estímulos apoptóticos [94].

Por lo anterior, es posible especular que en conjunto, estos mecanismos son los responsables de la resistencia a doxorubicina en nuestro modelo. Sin embargo, hasta el momento sólo hemos mostrado que las células estimuladas por IL-1 $\beta$  desarrollan resistencia a la doxorubicina e incrementan la expresión de estos genes pero falta por determinar si al inhibir estas proteínas por medio de fármacos o por el uso de RNAs de interferencia las células se vuelven sensibles al tratamiento.

Nuestros resultados en el modelo MCF-7 6D mostraron la asociación de la TEM inducida por IL-1 $\beta$  con la quimioresistencia. Considerando que las células 6D ya están transformadas, analizamos si IL-1 $\beta$  inducía cambios del tipo de transición epitelio-mesénquima en una línea celular no transformada (MFC-10A) y si estos cambios

correlacionaban con la pérdida de la arquitectura silvestre de los acinos glandulares generados *in vitro*.

Las células de epitelios glandulares, como las que se encuentran en las glándulas mamarias, poseen una morfología polarizada, contactos celulares especializados y el anclaje a una membrana basal que son críticos para su función. En la formación de los tumores epiteliales, se requiere la alteración de esta bien ordenada arquitectura. La línea de epitelio glandular no transformado MCF-10A se ha establecido como un modelo que permite recapitular la arquitectura de los epitelios glandulares *in vivo*. Estas células, exhiben varias características de un epitelio normal que incluyen el no formar tumores en ratones desnudos, el no tener crecimiento independiente de sustrato y depender de factores de crecimiento para su supervivencia y proliferación. Por lo tanto, este sistema nos permite interrogar a la célula sobre mecanismos de crecimiento y proliferación celular, de independencia a factores de crecimiento y de pegado a la lámina basal, de apoptosis y mecanismos que rigen la estructura del citoesqueleto que permite la arquitectura polarizada acinar. Todos estos procesos cuando son alterados están fuertemente asociados al desarrollo de adenocarcinomas y condicionan la aparición de rasgos como la dediferenciación de epitelio a mesénquima y la invasividad.

En los tejidos epiteliales glandulares, la polaridad exhibe una orientación característica, ya que su polo apical apunta hacia el lumen central y que se puede hacer evidente mediante el uso de la proteína del aparato de golgi GM130. Estudios de los acinos 3-D formados por células MDCK han mostrado que la interacción con la MEC juega un papel instructivo importante en los mecanismos que dirigen la polaridad de las células [95]. Nuestros resultados con cultivos 3-D de células MCF-10A, muestran que la polaridad, delineada por la orientación apical de la proteína GM130, se encuentra deslocalizada por el estímulo con IL-1 $\beta$ . Estos datos correlacionan positivamente con que los acinos no forman un lumen central y muestren una localización membranar de la

proteína  $\beta$ -catenina. Interesantemente, estudios en donde se alteraron moléculas como PALS1, un regulador de la polaridad en *Drosophila* o EMK1, el ortólogo de PAR1 en mamíferos, conlleva a la formación de estructuras con múltiples lúmenes o a la falta de la formación del mismo como las observadas en nuestro sistema [96]. La formación de acinos sin lumen remarca que las células han adquirido la capacidad de evadir la apoptosis, particularmente la anoikis y esta resistencia es importante durante la iniciación y progresión del cáncer ya que es la responsable de la supervivencia de las células cuando se despegan de su membrana basal [71].

En conjunto, nuestros resultados apoyan resultados obtenidos de nuestro grupo en los que se reportó que la citocina inflamatoria IL-1 $\beta$  favorece la TEM y en este trabajo se mostró que este proceso les confiere quimioresistencia a doxorubicina a las células que han pasado por este programa. Por otro lado, nuestros resultados en el modelo 3-D de células MCF-10A muestran que la IL-1 $\beta$  induce también un programa de TEM, ya que induce acinos desarreglados y con células capaces de suprimir la anoikis. De manera interesante, esta capacidad de supervivencia correlaciona positivamente con que en la TEM se observa también la resistencia al tratamiento con distintos quimioterapéuticos tal y como se observó en nuestro modelo de células MCF-7 6D resistentes a doxorubicina.

En conjunto, estos datos proporcionan evidencia que posicionan a la IL-1 $\beta$  como un importante inductor del cáncer participando tanto en la carcinogénesis como en la progresión tumoral.

## CONCLUSIONES

- El estímulo de IL-1 $\beta$  en las células MCF-7 6D induce la expresión de los genes *CDKN1A*, *TP63*, *BIRC3* y *SFN* asociados con la resistencia a doxorubicina.
- La expresión de estos genes por el efecto de IL-1 $\beta$  correlaciona con la capacidad de las células MCF-7 6D de ser resistentes al tratamiento con la doxorubicina en ensayos funcionales *in vitro*.
- La inducción de la Transición Epitelio-Mesénquima por medio de la IL-1 $\beta$  resulta en la generación de resistencia a doxorubicina en células MCF-7 6D, mostrando así la importancia del microambiente pro-inflamatorio mediado por esta citocina en la progresión del cáncer.
- La IL-1 $\beta$  es capaz de inducir alteración de la polaridad celular y resistencia a anoikis en el modelo de epitelio no transformado de células MCF-10A en condiciones 3-D.
- La inducción del programa de transición epitelio-mesénquima por parte de la IL-1 $\beta$ , en un modelo no transformado de células MCF-10A, provoca la supresión de la anoikis, mostrando que la IL-1 $\beta$  además de favorecer la progresión tumoral, pudiera estar también involucrada en el proceso de carcinogénesis.

## PERSPECTIVAS

Analizar si la IL-1 $\beta$  induce la expresión de genes y proteínas asociados con la resistencia a quimioterapéuticos en las células MCF-10A como en el caso de las células MCF-7 6D.

Analizar si el bloqueo de la señalización del receptor IL-1R1 afecta de los genes que confieren resistencia a doxorubicina y convierte a las células sensibles al tratamiento.

Analizar mediante que mecanismo y/o vía de señalización la IL-1 $\beta$  induce la expresión de los genes asociados a resistencia a doxorubicina.

Analizar si en el modelo de MCF-10A la supresión de la anoikis inducida por la IL-1 $\beta$  esta mediada por la vía de señalización de PI3K/AKT.



## Bibliografía

1. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Formann D, Bray F. , *GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11*. 2013.
2. Peppercorn, J., C.M. Perou, and L.A. Carey, *Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer*. Cancer Invest, 2008. **26**(1): p. 1-10.
3. Lee, Y.T., *Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy*. J Surg Oncol, 1983. **23**(3): p. 175-80.
4. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
5. Nguyen, D.X. and J. Massague, *Genetic determinants of cancer metastasis*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(5): p. 341-52.
6. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
7. Foroni, C., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact*. Cancer Treat Rev, 2012. **38**(6): p. 689-97.
8. Brabletz, T., et al., *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10356-61.
9. Christofori, G., *New signals from the invasive front*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 444-50.
10. Vleminckx, K., et al., *Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role*. Cell, 1991. **66**(1): p. 107-19.
11. Onder, T.T., et al., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3645-54.
12. Perl, A.K., et al., *A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma*. Nature, 1998. **392**(6672): p. 190-3.
13. Lo, H.W., et al., *Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9066-76.
14. Yang, L., C. Lin, and Z.R. Liu, *P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin*. Cell, 2006. **127**(1): p. 139-55.
15. Dong, R., et al., *Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells*. Braz J Med Biol Res, 2007. **40**(8): p. 1071-8.
16. Zavadil, J. and E.P. Bottinger, *TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
17. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.
18. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6958-69.

19. Bolos, V., et al., *The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 3): p. 499-511.
20. Peinado, H., et al., *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 306-19.
21. Yang, F., et al., *SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities*. EMBO J, 2012. **31**(1): p. 110-23.
22. Sanchez-Tillo, E., et al., *ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1*. Oncogene, 2010. **29**(24): p. 3490-500.
23. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
24. Mallini, P., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(3): p. 341-8.
25. Baguley, B.C., *Multiple drug resistance mechanisms in cancer*. Mol Biotechnol, 2010. **46**(3): p. 308-16.
26. Iseri, O.D., et al., *Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern*. Biomed Pharmacother, 2011. **65**(1): p. 40-5.
27. Wang, Z., et al., *Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2400-7.
28. Li, Q.Q., et al., *Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(8): p. 2657-65.
29. Hiscox, S., et al., *Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation*. Int J Cancer, 2006. **118**(2): p. 290-301.
30. Kim, M.R., et al., *Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells*. Cancer Sci, 2009. **100**(10): p. 1834-41.
31. Gupta, P.B., et al., *Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening*. Cell, 2009. **138**(4): p. 645-59.
32. Kumar, A., et al., *Tissue transglutaminase promotes drug resistance and invasion by inducing mesenchymal transition in mammary epithelial cells*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13390.
33. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
34. Cheng, G.Z., et al., *Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 1979-87.
35. Zhuo, W., et al., *Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway*. Lung Cancer, 2008. **62**(1): p. 8-14.
36. Zhuo, W.L., et al., *Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(4): p. 1098-102.

37. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 619-26.
38. Guadamillas, M.C., A. Cerezo, and M.A. Del Pozo, *Overcoming anoikis-- pathways to anchorage-independent growth in cancer*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 19): p. 3189-97.
39. Taddei, M.L., et al., *Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 380-93.
40. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
41. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
42. Grille, S.J., et al., *The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2172-8.
43. Derksen, P.W., et al., *Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis*. Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 437-49.
44. Vega, S., et al., *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. Genes Dev, 2004. **18**(10): p. 1131-43.
45. Valdes, F., et al., *The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes*. Mol Cancer Res, 2002. **1**(1): p. 68-78.
46. Sobic, D., et al., *Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity*. Cell, 2003. **112**(2): p. 169-80.
47. Takeyama, Y., et al., *Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells*. Cancer Lett, 2010. **296**(2): p. 216-24.
48. Fischer, A.N., et al., *PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression*. Oncogene, 2007. **26**(23): p. 3395-405.
49. Kanayama, S., et al., *Hepatocyte growth factor induces anoikis resistance by up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in uterine endometrial cancer cells*. Oncol Rep, 2008. **19**(1): p. 117-22.
50. Paludan, S.R., *Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 18-25.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Kim, D., et al., *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions*. Genome Biol, 2013. **14**(4): p. R36.
55. Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber, *HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data*. Bioinformatics, 2015. **31**(2): p. 166-9.

56. Zhou, X., H. Lindsay, and M.D. Robinson, *Robustly detecting differential expression in RNA sequencing data using observation weights*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(11): p. e91.
57. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics, 2010. **26**(1): p. 139-40.
58. Benjamini, Y., et al., *Controlling the false discovery rate in behavior genetics research*. Behav Brain Res, 2001. **125**(1-2): p. 279-84.
59. Mitra, A., L. Mishra, and S. Li, *EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance*. Oncotarget, 2015. **6**(13): p. 10697-711.
60. Thorn, C.F., et al., *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*. Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(7): p. 440-6.
61. Franco-Barraza, J., *Estudio del efecto de la citocina inflamatoria Interleucina 1-beta en la inducción de un fenotipo invasor en células de adenocarcinoma de mama*, in *Biomedicina Molecular 2009, CINVESTAV IPN México*. 2009.
62. 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.
63. Frisch, S.M., M. Schaller, and B. Cieply, *Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 1): p. 21-9.
64. Krause, S., et al., *The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: organization of MCF7 cells in 3D cultures*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 263.
65. Khamis, Z.I., Z.J. Sahab, and Q.X. Sang, *Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis*. Int J Breast Cancer, 2012. **2012**: p. 574025.
66. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
67. Tu, S., et al., *Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice*. Cancer Cell, 2008. **14**(5): p. 408-19.
68. Reed, J.R., et al., *Interleukin-1beta and fibroblast growth factor receptor 1 cooperate to induce cyclooxygenase-2 during early mammary tumorigenesis*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(2): p. R21.
69. 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.
70. Bunt, S.K., et al., *Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 10019-26.
71. Paoli, P., E. Giannoni, and P. Chiarugi, *Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3481-98.
72. Takayama, T., et al., *Aberrant expression and phosphorylation of beta-catenin in human colorectal cancer*. Br J Cancer, 1998. **77**(4): p. 605-13.
73. Daugherty, R.L. and C.J. Gottardi, *Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 303-9.
74. Schmitt, E., et al., *DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis*. J Zhejiang Univ Sci B, 2007. **8**(6): p. 377-97.

75. AbuHammad, S. and M. Zihlif, *Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line*. Genomics, 2013. **101**(4): p. 213-20.
76. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell, 1993. **75**(4): p. 805-16.
77. Dulic, V., et al., *Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 546-57.
78. Hawthorne, V.S., et al., *ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(4): p. 592-600.
79. Moller, A., et al., *Monitoring daunorubicin-induced alterations in protein expression in pancreas carcinoma cells by two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2002. **2**(6): p. 697-705.
80. Yang, W., et al., *ErbB2 overexpression in human breast carcinoma is correlated with p21Cip1 up-regulation and tyrosine-15 hyperphosphorylation of p34Cdc2: poor responsiveness to chemotherapy with cyclophosphamide methotrexate, and 5-fluorouracil is associated with Erb2 overexpression and with p21Cip1 overexpression*. Cancer, 2003. **98**(6): p. 1123-30.
81. Yu, D., et al., *Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase*. Mol Cell, 1998. **2**(5): p. 581-91.
82. Liu, S., W.R. Bishop, and M. Liu, *Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy*. Drug Resist Updat, 2003. **6**(4): p. 183-95.
83. Wang, S., et al., *Targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for new breast cancer therapeutics*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2012. **17**(3-4): p. 217-28.
84. Deveraux, Q.L., et al., *IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases*. EMBO J, 1998. **17**(8): p. 2215-23.
85. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
86. Mundt, H.M., et al., *Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(2): p. 335-41.
87. Yang, A., et al., *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 305-16.
88. Matin, R.N., et al., *p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis*. J Exp Med, 2013. **210**(3): p. 581-603.
89. Danilov, A.V., et al., *DeltaNp63alpha-mediated induction of epidermal growth factor receptor promotes pancreatic cancer cell growth and chemoresistance*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26815.
90. Leong, C.O., et al., *The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1370-80.
91. Wang, C.Y., et al., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.

92. Nomura, T., et al., *Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells*. *Oncol Rep*, 2005. **14**(4): p. 993-7.
93. Cohen, S., et al., *Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2*. *J Mol Med (Berl)*, 2013. **91**(3): p. 357-68.
94. Hunter, A.M., E.C. LaCasse, and R.G. Korneluk, *The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets*. *Apoptosis*, 2007. **12**(9): p. 1543-68.
95. Straight, S.W., et al., *Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 1981-90.
96. Cohen, D. and A. Musch, *Apical surface formation in MDCK cells: regulation by the serine/threonine kinase EMK1*. *Methods*, 2003. **30**(3): p. 269-76.

Research Article

# ***Helicobacter pylori* CagA Suppresses Apoptosis through Activation of AKT in a Nontransformed Epithelial Cell Model of Glandular Acini Formation**

**Gabriela Vallejo-Flores,<sup>1,2,3</sup> Javier Torres,<sup>2</sup> Claudia Sandoval-Montes,<sup>1</sup>  
Haruki Arévalo-Romero,<sup>3,4</sup> Isaura Meza,<sup>4</sup> Margarita Camorlinga-Ponce,<sup>2</sup>  
Julián Torres-Morales,<sup>1,3,5</sup> Adriana Karina Chávez-Rueda,<sup>6</sup>  
María Victoria Legorreta-Haquet,<sup>6</sup> and Ezequiel M. Fuentes-Pananá<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio, s/n, Colegio Santo Tomas, 11340 México, DF, Mexico

<sup>2</sup>Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP), Hospital de Pediatría, CMN Siglo-XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Avenida Cuauhtémoc No. 330, Colegio Doctores, 06720 México, DF, Mexico

<sup>3</sup>Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Colegio Doctores, 06720 México, DF, Mexico

<sup>4</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Colegio San Pedro Zacatenco, 07360 México, DF, Mexico

<sup>5</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad No. 3000, Colegio Universidad Nacional Autónoma, 04510 México, DF, Mexico

<sup>6</sup>Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN Siglo-XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Avenida Cuauhtémoc No. 330, Colegio Doctores, 06720 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Ezequiel M. Fuentes-Pananá; empanana@yahoo.com

Received 4 March 2015; Revised 16 April 2015; Accepted 20 April 2015

Academic Editor: Sandra Marmiroli

Copyright © 2015 Gabriela Vallejo-Flores et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*H. pylori* infection is the most important environmental risk to develop gastric cancer, mainly through its virulence factor CagA. *In vitro* models of CagA function have demonstrated a phosphoprotein activity targeting multiple cellular signaling pathways, while *cagA* transgenic mice develop carcinomas of the gastrointestinal tract, supporting oncogenic functions. However, it is still not completely clear how CagA alters cellular processes associated with carcinogenic events. In this study, we evaluated the capacity of *H. pylori* CagA positive and negative strains to alter nontransformed MCF-10A glandular acini formation. We found that CagA positive strains inhibited lumen formation arguing for an evasion of apoptosis activity of central acini cells. In agreement, CagA positive strains induced a cell survival activity that correlated with phosphorylation of AKT and of proapoptotic proteins BIM and BAD. Anoikis is a specific type of apoptosis characterized by AKT and BIM activation and it is the mechanism responsible for lumen formation of MCF-10A acini *in vitro* and mammary glands *in vivo*. Anoikis resistance is also a common mechanism of invading tumor cells. Our data support that CagA positive strains signaling function targets the AKT and BIM signaling pathway and this could contribute to its oncogenic activity through anoikis evasion.

## **1. Introduction**

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) colonizes the human gastric epithelium and is considered the most important cause of

chronic active gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer [1]. The pathogenesis of *H. pylori* is importantly associated with the presence of the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) and the *cagPAI* effector protein, the cytotoxin-associated gene A

(CagA) [2]. The *cagPAI* is a segment of DNA of about 40 kb that encodes a type IV secretion system (T4SS), which is necessary for CagA translocation into target epithelial cells. Once inside the cell, CagA is phosphorylated in tyrosine residues of the EPIYA motif by host cytoplasmic Src and c-Abl kinases, and phosphorylated and nonphosphorylated CagA interact with multiple signaling proteins [3–8].

*H. pylori* activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and protein kinase B (PKB/AKT) signaling pathway has been previously documented in transformed gastric epithelial cells (AGS cells), although the mechanism by which this happens is not fully understood. On one hand, some studies support CagA phosphorylation dependent and independent roles [9–11]. On the other hand, a role for proinflammatory outer membrane (OipA) and vacuolating cytotoxin A (VacA) proteins has been proposed [12, 13], ruling out a role for the *cagPAI* [14]. Also, multiple targets downstream of PI3K/AKT have been documented, including mammalian target for rapamycin (mTOR), forkhead box O (FoxO)-1 and -3a ERK mitogen activated kinase, and proapoptotic protein BAD [15–19]. Concordantly, the consequence of *H. pylori* activation of PI3K/AKT is also unclear, with different studies supporting deregulation of apoptosis, proliferation, or cell migration.

The use of transformed cells has been essential to understand *H. pylori* pathogenesis, but it may also contribute to the conflicting data as many signaling pathways and cellular processes associated with cell transformation are already deregulated. CagA-induced proliferation and altered cell polarity have also been shown in nontransformed Madin-darby canine kidney epithelial cells (MDCK cells), but CagA's signaling has been partially described [20, 21]. It was reported that CagA disrupts epithelial apical-basolateral polarity in MDCK cells by interacting with PARI/MARK kinase, which prevents atypical protein kinase C- (aPKC-) mediated PARI phosphorylation [22]. More definitive evidence of the CagA oncogenic role comes from transgenic mice, in which CagA expression induced epithelial hyperplasia, polyp formation, and adenocarcinomas of the gastrointestinal tract [23, 24]. Also, CagA transgenic expression in zebrafish induced epithelial cell proliferation and upregulation of cyclin D1, axin2, and the c-myc ortholog myca [25].

