



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Senescencia e inflamación en cáncer: Efecto de las citoquinas IL6 e IL8 en la inducción de la transición epitelio-mesenquimal y de CD44 en el desarrollo de funciones *stem* en células epiteliales tumorales.**

**Paola Ortiz Montero, Bióloga**

**Doctorado en Ciencias Biomédicas**  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá  
2018

**Senescencia e inflamación en cáncer: Efecto de las citoquinas IL6 e IL8 en la inducción de la transición epitelio-mesenquimal y de CD44 en el desarrollo de funciones *stem* en células epiteliales tumorales.**

**Paola Ortiz Montero, Bióloga, MSc.**

Tesis presentada como requisito para recibir el título de Doctora en Ciencias Biomédicas

**Director**

**Dr. Jean Paul Vernot, Biólogo, PhD,**  
Grupo de Fisiología Celular y Molecular (FCM),  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Facultad de Medicina, UNAL, Bogotá, Colombia

**Co-Director**

**Dr. Arturo Londoño-Vallejo, MD, PhD,**  
Grupo de “Telómeros y cáncerr”,  
Instituto Curie, Paris (TCIC)

**INSTITUCIÓN**

**Doctorado en Ciencias Biomédicas**  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá  
2018

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi familia, en especial a mis padres Esperanza y David por su apoyo durante este proceso.

Quiero expresar mi más sincero y muy especial agradecimiento a mi profesor, maestro, amigo y director Dr. Jean Paul Vernot, por haber sido una fuente de motivación para mi trabajo, por su infinita sabiduría y su ejemplar dedicación y pasión por la investigación.

Agradezco también al Dr. Arturo Londoño Vallejo, director del laboratorio de Telómeros y Cáncer del Instituto Curie (Paris), y a su grupo de trabajo, en especial a Mike y Celine por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por todas sus enseñanzas, su apoyo científico y personal.

También quiero agradecerles a mis compañeros de grupo de trabajo, Natalia Ospina, Paola Ruiz, Natalia Vanegas, Alejandra Rodríguez e Ivana, con quienes he tenido la fortuna de compartir no solo experiencias académicas laborales sino también su amistad, en especial a David Bernal con quién compartí desde el principio este camino durante el cual me brindo no solo su amistad sino su apoyo académico; a Yolanda Cardenas por su valiosa amistad y con quién disfrute de los buenos y malos momentos durante este proceso, y en general a todos mis amigos que me acompañaron en este proceso. A Sebastian Sanz por su amistad incondicional y generosidad.

Este trabajo fue financiado por el Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Colciencias (Contract No RC-692–2013).

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTADO DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b> .....	11
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	12
<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS</b> .....	13
<b>RESUMEN</b> .....	15
<b>ABSTRACT</b> .....	18
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>Objetivo general</b> .....	29
<b>Objetivos específicos</b> .....	29
<b>HIPOTESIS</b> .....	30
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	31
<b>Heterogeneidad celular en los tumores</b> .....	31
<b>Células <i>stem</i> cancerígenas (CSC)</b> .....	33
<b>Transición epitelio-mesenquimal (EMT)</b> .....	40
<b>Transición epitelio-mesenquimal (EMT) e inflamación</b> .....	42
<b>Transición epitelio-mesenquimal (EMT), CSC y tumorigenicidad</b> .....	42
<b>Microambiente tumoral, inflamación y CSC</b> .....	45
<b>Senescencia celular</b> .....	47
<b>Senescencia celular y progresión tumoral</b> .....	49
<b>Senescencia celular, inflamación y progresión tumoral</b> .....	50
<b>Papel de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 en la progresión tumoral</b> .....	52
<b>METODOLOGÍA</b> .....	55
<b>Líneas celulares y condiciones de cultivo</b> .....	55
<b>Obtención del medio condicionado senescente (MeCoSe)</b> .....	55
<b>Inducción de la transición epitelio-mesenquimal</b> .....	55
<b>1. Tratamiento de las líneas celulares derivadas de cáncer de seno con MeCoSe</b> .....	56
<b>2. Tratamiento de las líneas celulares derivadas de cáncer de seno con citoquinas y anticuerpos neutralizantes</b> .....	56
<b>3. Tratamiento de las líneas celulares derivadas de cáncer de seno con el inhibidor de Stat3</b> .....	56