To better understand CagA interactions with cancer-associated signaling pathways and cellular processes, we studied CagA activity in a model of nontransformed epithelial cells. The epithelial cell line MCF-10A forms three-dimensional (3D) acini-like spheroids with a hollow lumen and an apicobasal orientation when cultured in a simile of the extracellular matrix (ECM). These characteristics allow testing mechanisms of cell proliferation, cell survival and the cytoskeletal structure that yields the polarized spheroid architecture [26, 27]. Hence, this 3D cellular system has been previously used to test cellular and viral oncogenes and has proved useful to decipher mechanisms of transformation and their targeted cellular signaling pathways [28, 29]. We infected MCF-10A spheroids with CagA positive and negative *H. pylori* variants finding that CagA positive strains caused evasion of apoptosis that was associated with

phosphorylation of AKT, BIM, and BAD, which suggests that CagA inhibits the anoikis form of apoptosis.

## 2. Material and Methods

**2.1. *Helicobacter pylori* Strains and Culture.** Two CagA positive *H. pylori* strains were used in this study: strain 11637 with a Western-type CagA (EPIYA ABCCC) that was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA No. 43504); and strain NY02-149 with an East-Asian-type CagA (EPIYA ABD) that was kindly donated by Dr. Guillermo Perez-Perez from New York University. Two additional *H. pylori* CagA negative variants were used as controls: strain 365A3, which has a partial *cagPAI* lacking the effector protein CagA and strain 254 that contains a nonfunctional *cagPAI* [30]. The latter will be referred as the *cagPAI* negative strain. The two CagA positive strains and the CagA negative variant are *VacA* sl/m1, while the *cagPAI* negative strain is positive to sl and negative to the m region (Data no show). All *H. pylori* strains were grown on blood agar (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA No. 211037) for 48 h at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C.

**2.2. PCR Assay.** DNA was obtained from *H. pylori* strains using a Qiagen DNA extraction kit (Qiagen, Hilde, Germany No. 51306) according to the manufacturer protocols. DNA samples were subjected to PCR with primers *cagA*-F1 5'-ATGACTAACGAACTATTGATCAA-3' and *cagA*-R7 5'-TTAAGATTTTTGGAAACCAC-3' for full-length *cagA* amplification and *cagA*-F5 5'-CCCTAGTTCGGTA-ATGGGTTATC-3' and *CagA*-R7 for EPIYA region amplification (Figure 1(a)). PCRs for *VacA* were also performed with primers VAIF 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3' and VAIR 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' for amplification of the S region and VAGF 5'-CAATCTGTCCAATCA-AGCGAG-3' and VAGR 5'-GCGTCAAATAATTCCCA-AGG-3 for the M region.

**2.3. Cells Lines and Infection.** MCF-10A (CRL-10317) and AGS (CRL-1739) cells were obtained from the American Type culture collection (ATCC, Manassas, VA, USA). MCF-10A cells were grown in DMEM/F12 medium supplemented with 5% horse serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA- No. 16050-114), 20 ng/mL of epidermal growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA. No AF-100-15), 5 µg/mL hydrocortisone (No H-0808), 100 ng/mL cholera toxin (C-8052), and 10 µg/mL insulin (I-1882) (all from Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). AGS cells were grown in F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, No. 16000044). All cultures also contained 100 units/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, No. 15240).

Infection was carried out with a MOI of 100 in MCF-10A and AGS cells at 80% subconfluency in nonsupplemented medium, unless otherwise specified. For proliferation assays MCF-10A cells were infected at 30% subconfluency in supplemented medium with 3% horse serum and the standard concentration of the other components. MCF-10A acini were



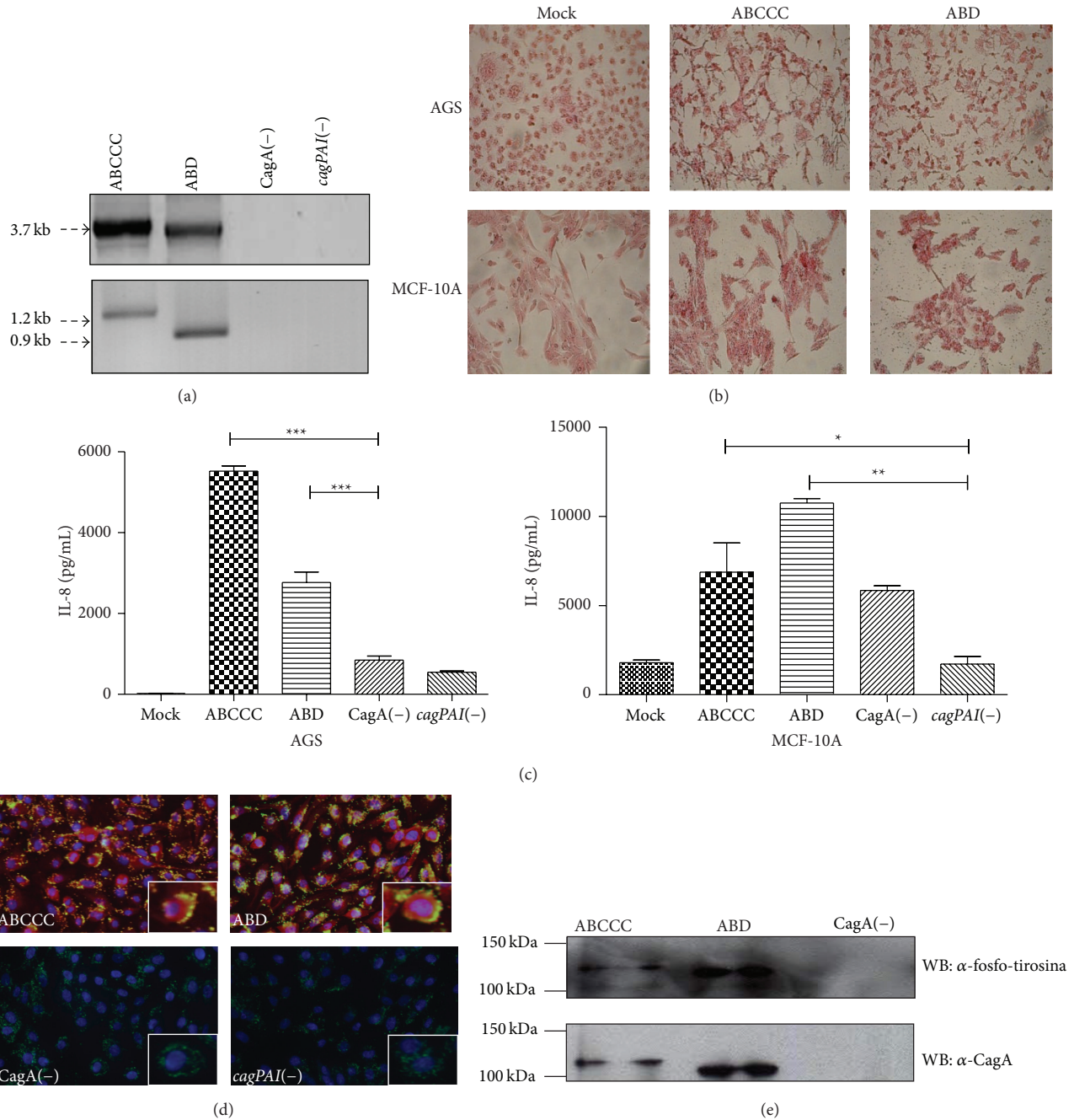


FIGURE 1: CagA is translocated into MCF-10A cells. (a) PCR amplification of the C-terminal variable region. (b) Morphology of AGS and MCF-10A cells infected with CagA positive strains. (c) IL-8 determination in supernatants of infected cells. (d) Immunofluorescence image showing *H. pylori* (green), CagA (red), and nuclei (Blue). Inset is an optical zoom of an infected cell. (e) Whole lysates from infected MCF-10A cell were immunoprecipitated with anti-CagA antibodies and immunoblotted against total phosphotyrosine proteins (top panel). The blots were reprobred with anti-CagA and anti- $\beta$ -actin antibodies. Statistical analysis by one-way ANOVA followed by the Tukey test ( $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

formed in matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, No. 354230) following the method reported by Debnath et al. [27].  $5 \times 10^3$  MCF-10A cells were seeded in an 8-well plate (Lab-Tek Chamber Slide System, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA, No. 177402) on  $40 \mu\text{L}$  of a solidified layer

of Matrigel.  $400 \mu\text{L}$  of culture medium was added per well and acini were allowed to form for 10–15 days, observing daily at the optical microscope and changing media every two days. Acini were grown in same medium as MCF-10A monolayers but with 2% of matrigel. For infection assays, MCF-10A cells

were infected with a MOI of 100 in a monolayer for 2 h at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C before recovering the cells and seeding them in the layer of matrigel. Cells were grown for 10 to 15 days changing medium every other day. Media of days 2, 4, and 6 also contained bacteria at the same MOI. To inhibit CagA phosphorylation-dependent activity, the PP2 Src kinase inhibitor was added on day 0, 2, 4, and 6 of acini formation and pictures were taken on day 10.

**2.4. Hummingbird Phenotype and IL-8 Analyses.** AGS and MCF-10A cells were plated in six-well plates (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, MA, USA, No. 3516) at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells per well and infected with *H. pylori* strains for 24 h; supernatants were collected and cells were fixed with 70% methanol and stained with safranin (Hycel, D.F, México No. 541) to analyze the hummingbird phenotype. Levels of IL-8 were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a sandwich ELISA kit (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA, No. 555244) according to the manufacturer's instructions. Supernatants were collected and stored at -80°C.

**2.5. Western Blot and Immunoprecipitation Assays.** MCF-10A cells were infected with *H. pylori* strains. After 6 h of infection, cultures were treated with 200 ng/mL gentamicin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, No. 15750-060) for another hour to eliminate bacteria. Cells were washed 3x with PBS and lysed with RIPA buffer (No. 20-188) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (No. 20-201) (both from Millipore, MA, USA) and 2 mM sodium orthovanadate (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, No. 56508) for 10 min on ice. Cell lysates were separated in 8 or 12% polyacrylamide gels (SDS-PAGE), transferred into a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA, No. IPVH00010), and blocked overnight in 2% fat-free dry milk (for assays of nonphosphorylated proteins) or 5% bovine serum albumin (BSA) (for phosphorylated proteins) in TBS containing 0.1% Tween-20. Membranes were probed with polyclonal anti-CagA antibody (B-300; No. sc-25766) or an anti-tyrosine-phosphorylated protein antibody (PY99; No. sc-7020) (both from Santa Cruz Biotechnology) followed by the secondary antibody (Dako, Cambridge, UK, No. 201609). Blots were developed by chemiluminescence (Millipore, Billerica, MA, USA, No. WBKLS0100). Immunoprecipitations were performed using the anti-CagA antibody, followed by immunoblotting with the anti-CagA or anti-tyrosine-phosphorylated protein antibodies described above. Signaling pathways were analyzed after infection of either cell attached to flasks or growing in suspension, the latter to promote cell death and better visualize infection-induced protection. Cells were lysed at 30 min and 1, 2, 4, and 6 h after infection and immunoblots were performed as described above. The antibodies used for the assessment of signaling pathways were AKT (GTX121937), AKT-phosphorylated (GTX128414), BAD-phosphorylated (GTX50136), and BIM-phosphorylated (YE0911W) (all from GeneTex, Inc., San Antonio, Texas); a homemade  $\beta$ -actin antibody was kindly

donated by Dr. Manuel Hernandez-Hernandez from CINVESTAV.

**2.6. Immunofluorescence Assay.**  $8 \times 10^4$  MCF-10A cells were seeded on coverslips and infected with *H. pylori* strains for 6 h, fixed with paraformaldehyde (4% in PBS) for 10 min, and permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS. Samples were incubated with blocking buffer (10% goat serum, 1% BSA, 0.2% triton X-100 and 0.05% Tween-20) for 1 h and then with a 1:500 dilution of a monoclonal anti-CagA antibody for 1 h (abcam, Cambridge, UK, No. ab37351) and with the secondary antibody anti-mouse-Cy3 for 30 min (Genetex No. GTX85338). Samples were reincubated with blocking buffer for 1 h and then with a 1:500 dilution of a polyclonal anti-*H. pylori* antibody (Dako, Cambridge, UK, No B0471) and with the secondary antibody anti-rabbit-FITC, each one for 30 min (Jackson ImmunoResearch, No. 711-095-152). Cells were observed using a fluorescence microscope Olympus BX51 and images were acquired with a digital camera (Camedia C4040, Olympus). For immunofluorescence analysis of 3D cultures the acini were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature; cells were then permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 for 10 min at 4°C. After that, the acini were incubated with blocking buffer (1% BSA, 0.2% Triton X-100, 10% goat serum in PBS) for 1 h at room temperature and then overnight at 4°C with any of the following antibodies: a 1:300 dilution of anti-Ki67 antibody (Genetex, Cambridge, UK, No. GTX76072), a 1:500 dilution of a polyclonal anti-*H. pylori* antibody, and a 1:200 dilution of a monoclonal anti-CagA antibody (Abcam, Cambridge, UK, No. ab37351); and then the acini were incubated with the secondary antibody anti-rabbit-FITC or anti-mouse FITC (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA., No. F0257), for 30 min. Finally, nuclei were stained with DAPI and acini were analyzed in a LSM5 Pascal confocal microscope (Zeiss). Serial confocal cross sections ( $x$ - $y$  axis) were made in MCF-10A acini. See figures for schematic diagrams overlying each section, which illustrate the relative position of the optical section with respect to the  $z$ -axis.

**2.7. Carboxyfluorescein Proliferation Assay.** MCF-10A cells were labeled in a 12-well dish with 25 Mm Carboxyfluorescein (CFSE-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, No. 10023), according to the manufacturer's protocol. After labeling, cells were infected with the *H. pylori* strains and incubated 3 days at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. CFSE positive cells were quantified with BD CellQuest Pro software (BD Bioscience, Sparks, MD) using a FACS-Calibur flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA).

**2.8. Apoptosis Resistance Assay.** MCF-10A cells were infected with *H. pylori* strains ABCCC (MOI = 100) and ABD (MOI = 25) in single-cell suspensions for 4 h with or without 8  $\mu$ M of the AKT inhibitor GSK690693 at 37°C. Cells were then stained with a KIT containing annexin V and propidium iodide (Biolegend, San Diego, CA, USA, No. 235678), according to the manufacturer's protocol. Annexin V and propidium

iodide positive cells were quantified with the BD CellQuest Pro software using a FACS-Calibur flow cytometer.

**2.9. Statistical Analysis.** The statistical differences between two variables were determined with the Student's *t*-test; differences among three or more continuous variables were compared by one-way ANOVA, followed by the Tukey test. Statistical significance was established at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

**3.1. *H. pylori* CagA Is Efficiently Translocated into Nontransformed MCF-10A Cells.** The two CagA positive *H. pylori* strains that were used in our study were able to induce a hummingbird phenotype and IL-8 secretion in AGS cells, as previously described [31, 32], which are indirect markers of CagA translocation into these cells (Figures 1(b) and 1(c)). AGS and MCF-10A infections with analysis of hummingbird phenotype and IL-8 secretion were run in parallel through all experiments to monitor the viability of the *H. pylori* strains. To determine if MCF-10A cells were permissive to *H. pylori* infection, infected cells were analyzed by immunofluorescence and Western blot. The immunofluorescence analysis showed that *H. pylori*, regardless of CagA status, adhered to the cell membrane of MCF-10A, with CagA signal observed within the cell (Figure 1(d)). Detection of phosphorylated-CagA confirmed its cellular translocation and activation (Figure 1(e)). Of note, the CagA-ABD strain showed stronger intensity of the phosphorylated CagA band and stronger activity than the CagA-ABCCC strain. These results indicated that MCF-10A cells are permissive for infection/CagA translocation with *H. pylori* strains.

**3.2. MCF-10A Cells Do Not Increase Proliferation in Response to *H. pylori* Infection.** In spite of multiple evidence supporting increased proliferation rates after *H. pylori* infection of transformed cells, infected MCF-10A acini showed normal size and maintained the spheroid structure (Figures 2(a) and 2(b)). Cells within the acini normally divide until day 7-8, after which further growth is arrested. To further test whether CagA translocation affected MCF-10A cell proliferation, infected acini were stained with an antibody against the proliferation marker Ki-67. Figure 2(c) shows that both mock infected and CagA positive infected acini presented a dim Ki-67 signal at day seven and a negative signal by day ten, suggesting that *H. pylori* infection did not alter rates of acini growth. A day four staining is shown as a positive control for a bright Ki-67 signal. Nonetheless, *H. pylori* staining and confocal microscopy analysis of acini grown for 10 days show bacteria (Figure 2(d)) and CagA (Figure 2(e)) in close contact with external and central luminal cells, arguing in favor of sustained CagA translocation during acini growth. To confirm that *H. pylori* does not induce proliferation, CFSE-labeled MCF-10A cells were infected in monolayer for 3 days and CFSE fluorescence intensities were analyzed by flow cytometry (Figure 2(f)). No differences were observed in the rate of proliferation between cells infected with CagA positive and CagA negative variant strains.

**3.3. MCF-10A Cells Evade Apoptosis after Infection with CagA Positive *H. pylori* Strains.** A consistent observation of MCF-10A acini infected with CagA positive *H. pylori* strains was the lack of a well-formed lumen. To explore the possibility that CagA induces survival of acini central cells, the number of nuclei was quantified at day 10 acini. Confocal microscopy transversal cuts 50% deep in the acini were used for nuclei count, finding significant differences between CagA positive *H. pylori* strains and mock infected acini (Figures 3(a) and 3(b)). Acini morphogenesis in the presence of the Src kinases inhibitor PP2 indicated that the survival of the acini central cells was dependent on phosphorylation of CagA (Figures 3(c) and 3(d)). MCF-10A cells were also infected in suspension and apoptosis was determined by Annexin V and propidium iodide (PI) staining and flow cytometry analysis. Figures 3(e) and 3(f) show that, after 6 h of suspension, cells infected with CagA negative variants were mostly dead, while about 40% of the ones infected with CagA positive strains remained annexin V and PI negative. Overall, these data suggest that CagA promotes survival of cells that have lost substrate or ECM interactions.

**3.4. AKT and BIM Are Important Targets during CagA Positive *H. pylori* Mediated Evasion of Apoptosis.** Anoikis is a form of apoptosis responsible for death of the acini luminal cells after loss of ECM interactions. Anoikis resistance in MCF-10A acini formation and mammary gland development has been associated with constitutive activity of the PI3K/AKT signaling pathway and phosphorylation-dependent inactivation of proapoptotic proteins mainly BIM but also BAD [33]. To evaluate whether CagA-induced activation of AKT was responsible for the anoikis resistance observed in MCF-10A acini luminal cells, we first tested AKT phosphorylation in response to *H. pylori* infection by Western blot analysis. MCF-10A cells were infected in single-cell suspensions with *H. pylori* strains for 4 h and cell lysates were blotted with the antiphosphorylated AKT. Figure 4(a) shows the specific activation of AKT by CagA positive strains. Also, a preferentially increased phosphorylation of BIM over BAD was observed (Figure 4(a)). We then inhibited AKT activation reducing the frequency of live MCF-10A cells in suspension (Figures 4(b) and 4(c)). These results argue in favor of an *H. pylori* mechanism of anoikis evasion through CagA-induced activation of AKT and inhibition of BIM.