<b>Evaluación y caracterización de la EMT</b> .....	57
<b>Determinación de la proliferación celular</b> .....	57
1. <b>Determinación de la proliferación celular por recuento celular</b> .....	57
2. <b>Evaluación de la expresión del marcador de proliferación Ki-67</b> .....	57
3. <b>Determinación de la proliferación celular por la marcación con BrdU</b> .....	58
4. <b>Determinación de la proliferación celular con EDU</b> .....	58
<b>Evaluación de las características fenotípicas asociadas a la EMT</b> .....	59
1. <b>Evaluación de la expresión de marcadores asociados a la EMT por citometría de flujo</b> .....	59
2. <b>Separación celular por citometría de flujo</b> .....	59
3. <b>Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real (qRT-PCR)</b> .....	60
4. <b>Evaluación de la expresión de marcadores asociados a EMT y de los FTs Stat3 y NF-kB por Western Blot</b> .....	61
5. <b>Análisis por inmunohistoquímica (IHC) de marcadores asociados a la EMT</b> 62	
<b>Evaluación de las características funcionales asociadas a la EMT</b> .....	62
1. <b>Determinación de la capacidad de migración celular</b> .....	62
2. <b>Determinación de la capacidad de invasión celular</b> .....	63
3. <b>Evaluación de la capacidad de adhesión celular</b> .....	63
<b>Evaluación de características asociadas a un fenotipo de células <i>stem</i></b> .....	64
1. <b>Evaluación de la capacidad clonogénica</b> .....	64
2. <b>Evaluación de la capacidad de autorrenovación</b> .....	64
3. <b>Evaluación de la capacidad de proliferación de las células presentes en las mamoesferas</b> .....	64
4. <b>Evaluación de la capacidad de diferenciación multilinaje</b> .....	65
5. <b>Determinación de la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1)</b> .....	66
6. <b>Evaluación de la capacidad tumorigénica</b> .....	66
<b>Evaluación de la inducción de senescencia e inflamación.</b> .....	67
1. <b>Ensayo <math>\beta</math>-galactosidasa asociado a senescencia (SA-<math>\beta</math>GAL)</b> .....	67
2. <b>Evaluación de la producción de ROS intracelular y mitocondrial</b> .....	67
3. <b>Evaluación de citoquinas inflamatorias humanas</b> .....	68
4. <b>Evaluación del nivel de expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias</b> .....	68
<b>Evaluación del papel de IL6 e IL8 en la línea celular MDA-MB-231</b> .....	68
<b>Análisis estadístico</b> .....	69

<b>RESULTADOS</b> .....	70
<b>CAPITULO I. Un microambiente senescente induce un fenotipo EMT, propiedades de células <i>stem</i> y capacidad tumorigénica</b> .....	70
<b>Un microambiente senescente induce plasticidad epitelial (EMT-MET) y capacidad tumorigénica</b> .....	70
<b>El tratamiento con el MeCoSe induce un programa de EMT en células MCF-7</b> .....	72
<b>El tratamiento con IL6 e IL8 reproduce los cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales inducidos por el MeCoSe en las células MCF-7</b> .....	76
<b>Células MCF-7 estimuladas con MeCoSe o con IL6 o IL8 muestran propiedades de células <i>stem</i></b> .....	82
<b>CAPITULO II. La neutralización de IL6 e IL8 y las vías de señalización activadas determinan su papel en la EMT, en la expresión de CD44 y en la adquisición de funciones específicas</b> .....	89
<b>Anticuerpos neutralizantes de IL6 e IL8 revierten el efecto del MeCoSe</b> .....	89
<b>Stat3 participa en la inducción de la EMT y en la generación de células <i>stem</i></b> .....	93
<b>La expresión de CD44 inducida por IL6 e IL8 se asocia con la inducción de algunas propiedades funcionales, pero no de autorrenovación</b> .....	99
<b>CAPITULO III. Senescencia e inflamación se refuerzan recíprocamente y se asocian con la generación de células <i>stem</i></b> .....	106
<b>El tratamiento con el MeCoSe induce un mecanismo autocrino de producción de IL6 e IL8 y senescencia en las células MCF-7</b> .....	106
<b>Un microambiente pro-inflamatorio induce senescencia a través de un aumento en la producción de ROS</b> .....	109
<b>CAPITULO IV. Relación entre las características de células <i>stem</i>, la agresividad tumoral y la capacidad tumorigénica</b> .....	111
<b>Células MDA-MB-231 secretoras de IL6 e IL8 muestran un fenotipo similar a la EMT, pero exhiben propiedades parciales/incompletas de células <i>stem</i></b> .....	111
<b>El modelo de células HEK corrobora que la adquisición de un fenotipo <i>stem</i> no se relaciona con una mayor tumorigenicidad</b> .....	118
<b>Las subpoblaciones celulares CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> difieren dramáticamente en su potencial tumorigénico</b> .....	125
<b>Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> muestran características de células <i>stem</i></b> .....	128
<b>Células HEK CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan un perfil de expresión génica asociado a inflamación</b> .....	136
<b>DISCUSIÓN</b> .....	139
<b>Un microambiente senescente/pro-inflamatorio induce un fenotipo híbrido en las células MCF-7 asociado a la adquisición de una EMT parcial</b> .....	140

<b>Un microambiente senescente/pro-inflamatorio se asocia con la generación de células con propiedades de células <i>stem</i></b> .....	142
<b>Las citoquinas IL6 e IL8, la activación de vías de señalización, y la expresión de CD44 participan en la inducción de la EMT y el mantenimiento de células <i>stem</i></b> ..	143
<b>Senescencia e inflamación se refuerzan recíprocamente a través de la producción de IL6 e IL8 y se asocian con la generación de células <i>stem</i></b> .....	147
<b>Relación entre las características de células <i>stem</i>, la agresividad tumoral y la capacidad tumorigénica</b> .....	150
<b>La adquisición de <i>stemness</i> es dependiente del contexto celular, y define el potencial tumorigénico de células derivadas del modelo HEK</b> .....	152
<b>CONCLUSIONES</b> .....	160
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	161
<b>FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b> .....	162
<b>TABLAS</b> .....	173
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	174
<b>ANEXOS</b> .....	207

## LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1. Un microambiente senescente induce un aumento en la heterogeneidad y en las capacidades de células stem en un modelo de células HEK inmortalizadas.</i> .....	71
<i>Figura 2. Línea celular y caracterización de fibroblastos senescentes .</i> .....	72
<i>Figura 3. Caracterización del MeCoSe.</i> .....	73
<i>Figura 4. El tratamiento con el MeCoSe indujo cambios morfológicos asociados a un programa de EMT en células MCF-7.</i> .....	74
<i>Figura 5. El tratamiento con el MeCoSe indujo cambios en la expresión de marcadores y FTs asociados a la EMT.</i> .....	75
<i>Figura 6. El tratamiento con el MeCoSe indujo un aumento en la capacidad de migración de células MCF-7.</i> .....	76
<i>Figura 7. El tratamiento con la IL6 y la IL8 indujo cambios morfológicos y fenotípicos asociados con un programa de EMT.</i> .....	77
<i>Figura 8. El tratamiento con IL6 e IL8 indujo un aumento en la capacidad de migración de células MCF-7.</i> .....	78
<i>Figura 9. Evaluación de la proliferación de las células MCF-7 durante el ensayo de migración.</i> .....	79
<i>Figura 10. El tratamiento con IL6 e IL8 indujo un aumento en la capacidad de invasión y de adhesión en las células MCF-7.</i> .....	80
<i>Figura 11. El tratamiento con citoquinas proinflamatorias indujo un aumento en el nivel de expresión génica de factores de transcripción asociados a EMT.</i> .....	81
<i>Figura 12. El tratamiento con IL6 e IL8 indujo cambios en la proliferación de células MCF-7 y en la expresión del marcador de proliferación Ki-67.</i> .....	82
<i>Figura 13. Las células MCF-7 estimuladas con MeCoSe adquieren propiedades de autorrenovación.</i> .....	83
<i>Figura 14. Las células MCF-7 estimuladas con citoquinas adquirieron propiedades de autorenovación.</i> .....	84
<i>Figura 15. Células MCF-7 estimuladas con MeCoSe adquieren propiedades de autorenovación.</i> .....	85
<i>Figura 16. Células MCF-7 estimuladas con citoquinas mantienen sus propiedades de autorenovación.</i> .....	86
<i>Figura 17. Células MCF-7 tratadas con IL6 e IL8 presentan características asociadas a un potencial de diferenciación.</i> .....	87
<i>Figura 18. Células MCF-7 estimuladas con citoquinas o MeCoSe expresan FTs asociados a reprogramación.</i> .....	88
<i>Figura 19. Neutralización de las citoquinas IL6 e IL8 presentes en el MeCoSe.</i> .....	89
<i>Figura 20. Las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 son requeridas para la inducción de cambios morfológicos y fenotípicos asociados con el programa de EMT.</i> .....	90
<i>Figura 21. El tratamiento con anticuerpos neutralizantes inhibió la capacidad de migración de las células MCF-7.</i> .....	91
<i>Figura 22. El tratamiento con anticuerpos neutralizantes inhibió la capacidad de autorrenovación de las células MCF-7.</i> .....	92
<i>Figura 23. Efecto de WP1066 en la activación de Stat3 en células MCF-7 estimuladas con citoquinas.</i> .....	94