### 4. Discussion

The 3D culture of MCF-10A epithelial cells interacting with a simile of ECM results in formation of acini-like polarized structures that recapitulate many of the characteristics of the *in vivo* mammary gland architecture. Acini formation involves programmed grow arrest, anoikis of luminal cells, and preservation of the cytoskeleton-dependent morphology, biological and biological processes that are usually deregulated in cancer cells. Therefore, this system has been extensively used to study cellular and viral oncogenes, including some unrelated to mammary tissue but whose transforming



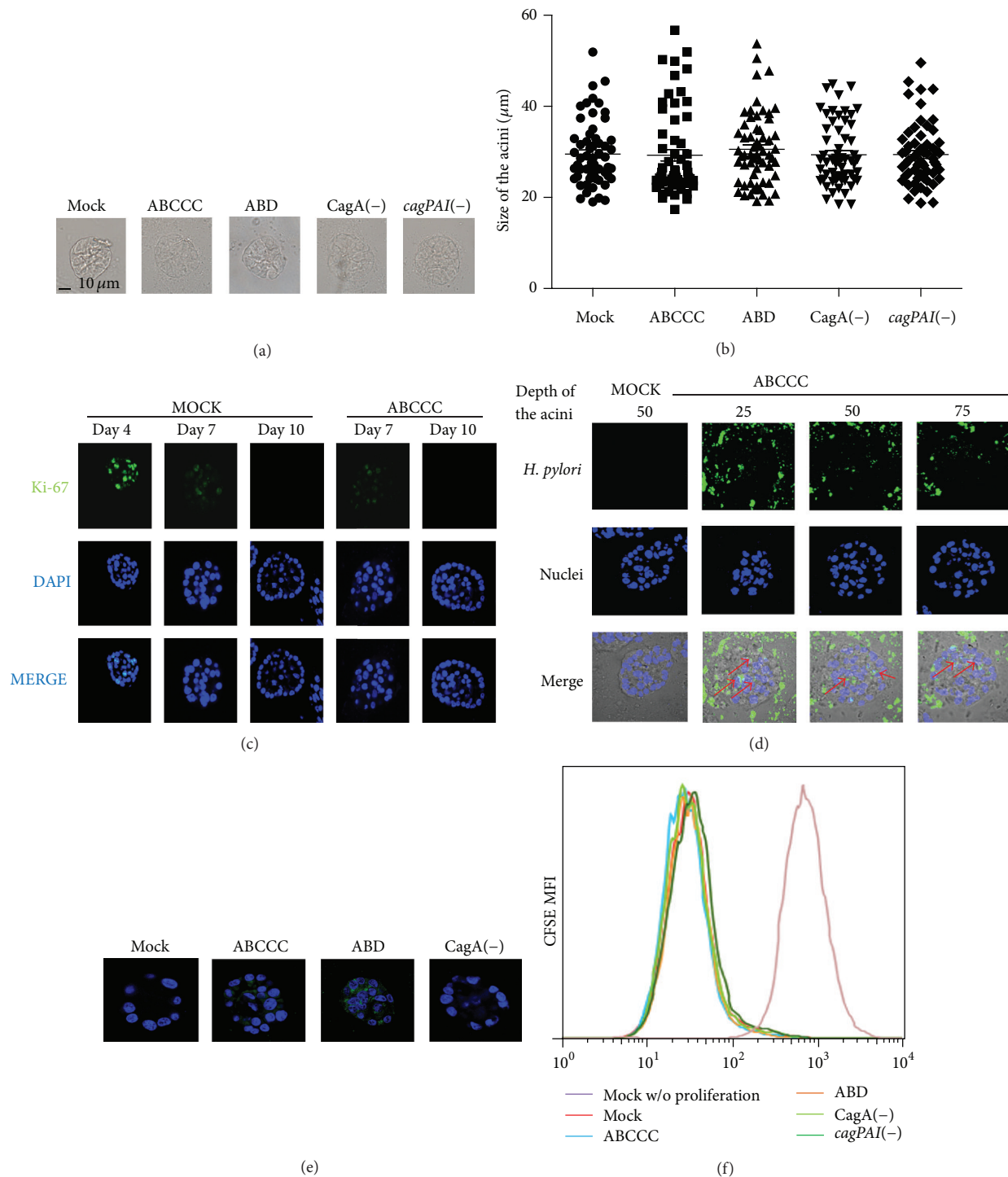


FIGURE 2: *H. pylori* does not induce proliferation of MCF-10A cell. MCF-10A cells were 3D cultured and infected with *H. pylori* strains. (a) Example of the average size of the acini. (b) The size of acini from three independent experiments was quantified at day 10, and no statistical differences were found. (c) 3D MCF-10A cells were stained with anti-Ki-67 antibody (green) and DAPI (blue) at different days of acini growth. (d) Confocal microscopy sections were made at 25, 50, and 75% deep of the acini. Red arrows indicate *H. pylori* (green) presence in close contact with the acini luminal cells (DAPI). (e) Confocal microscopy sections were made at 50% deep of the acini; image shows CagA (green) and nuclei (DAPI) in the acini central cells. (f) Monolayers of MCF-10A cells labeled with CFSE were infected with *H. pylori* strains for 3 days. No statistical differences were found in the rate of proliferation between the different infected cells.

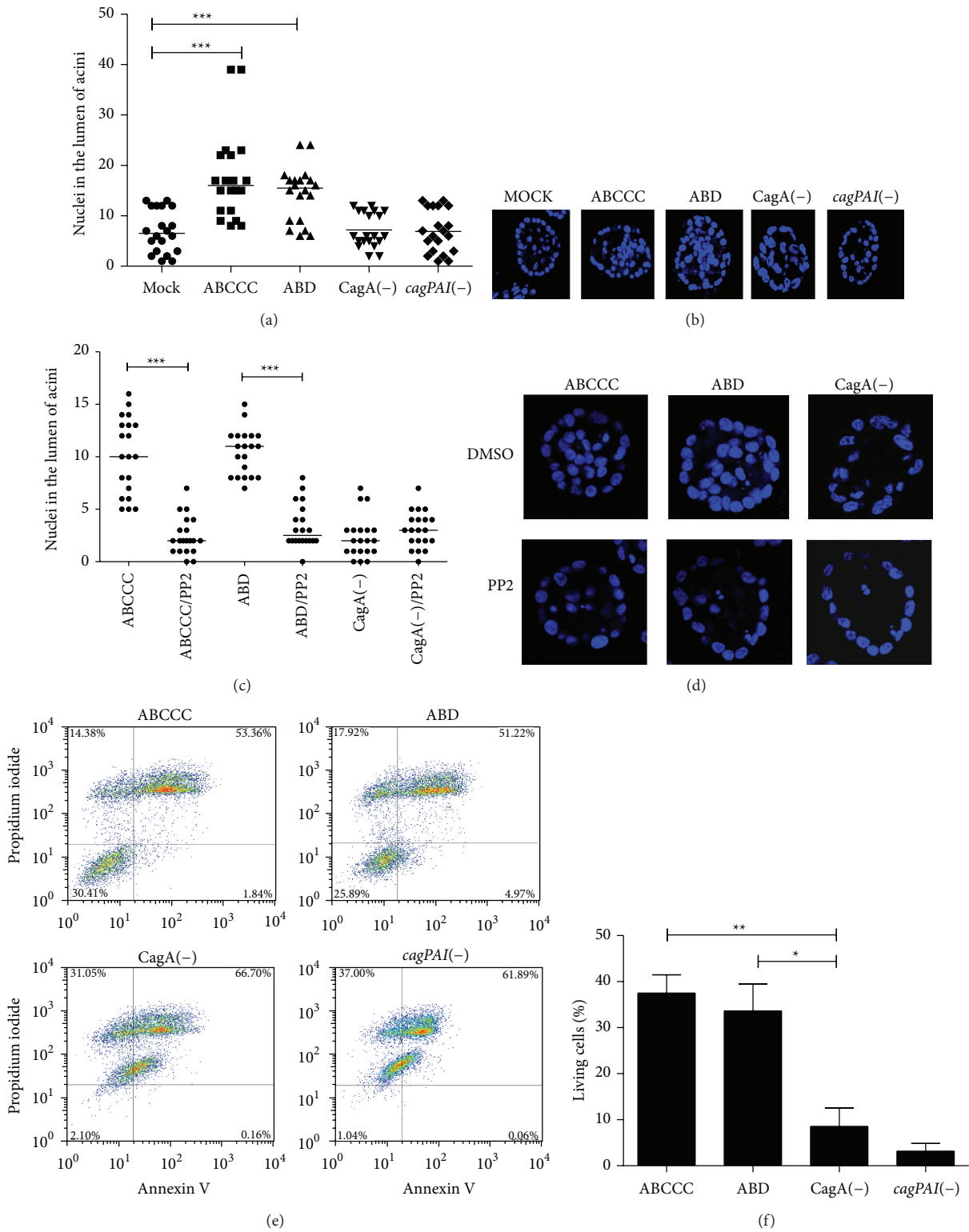


FIGURE 3: CagA induces evasion of apoptosis. (a) The nuclei (DAPI positive cells) in the lumen of acini were quantified on day 10. Each point represents one acini; three fields were counted in three independent experiments. (b) Representative acini showing the typical number of nuclei positive cells in lumens. (c) The same experiment was carried out in the presence of the Src kinase inhibitor PP2. (d) Representative acini showing the typical number of nuclei positive cells in lumens after PP2 treatment. (e) MCF-10A cells were infected in suspension with *H. pylori* strains and apoptosis was determined by annexin V and propidium iodide (PI) staining. (f) Average percentage of living cell (Anexin V & PI negative) from three independent experiments. Asterisks denote statistical differences ( $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$ , and  $***p \leq 0.001$ ). (a) and (f) One-way ANOVA followed by the Tukey test, and (c) Student's *t*-test.

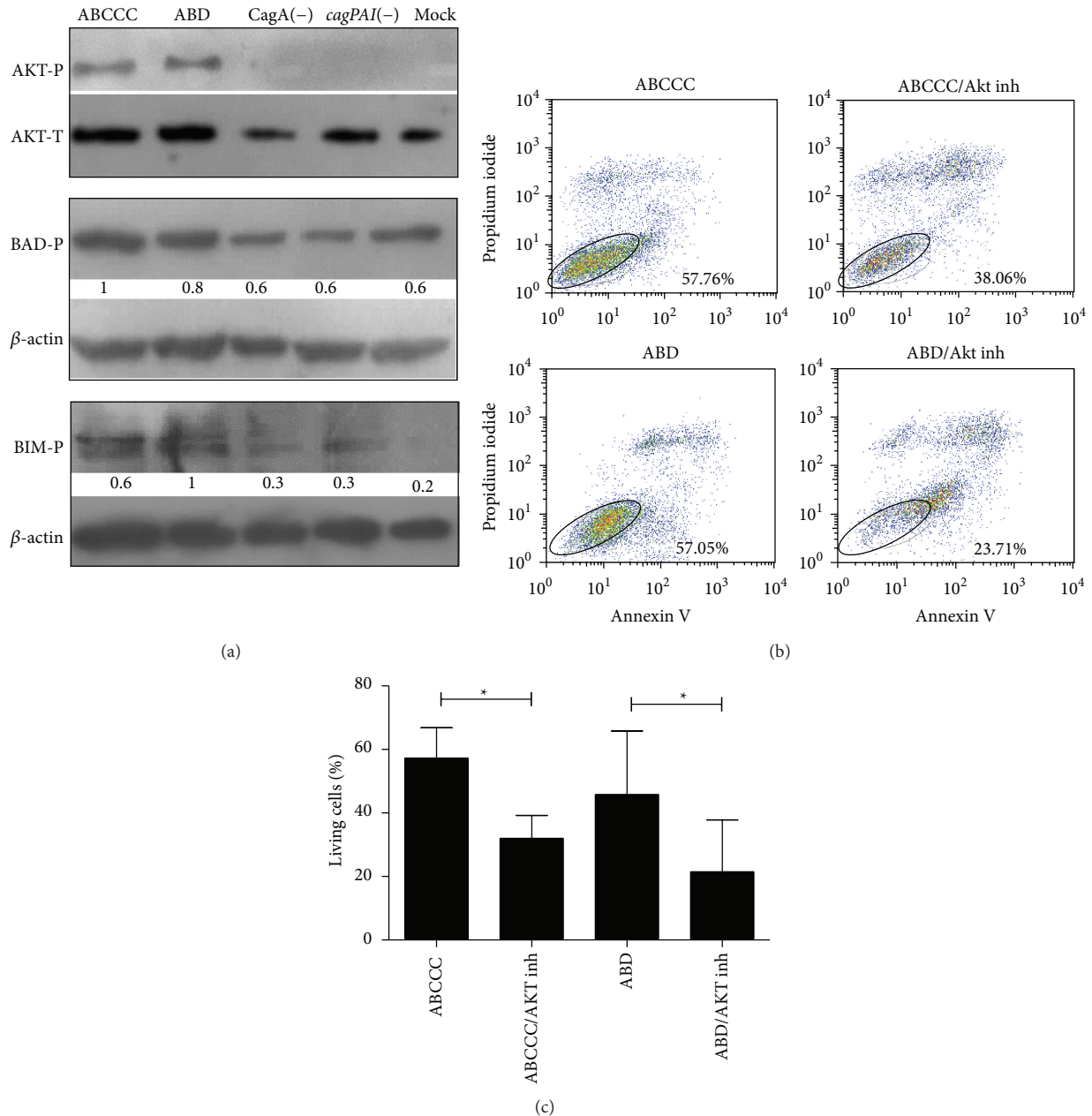


FIGURE 4: AKT induced evasion of apoptosis correlates with BIM and BAD phosphorylation. (a) MCF-10A cell lysates were immunoblotted against AKT, BIM, and BAD and their phosphorylated forms (AKT in Ser473, BAD in Ser136, and BIM in Ser87). A densitometric analysis of phosphorylated proteins was normalized to the corresponding  $\beta$ -actin levels. An arbitrary value of 1 was assigned to the highest activity. (b) MCF-10A cells were infected with *H. pylori* strains in cell suspension and an AKT inhibitor was added; apoptosis was determined by annexin V and propidium iodide (PI) staining. (c) Percentage of living cells (Anexin V and PI negative). Representative assay of three independent experiments is shown. Asterisks denote statistical differences by the Student's *t*-test, ( $p \leq 0.05$ ).

mechanisms can be mirrored during acini formation [26, 28, 34–36].

Oncogene expression often results in MCF-10A acini with solid lumens, similar to the ones observed in this study after infection with CagA positive *H. pylori* strains, and this is considered an indication of resistance to anoikis [37, 38]. Anoikis is a form of apoptosis responsible for death of inner

cell populations that have lost ECM interactions and grow factor stimulus, forming the hollow ducts in which milk is transported during mammary gland morphogenesis. MCF-10A *in vitro* acini formation has been critical to understand the *in vivo* mechanism of anoikis during mammary morphogenesis [26, 27]. Anoikis resistance is very important during cancer initiation and progression since it is most likely

responsible for the survival capacity of tumor cells filling the luminal glandular space in early carcinomas and of detached invasive and metastatic tumor cell [39], including gastric cancer cells [40]. In agreement, bonafide oncoproteins such as ERBB2 and CFS1R induce resistance to anoikis facilitating migration and metastasis of malignant cells [41–43].

In this paper we have shown that CagA positive *H. pylori* strains activate AKT resulting in evasion of apoptosis, a finding that correlates with previous reports in AGS transformed gastric tumor cells [9–11]. AKT is an important regulator of cell survival. AKT is activated by PI3K leading to inactivation of various proapoptotic proteins, including BIM and BAD [19]. AKT phosphorylates BAD in Ser136 and BIM in Ser87 in response to cell-integrin interactions. Phosphorylated BAD and BIM are then sequestered by the 14-3-3 complex counteracting its proapoptotic activity [44, 45]. Loss of the AKT activity results in augmented apoptosis [38, 46], and activating mutations in PI3K and AKT are often found in gastric tumors [47]. Furthermore, lumen formation by mammary glands and MCF-10A cells tightly depends on BIM activity [33, 48].

Several studies also support an increased rate of cell apoptosis after *H. pylori* infection mediated by different bacterial factors, mainly VacA [49–51], gamma-glutamyl transpeptidase [52], the cagPAI [53], and CagA itself [54]. Cancer precursor gastric lesions, such as atrophic gastritis and metaplasia, are already characterized by loss of the glandular structure. These lesions may result from infection-triggered unbalanced cell apoptosis intimately linked to increased cellular regeneration to repair the gastric mucosa. CagA may help to counteract those apoptosis-inducing mechanisms triggered by bacterial factors or cell death resulting from chronic inflammation [55, 56].

Our results showed that *H. pylori* infection does not increase proliferation of MCF-10A cells during acini or monolayer growth, which contrasts with previous studies showing that phosphorylated CagA interacts with GRB2 or SHP2 activating the Ras/MAPK pathway, leading to cell scattering and cell proliferation [4, 57]. Other studies support that *H. pylori* promote proliferation through upregulating miR-222 [58]. In addition, zebrafish expressing transgenic CagA exhibited epithelial cell proliferation with significant upregulation of gene markers of proliferation *CCND1* and the c-myc ortholog *myc* [25]. Similarly, CagA transgenic mice showed gastric epithelial hyperplasia [23]. We have no clear explanation for these differences, but we hypothesize that this may be due to the different genetic background of the cell lines used in those studies and our study. While in animal models multiple processes converge during carcinogenesis, such as inflammation and persistent tissue damage due to chronic CagA expression.

Studies in nontransformed MDCK cells found that *H. pylori* induced loss of cell polarity and mobilization of zonula occludens-1 (ZO-1) protein with loss of integrity of the tight junctions [20, 21]. In contrast, we did not observe gross cytoskeletal changes in infected MCF-10A acini, which maintained the spheroid structure. Analysis of proteins participating in monolayer integrity and cell-to-cell contacts is needed together with nutrient deprivation studies to better

understand the capacity of *H. pylori* and CagA to disturb these processes in MCF-10A acini.

The importance to test *H. pylori* pathogenicity in cellular models of organogenesis has been highlighted by the appearance of three recent papers in which mouse and human primary gastric organoids are tested for *H. pylori* infection and CagA signaling activity [59–61]. Two of those studies provide evidence of a CagA-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT). Interestingly, EMT is importantly regulated by GSK3 $\beta$  inhibition of  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$  is negatively regulated by AKT. These studies and ours place AKT as an important target of CagA induced carcinogenesis.

## 5. Conclusion

We found that *H. pylori* CagA positive strains induce anoikis resistance in MCF-10A acini through the AKT signaling pathway, via phosphorylation and inactivation of proapoptotic proteins BIM and BAD. This CagA-dependent mechanism of anoikis resistance may contribute to the *H. pylori*/CagA carcinogenic potential. Our results also support the use of nontransformed cells and *in vitro* organogenesis in order to better understand the oncogenic mechanisms involved in *H. pylori* associated cancer development.

## Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

## Authors' Contribution

Gabriela Vallejo-Flores, Haruki Arévalo-Romero, and Julián Torres-Morales performed the experiments; Adriana Karina Chávez-Rueda and María Victoria Legorreta-Haquet helped with the proliferation assays and the flow cytometry; Margarita Camorlinga-Ponce helped with the *H. pylori* isolation, *cagA*, *cagPAI*, and *vacA* characterization and the IL-8 ELISA; Javier Torres, Isaura Meza, and Ezequiel M. Fuentes-Pananá designed the study and interpreted the results; Javier Torres, Claudia Sandoval-Montes, Isaura Meza, and Ezequiel M. Fuentes-Pananá supervised the experiments; Gabriela Vallejo-Flores and Ezequiel M. Fuentes-Pananá wrote the paper, and Javier Torres, Claudia Sandoval-Montes, and Isaura Meza provided a critical review of the paper.

## Acknowledgments

This paper constitutes the fulfillment of the Graduate Program in immunology, Department of Immunology, National School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute (IPN), to G. Vallejo-Flores. G. Vallejo-Flores also acknowledges the scholarship and financial support provided by CONACyT, IMSS, and PIFI. H. Arévalo-Romero acknowledges the scholarship and financial support provided by CONACyT and IMSS. This study was supported by Grants 176880 (to E. M. Fuentes-Pananá), 166462 (to I. Meza), and 69450 (to J. Torres) from CONACyT, Grant PICSA 12-209 ICyTDF (to J. Torres), Grant FIS/IMSS/PROT/G10/881, and



grant HIM-2013-051 (to E. M. Fuentes Pananá) and Fondo de Apoyo a la Investigación from Hospital Infantil de México Federico Gómez.