<b>Figura 24. Stat3 regula parcialmente el programa de EMT en células MCF-7 estimuladas con citoquinas.</b> .....	95
<b>Figura 25. El tratamiento con WP1066 inhibió la capacidad de migración de las células MCF-7.</b> .....	96
<b>Figura 26. El tratamiento con WP1066 inhibió la capacidad de invasión de las células MCF-7.</b> .....	97
<b>Figura 27. Stat3 juega un papel importante en la adquisición de propiedades pro-tumorigénicas.</b> .....	98
<b>Figura 28. El tratamiento con IL8 potenció la capacidad de formación de esferas de las células MCF-7.</b> .....	99
<b>Figura 29. El tratamiento con IL8 indujo un ligero incremento en la población de células stem (CD44+).</b> .....	100
<b>Figura 30. Citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 inducen una mayor capacidad de adhesión en las células MCF-7 CD44<sup>Medio</sup> CD24<sup>Alto</sup>.</b> .....	102
<b>Figura 31. Citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 inducen una mayor capacidad de migración en las células MCF-7 CD44<sup>Medio</sup> CD24<sup>Alto</sup>.</b> .....	103
<b>Figura 32. Citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 indujeron células con características stem en las células MCF-7 CD44<sup>Medium</sup> CD24<sup>Low</sup>.</b> .....	104
<b>Figura 33. Las mamoesferas contienen una pequeña población de células que retienen el marcador de proliferación CFSE.</b> .....	105
<b>Figura 34. El MeCoSe incrementa la expresión de IL6 e IL8 en células MCF-7.</b> .....	106
<b>Figura 35. El tratamiento con IL6 e IL8 indujo senescencia en las células MCF-7.</b> ....	107
<b>Figura 36. El tratamiento prolongado con citoquinas pro-inflamatorias indujo un aumento en la senescencia de células MCF-7.</b> .....	108
<b>Figura 37. El MeCoSe incrementó la expresión de IL6 e IL8 en células MCF-7 lo cual se asoció a un estado de senescencia irreversible.</b> .....	109
<b>Figura 38. El tratamiento con citoquinas o con MeCoSe indujo un aumento en los niveles de ROS.</b> .....	110
<b>Figura 39. La neutralización de IL6 e IL8 redujo la senescencia observada en las células MCF-7.</b> .....	111
<b>Figura 40. Células MDA-MB-231 son ricas en citoquinas pro-inflamatorias y presentan un fenotipo similar a la EMT.</b> .....	112
<b>Figura 41. Las células MDA-MB-231 presentan una alta capacidad de migración.</b> .....	113
<b>Figura 42. La IL6 y la IL8 son relevantes en la adquisición de propiedades funcionales asociadas al programa de EMT en células MDA-MB-231.</b> .....	114
<b>Figura 43. IL6 e IL8 son importantes para el mantenimiento de características asociadas a la EMT en células MDA-MB-231.</b> .....	115
<b>Figura 44. Células MDA-MB-231 presentan características de células stem incompletas/aberrantes.</b> .....	117
<b>Figura 45. Células HEK explantadas, PC1-Expl-1, presentan una expresión heterogénea del marcador CD24.</b> .....	119
<b>Figura 46. Evaluación de la expresión de CD24 Y CD44.</b> .....	119
<b>Figura 47. Células CD44+CD24Pos y CD44+CD24Neg difieren en su capacidad de proliferación.</b> .....	120
<b>Figura 48. Células CD44+CD24Pos expresan marcadores asociados a la EMT.</b> .....	121
<b>Figura 49. Nivel de expresión génica de miembros de la familia miR200.</b> .....	122

<b>Figura 50. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de migración espontánea.</b> .....	122
<b>Figura 51. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de migración dirigida.</b> .....	123
<b>Figura 52. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de invasión.</b> .....	124
<b>Figura 53. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> presentan una mayor capacidad de adhesión.</b> .....	124
<b>Figura 54. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> muestran una mayor capacidad tumorigénica.</b> .....	126
<b>Figura 55. Caracterización histológica de tumores derivados de células HEK.</b> .....	127
<b>Figura 56. Caracterización inmunohistoquímica de marcadores asociados a EMT.</b> ....	128
<b>Figura 57. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan propiedades stem.</b> ....	129
<b>Figura 58. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> expresan FTs asociados a características de células stem.</b> .....	130
<b>Figura 59. Expresión de marcadores de células stem.</b> .....	131
<b>Figura 60. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> presentan una mayor capacidad clonogénica.</b> .	132
<b>Figura 61. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan un leve incremento en la capacidad de diferenciación.</b> .....	133
<b>Figura 62. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de diferenciación adipogénica.</b> .....	134
<b>Figura 63. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de diferenciación condrogénica.</b> .....	135
<b>Figura 64. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> presentan una mayor capacidad de diferenciación osteogénica.</b> .....	135
<b>Figura 65. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias.</b> .....	136
<b>Figura 66. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> secretan citoquinas asociadas a la inflamación.</b> ..	137
<b>Figura 67. Las células representan dos subpoblaciones que difieren en sus perfiles de expresión génica.</b> .....	138
<b>Figura 68. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan altos niveles de NF-<math>\kappa</math>B.</b> .....	138
<b>Figura 69. Evaluación del nivel de expresión de STAT3.</b> .....	138
<b>Figura 70. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan niveles altos de Notch.</b> .....	139

## LISTADO DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

<i>Figura suplementaria 1. Cinética de crecimiento de las células MCF-7 bajo el tratamiento con MeCoSe.</i>	162
<i>Figura suplementaria 2. Evaluación de la proliferación celular mediante la marcación con EDU.</i>	163
<i>Figura suplementaria 3. Células MCF-7 tratadas con MeCoSe presentan características asociadas a un potencial de diferenciación.</i>	164
<i>Figura suplementaria 4. El tratamiento con anticuerpos neutralizantes indujo cambios en la expresión de marcadores y FTs asociados a la EMT.</i>	165
<i>Figura suplementaria 5. Papel de Stat3 en la activación de NF-kB en células MCF-7.</i>	166
<i>Figura suplementaria 6. Separación de células MCF-7 por la expresión del marcador CD44.</i>	167
<i>Figura suplementaria 7. Células MCF-7 CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> presentan un fenotipo heterogéneo.</i>	168
<i>Figura suplementaria 8. Expresión del marcador CD44 en células MCF-7 CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup>.</i>	169
<i>Figura suplementaria 9. Expresión de marcadores asociados a EMT en células MCF-7 CD44<sup>Medium</sup>CD24<sup>High</sup>.</i>	169
<i>Figura suplementaria 10. El MeCoSe indujo un estado de senescencia irreversible.</i>	170
<i>Figura suplementaria 11. El tratamiento con citoquinas o con MeCoSe indujo un aumento en los niveles de ROS.</i>	171
<i>Figura suplementaria 12. Células MCF-7 tratadas con MeCoSe presentan mayor capacidad de migración.</i>	171
<i>Figura suplementaria 13. Evaluación de la capacidad de crecimiento de células MDA-MB-231.</i>	172
<i>Figura suplementaria 14. Las células MDA-MB-231 no presentaron capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico.</i>	172
<i>Figura suplementaria 15. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> mantienen la expresión de ABCB1 y VCAM en las condiciones de mamoesferas.</i>	173
<i>Figura suplementaria 16. Evaluación temprana de la capacidad de diferenciación no revela diferencias claras entre las dos subpoblaciones.</i>	173

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla suplementaria 1. Secuencias de genes utilizados.....</b>	<b>173</b>
-------------------------------------------------------------------	------------



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ALDH:** Aldehído Deshidrogenasa 1
- BrdU:** Bromodesoxiuridina
- CBA:** Arreglo de perlas por citometria
- CSC:** Células *Stem* de Cáncer
- COX:** Ciclooxygenasa
- CTC:** Células tumorales circulantes
- CIN:** Inestabilidad cromosómica
- C/EBPb:** Proteína beta de unión a regiones CCAAT
- CFSE:** Carboxifluoresceína succinimidil ester
- DCFH-DA:** Diclorofluoresceína Diacetato
- EDU:** 5-Etínil-2'-desoxiuridina
- EMT:** Transición Epitelial-Mesenquimal
- EMA:** Antígeno Epitelial de Membrana
- ER:** Receptor de Estrógenos
- EGF:** Factor de crecimiento epidérmico
- FACS:** Separación de Células Activadas por Fluorescencia
- FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico
- FTs:** Factores de transcripción
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- GCP-2:** Proteína 2 quimioatrayente de granulocitos
- GRO-a:** Oncogén regulado por crecimiento
- HA:** Ácido Hialurónico
- HEK:** Células Embrionarias de Riñón de Humano
- HGF:** Factor de Crecimiento Hepático
- HIF1:** Factor Inducido por Hipoxia-1
- ICH:** Inmunohistoquímica
- IGF:** factor de crecimiento insulínico
- JAK:** Janus quinasa
- MET:** Transición Mesenquimal-Epitelial

**MeCoSe:** Medio Condicionado Senescente

**MDR:** Multirresistencia a fármacos

**NAP-2:** Proteína 2 activadora de neutrófilos

**NSAIDs:** Drogas Anti-Inflamatorias No-Esteroidales

**NF- $\kappa$ B:** Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras kappa de las Células B activadas

**PD:** Doblaje Poblacional

**PDGF:** Factor derivado de plaquetas

**PLC:** Fosfolipasa C

**PKC:** Proteína quinasa C

**ROS:** Radicales Libres de Oxígeno

**Rb:** Retinoblastoma

**RCC:** Carcinoma de Células de Riñón

**RT-PCR:** PCR en Tiempo Real

**sIL-6R:** Receptor soluble de IL6

**SASP:** Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia

**SA- $\beta$ gal:** Senescencia asociada a beta-galactosidasa

**SCID:** Inmunodeficiencia combinada severa

**SFB:** Suero fetal Bovino

**SMA:** Actina de Musculo Liso

**TA:** Temperatura ambiente

**TGF $\beta$ :** Factor de Crecimiento Transformante Beta

**TJP-1:** *tight junction protein 1*

**TEMIA:** Asociación Internacional de la Transición Epitelio Mesenquimal

**TNF $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral alfa

**WB:** *Western Blot*

## RESUMEN

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un programa celular que ocurre durante la homeostasis de los tejidos, y en condiciones patológicas como el cáncer. En células pre-malignas o malignas, la EMT conlleva a la adquisición de propiedades migratorias e invasivas, y a un fenotipo con funciones de célula *stem* (o *stem-like*)<sup>1</sup>, que se ha asociado con un mayor potencial tumorigénico. Estas células se denominaron como células *stem* cancerígenas (CSC<sup>2</sup>), y se han identificado en diversos tipos de cáncer por la expresión de marcadores específicos (CD44, CD133, CD105, ALDH, EpCAM) o por pruebas funcionales. Por otra parte, se sabe que la senescencia celular es un mecanismo de supresión tumoral. Sin embargo, las células tumorales evaden este mecanismo de diferentes maneras y pueden utilizarlo para su crecimiento. En un modelo de células embrionarias de riñón humano (HEK) inmortalizadas, se mostró que estas células eran tumorigénicas únicamente en presencia de fibroblastos senescentes. Se encontró que las células recuperadas o explantadas de estos tumores mostraron un incremento en las propiedades de células *stem*, esto es capacidad de autorrenovación y de diferenciación multipotente y, sorprendentemente, capacidad autónoma para formar tumores. Igualmente, un medio condicionado de fibroblastos senescentes (MeCoSe) indujo en estas células plasticidad epitelial (fenotipo híbrido con marcadores epiteliales y mesenquimales, con expresión elevada de CD44 y variable de CD24) y adquisición de propiedades de células *stem*, sugiriendo que los factores solubles serían responsables de estas adquisiciones funcionales. La caracterización del MeCoSe mostró que estaba enriquecido principalmente en las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8. En la línea celular MCF-7 de cáncer de seno tipo luminal, clasificada como poco agresiva, mostramos que IL6 e IL8 indujeron la EMT, funciones de células *stem* (autorrenovación y capacidad de diferenciación multipotente) y una mayor migración e invasión, es decir, células con un fenotipo mucho más agresivo. De esta manera, se mostró que células no tan agresivas o pre-malignas pueden adquirir un fenotipo más tumorigénico cuando se encuentran en un microambiente senescente. La utilización de anticuerpos neutralizantes para IL6 e IL8 y la