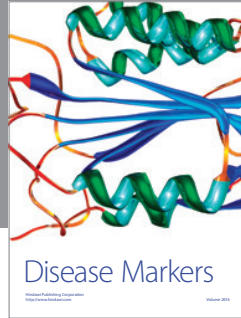
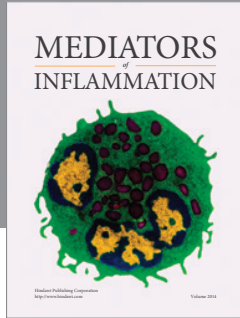
## References

- [1] J. Parsonnet, G. D. Friedman, D. P. Vandersteen et al., “*Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 325, no. 16, pp. 1127–1131, 1991.
- [2] J. Parsonnet, G. D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelmann, “Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection,” *Gut*, vol. 40, no. 3, pp. 297–301, 1997.
- [3] H. Higashi, R. Tsutsumi, S. Muto et al., “SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein,” *Science*, vol. 295, no. 5555, pp. 683–686, 2002.
- [4] H. Mimuro, T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa, “Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities,” *Molecular Cell*, vol. 10, no. 4, pp. 745–755, 2002.
- [5] D. Mueller, N. Tegtmeyer, S. Brandt et al., “c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 4, pp. 1553–1566, 2012.
- [6] M. Suzuki, H. Mimuro, T. Suzuki, M. Park, T. Yamamoto, and C. Sasakawa, “Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, no. 9, pp. 1235–1247, 2005.
- [7] R. Tsutsumi, H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada, and M. Hatakeyama, “Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA-SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 6, pp. 3664–3670, 2003.
- [8] M. Selbach, F. E. Paul, S. Brandt et al., “Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins,” *Cell Host and Microbe*, vol. 5, no. 4, pp. 397–403, 2009.
- [9] T. A. Nagy, M. R. Frey, F. Yan, D. A. Israel, D. B. Polk, and R. M. Peek Jr., “*Helicobacter pylori* regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 199, no. 5, pp. 641–651, 2009.
- [10] F. H. Tabassam, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka, “*Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylation,” *Cellular Microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 70–82, 2009.
- [11] M. Suzuki, H. Mimuro, K. Kiga et al., “*Helicobacter pylori* CagA phosphorylation-independent function in epithelial proliferation and inflammation,” *Cell Host and Microbe*, vol. 5, no. 1, pp. 23–34, 2009.
- [12] J. Zhang, J. Qian, X. Zhang, and Q. Zou, “Outer membrane inflammatory protein A, a new virulence factor involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*,” *Molecular Biology Reports*, vol. 41, no. 12, pp. 7807–7814, 2014.
- [13] M. Nakayama, J. Hisatsune, E. Yamasaki et al., “*Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 3, pp. 1612–1619, 2009.
- [14] O. Sokolova, M. Vieth, T. Gnad, P. M. Bozko, and M. Naumann, “*Helicobacter pylori* promotes eukaryotic protein translation by activating phosphatidylinositol 3 kinase/mTOR,” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 55, pp. 157–163, 2014.
- [15] F. H. Tabassam, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka, “*Helicobacter pylori*-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells,” *Helicobacter*, vol. 17, no. 3, pp. 193–202, 2012.
- [16] Y. Zhu, C. Wang, J. Huang et al., “The *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes Erk1/2-mediated Bad phosphorylation in lymphocytes: a mechanism of CagA-inhibited lymphocyte apoptosis,” *Cellular Microbiology*, vol. 9, no. 4, pp. 952–961, 2007.
- [17] X. J. Qi, G. M. Wildey, and P. H. Howe, “Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 2, pp. 813–823, 2006.
- [18] J. Zha, H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S. J. Korsmeyer, “Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X<sub>L</sub>,” *Cell*, vol. 87, no. 4, pp. 619–628, 1996.
- [19] X. Zhang, N. Tang, T. J. Hadden, and A. K. Rishi, “Akt, FoxO and regulation of apoptosis,” *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, vol. 1813, no. 11, pp. 1978–1986, 2011.
- [20] F. Bagnoli, L. Buti, L. Tompkins, A. Covacci, and M. R. Amieva, “*Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 45, pp. 16339–16344, 2005.
- [21] S. Tan, L. S. Tompkins, and M. R. Amieva, “*Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche,” *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 5, Article ID e1000407, 2009.
- [22] I. Saadat, H. Higashi, C. Obuse et al., “*Helicobacter pylori* CagA targets PARI/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity,” *Nature*, vol. 447, no. 7142, pp. 330–333, 2007.
- [23] N. Ohnishi, H. Yuasa, S. Tanaka et al., “Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 3, pp. 1003–1008, 2008.
- [24] M. Miura, N. Ohnishi, S. Tanaka, K. Yanagiya, and M. Hatakeyama, “Differential oncogenic potential of geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA isoforms in mice,” *International Journal of Cancer*, vol. 125, no. 11, pp. 2497–2504, 2009.
- [25] J. T. Neal, T. S. Peterson, M. L. Kent, and K. Guillemain, “*H. pylori* virulence factor CagA increases intestinal cell proliferation by Wnt pathway activation in a transgenic zebrafish model,” *Disease Models and Mechanisms*, vol. 6, no. 3, pp. 802–810, 2013.
- [26] J. Debnath and J. S. Brugge, “Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 9, pp. 675–688, 2005.
- [27] J. Debnath, S. K. Muthuswamy, and J. S. Brugge, “Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures,” *Methods*, vol. 30, no. 3, pp. 256–268, 2003.
- [28] J. Debnath, K. R. Mills, N. L. Collins, M. J. Reginato, S. K. Muthuswamy, and J. S. Brugge, “The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini,” *Cell*, vol. 111, no. 1, pp. 29–40, 2002.
- [29] E. Katz, M. H. Lareef, J. C. Rassa et al., “MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial

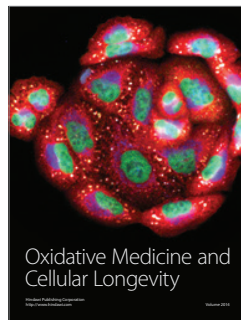
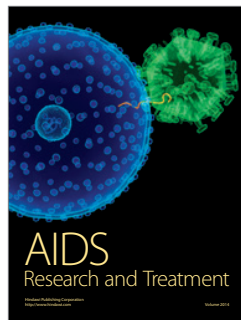
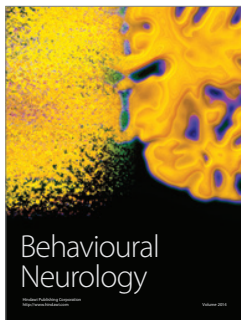
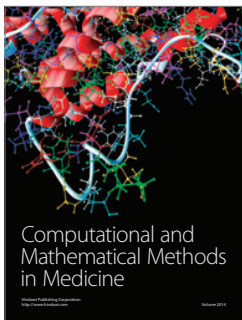
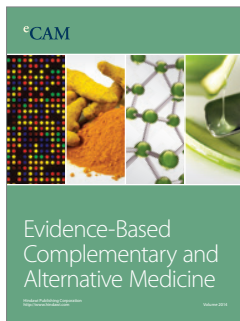
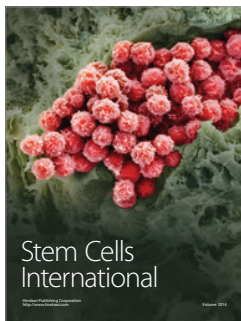
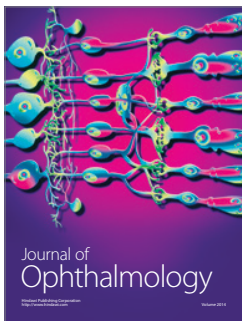
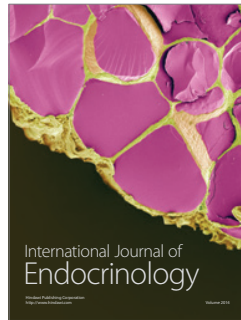


- cells in three-dimensional culture," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 201, no. 3, pp. 431–439, 2005.
- [30] A. Reyes-Leon, J. C. Atherton, R. H. Argent, J. L. Puente, and J. Torres, "Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene," *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 7, pp. 3445–3454, 2007.
- [31] E. D. Segal, J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins, "Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 25, pp. 14559–14564, 1999.
- [32] S. A. Sharma, M. K. R. Tummuru, M. J. Blaser, and L. D. Kerr, "Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells," *The Journal of Immunology*, vol. 160, no. 5, pp. 2401–2407, 1998.
- [33] A. A. Mailleux, M. Overholtzer, T. Schmelzle, P. Bouillet, A. Strasser, and J. S. Brugge, "BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms," *Developmental Cell*, vol. 12, no. 2, pp. 221–234, 2007.
- [34] C. Hebner, V. M. Weaver, and J. Debnath, "Modeling morphogenesis and oncogenesis in three-dimensional breast epithelial cultures," *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 3, pp. 313–339, 2008.
- [35] S. M. Grande, G. Bannish, E. M. Fuentes-Panana, E. Katz, and J. G. Monroe, "Tonic B-cell and viral ITAM signaling: context is everything," *Immunological Reviews*, vol. 218, no. 1, pp. 214–234, 2007.
- [36] G. Singhal, E. Leo, S. K. Gadham Setty, Y. Pommier, and B. Thimmappaya, "Adenovirus E1A oncogene induces rereplication of cellular DNA and alters DNA replication dynamics," *Journal of Virology*, vol. 87, no. 15, pp. 8767–8778, 2013.
- [37] K. K. Haenssen, S. A. Caldwell, K. S. Shahriari et al., "ErbB2 requires integrin  $\alpha 5$  for anoikis resistance via Src regulation of receptor activity in human mammary epithelial cells," *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 8, pp. 1373–1382, 2010.
- [38] S. J. Isakoff, J. A. Engelman, H. Y. Irie et al., "Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells," *Cancer Research*, vol. 65, no. 23, pp. 10992–11000, 2005.
- [39] P. Paoli, E. Giannoni, and P. Chiarugi, "Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1833, no. 12, pp. 3481–3498, 2013.
- [40] T. Uekita, M. Tanaka, M. Takigahira et al., "CUB-domain-containing protein 1 regulates peritoneal dissemination of gastric scirrhous carcinoma," *American Journal of Pathology*, vol. 172, no. 6, pp. 1729–1739, 2008.
- [41] S. K. Muthuswamy, D. Li, S. Lelievre, M. J. Bissell, and J. S. Brugge, "ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini," *Nature Cell Biology*, vol. 3, no. 9, pp. 785–792, 2001.
- [42] B. M. Kacinski, K. A. Scata, D. Carter et al., "FMS (CSF-1 receptor) and CSF-1 transcripts and protein are expressed by human breast carcinomas in vivo and in vitro," *Oncogene*, vol. 6, no. 6, pp. 941–952, 1991.
- [43] T. Schmelzle and M. N. Hall, "TOR, a central controller of cell growth," *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 253–262, 2000.
- [44] P. Chiarugi and E. Giannoni, "Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells," *Biochemical Pharmacology*, vol. 76, no. 11, pp. 1352–1364, 2008.
- [45] T. F. Gajewski and C. B. Thompson, "Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence," *Cell*, vol. 87, no. 4, pp. 589–592, 1996.
- [46] S. E. Scanga, L. Ruel, R. C. Binari et al., "The conserved PI3K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*," *Oncogene*, vol. 19, no. 35, pp. 3971–3977, 2000.
- [47] K. Wang, S. T. Yuen, J. Xu et al., "Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer," *Nature Genetics*, vol. 46, no. 6, pp. 573–582, 2014.
- [48] M. J. Reginato, K. R. Mills, J. K. Paulus et al., "Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis," *Nature Cell Biology*, vol. 5, no. 8, pp. 733–740, 2003.
- [49] T. L. Cover, U. S. Krishna, D. A. Israel, and R. M. Peek Jr., "Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin," *Cancer Research*, vol. 63, no. 5, pp. 951–957, 2003.
- [50] A. Galmiche, J. Rassow, A. Doye et al., "The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release," *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 23, pp. 6361–6370, 2000.
- [51] E. Yamasaki, A. Wada, A. Kumatori et al., "*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 16, pp. 11250–11259, 2006.
- [52] M. Valenzuela, D. Bravo, J. Canales et al., "*Helicobacter pylori*-induced loss of survivin and gastric cell viability is attributable to secreted bacterial gamma-glutamyl transpeptidase activity," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 208, no. 7, pp. 1131–1141, 2013.
- [53] T. Nagasako, T. Sugiyama, T. Mizushima, Y. Miura, M. Kato, and M. Asaka, "Up-regulated Smad5 mediates apoptosis of gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* infection," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 7, pp. 4821–4825, 2003.
- [54] A. M. Wandler and K. Guillemin, "Transgenic expression of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes apoptosis or tumorigenesis through JNK activation in *Drosophila*," *PLoS Pathogens*, vol. 8, no. 10, Article ID e1002939, 2012.
- [55] H. Mimuro, T. Suzuki, S. Nagai et al., "*Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach," *Cell Host and Microbe*, vol. 2, no. 4, pp. 250–263, 2007.
- [56] A. Oldani, M. Cormont, V. Hofman et al., "*Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells," *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 10, Article ID e1000603, 2009.
- [57] H. Higashi, A. Nakaya, R. Tsutsumi et al., "*Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 17, pp. 17205–17216, 2004.
- [58] N. Li, B. Tang, E.-D. Zhu et al., "Increased miR-222 in *H. pylori*-associated gastric cancer correlated with tumor progression by promoting cancer cell proliferation and targeting RECK," *FEBS Letters*, vol. 586, no. 6, pp. 722–728, 2012.
- [59] N. Bertaux-Skeirik, R. Feng, M. A. Schumacher et al., "CD44 plays a functional role in *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell proliferation," *PLOS Pathogens*, vol. 11, no. 2, Article ID e1004663, 2015.

- [60] P. Schlaermann, B. Toelle, H. Berger et al., "A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro," *Gut*, 2014.
- [61] L. E. Wroblewski, M. B. Piazuelo, R. Chaturvedi et al., "*Helicobacter pylori* targets cancer-associated apical-junctional constituents in gastroids and gastric epithelial cells," *Gut*, vol. 64, no. 5, pp. 720–730, 2015.



**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



***Helicobacter pylori* CagA and IL-1 $\beta$  promote  $\beta$ -catenin nuclear translocation but only CagA activates an aggressive phenotype in a non-transformed epithelial cell model**

**Running title: CagA and IL-1 $\beta$  in EMT**

**Haruki Arévalo-Romero<sup>1,2</sup>, Isaura Meza<sup>1</sup>, Gabriela Vallejo-Flores<sup>2</sup>, Ezequiel M. Fuentes-Pananá<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México 07360, México.

<sup>2</sup>Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México, Federico Gómez, México, D.F. México. Dr. Márquez 162, Colonia Doctores, Ciudad de México 06720, México.

**Author to whom correspondence should be addressed. Unidad de Investigación Médica en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México Federico Gómez. Dr. Márquez 162, Col. Doctores, C.P. 06720. Ciudad de México., México E-Mail: [empanana@yahoo.com](mailto:empanana@yahoo.com) (E.M. F-P.); Tel.: 52+ 55-4434-9663; Fax: 52+ 55-4434-9663.**

## **Abstract**

Gastric cancer is the third cause of cancer death worldwide and infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is considered the most important risk factor, mainly by the activity of its virulence factor CagA. *H. pylori*/CagA-induced chronic inflammation triggers the progression of gastric lesions of increased severity, starting with gastritis and ending with cancer. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) has been associated with tumor development and invasiveness in different types of cancer, including gastric cancer. Today, it is not clear if there is an association between CagA and IL-1 $\beta$  at a cellular level. In this study, we analyzed the effects of IL-1 $\beta$  and CagA to alter the MCF-10A acini morphogenesis. We found that both CagA and IL-1 $\beta$  induced translocation of  $\beta$ -catenin to the nucleus and morphological changes to the acini, but only CagA induced expression of *Snail1* and *ZEB1*, transcription factors associated with the epithelial to mesenchymal transition (EMT), leading to enhance MMP9 activity and cell invasion. Our data support that IL-1 $\beta$  and CagA target the  $\beta$ -catenin pathway, with CagA leading to acquisition of a stage related to aggressive tumors.

## **Introduction**

Gastric cancer is the fifth most frequently diagnosed malignancy in the world and the third cause of cancer death worldwide [1]. Persistent infections have been found responsible for various types of cancers and development of gastric cancer is strongly associated with infection by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), today considered the most important risk factor and classified as a class 1 carcinogen by IARC [2-6]. *H. pylori* is a microaerophilic gram negative bacteria that persistently colonizes the gastric mucosa in at least 50% of the world population [7].

*H. pylori* has developed several virulence and colonization factors that have enabled it to adapt to the gastric acidic conditions [8-11]. The pathological effects of *H. pylori* in the gastric mucosa are associated with the presence of the virulence factor CagA (citotoxin Associated gene A), which is encoded in the cag pathogenicity island (cagPAI), a chromosomal DNA segment of about 40 kb encoding genes for a type IV secretion system (T4SS) [5, 12-14]. Different bacteria use these secretion systems to release effector molecules into host cells [15, 16]. Studies in gastric cancer cell lines showed that after the adhesion of *H. pylori* to the epithelial cell, this secretion system is used to introduce the CagA protein [17]. Once CagA is inside the cell, it is phosphorylated in EPIYA motifs by members of the Src family of kinases and by c-Abl [18-23]. Phosphorylated and un-phosphorylated CagA then activate a complex network of signaling molecules directly inferring in cellular process related to cellular transformation, such as proliferation, cell survival, cell polarity and the epithelial to mesenchymal transition (EMT) [24-31].

Chronic inflammation is an important driver of different types of cancer so that it is considered one of the hallmarks of cancer [32, 33]. Particularly, in gastric cancer oncogenic transformation of the gastric mucosa evolves through progressive inflammatory lesions, starting with a superficial gastritis, followed by atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia, to finally become a cancerous lesion [34, 35]. Highly inflammatory lesions are characterized by prominent infiltration of mononuclear and polymorphonuclear immune cells and the presence of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF) and/or interleukin-1 (IL-1) [36]. Epidemiological data also support an association between gastric cancer and polymorphisms in genes involved in the inflammatory response, mainly IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-8 [37-39].

Macrophages localized in the tumor microenvironment are among the most important secretors of IL-1 $\beta$  and the cytokine is involved in several stages of the carcinogenesis process, from tumor initiation to tumor growth and invasiveness [40]. Elevated levels of IL-1 $\beta$  have been reported in the microenvironment of the gastric mucosa and the transgenic mouse ectopically expressing IL-1 $\beta$  develops severe lesions that mirror the multistage process occurring during human gastric carcinogenesis. Interestingly, these changes are accelerated when *H. pylori* infection is introduced providing evidence that both mechanisms can cooperate during gastric carcinogenesis [41-44].

EMT is characterized by multiple biochemical changes allowing a polarized terminally differentiated epithelial cell to assume a mesenchymal phenotype. Tumor cells become migratory after EMT, with increased capacity for degrading extracellular matrix (ECM) components and resistance to anoikis, a type of apoptosis of detached cells [45]. Thus, it is believed that progression from non-invasive to invasive tumors relies on activation of the

EMT program characterized by activation of transcription factors Snail, Twist, Slug and ZEB, loss of cell to cell junctional complexes by degradation of E-cadherin and down-regulation of the *CDHI* promoter. Additionally, EMT correlates with increased expression of metalloproteinase genes, which enhance the cell capacity to degrade ECM, facilitating invasion. All together these processes correlate with tumors with highly aggressive phenotypes [46].

We recently found that CagA positive *H. pylori* strains inhibit lumen formation in an acini three dimensional (3-D) culture model, indicating that the central acini cells acquired the capacity of evasion of anoikis. Anoikis resistance was induced through CagA-activation of the AKT signaling pathway with downstream phosphorylation and inactivation of proapoptotic proteins BIM and BAD [47]. AKT is also an important mediator of EMT through inactivation of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ), a critical negative regulator of  $\beta$ -catenin. Once GSK3 $\beta$  is inactive,  $\beta$ -catenin moves to the nucleus where it helps to turn on the EMT transcriptional program [48]. Resistance to anoikis and EMT often work together to allow tumor cell mobility and survival of the tissue-detached cell, thus contributing to tumor cell invasion and metastasis. Recent studies have also supported a link between CagA, AKT and EMT [49, 50]. In this study, we found that both CagA and IL-1 $\beta$  induce translocation of  $\beta$ -catenin to the nucleus, but only CagA induced expression of the genes encoding for EMT transcription factors Snail1 and ZEB1 leading to enhance MMP9 activity and invasion.

## **Material and methods**

### ***Helicobacter pylori* strains and culture**



Two CagA positive *H. pylori* strains were used in this study: strain 11637 with a Western type CagA (EPIYA ABCCC) that was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA No. 43504); and strain NY02-149 with an East-Asian-type CagA (EPIYA ABD) that was kindly donated by Dr. Guillermo Perez-Perez from New York University. Two additional *H. pylori* CagA negative strains were used as controls: strain 365A3, which has a partial cagPAI lacking the effector protein CagA, and strain 254 that contains a non-functional cagPAI. All *H. pylori* strains were grown on blood agar (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA No. 211037) for 48h at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C.

### **MCF-10A 3-D culture, infection and IL-1 $\beta$ stimulation**

MCF-10A are human mammary epithelial cells that were obtained from the American Type culture collection (ATCC CRL-10317, Manassas, VA, USA). MCF-10A were grown in DMEM-F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA- No. 16000-044), 20ng/mL of epidermal growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA. No AF-100-15), 5 $\mu$ g/mL hydrocortisone (No H-0808), 100ng/mL cholera toxin (C-8052) and 10 $\mu$ g/mL insulin (I-1882) (all from Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA.). All cultures also contained 100 units/mL of penicillin and 100 $\mu$ g/mL of streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA- No. 15240).