---

<sup>1</sup> *Stem-like* para denotar células que presentan un fenotipo y funciones similares a la de células madre normales o referidas aquí como *stem*.

<sup>2</sup> Células denominadas también como células *stem* tumorales, o células iniciadoras de tumor (TIC, por sus siglas en inglés) y referidas aquí como CSC. Son células que además de presentar características de células *stem*, presentan una alta capacidad de formar tumores.

activación de la vía de señalización de Jak/Stat3 confirmaron la relevancia de estas citoquinas en estos procesos. La población de células enriquecidas en el marcador CD44 mostró una mayor adhesión y migración, pero no una mayor capacidad de autorrenovación. Por otra parte, mostramos una relación importante entre la senescencia y la inflamación, y de manera muy relevante, que existen mecanismos celulares de retroalimentación recíproca, con células senescentes que producen citoquinas inflamatorias, las cuales a su vez inducen más senescencia y secreción adicional de citoquinas inflamatorias que perpetúan el estímulo y la aparición de CSC. Se evaluó también el papel de IL6 e IL8 en una línea celular del subtipo basal/mesenquimal, claudina bajo (MDA-MB-231), con fenotipo EMT y por ende propiedades *stem*, que secreta IL6 e IL8 de manera constitutiva y además, es más agresiva. La neutralización de las citoquinas disminuyó la capacidad de migración de células MDA-MB-231, pero no tuvo un efecto mayor sobre sus propiedades *stem*. No obstante, estas células presentaron funciones de células *stem* incompletas, es decir, una menor capacidad de autorrenovación y una diferenciación multipotente anormal. Estos experimentos muestran que un fenotipo tumoral puede ser modulado mayormente por el microambiente tumoral y sugieren que si bien la capacidad tumorigénica se asocia de manera general con propiedades de células *stem*, esta puede darse en contexto de unas funciones *stem* no tan robustas, siempre y cuando el contexto celular (presencia de ciertas capacidades funcionales) las complemente de manera adecuada. Para evaluar mejor la relación entre tumorigenicidad y la presencia o adquisición de funciones de células *stem*, se utilizó nuevamente el modelo de células HEK explantadas. La selección de dos subpoblaciones de la línea celular explantada PC1-Expl-1, con base en la expresión del marcador CD24, mostró que a pesar de que las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentaron un fenotipo EMT, una mayor migración e invasión, y un enriquecimiento en propiedades de células *stem*, fueron incapaces de formar tumores. Por el contrario, las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> formaron tumores de manera muy eficiente, muy similar a las células parentales (PC1-Expl-1). Al igual que lo que señalamos arriba para la línea de cáncer de seno MDA-MB-231, las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> mostraron funciones de células *stem* menos robustas, pero mayor capacidad de adhesión, de proliferación celular y de formación de colonias, revelando que otras características funcionales adicionales pueden ser determinantes en el potencial tumorigénico y que éstas dependerían de las funciones de células *stem* que presenten las células malignas en un momento determinado del desarrollo

tumoral. En otras palabras, los resultados obtenidos en estos modelos sugieren que un estado *stem* (en inglés, *stemness*<sup>3</sup>) completo no es indispensable para la tumorigenicidad, y que la agresividad tumoral puede deberse a otras características celulares que complementan las funciones de células *stem* presentes en la célula tumoral. Si la tumorigenicidad resulta ser dependiente de ciertas características de células *stem* que se manifiestan en conjunto en un contexto celular particular y en una etapa determinada del desarrollo tumoral, su definición sería de relevancia para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos.

---

<sup>3</sup> Hace referencia a las propiedades de células *stem* fenotípicas y funcionales definidas por patrones específicos genéticos y epigenéticos de expresión génica dentro del contexto del tejido en donde ellas residen.