MCF-10A acini were formed in matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, No.354230) following the method reported by Debnath [51]. 2.5 X 10<sup>3</sup> MCF-10A cells were seeded in an 8-well plate (Lab-Tek Chamber Slide System, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA, No. 177402) on 40  $\mu$ L of a solidified layer of Matrigel. 300  $\mu$ L of culture medium were

added per well and acini were allowed to form for 10-14 days, observing daily at the optical microscope and changing media every two days. Acini were grown in same medium as MCF-10A monolayers but with 2% of matrigel.

For infection assays, MCF-10A cells were seeded at 3000 cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 48 hrs to reach 70% subconfluency and then switched to DMEM-F12 without FBS for 18 h. Afterwards, cells were infected with an *H. pylori* M.O.I. of 100 or/and stimulated with 20 ng/ml of human recombinant IL-1 $\beta$  (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 48 hrs at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C. Control cells were not stimulated with the cytokine or infected with *H. pylori*. For 3-D culture infection-stimulation assays, single cells suspensions were treated as mentioned above for 1 hour after which cells were recovered and seeded in matrigel. Cells were grown for 14 days changing medium every other day. Media of days 2, 4 and 6 also contained bacteria at the same MOI and the same concentration of IL-1 $\beta$ .

### **Immunofluorescence**

Cells grown under 3-D conditions were washed three times with PBS. Thereafter, the cells were fixed with paraformaldehyde (PFA Electron Microscopy Sciences Cat. 15713) at 3.7% for 20 minutes at room temperature, washed three times with PBS and permeabilized with PBS-0.2% Triton X-100 for 20 minutes. Following permeabilization, preparations were washed again and treated with PBS-0.02% triton X-100 plus 10% goat-serum and 1% BSA (blocking buffer) for one hour to block nonspecific binding. Cells were then incubated overnight at 4°C with anti-GM130 antibody (Genetex No. GTX61445; 1:50 dilution in blocking buffer). After incubation, the cells were washed three times with PBS-Tween for 10

minutes with stirring, and incubated with anti-rabbit IgG coupled labeled with Alexa-488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA No. A11008, 1:100 dilution) for one hour at room temperature. Cells were washed again and nuclei were stained with DAPI (10 ng/mL, 1:2000 dilution) for 5 minutes. Finally, the preparations were washed and mounted in the 3-D culture chambers adding 12  $\mu$ L of Vecta-Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA No. H-1000) to observe them in the confocal microscope. The preparations were observed under a microscope Leica SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and the images were analyzed with the Leica LAS AF-Lite 2.6.0 software.

For 2-D assays, cells were grown on sterile glass coverslips in DMEM-F12 for 48 hours. Cells were then serum starved and IL-1 $\beta$  stimulated or infected for 48 hours as previously described. Then, cells were subjected to the same staining process as described for the 3-D cultures by using antibodies against  $\beta$ -catenin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No.138400), E-cadherin (BD Bioscience, San Jose, CA No. 610182) and ZO-1 (Genetex, Irving CA, No. GTX108613). Finally, cell preparations were mounted on slides to which 7 mL of Vecta-Shield were added to observe them with the inverted epi-fluorescence microscope Olympus IX50, images were recorded with the DP72 digital camera and analyzed with Image-Pro Plus software (V7.0) averaged Cybernetics (Silver Spring MD, USA).

### **RNA extraction and PCR**

Total RNA was obtained from stimulated-infected cells lysed with 1 ml of Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No. 15596018) according to the manufacturer instructions. Complementary DNA synthesis was performed using 2.5  $\mu$ g of total RNA in a reaction

mixture with SuperScript kit VILO MasterMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No. 11755-050). ZEB1 gene was amplified by using the oligonucleotide pairs, sense: GGG AAT GCT AAG ACT GCT GG, and anti-sense GGT GTA ACT GCA CAG GGA GC. For Snail gene the oligonucleotides were: sense TCG GAA GCC TAA CTA CAG CGA and anti-sense AGA TGA GCA TTG GCA GCG AG.

### **Zymography**

MCF-10A cells were cultured with IL-1 $\beta$  with or without *H. pylori* infection and culture supernatants were recovered and concentrated using 30K cutoff Amicon Centricon filters (Millipore, Billerica, MA, USA No. UFC503024). Protease activity was revealed in 8% SDS-PAGE gels co-polymerized with 1mg/ml gelatin. After electrophoresis, gels were rinsed three times with 2.5% Triton X-100 in PBS and then incubated in activation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 4.5mM CaCl<sub>2</sub>) at 37°C for 48 h. Gels were stained with coomassie blue and densitometric analyses were performed with ImageJ software.

### **Invasion assays**

Cultures of MCF-10A cells after IL-1 $\beta$  stimulus or infection were harvested with PBS-0.05% EDTA, and 1x10<sup>3</sup> cells were seeded in the inner chamber of Transwell units (Corning, NY, USA No. 3422) with Matrigel-coated polycarbonate filters as a substrate for degradation and filled up with DMEM-F12 free of serum. The outer chamber of the Transwell unit was loaded with DMEM-F12 supplemented with 10% of FBS as the chemoattractant. Cells were allowed

to migrate for 36 h at 37°C. The porous membranes containing migrating cells were cut out from the inner chambers and fixed with 3.4% PFA for 30 min. Fixed cells were permeabilized with PBS-0.2% Triton X-100 and stained with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No.D1306). Membranes were mounted on Vectashield.

### **SDS-PAGE and Western blot**

Protein extracts were obtained lysing cells with RIPA buffer (Millipore, Billerica, MA, USA No. 20-188) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science Mannheim, Germany No. 04693116001). The samples were incubated on ice for 10 minutes and after centrifugation at 12,000 rpm for 10 min, the supernatant was recovered. 30 µg of protein were loaded per lane, and separated in 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and blotted onto nitrocellulose membranes. After blocking with TBS-0.1% Tween 10% milk, the membranes were challenged with the described anti-E-cadherin and anti-β catenin antibodies. As loading control, an anti-β-actin antibody (kindly provided by Dr. J. M. Hernandez; CINVESTAV-IPN, Mexico) was utilized. HRP-conjugated secondary antibody was from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. No. G21040. Positive bands were revealed by enhanced chemiluminescence.

### **Results**

***H. pylori* CagA and IL-1β efficiently translocate β-catenin into the nucleus of non-transformed MCF-10A cells.**

We recently found that infection with CagA positive *H. pylori* strains induces AKT-mediated anoikis resistance [47]. AKT is also an important mediator of EMT through promotion of  $\beta$ -catenin nuclear translocation. Because resistance to anoikis and EMT often work together to allow tumor cell mobility and survival of the tissue-detached cell, we address whether in the MCF-10A acini morphogenesis model CagA alone and/or cooperating with the inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  promote  $\beta$ -catenin translocation. For this, the MCF-10A cells were first grown in 2-D and stimulated with IL-1 $\beta$  or infected and then subjected to immunofluorescence assays. As shown in Figure 1A, in mock treated cells  $\beta$ -catenin was localized to epithelial cell to cell junctions. In contrast, after IL-1 $\beta$  or infection with CagA positive strains we observed that the protein is translocated to the nucleus. In order to assess whether the stimulation with IL-1 $\beta$  had an additive effect with CagA activity, cells were infected and stimulated at the same time. We did not find evidence that the combination of the two stimuli were able to induce the translocation of the protein into the nuclei of cells with an additive or synergistic effect (Figure 1B). When cells were infected with *H. pylori* strains lacking *cagA* or with a defective *cagPAI*, the localization of  $\beta$ -catenin was not altered.

***H. pylori* CagA and IL-1 $\beta$  alter the tight junctions and polarity of the non-transformed MCF-10A cells.**

When  $\beta$ -catenin is translocated to nucleus there is disruption of the cell to cell contacts and adherens junctions begin to disassemble. In previous studies it has been reported that CagA is capable to alter the localization of ZO-1 and induces loss of E-cadherin, which leads to altered function of the epithelial barrier [26, 49, 50]. To analyze the effect of CagA on cell polarity

and cell junctions of MCF-10A cells, we performed immunofluorescent assays after infection with the bacteria in 2-D cell cultures. As shown in Figure 2A, E-cadherin protein is distributed in the cell membrane homogeneously in uninfected cells, while in cells infected with the CagA positive strain there are some areas where the fluorescence signal decreases (arrows). Furthermore, when we analyzed ZO-1 it was observed that CagA was able to redistribute the protein to form ectopic patches. In order to determine the effects of CagA and IL-1 $\beta$  on the architecture of MCF-10A *in vitro* grown glands, cells were infected or cytokine-stimulated during acini morphogenesis. As shown in Figure 2C, the analysis of the localization of protein GM130 in control cells indicated that this is located towards the center of the lumen showing apical targeting of cells. However, when cells were stimulated with IL-1 $\beta$  or infected with *H. pylori* CagA positive strains a delocalization of GM130 protein was observed and this was also observed when cells were stimulated and infected at the same time. These results show that *H. pylori* CagA and IL-1 $\beta$  are capable of disrupting the cell polarity and cell junctions during acini morphogenesis, an activity that also correlates with initiation of the EMT.

**CagA activity correlates with establishment of an EMT program and increased cell invasive properties.**

To determine whether the protein levels of  $\beta$ -catenin and E-cadherin were affected by IL-1 $\beta$  and/or CagA, cells were analyzed by Western blot after treatment. Figure 3A shows a representative blot of total extracts from MCF-10A cells after IL-1 $\beta$  stimulation or infection with different strains of *H. pylori*. We observed that  $\beta$ -catenin and E-cadherin

levels remain non-significantly affected. Therefore, these data show that both the inflammatory stimulus by IL-1 $\beta$  and the CagA protein are able to induce translocation of the protein  $\beta$ -catenin into the nuclei of cells without affecting protein levels at early experimental time-points.

$\beta$ -catenin nuclear translocation is considered a marker of aggressive tumors in various types of cancers, because of its efficient activation of the EMT gene expression program implicated in the progression to highly invasive tumors. EMT is mediated by key transcription factors, such as *ZEB1* and *Snail1*. Therefore, we aimed to analyze the expression levels of *ZEB1* and *Snail1*, and also of *CDHI*, the gene that encodes for E-cadherin, to evaluate whether expression levels of these genes were altered as corresponds to EMT. As shown in Figure 3B, we observed an increased expression of *Snail1* after stimulation with IL-1 $\beta$  or *H. pylori* infection, this latter was significantly larger for the *H. pylori* encoding a CagA with an East Asia EPIYA (ABD) than with the Western ABCCC strain. However, ABCCC CagA was as efficient as IL-1 $\beta$  to induce *ZEB1* expression. On the other hand, *CDHI* expression was severely diminished by IL-1 $\beta$  treatment or infection with any of the CagA positive *H. pylori* strains. Overall these results agree with an expression pattern characteristics of cells on the onset of EMT.

We then analyzed the ability of IL-1 $\beta$  treated or *H. pylori* infected cells to express metalloproteinases and to degrade ECM components. We measured the activity of metalloproteases secreted in the supernatants of MCF-10A cells (Figure 4A). Densitometric analysis of hydrolyzed bands in gelatin zymograms showed enzymatic activity with a molecular weight correlating with that of MMP9. This activity had a major peak when cells were subjected to *H. pylori* infection than with IL-1 $\beta$  stimulus (Figure 4B). Also, the invasive ability of treated cells was determined by culture them in transwell chambers with



filters coated with matrigel (figure 4C). The invasion index measured after the stimulus or infection again showed that CagA have the ability to confer migratory properties to *H. pylori* infected cells. The invasion index was 3-fold higher than the one of the control cells. Interestingly, similar to the metalloproteinase assay, IL-1 $\beta$  was not efficient to induce cell invasion. Finally, to confirm the involvement of CagA to induce invasive properties of infected cells, we pharmacologically inhibited AKT and Src kinase activities. Src is the main kinase that phosphorylates CagA and we have previously shown that CagA-induced activation of AKT relays on Src activity [47]. We showed that the CagA-induced cell invasion is dependent on Src and AKT kinases. Again, we did not observe an important invasive activity promoted by IL-1 $\beta$  or a synergic or cooperative effect between CagA and IL-1 $\beta$ .

## **Discussion**

Glandular epithelial cells have a polarized structure, specialized cell to cell contacts and basement membrane anchors that are critical to its morphology and function. Cell transformation is characterized by loss of this well-ordered architecture, as occurs in adenocarcinomas. The non-transformed cell line MCF-10A has been established as a model that recapitulates the architecture of glandular epithelium *in vitro* providing a system in which to interrogate about the mechanisms of cell growth, proliferation, growth factors independence, cell polarity, as well as those mechanisms responsible for cancer cell filling of the gland lumen in early *in situ* tumors or metastasis to other tissues in more aggressive late tumors. Therefore, this model has been used to study the mechanisms of epithelial transformation of several viral and cellular oncogenes including some that are not related to

the development of breast carcinomas [51-54]. Also, many of the initial knowledge about the mechanisms of anoikis during gland development were initially understood in this system [51, 53].

Several articles have established a link between CagA and EMT. For example, in transformed cell lines AGS and MKN74 *H. pylori* induces expression of mesenchymal markers, such as *ZEB1*, *vimentin*, *Snail1*, *Snail3* and *MMP9* with concomitant decreasing of the epithelial marker *Keratin-7* [55]. Moreover, these EMT leads to a dedifferentiation process generating cells with characteristics of cancer stem cells (CSC) and expression of CD44 [56]. However, these studies are based on transformed cell lines in which much of the signaling and biological processes associated with cancer were already altered before the expression of CagA. In the past two years, several studies of primary cultures of gastroids models have emerged in which infection by *H. pylori* or CagA activity were analyzed. In one study, *H. pylori* was found to induce activation of the NF $\kappa$ B pathway that induced the secretion of inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as well as several chemokines like CXCL8 [57]. In another study, *H. pylori* altered the cell polarity through relocalization of claudin-7 by activation of  $\beta$ -catenin and Snail [58].

Recognition of the CagA oncogenic potential came from studies in several cellular systems including some unrelated to gastric tissue, such as MDCK cells, and gastric cancer cell lines such as AGS [58]. CagA oncogenic activity was later confirmed in transgenic mice and in mongolian gerbils [59-62]. Studies in MDCK cells have shown that *H. pylori* infection induces loss of cell polarity and relocation of ZO-1 protein, which causes impairment of the epithelial barrier integrity [26, 30]. ZO-1 is a component of epithelial apical-junction complexes that form a network of different proteins controlling cell polarity, proliferation and differentiation [63, 64]. In glandular epithelial tissues, cell

polarity exhibits a characteristic orientation, in which the cell apical pole points towards the central lumen. In our study we show delocalization of ZO-1 and of the Golgi protein GM130, which is delocalized by CagA and also by the inflammatory stimulus of IL-1 $\beta$ . Other proteins that are part of the apical-junction complex are E-cadherin and  $\beta$ -catenin [65]. E-cadherin protein is frequently lost in EMT-induced metastatic cancer cells [66]. Our results show that the total protein levels of E-cadherin and its membrane localization remained unchanged during the different conditions analyzed. However, when we analyzed mRNA expression we observed downregulation of the transcript after both IL-1 $\beta$  and CagA stimulus. Therefore these results suggest that degradation mechanisms are activated at later times than the ones analyzed in this study. However, some reports have shown that changes to EMT can occur without affecting the expression of E-cadherin, or that highly invasive cells maintain high levels of E-cadherin [67, 68].

Deregulation of ELKL motif kinase 1 (EMK1), the mammalian orthologue of PAR1 or PALS1, a regulator of polarity in *Drosophila*, leads to depolarized organoids with multiple lumens or with lack of lumen altogether [69, 70]. The formation of acini without a central lumen highlights the ability of central cells to evade anoikis. This phenomenon is important for the initiation and progression of various types of cancer because it is responsible for the survival of tumor cells when detached from the basal membrane [71]. We have previously shown that CagA positive *H. pylori* infected acini do not form a central lumen, which can also be observed here in figure 2C. We also showed that CagA induced resistance to anoikis was via an AKT-mediated phosphorylation and inactivation of the pro-apoptotic proteins BIM and BAD [47]. AKT is also an important mediator of EMT and  $\beta$ -catenin nuclear translocation through inactivation of GSK3 $\beta$ . Other studies have shown CagA activity leading to  $\beta$ -catenin nuclear accumulation [31]. Nuclear  $\beta$ -catenin can induce

transcription of several genes involved in EMT and tumor progression [72]. Our results show that translocation of  $\beta$ -catenin correlates with an increased expression of the *Snail1* and *ZEB1* EMT genes, which are involved in deregulation of adherens junctions by transcriptional repression of E-cadherin promoter [73]. This data is also in concordance with the loss of expression of the E-cadherin transcript after the IL-1 $\beta$  and CagA stimulus. MCF-10A cells expressing genes involved with the onset of EMT would be expected to behave like an aggressive invasive tumor and Matrigel-invasion assays showed increased invasion and increased MMP9 protease activity promoted by CagA. Metalloproteinases degrade ECM components facilitating cell invasiveness and morphological changes in the gland architecture. Interestingly, we only observed a CagA-mediated increased MMP9 activity and cell invasiveness, in spite of IL-1 $\beta$  efficiently promoting  $\beta$ -catenin translocation, transcriptional upregulation of *ZEB1* and *Snail1* and downregulation of *CDH1*. This may be due to a more chronic requirement on IL-1 $\beta$  to achieve a similar activity. Also relevant is the lack of evidence of synergism or cooperation between CagA and IL-1 $\beta$  signals to promote EMT effects. This may occur because infection by *H. pylori* may directly induce an inflammatory response in which IL-1 $\beta$  is present, thus already saturating the need for IL-1 $\beta$  activity. Alternatively, this may be because the cells have regulatory mechanisms that prevent the pro-tumor effect of this cytokine. In fact, it has recently been reported that to induce EMT-related molecular changes with IL-1 $\beta$  it is necessary to treat MCF-10A cells for more than 3 weeks [74], and in this study treatment went only for 2 or 10 days in 2-D or 3-D cultures, respectively.

## **Conclusions**

We tested two of the more relevant triggers of cancer gastric progression, the CagA *H. pylori* oncoprotein and the inflammatory stimulus of IL-1 $\beta$  in a model of acini morphogenesis of non-transformed cells, finding that both stimuli can alter cell junctions and cell polarity and guide treated cells to the onset of EMT. However, only CagA induced an invasive phenotype related to the most aggressive cancers.

### **Acknowledgments**

This paper constitutes the fulfillment of the Graduate Program Molecular Biomedicine Department of the CINVESTAV (IPN), to Haruki Arévalo Romero. H. Arévalo Romero also acknowledges the scholarship and financial support provided by CONACyT and IMSS. This study was supported by grants 176880 (to E.M. Fuentes-Pananá) and 166462 (to I. Meza) from CONACYT, and grant HIM-2013-051 (to E.M. Fuentes Pananá) from Fondo de Apoyo a la Investigación Hospital Infantil de México Federico Gómez.

The authors thank R. Bonilla-Moreno for their generous support with molecular biology techniques. We also thank MC Dominguez-Robles and A. Trejo for technical assistance.

### **Authors' Contribution**

GV-F, HA-R and performed the experiments; IM and EMF-P designed the study and interpreted the results; IM and EMF-P supervised the experiments; HA-R and EMF-P wrote the manuscript, and GV-F and IM provided a critical review of the manuscript.

## Bibliography

1. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Formann D, Bray F. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0 *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11*.
2. Forman, D., et al., *Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation*. BMJ, 1991. **302**(6788): p. 1302-5.
3. Parkin, D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. Int J Cancer, 2006. **118**(12): p. 3030-44.
4. *An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group*. Lancet, 1993. **341**(8857): p. 1359-62.
5. Nomura, A., et al., *Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii*. N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1132-6.
6. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1127-31.
7. Taylor, D.N. and M.J. Blaser, *The epidemiology of Helicobacter pylori infection*. Epidemiol Rev, 1991. **13**: p. 42-59.
8. Eaton, K.A., et al., *Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets*. Infect Immun, 1991. **59**(7): p. 2470-5.
9. Kusters, J.G., A.H. van Vliet, and E.J. Kuipers, *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3): p. 449-90.
10. Eaton, K.A., et al., *In vivo complementation of ureB restores the ability of Helicobacter pylori to colonize*. Infect Immun, 2002. **70**(2): p. 771-8.
11. Eaton, K.A. and S. Krakowka, *Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori*. Infect Immun, 1994. **62**(9): p. 3604-7.
12. Blaser, M.J., et al., *Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach*. Cancer Res, 1995. **55**(10): p. 2111-5.
13. Parsonnet, J., et al., *Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection*. Gut, 1997. **40**(3): p. 297-301.
14. Censini, S., et al., *cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14648-53.
15. Cascales, E. and P.J. Christie, *The versatile bacterial type IV secretion systems*. Nat Rev Microbiol, 2003. **1**(2): p. 137-49.
16. Wallden, K., A. Rivera-Calzada, and G. Waksman, *Type IV secretion systems: versatility and diversity in function*. Cell Microbiol, 2010. **12**(9): p. 1203-12.
17. Odenbreit, S., et al., *Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1497-500.
18. Asahi, M., et al., *Helicobacter pylori CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 593-602.
19. Segal, E.D., et al., *Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14559-64.
20. Stein, M., et al., *c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs*. Mol Microbiol, 2002. **43**(4): p. 971-80.

21. Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci, *Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1263-8.
22. Selbach, M., et al., *Src is the kinase of the Helicobacter pylori CagA protein in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 6775-8.
23. Mueller, D., et al., *c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian Helicobacter pylori strains*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1553-66.
24. Higashi, H., et al., *SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein*. Science, 2002. **295**(5555): p. 683-6.
25. Yamazaki, S., et al., *The CagA protein of Helicobacter pylori is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa*. J Infect Dis, 2003. **187**(2): p. 334-7.
26. Amieva, M.R., et al., *Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA*. Science, 2003. **300**(5624): p. 1430-4.
27. Saadat, I., et al., *Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity*. Nature, 2007. **447**(7142): p. 330-3.
28. Lu, H.S., et al., *Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of Helicobacter pylori CagA*. Cancer Sci, 2008. **99**(10): p. 2004-11.
29. Lu, H., et al., *Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of Helicobacter pylori CagA*. J Biol Chem, 2009. **284**(34): p. 23024-36.
30. Tan, S., L.S. Tompkins, and M.R. Amieva, *Helicobacter pylori usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000407.
31. Franco, A.T., et al., *Activation of beta-catenin by carcinogenic Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10646-51.
32. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
33. Mantovani, A., C. Garlanda, and P. Allavena, *Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation*. Ann Med, 2010. **42**(3): p. 161-70.
34. Correa, P. and Y.H. Shiao, *Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(7 Suppl): p. 1941s-1943s.
35. Correa, P., et al., *Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies*. Cancer Res, 1990. **50**(15): p. 4731-6.
36. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073-81.
37. Wroblewski, L.E., R.M. Peek, Jr., and K.T. Wilson, *Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(4): p. 713-39.
38. Dicken, B.J., et al., *Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions*. Ann Surg, 2005. **241**(1): p. 27-39.
39. El-Omar, E.M., et al., *Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 398-402.
40. 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.
41. Serelli-Lee, V., et al., *Persistent Helicobacter pylori specific Th17 responses in patients with past H. pylori infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1beta*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39199.
42. Jung, H.C., et al., *Helicobacter pylori induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta,*

- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha*. J Gastroenterol Hepatol, 1997. **12**(7): p. 473-80.
43. Basso, D., et al., *Helicobacter pylori* infection enhances mucosal interleukin-1 beta, interleukin-6, and the soluble receptor of interleukin-2. Int J Clin Lab Res, 1996. **26**(3): p. 207-10.
  44. Tu, S., et al., *Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice*. Cancer Cell, 2008. **14**(5): p. 408-19.
  45. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
  46. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
  47. Vallejo-Flores, G., et al., *Helicobacter pylori CagA Suppresses Apoptosis through Activation of AKT in a Nontransformed Epithelial Cell Model of Glandular Acini Formation*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 761501.
  48. Talbot, L.J., S.D. Bhattacharya, and P.C. Kuo, *Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. **3**(2): p. 117-36.
  49. Yu, H., et al., *Helicobacter pylori* promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer by downregulating programmed cell death protein 4 (PDCD4). PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105306.
  50. Choi, Y.J., et al., *Helicobacter pylori*-induced epithelial-mesenchymal transition, a potential role of gastric cancer initiation and an emergence of stem cells. Carcinogenesis, 2015. **36**(5): p. 553-63.
  51. 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.
  52. Giunciuglio, D., et al., *Invasive phenotype of MCF10A cells overexpressing c-Ha-ras and c-erbB-2 oncogenes*. Int J Cancer, 1995. **63**(6): p. 815-22.
  53. Debnath, J., et al., *The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini*. Cell, 2002. **111**(1): p. 29-40.
  54. Muthuswamy, S.K., et al., *ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 785-92.
  55. Baud, J., et al., *Helicobacter pylori* initiates a mesenchymal transition through ZEB1 in gastric epithelial cells. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60315.
  56. Bessede, E., et al., *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. Oncogene, 2014. **33**(32): p. 4123-31.
  57. Schlaermann, P., et al., *A novel human gastric primary cell culture system for modelling Helicobacter pylori infection in vitro*. Gut, 2016. **65**(2): p. 202-13.
  58. Wroblewski, L.E., et al., *Helicobacter pylori* targets cancer-associated apical-junctional constituents in gastroids and gastric epithelial cells. Gut, 2015. **64**(5): p. 720-30.
  59. Bagnoli, F., et al., *Helicobacter pylori CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(45): p. 16339-44.
  60. Miura, M., et al., *Differential oncogenic potential of geographically distinct Helicobacter pylori CagA isoforms in mice*. Int J Cancer, 2009. **125**(11): p. 2497-504.
  61. Ohnishi, N., et al., *Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 1003-8.



62. Watanabe, T., et al., *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology*, 1998. **115**(3): p. 642-8.
63. Knust, E. and O. Bossinger, *Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells*. *Science*, 2002. **298**(5600): p. 1955-9.
64. Jamora, C. and E. Fuchs, *Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(4): p. E101-8.
65. Christofori, G. and H. Semb, *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(2): p. 73-6.
66. Wang, F.M., et al., *SHP-2 promoting migration and metastasis of MCF-7 with loss of E-cadherin, dephosphorylation of FAK and secretion of MMP-9 induced by IL-1beta in vivo and in vitro*. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. **89**(1): p. 5-14.
67. Martinez-Orozco, R., et al., *Arachidonic acid promotes epithelial-to-mesenchymal-like transition in mammary epithelial cells MCF10A*. *Eur J Cell Biol*, 2010. **89**(6): p. 476-88.
68. Nieman, M.T., et al., *N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(3): p. 631-44.
69. Straight, S.W., et al., *Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 1981-90.
70. Cohen, D. and A. Musch, *Apical surface formation in MDCK cells: regulation by the serine/threonine kinase EMK1*. *Methods*, 2003. **30**(3): p. 269-76.
71. Paoli, P., E. Giannoni, and P. Chiarugi, *Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3481-98.
72. Daugherty, R.L. and C.J. Gottardi, *Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions*. *Physiology (Bethesda)*, 2007. **22**: p. 303-9.
73. de Herreros, A.G., et al., *Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010. **15**(2): p. 135-47.
74. 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.

## Figure legends

**Figure 1. *H. pylori* CagA and IL-1 $\beta$  induce  $\beta$ -catenin nuclear translocation.** Analysis of localization of  $\beta$ -catenin in MCF-10A cells after the stimulus of IL-1 $\beta$  or the infection with *H. pylori* strains. **A.** MCF-10A cells were infected with CagA positive strains (ABCCC or ABD) or stimulated with IL-1 $\beta$ . **B.** MCF-10A cells were both infected with CagA positive strains and stimulated with IL-1 $\beta$  or single infected with CagA negative variants CagA(-) and cagPAI(-). Immunofluorescence images show  $\beta$ -catenin (green) and nuclei (Blue). Arrows indicate nuclear staining of  $\beta$ -catenin in A and of membrane staining in B.

**Figure 2. Localization of ZO-1 and GM130 is altered by *H. pylori* CagA.** Analysis of localization of E-cadherin, ZO-1 and GM130 in MCF-10A cells after infection with *H. pylori* or stimulation with IL-1 $\beta$ . **A-B.** Cells were infected with the CagA positive strain EPIYA ABCCC and were stained with anti-ZO-1 or anti-E-cadherin antibodies (green) and DAPI (Blue). Arrows in panel **A** indicate the lost of signal of E-cadherin and in panel **B** show delocalization of ZO-1. **C.** MCF-10A cells were infected with *H. pylori* positive strains ABCCC and ABD, stimulated with IL-1 $\beta$  or both infected/stimulated during acini morphogenesis. The acini structures were stained with anti-GM130 antibody (green) and DAPI (blue) and confocal microscopy section were made at 50% deep of the acini.

**Figure 3. Nuclear translocation of  $\beta$ -catenin correlates with increased expression of *ZEB1* and *Snail1*.** **A.** Immunoblotting of whole cell lysates of infected or IL-1 $\beta$ -stimulated cells with anti- $\beta$ -catenin and anti-E-cadherin antibodies. **B.** The relative expression of

*ZEB1*, *Snail* and *CDH1* genes was determined by semiquantitative RT-PCR. mRNA was isolated from MCF-10A cells after infection with CagA positive strains (ABCCC/ABD) and CagA(-) variant or after stimulation with IL-1 $\beta$ .

**Figure 4. CagA but no IL-1 $\beta$  promotes MMP9 activity and Invasion.** **A.** Representative gelatin zymogram showing metalloproteinase 9 (MMP-9) hydrolytic activity in culture media recovered from MCF-10A cells stimulated with IL-1 $\beta$  or infected with CagA positive and negative *H. pylori* strains. **B.** Densitometric analysis of three independent experiments. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA (\*\*\*)  $p \leq 0.001$  and mock infected/treated cells were used as baseline control. **C.** Matrigel invasion assays of cells stimulated with IL-1 $\beta$  or infected using Transwell chambers. AKT and Src kinase inhibitors were used to inhibit EMT and CagA activity, respectively. The bars are the mean fold changes normalized to mock infected/treated cells.

Figure 1

**A**

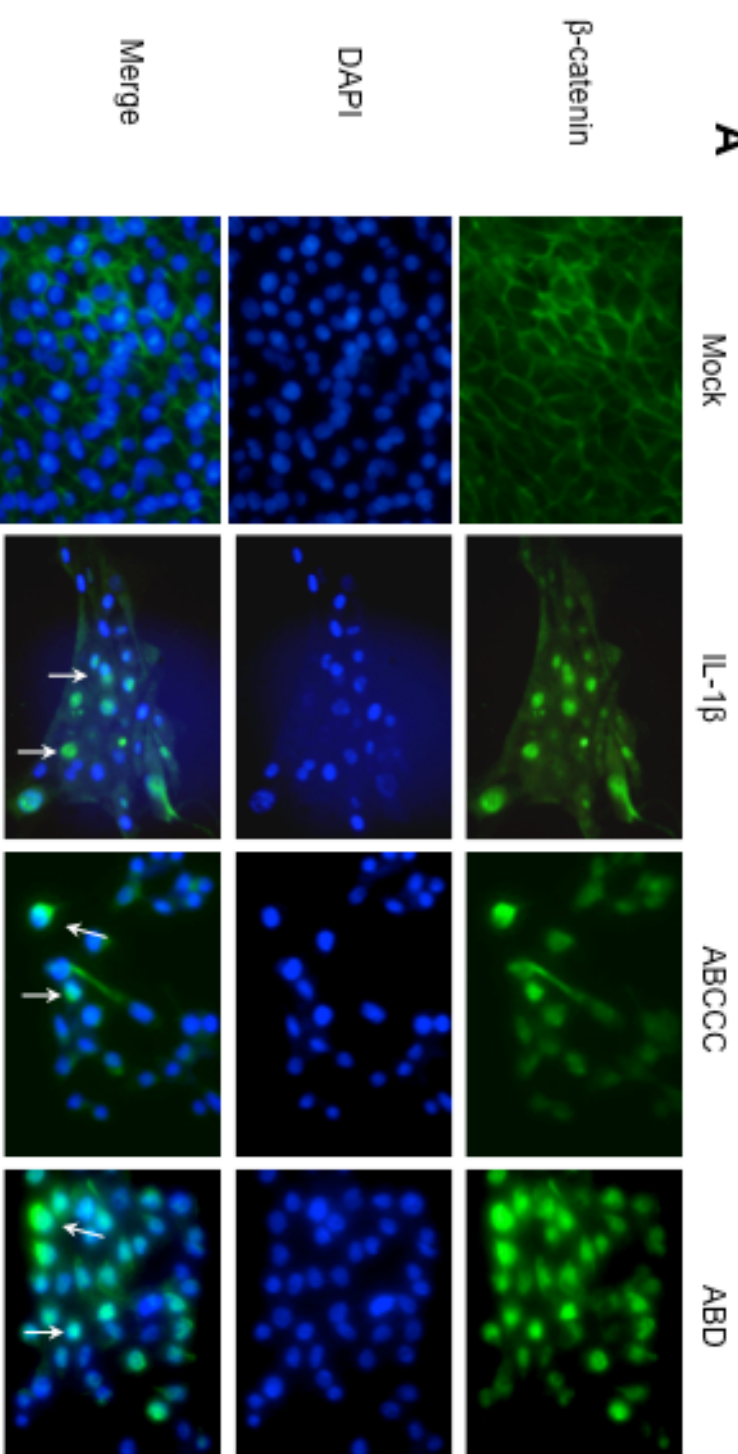


Figure 1

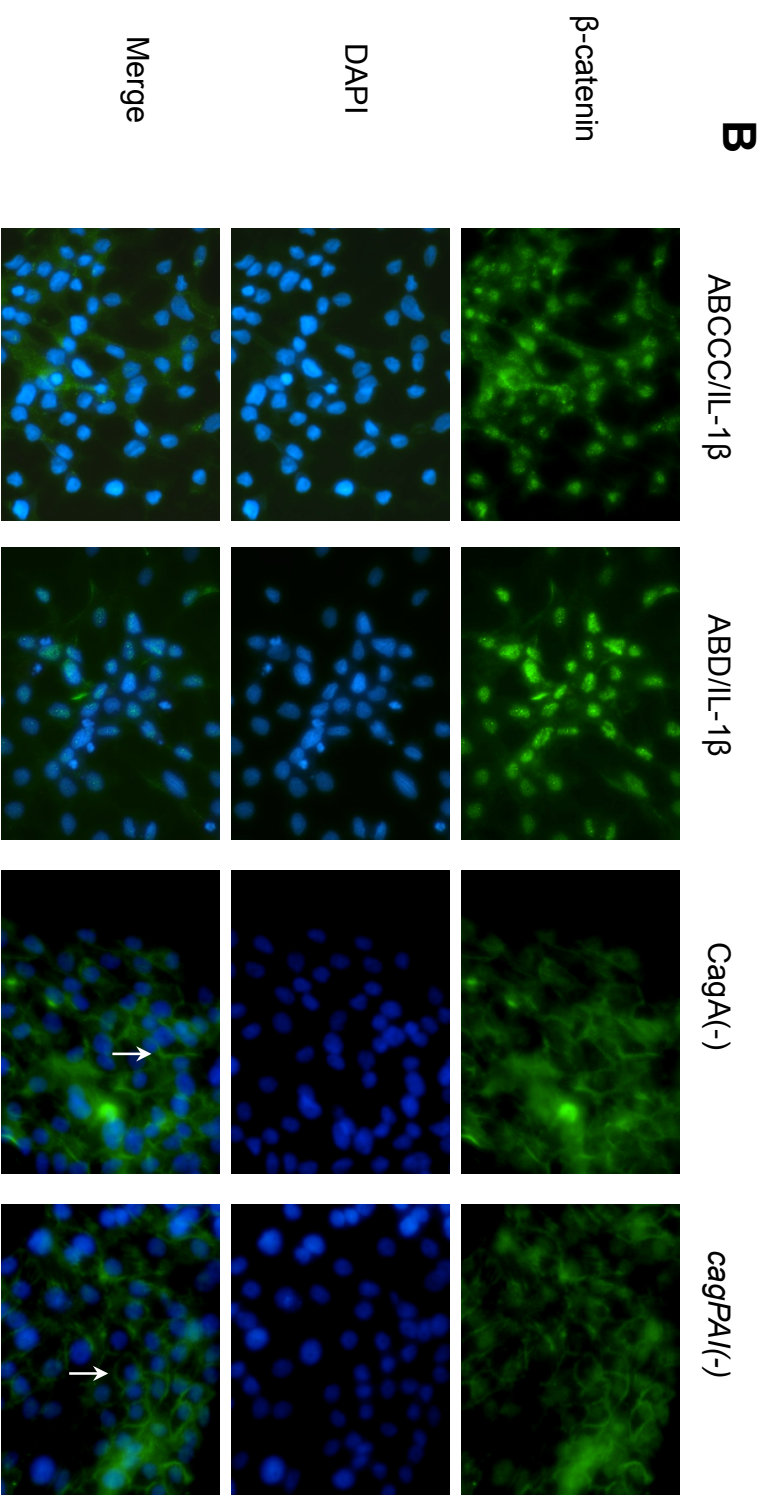
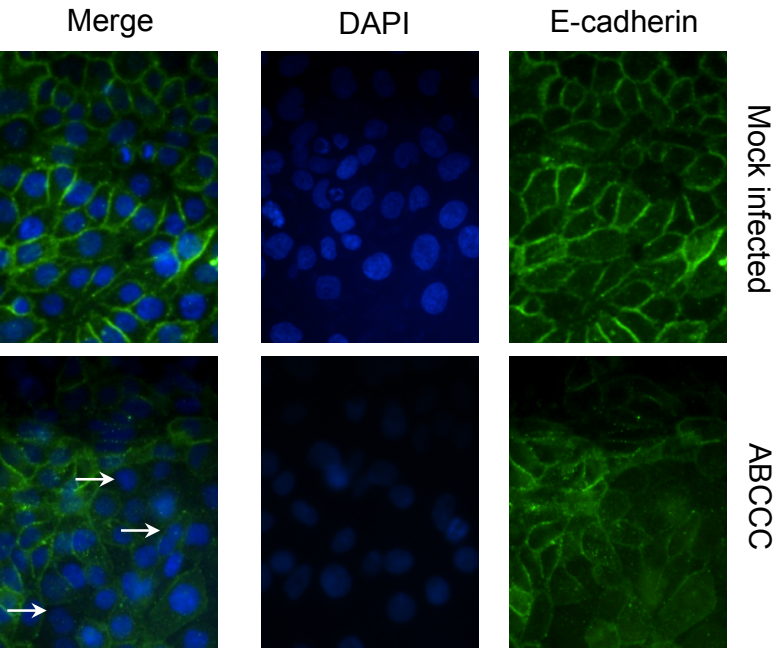