## ABSTRACT

The epithelial mesenchymal transition (EMT) is a cellular program present during tissue homeostasis and in pathological conditions such as cancer. In premalignant and malignant cells, the EMT is often accompanied by the acquisition of migratory and invasive properties, and the generation of cells with a phenotype similar in function to stem cells (stem-like)<sup>4</sup>, associated with an increase in tumorigenic potential. These cells are called cancer stem cells (CSC)<sup>5</sup>, and they have been identified in various types of cancer by the expression of specific markers (CD44, CD133, CD105, ALDH, EpCAM) or by functional assays. On the other hand, Cellular senescence is a tumour-suppressive mechanism. However, the tumour cells evade this mechanism in different ways and can use it for their own growth. In an immortalized Human embryonic kidney cells (HEK) model, it was previously shown that these cells have the potential to become fully tumorigenic exclusively in the presence of senescent fibroblasts. Cells recovered from senescence-promoted tumors or explanted cells exhibited enhanced stem-like cell properties, including self-renewal and multilineage differentiation capacity and surprisingly high cell-autonomous tumorigenicity. Likewise a senescent-conditioned medium of senescent fibroblasts (MeCoSe) induced epithelial cell plasticity (hybrid phenotype with epithelial and mesenchymal markers, high expression of CD44 and variable expression of CD24) and the acquisition of stem cell properties, suggesting that soluble factors would be responsible for the acquisition of these functional properties. The characterization of MeCoSe showed an enrichment mainly in the pro-inflammatory cytokines IL6 and IL8. In MCF-7, a luminal type breast cancer cell line, classified as not very aggressive, we showed that IL6 and IL8 induced the EMT, functions of stem cells (self-renewal and multipotent differentiation capacity) and higher migration and invasive capacities, that is, cells with a more aggressive phenotype. Thereby, it was shown that less aggressive or pre-malignant cells in the presence of senescent microenvironment can acquire a more tumorigenic phenotype. Indeed, neutralizing antibodies against IL6 and

---

<sup>4</sup> Stem-like to denote cells that harbor a phenotype and functions similar to that of normal stem cells or referred to here as stem.

<sup>5</sup> Cells also known as cancer stem cells, or tumor-initiating cells (TICs) and referred here as CSCs. They are cells that besides presenting characteristics of stem cells, have a high capacity to form tumors.

IL8 and the activation of Jak/Stat3 signaling pathway reaffirm the relevance of these cytokines in these processes.

The population of cells enriched in the CD44 marker showed a greater adherence and migration capacity, but not a greater self-renewal capacity. Furthermore, we show an important relationship between senescence and inflammation, and very importantly, that there exists a cellular mechanism by which senescence and inflammation are reinforced with senescent cells that produce inflammatory cytokines which in turn induce more senescence and the additional secretion of inflammatory cytokines that perpetuate the stimulus and the appearance of CSC. We also evaluated the role of IL6 and IL8 in a basal/mesenchymal breast cancer cell line (MDA-MB-231), with an EMT phenotype and therefore stem properties, which secretes constitutively IL6 and IL8 and is also more aggressive. The neutralization of the cytokines decreased the migration capacity of MDA-MB-231 cells but did not have a significant effect on their stem properties. Nevertheless, these cells exhibited incomplete stem cell functions, that is, a lower self-renewal capacity and an abnormal multipotent differentiation. These experiments show that a tumour phenotype can be modulated mainly by the tumour microenvironment and suggest that although the tumorigenic capacity is generally associated with stem cell properties, this can occur in the context of not so robust stem functions, as long as the cellular context (presence of certain functional capacities) complements them adequately. To better assess the relationship between tumorigenicity and the presence or acquisition of stem cell functions, the HEK-derived explanted cells model was used again. The selection of two subpopulations from PC1-Expl-1 explanted cell line, according to the expression of CD24 cell marker, showed that although the CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> cells exhibited an EMT phenotype, a higher migration and invasion capacities, and an enrichment in stem cell properties, were unable to form tumors. On the contrary, the CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> cell subpopulation was totally competent to induce tumour formation as efficiently as the parental cell line (PC1-Expl-1). Similarly to what was previously indicated for the breast cancer cell line MDA-MB-231, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> cell subpopulation showed less robust stem cell functions, but high adhesion, proliferation and clonogenic capacity, revealing that other additional functional characteristics can be determinant in the

tumorigenic potential and that these would rely on the stem cell functions that malignant cells have at certain moments of tumor development.

In other words, the results obtained in these models suggest that a complete state of stem cells (stemness)<sup>6</sup> is not indispensable for tumorigenicity, and that the tumor aggressiveness may be due to other cellular characteristics that complement the functions of stem cells present in the tumor cell. If tumorigenicity turns out to be dependent on certain characteristics of stem cells that are manifested together in a particular cellular context and at a certain stage of tumor development, its definition would be relevant for the development of new therapeutic targets.

---

<sup>6</sup> It refers to the phenotypic and functional properties of stem cells defined by specific genetic and epigenetic patterns of gene expression within the context of the tissue in which they reside.