Figure 2

**A**



**B**

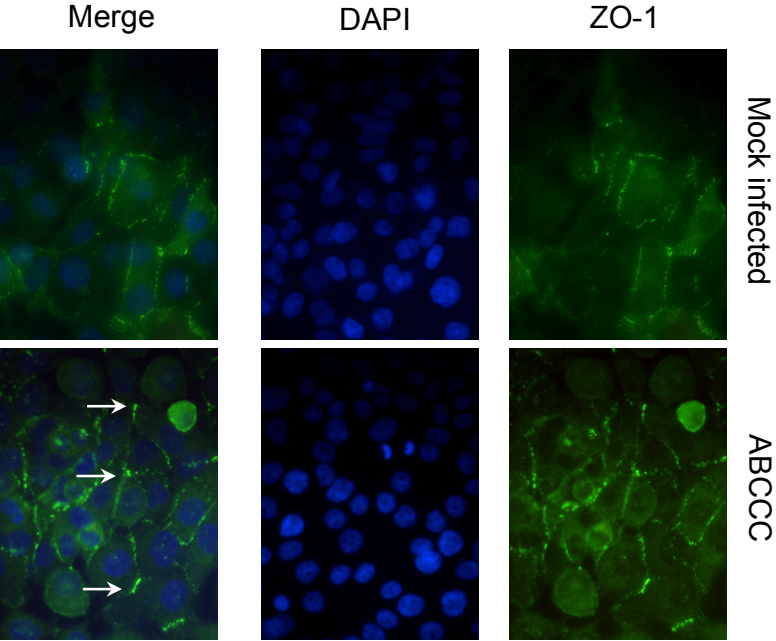


Figure 2

C

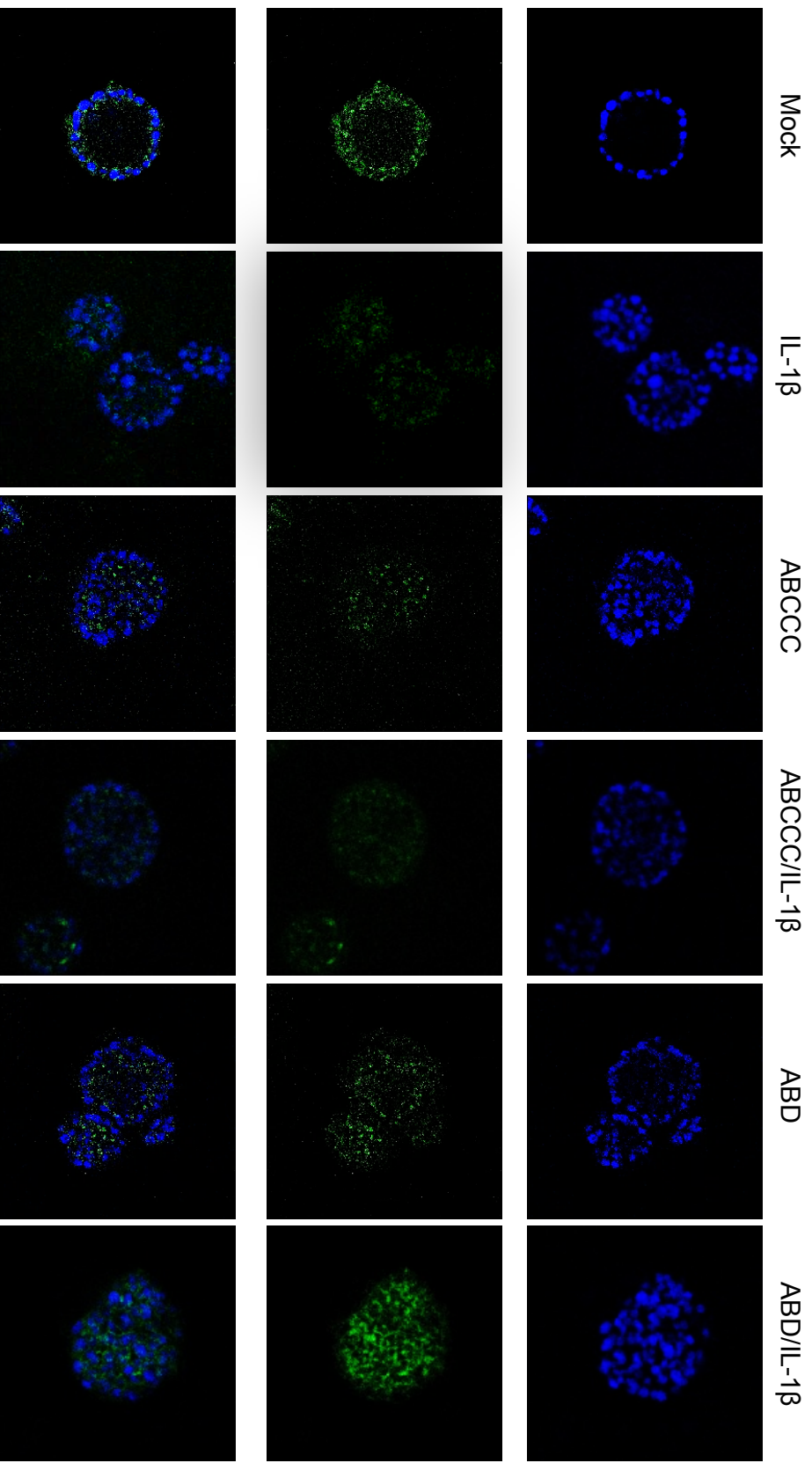


Figure 3

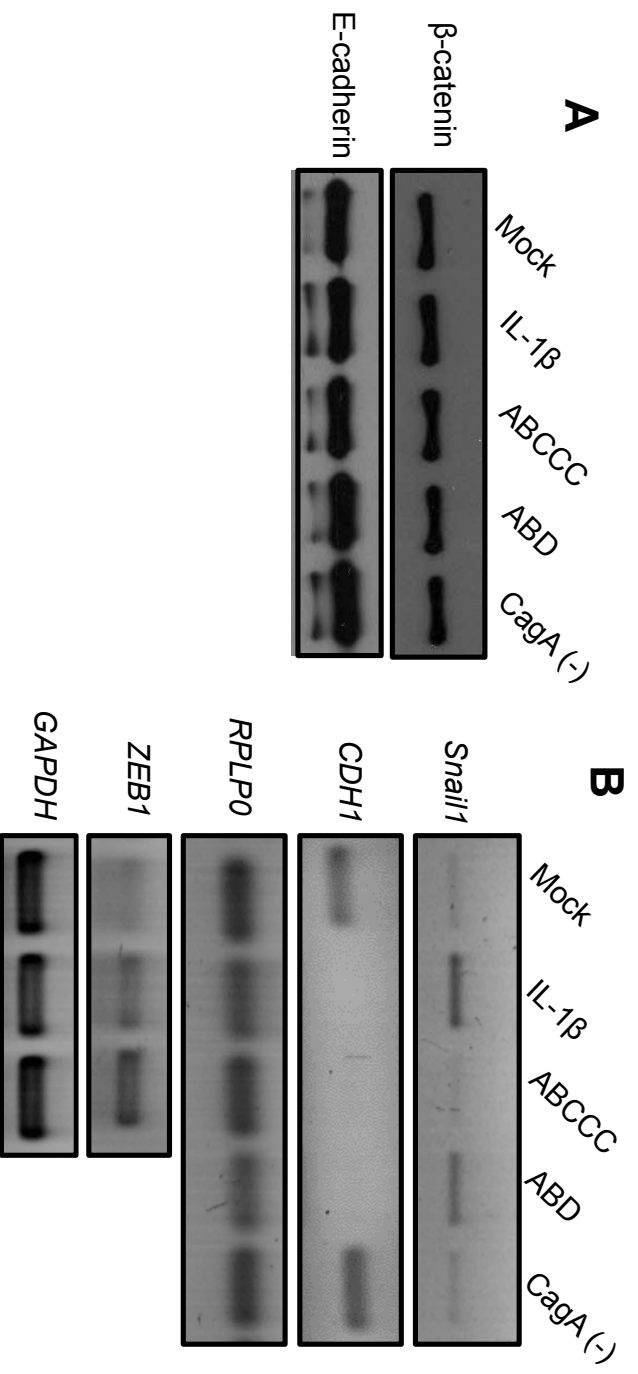
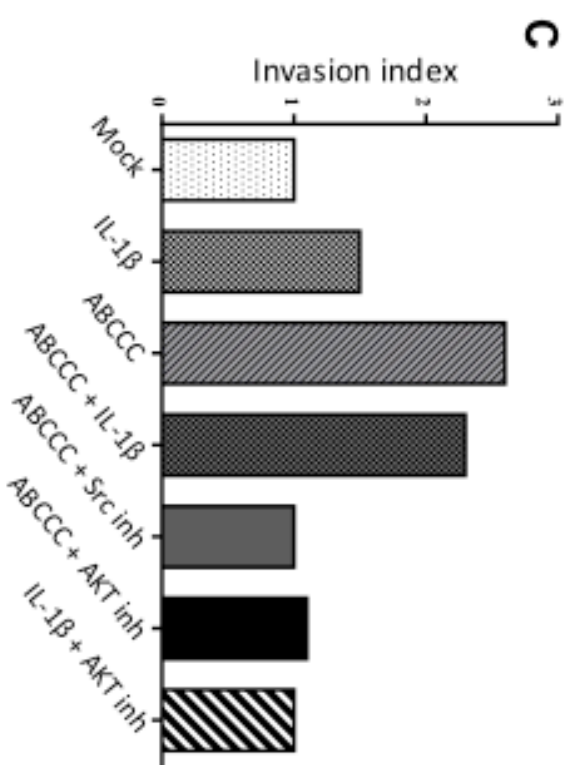
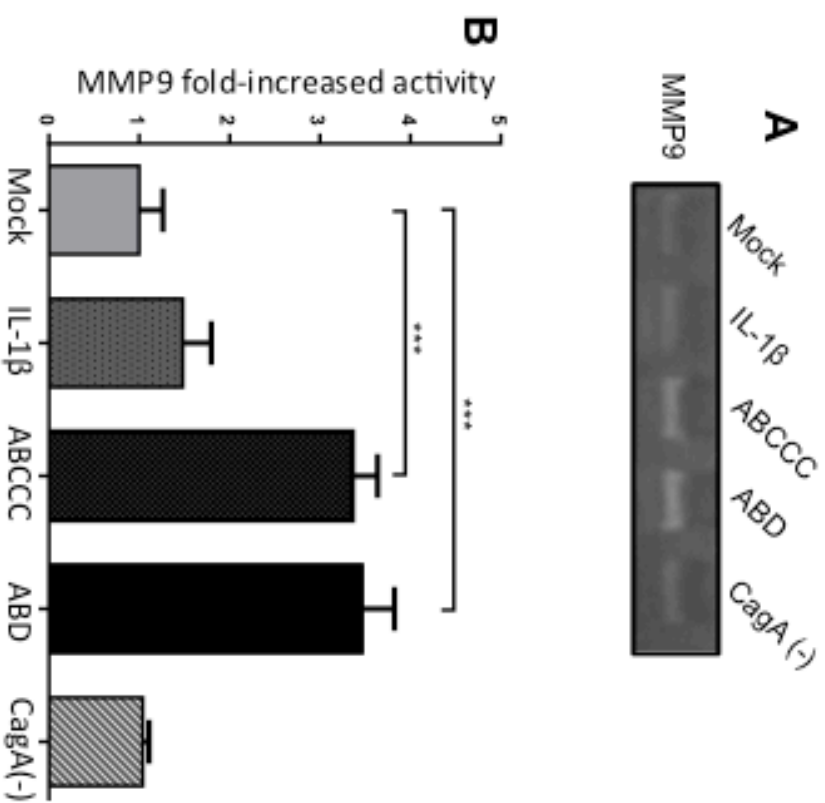




Figure 4



**IL-1 $\beta$  induces chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells  
by expressing genes involved in the control of cell cycle progression  
and apoptosis**

Haruki Arévalo Romero<sup>1,2</sup>, Jorge-Tonatiuh Ayala Sumuano<sup>3</sup>, Ezequiel M. Fuentes-Pananá<sup>2</sup>, and Isaura Meza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México 07360, México.

<sup>2</sup>Unidad de Investigación en Virología y Cáncer, Hospital Infantil de México Federico Gómez. Dr. Márquez 162, Colonia Doctores, Ciudad de México 06720, México.

<sup>3</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro 76230, México

Author to whom correspondence should be addressed. Isaura Meza. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Mexico DF 07360, Mexico. México D.F., México E-Mail: [imeza@cinvestav.mx](mailto:imeza@cinvestav.mx). Tel.: +52(55) 57473800 ext. 5000; Fax: +52(55) 57477002.

## **Abstract**

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy in the world and the first cause of death in women. In the tumor microenvironment the inflammatory interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) has been associated with tumor development and invasiveness in breast cancer. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) facilitates tumor progression favoring invasion, metastasis, chemoresistance and relapse, all of them observed in characteristic aggressive cancers. IL-1 $\beta$ -induced EMT triggers activation of PI3K/Rac pathways leading to expression of markers associated with cell migration and invasion. Recently, it has been found that IL-1 $\beta$  also activates the pathway IL-1R1/ $\beta$ -catenin, promoting transcription of *SNAIL*, *c-MYC* and *MMP2*, that are genes involved in the progression of a non-invasive to invasive phenotype of breast cancer cell line. However, it is still undefined the possible association between IL-1 $\beta$ -induced-EMT and the acquisition of chemoresistance in these cells. In this study, we analyzed the expression and participation of cell survival genes in an IL-1 $\beta$ -highly sensitive MCF-7 clone. These genes were found up regulated in a RNA-seq analysis of cells stimulated with IL-1 $\beta$ . The expression of genes *CDKN1A*, *TP63*, *BIRC3* and *SFN* was validated by real time-PCR. When stimulated cells were challenged with doxorubicin, drug resistance correlated with an increase of such genes. Our data showed that IL-1 $\beta$  stimulus induced resistance to doxorubicin through expression of cell survival genes.

Keywords: epithelial-mesenchymal transition; IL-1 $\beta$  stimulation; cell survival genes; inflammation; anti-cancer drugs

## **Introduction**

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy in the world and the first cause of cancer death in women [1]. Metastasis is a multistep process that leads to development of secondary tumors, which are considered a bad prognosis marker in patients [2]. It has been shown that metastasis is facilitated by the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process in which epithelial cells lose their organization becoming attuned to a mesenchymal phenotype [3]. Chronic inflammation has been implicated in several stages of the carcinogenesis process, from tumor initiation to tumor growth and invasiveness. Elevated levels of IL-1 $\beta$  have been observed in the microenvironment of invasive breast tumors [4].

Previous work from our group have shown that in non-invasive MCF-7 breast cancer cells, IL-1 $\beta$  induces the disruption of adherent junctions, loss of E-cadherin and dispersion of the cells that acquired a fibroblastic phenotype, suggesting the onset of the EMT program [5]. This program was initially induced through activation of PI3K/Rac signaling, reorganization of the actin cytoskeleton and subsequent expression of CXCR4 receptor, MMP2, MMP9 and S100A4 protein all of them important molecules that mark invasion and metastasis [5]. Further analysis of the EMT in MCF-7 cell clone, highly responsive to IL-1B (MCF-7 6D); showed that the cytokine leads to the activation of a novel pathway driven by IL-1R1 and  $\beta$ -catenin. In this pathway activation of the AKT kinase leads to downstream phosphorylation and inactivation of glycogen synthase

kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), a critical negative regulator of  $\beta$ -catenin. Once GSK3 $\beta$  was inactivated,  $\beta$ -catenin translocates to the nuclei where it functions together with TCF/LEF to induce expression of *c-MYC*, *CCDN1*, *SNAIL1* and *MMP2*. The expression of these genes correlated with enhanced proliferation, migration and invasion [6]. Although it has been recently shown that EMT is associated with the expression of transcription factors such as Snail and Twist, which acts as master regulators of EMT, it has not been shown that an inflammatory environment induced EMT also confers chemoresistance to anti-cancer drugs such as doxorubicin, etoposide or paclitaxel [7,8,9].

In this study, we analyzed whether the EMT program induced by IL-1 $\beta$  stimulation also conferred chemoresistance to MCF7 6D cells (6D cells). We used data from a RNA-seq analysis (our unpublished results) of MCF-7 6D cells stimulated with IL-1 $\beta$ . This analysis allowed identifying the up regulation of *CDKN1A*, *TP63* and *BIRC3* and *SFN*, which are involved in cell cycle regulation and apoptosis inhibition. As doxorubicin is one of the drugs widely used of clinic treatment of breast cancer, we determined the cell survival mediated by IL-1 $\beta$  by challenging the MCF-7 6D cells with the drug. Our results show that IL-1 $\beta$  besides inducing of EMT confers resistance to anti-cancer drugs such as doxorubicin.

## **Materials and methods**

### **Cell culture and stimulation with IL-1 $\beta$**

MCF-7 6D cells represent an IL-1 $\beta$ -highly responsive clone derived from MCF-7 (ATCC HTB-22, Manassas, VA, USA) [6]. Cells were grown in DMEM-F12 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA No. 11330-032) supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), penicillin, and streptomycin (both from Invitrogen). For experiments,  $2.5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> were seeded on culture dishes and cultured for 48 h. After switching to DMEM-F12 with 1% FBS for 18 h cells were cultured without serum and stimulated with 20 ng/ml of human recombinant IL-1 $\beta$  (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 48 h. Control cells were cultured in the same way but not stimulated with the cytokine.

### **Reverse transcription and quantitative PCR**

Total RNA was isolated with Trizol (Invitrogen) and isopropyl alcohol precipitation. Complementary DNA was obtained using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen), following manufacturer's instructions. Gene expression was measured by using FastStart SYBR Green Master (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) in a Real Time 7500 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Relative expression levels were calculated by using  $2^{\Delta\Delta Ct}$  equation. The data were normalized to the value of the housekeeping *RPLP0* gene. Specific primers for target genes are show in supplementary table S1.

## **Western Blotting**

Protein extracts were obtained lysing cells with RIPA buffer (Millipore, Billerica, MA, USA) containing Complete<sup>®</sup> protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science Mannheim, Germany). Fifty micrograms of protein were loaded in 10% polyacrylamide gels and separated by (SDS-PAGE) and electro-transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After blocking with 10% low-fat milk in TBS/0.1% Tween 20 the membranes were incubated with the primary antibodies: c-IAP2/BIRC3 (Cell Signaling Technology, Danvers MA U.S.A No. 3130) and anti- $\beta$ -actin monoclonal antibody as a loading control [kindly donated by Dr. J.M. Hernández (CINVESTAV-IPN)]. Finally, membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies and revealed with Supersignal West Femto reagent (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Reactive protein bands were quantitatively evaluated by scanning densitometry using the NIH ImageJ software.

## **IL-1 $\beta$ –resistance to doxorubicin**

MCF-7 6D cells were cultured and stimulated with IL-1 $\beta$  as previously described. Then, cells were incubated with 500 nm doxorubicin (PISA Farmacéutica, Guadalajara, Mexico) in DMEM-F12 containing 20 ng/ml IL-1 $\beta$  for 4 days at 37°C, changing the media every two days. To evaluate the number of viable/apoptotic cells, cultures were then stained with Calcein AM (dilution



1:4000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1 mg/ml propidium iodide (Biolegend, San Diego, CA, USA) for 25 min. The number of live cells was evaluated by counting green fluorescent cells in 5 fields randomly chosen using an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX50). Field images were taken with the DP72 digital camera and analyzed with Image-Pro Plus software (V7.0) media Cybernetics (Silver Spring MD, USA).

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation. For comparisons between data groups, Mann–Whitney U test was applied. A P value equal or lower than 0.05 was used to establish significances between groups.

### **Results**

#### **Interleukin 1 $\beta$ -induces expression of chemoresistance related genes**

The EMT has been associated with chemoresistance of tumor cells and it is believed that this transition is responsible for tumor relapse [20]. Since IL-1 $\beta$  has been reported to promote EMT and it is a critical component of the inflammatory microenvironment that surrounds a tumor, we searched for gene candidates that promote chemoresistance in a RNA-seq analysis of IL-1 $\beta$ -stimulated MC-7 6D cells (Our unpublished results).

The data obtained were analyzed using the Gene Set Analysis Toolkit WEB-based program [10,11] in order to evaluate which genes that were associated with resistance to chemotherapy routinely used in the treatment of breast cancer. The results showed that IL-1 $\beta$  was able to induce an increase in different genes associated with resistance to various chemotherapeutics such as cisplatin, doxorubicin, daunorubicin and paclitaxel (our unpublished results).

After this analysis the candidate genes were: *CDKN1A* (CDK inhibitor p21), *TP63* (tumor protein p63), *BIRC3* (cIAP-2) and *SFN* (Stratafin), which showed an increase in their expression of at least 2-fold with a Benjamini-Hochberg FDR lower than 0.001, when MCF-7 6D cells were stimulated with IL-1 $\beta$ . The genes that showed higher increase in their expression after stimulation were *BIRC3* (12.9-fold) and *TP63* (3.5-fold). Other genes also up regulated but with lower increases were *CDKN1A* (2-fold) and *SFN* (2.1-fold) (Figure 1).

To confirm changes in the expression of these genes, their expression was validated by qPCR. Figure 2A shows that after IL-1 $\beta$ -stimulation, MCF-7 6D cells increased expression of *CDKN1A* by 2.4-fold compared to the control cells. For *TP63* expression, an increase of 2-fold in stimulated cells was observed, while for *BIRC3* the increase was of 63.9-fold. In contrast, a limited increase in the expression of *SFN* with a value of 1.4-fold was observed after IL-1 $\beta$ -stimulation. These results confirmed that IL-1 $\beta$  up regulates expression of genes known to control cell cycle and apoptosis, which lead to an increased cell survival.

From the above data it seems that IL-1 $\beta$  particularly targets the up-regulation of *BIRC3*. We picked this gene to confirm the IL-1 $\beta$ -induced gene expression by measuring the protein levels. To do this, cell extracts from parental MCF-7 and cloned MCF-7 6D cells obtained after treatment with IL-1 $\beta$  were analyzed by Western blot. Figure 2B shows that BIRC3 levels were increased in both cell lines (+IL-1 $\beta$  lanes). Densitometry analysis of blots showed that IL-1 $\beta$  stimulation increased 2.4-fold the BIRC3 levels in MCF-7 cells and 5-fold in MCF-7 6D cells, compared to their non-stimulated controls. These results confirm that IL-1 $\beta$  stimulus induces expression of a gene set that has been shown to be involved in cell survival by escaping apoptosis.

#### **Breast cancer cell stimulated with IL-1 $\beta$ acquired resistance to doxorubicin.**

The results above showed that IL-1 $\beta$  up regulates the expression of genes associated with cell survival and apoptosis. As doxorubicin is one of the most commonly used drugs to treat breast cancer [21], we chose this drug to evaluate the capacity of stimulated cells to survive doxorubicin treatment. As shown in Figure 3A when cell viability was measured in both control and IL-1 $\beta$ -stimulated MCF-7 6D cells most of them were determined as viable by using Calcein AM (green signal), a marker of live cells. However, when MCF-7 6D cells were treated with doxorubicin an increase number of apoptotic cells was observed. In contrast, when cells were stimulated with IL-1 $\beta$  and challenged with

doxorubicin few apoptotic cells were detected, indicating that the IL-1 $\beta$  stimulus confers resistance to doxorubicin-induced death. As control for cell death, non-stimulated and stimulated cells were irradiated with UV radiation. In these conditions we did not observe viable cells, as all cells showed internalized propidium iodide (red). Quantification of cell viability (Figure 3B) shows that IL-1 $\beta$ -stimulated 6D cells have a 3-fold higher survival rate than cells only treated with doxorubicin. These data show that IL-1 $\beta$  confers to breast cancer cells an increased resistance to doxorubicin-induced death. Considering that IL-1 $\beta$  induces promotion of the EMT program [6] and up regulation of genes controlling both cell cycle and apoptosis, it is plausible to consider that IL-1 $\beta$  could induce chemoresistance through EMT.

## **Discussion**

Breast cancer is a disease affecting millions of women worldwide [1]. The main cause of death of cancer patients is tumor metastasis, which is believed to be promoted by a microenvironment rich in growth factors and inflammatory cytokines [12]. Previously reported evidence support a critical role for IL-1 $\beta$  in cancer progression; and, particularly in breast cancer elevated levels of IL-1 $\beta$  have been reported in the microenvironment of invasive breast tumors [4]. Previous work of our group with the MCF-7 cell line showed that stimulation with IL-1 $\beta$  results in disassembly of their adherent junctions and loss of E-cadherin; thus, cells acquire a fibroblastic shape with increased mobility and matrix

degradation activity. The induction of these changes by IL-1 $\beta$  suggested the possible activation of the EMT program [5]. Later, it was found that the rearrangement of the actin cytoskeleton required for the increased motility was induced by activation of PI3K/Rac and PI3K/AKT signaling pathways that lead to expression of different genes that drive proliferation, migration and invasion, all of them mechanism associated with tumor progression [6].

Several studies have established the link between the EMT and chemoresistance. In breast cancer cell lines, Twist1 mediates Adriamycin-induced EMT relates to multidrug resistance and invasive potential [7]. Moreover, these EMT program was also observed in MCF-7 cells resistant to tamoxifen [8]. This was later correlated with increased levels of the mesenchymal markers N-cadherin and vimentin, mediated by Snail transcriptional activity [9,13]. Ectopic expression of Twist in the non-invasive breast MDA-MB-435 cell line leads to EMT and has been correlated with increased invasion activity and resistance to paclitaxel [14]. Because of the relationship between the EMT program and chemoresistance new anti-cancer therapies are being directed to block EMT, looking to restore the tumor sensitivity to different drugs. For example, the knock down of *Snail* and *Twist* with short interfering RNAs are reported to restore the sensitivity to cisplatin in A549 lung cells [15,16].

In this study, we identified from RNA-seq analysis that IL-1 $\beta$  induces the up regulation of genes involved in cell survival, which contributes to chemoresistance to doxorubicin. Drug resistance mechanisms have been

classified into different categories that include: increased expression of genes required for cellular processes such as drug transport, DNA repair, cell cycle progression and apoptosis [17]. Our results here show that genes up regulated in IL-1 $\beta$ -stimulated MCF-7 6D cells are participating in some of these processes: *CDKN1A* (a regulator of cell cycle progression), *TP63* (a regulator of cell cycle progression, apoptosis and DNA repair) and particularly *BIRC3* (an inhibitor of apoptosis).

Studies using wild type MCF-7 cells resistant to doxorubicin have shown that they have an increased expression of *CDKN1A* [18]. This gene encodes for p21 that controls the G2/M and G1/S transitions of cell cycle [19,20]. Other studies, using breast and pancreatic cancer cell lines showed that induction of *CDKN1A* is a common mechanism of resistance to different drugs [21,22,23]. Our results are the first to show that resistance to doxorubicin occurs through the stimulus of IL-1 $\beta$  and EMT program by the activation of the IL-1R1/B-catenin described previously by our group. It has been shown that p21 may promote chemoresistance by inactivating the Cdk1-ciclin B complex after DNA damage, arresting cells in the G2/M transition and thus preventing cells entering in apoptosis [24]. Therefore, the up regulation of p21 in 6D cells would suppress the doxorubicin-induced death.

Another mechanism that promotes resistance to different drugs is the regulation of the apoptotic pathways. A study using liver cancer cell lines showed that  $\Delta$ p63 isoform confers resistance to doxorubicin by inhibiting the expression of pro-

apoptotic proteins Bax, Bim and NOXA [25]. Other studies using different cancer cell lines show that this isoform confers resistance to cisplatin by inactivation of the apoptotic process mediated by P53 and TAp73 [26,27,28]. Besides the up regulation of TP63 expression, we found increased expression of *BIRC3*, another gene participating in apoptosis regulation. Therefore, the observed up regulation of these genes by 6D cells could be an additional or alternative mechanism to escape from doxorubicin-induced death.

Our previous results have shown that blockage of MyD88 negatively affects the IL-1R1 signal that initiates the EMT program [6]. Interestingly the canonical signaling pathway of IL-1 $\beta$  leads to activation of NF- $\kappa$ B and several anti-apoptotic genes, including *BIRC3*, that are NF- $\kappa$ B target genes [29] suggesting that this mechanism is responsible for *BIRC3* expression observed in IL-1 $\beta$ -stimulated MCF-7 6D cells. BIRC3 protein belongs to the family of inhibitors of apoptosis (IAPs), whose members bind and inactivate caspases controlling intrinsic and extrinsic apoptotic pathways [30,31]. This mechanism for caspase inhibition has been well documented in ovarian and prostate cancers cell lines that are resistant to cisplatin [32,33]. Taken all together, these changes in cell cycle and apoptotic genes suggest that these mechanisms are responsible for the resistance to doxorubicin observed in our cell model. However, so far we have only shown that IL-1 $\beta$ -stimulated 6D cells develop resistance to doxorubicin that is correlated with increased expression of genes participating in DNA repair, cell cycle and apoptosis. Still, the direct link between these genes and drug resistance requires further research. Collectively those studies and our present

data support that the EMT program is an important mechanism to confer chemoresistance and show the importance of the inflammatory microenvironment mediated by IL-1 $\beta$  how an inductor of the tumor progression.

### **Acknowledgements**

The authors thank R. Bonilla-Moreno for generous support with molecular biology techniques and MC Dominguez-Robles and A. Trejo for technical assistance. This work was supported by grants 166462 to IM, 176880 to EMFP, and 238566 to JTAS, all from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico). HAR acknowledges financial support from CONACyT (predoctoral fellow 209637) and a scholarship from Instituto Mexicano del Seguro Social.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.



## References

- [1] S.I. Ferlay J, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Formann D, Bray F. , GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11., (2013).
- [2] D.X. Nguyen, J. Massague, Genetic determinants of cancer metastasis, *Nat Rev Genet* 8 (2007) 341-352.
- [3] R. Kalluri, R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J Clin Invest* 119 (2009) 1420-1428.
- [4] S.R. Paludan, Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects, *J Leukoc Biol* 67 (2000) 18-25.
- [5] J. Franco-Barraza, J.E. Valdivia-Silva, H. Zamudio-Meza, A. Castillo, E.A. Garcia-Zepeda, L. Benitez-Bribiesca, I. Meza, Actin cytoskeleton participation in the onset of IL-1beta induction of an invasive mesenchymal-like phenotype in epithelial MCF-7 cells, *Arch Med Res* 41 (2010) 170-181.
- [6] E.A. Perez-Yopez, J.T. Ayala-Sumuano, R. Lezama, I. Meza, A novel beta-catenin signaling pathway activated by IL-1beta leads to the onset of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells, *Cancer Lett* 354 (2014) 164-171.
- [7] Q.Q. Li, J.D. Xu, W.J. Wang, X.X. Cao, Q. Chen, F. Tang, Z.Q. Chen, X.P. Liu, Z.D. Xu, Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal

- transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells, *Clin Cancer Res* 15 (2009) 2657-2665.
- [8] S. Hiscox, W.G. Jiang, K. Obermeier, K. Taylor, L. Morgan, R. Burmi, D. Barrow, R.I. Nicholson, Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation, *Int J Cancer* 118 (2006) 290-301.
- [9] O.D. Iseri, M.D. Kars, F. Arpaci, C. Atalay, I. Pak, U. Gunduz, Drug resistant MCF-7 cells exhibit epithelial-mesenchymal transition gene expression pattern, *Biomed Pharmacother* 65 (2011) 40-45.
- [10] B. Zhang, S. Kirov, J. Snoddy, WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) W741-748.
- [11] J. Wang, D. Duncan, Z. Shi, B. Zhang, WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013, *Nucleic Acids Res* 41 (2013) W77-83.
- [12] Z.I. Khamis, Z.J. Sahab, Q.X. Sang, Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis, *Int J Breast Cancer* 2012 (2012) 574025.
- [13] M.R. Kim, H.K. Choi, K.B. Cho, H.S. Kim, K.W. Kang, Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells, *Cancer Sci* 100 (2009) 1834-1841.
- [14] G.Z. Cheng, J. Chan, Q. Wang, W. Zhang, C.D. Sun, L.H. Wang, Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel, *Cancer Res* 67 (2007) 1979-1987.

- [15] W. Zhuo, Y. Wang, X. Zhuo, Y. Zhang, X. Ao, Z. Chen, Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway, *Lung Cancer* 62 (2008) 8-14.
- [16] W.L. Zhuo, Y. Wang, X.L. Zhuo, Y.S. Zhang, Z.T. Chen, Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway, *Biochem Biophys Res Commun* 369 (2008) 1098-1102.
- [17] B.C. Baguley, Multiple drug resistance mechanisms in cancer, *Mol Biotechnol* 46 (2010) 308-316.
- [18] S. AbuHammad, M. Zihlif, Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line, *Genomics* 101 (2013) 213-220.
- [19] J.W. Harper, G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S.J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell* 75 (1993) 805-816.
- [20] V. Dulic, G.H. Stein, D.F. Far, S.I. Reed, Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition, *Mol Cell Biol* 18 (1998) 546-557.
- [21] V.S. Hawthorne, W.C. Huang, C.L. Neal, L.M. Tseng, M.C. Hung, D. Yu, ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells, *Mol Cancer Res* 7 (2009) 592-600.

- [22] A. Moller, C. Malerczyk, U. Volker, H. Stoppler, E. Maser, Monitoring daunorubicin-induced alterations in protein expression in pancreas carcinoma cells by two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics* 2 (2002) 697-705.
- [23] W. Yang, K.S. Klos, X. Zhou, J. Yao, Y. Yang, T.L. Smith, D. Shi, D. Yu, ErbB2 overexpression in human breast carcinoma is correlated with p21Cip1 up-regulation and tyrosine-15 hyperphosphorylation of p34Cdc2: poor responsiveness to chemotherapy with cyclophosphamide methotrexate, and 5-fluorouracil is associated with Erb2 overexpression and with p21Cip1 overexpression, *Cancer* 98 (2003) 1123-1130.
- [24] D. Yu, T. Jing, B. Liu, J. Yao, M. Tan, T.J. McDonnell, M.C. Hung, Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase, *Mol Cell* 2 (1998) 581-591.
- [25] H.M. Mundt, W. Stremmel, G. Melino, P.H. Krammer, T. Schilling, M. Muller, Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways, *Biochem Biophys Res Commun* 396 (2010) 335-341.
- [26] R.N. Matin, A. Chikh, S.L. Chong, D. Mesher, M. Graf, P. Sanza, V. Senatore, M. Scatolini, F. Moretti, I.M. Leigh, C.M. Proby, A. Costanzo, G. Chiorino, R. Cerio, C.A. Harwood, D. Bergamaschi, p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis, *J Exp Med* 210 (2013) 581-603.

- [27] A.V. Danilov, D. Neupane, A.S. Nagaraja, E.V. Feofanova, L.A. Humphries, J. DiRenzo, M. Korc, DeltaNp63alpha-mediated induction of epidermal growth factor receptor promotes pancreatic cancer cell growth and chemoresistance, *PLoS One* 6 (2011) e26815.
- [28] C.O. Leong, N. Vidnovic, M.P. DeYoung, D. Sgroi, L.W. Ellisen, The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers, *J Clin Invest* 117 (2007) 1370-1380.
- [29] M. Gyrd-Hansen, P. Meier, IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer, *Nat Rev Cancer* 10 (2010) 561-574.
- [30] Q.L. Deveraux, N. Roy, H.R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, J.C. Reed, IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases, *EMBO J* 17 (1998) 2215-2223.
- [31] C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, A.S. Baldwin, Jr., NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science* 281 (1998) 1680-1683.
- [32] T. Nomura, M. Yamasaki, Y. Nomura, H. Mimata, Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells, *Oncol Rep* 14 (2005) 993-997.
- [33] S. Cohen, I. Bruchim, D. Graiver, Z. Evron, V. Oron-Karni, M. Pasmanik-Chor, R. Eitan, J. Bernheim, H. Levavi, A. Fishman, E. Flescher, Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the

increased expression of its target cIAP-2, J Mol Med (Berl) 91 (2013) 357-368.

## Figure legends

**Figure 1. Changes in the expression of genes involved in cell survival and apoptosis.** MCF-7 6D cells were stimulated with IL-1 $\beta$  for 48 h and mRNA was used to perform a RNA-seq analysis (our unpublished results). From this analysis, we selected a set of genes involved in cell survival and apoptosis. Gene expression is presented as Log<sub>2</sub> fold change and values above each gene represent the Benjamini-Hochberg false discovery rate to establish significant differences between stimulated and non-stimulated cells.

**Figure 2. IL-1 $\beta$  up regulates the expression of a gene set that participates in the control of cell cycle and apoptosis.** A. Relative expression of *CDKN1A*, *TP63*, *BIRC3* and *SFN* genes determined by qPCR in MCF-7 6D cells under no stimulation conditions (black symbols) or stimulated with IL-1 $\beta$  (blue symbols). Data is presented as the mean of three independent experiments plus/minus standard deviation (n=9). Asterisks represent a P value lower than 0.01. B. Representative Western blot of total extracts from MCF-7 and MCF-7 6D cells non-stimulated (NS) or stimulated with IL-1 $\beta$  (+IL-1 $\beta$ ) for 48 h, and challenged with an anti-BIRC3 antibody.  $\beta$ -actin was used as a load control. C. Densitometry analysis obtained from three independent experiments. In all of them BIRC3

expression was normalized with respect to protein expression in non-stimulated conditions. Asterisk represents a P value equal to 0.0001.

**Figure 3. IL-1 $\beta$  stimulation confers resistance to doxorubicin-induced apoptosis in MCF-7 6D cells.** A. Representative micrographs of cells stained with Calcein AM/propidium iodide showing the amount of viable MCF-7 6D cells under stimulus with IL-1 $\beta$  and challenged with doxorubicin. As a control of cell death stimulated cells were exposed to UV radiation. B. Quantification of viable MCF-7 6D cells, stimulated with IL-1 $\beta$  and challenged with doxorubicin. Cells in five randomly selected fields were counted in each condition in three independent experiments (n=15). Data are presented as mean plus/minus standard deviation. Asterisk represents a P value equal to 0.0001.

Figure 1

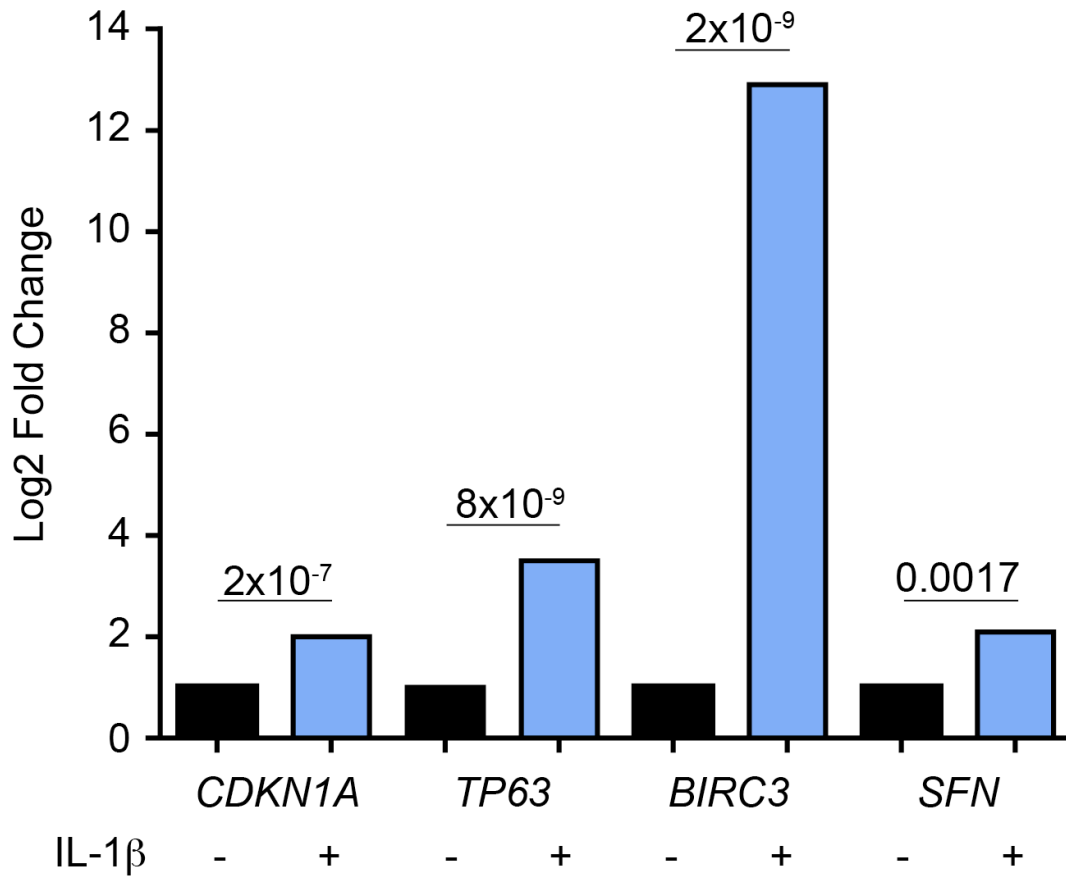




Figure 2

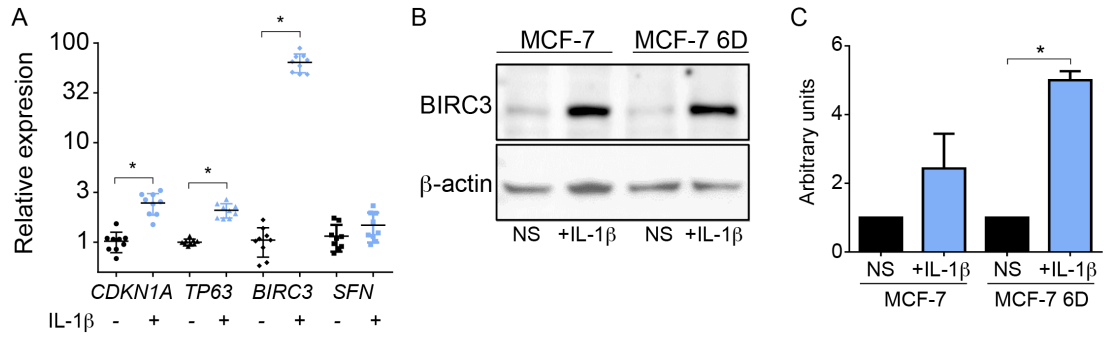


Figure 3