## INTRODUCCIÓN

El cáncer de origen epitelial es una de las enfermedades malignas más frecuentes en humanos (Blanpain C, 2013). Los tumores están compuestos de una población heterogénea de células que difieren en características fenotípicas (morfología, lesiones genéticas, estado de diferenciación), funcionales (capacidad de proliferación, autorrenovación, diferenciación) y en la respuesta a agentes quimioterapéuticos. Existe suficiente evidencia que muestra que la mayoría de los tumores tienen una organización jerárquica con una subpoblación de células tumorales con propiedades de células *stem* (*stem-like*) en el ápice de esta jerarquía (Singh SK, 2003; Al-Hajj M, 2003). Estas células, denominadas como CSC, se han identificado en diversos tipos de cáncer por la expresión de ciertos marcadores de superficie celular (CD44, CD133, CD105, ALDH, EpCAM) y por ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*. En particular, la expresión de CD44, una glicoproteína de superficie celular, que se expresa de manera abundante en la mayoría de los tumores de tipo epitelial, juega un papel importante en la iniciación, progresión y metástasis del tumor, y por lo tanto se ha utilizado en conjunto con la expresión o falta de expresión de otros marcadores (por ejemplo, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> en células de cáncer de seno) en la identificación de CSC (Al-Hajj M, 2003; Thapa R, 2016). Una de las características distintivas de las CSC es su capacidad de formar nuevos tumores, a diferencia de la mayoría de las células del tumor original. Las CSC son responsables de la heterogeneidad tumoral, las recaídas, la metástasis y de manera importante, de la resistencia a los tratamientos (Spillane JB, 2007; Shibue T, 2017). De manera interesante, se ha demostrado que las CSC muestran un alto grado de plasticidad celular, es decir presentan la capacidad de realizar conversiones dinámicas entre diferentes estados de diferenciación, las cuales pueden ocurrir de manera espontánea (Chaffer CL, 2011; Gupta PB, 2011), o inducida por procesos como la transición epitelio mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) (Mani SA, 2008; Morel AP, 2008) o por un microambiente senescente o inflamatorio (Iliopoulos D, 2011; Hartman ZC, 2013). El concepto de la existencia de CSC, junto con la identificación del programa EMT como regulador de las poblaciones CSC, revolucionaron la biología tumoral, permitiendo entender las bases moleculares de la resistencia a los medicamentos y proporcionando nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias en cáncer (Liu S, 2010;

Agliano A, 2017). Más recientemente, se mostró que esta plasticidad celular puede ocurrir por las transiciones celulares que ocurren entre el programa EMT y el programa inverso (MET) (Yao D, 2011). El primero promoviendo la metástasis, al favorecer la migración y la invasión, y el segundo, ayudando a la supervivencia de las células tumorales y promoviendo la colonización tisular y la proliferación celular.

Las CSC, al igual que sus equivalentes normales, residen en microambientes especializados que regulan, en gran parte, sus características fenotípicas y funcionales (Carstens JL, 2014). Se entiende como microambiente tumoral el conjunto de diferentes tipos celulares presentes en el tumor (células estromales, vasculares, inmunes, etc.), factores solubles (factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, etc.) y componentes de la matriz extracelular. Existe suficiente evidencia que muestra que la mayor barrera para una terapia exitosa contra el cáncer es precisamente el microambiente tumoral, y en particular la existencia de un microambiente senescente. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que tanto la incidencia del cáncer como la mortalidad se relacionan de manera directa con la edad. Se cree que esto pueda deberse a un efecto de un “microambiente senescente” en la medida que se acumulan células estromales senescentes en los tejidos (Jeyapalan JC, 2007). Las células senescentes se caracterizan por un estado permanente de detención del ciclo celular, proceso que se identificó inicialmente como una pérdida de la capacidad replicativa después de cultivos celulares prolongados *in vitro* (senescencia replicativa) (Hayflick L, 1965). Hoy se sabe que diferentes tipos de estrés pueden inducir senescencia celular, por ejemplo, la expresión robusta de oncogenes como Ras (Serrano M, 1997), rompimientos de doble cadena del ADN (Aguilera A, 2013) o acortamiento telomérico (Davoli T, 2010), entre otros (Childs BG, 2017). Además, se conoce que es un mecanismo importante de supresión tumoral (Bartkova J, 2006; Xue W, 2007); en efecto, las células con daño celular o estrés, al estar detenidas en el ciclo celular, no pueden proliferar para formar tumores. Sin embargo, las células tumorales son capaces de evadir este mecanismo de diferentes maneras (Foster SA, 1998; Hollstein M, 1991; Jarrard DF, 1999; Kim NW, 1994; Shay JW, 1997). La senescencia también puede promover cambios pre-neoplásicos en células adyacentes del estroma, e inducir la producción de factores promotores del crecimiento de células tumorales (Hornsby PJ, 2002; Collado M, 2007; Campisi J, 2011; Krtolica A, 2001; Liu D, 2007). Las células

senescentes secretan una gran variedad de moléculas solubles, denominadas en conjunto como SASP (Coppe JP, 2008; Kuilman T; 2008). Este SASP, en una fase inicial limitada en el tiempo, puede actuar como supresor de tumores induciendo la vigilancia inmunológica, pero también, en una fase posterior crónica, como promotor de tumores. SASP induce plasticidad epitelial y funciones *stem* en células pre-malignas y malignas (Castro-Vega LJ, 2015) y plasticidad celular y capacidades regenerativa en un modelo de regeneración tisular de queratinocitos (Ritschka B, 2017). La composición de SASP varía dependiendo del tipo celular, del tejido de origen y del mecanismo desencadenante de la senescencia (Lasry A, 2015); sin embargo, la presencia de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 es recurrente y abundante (Coppé JP, 2010; Childs BG, 2017). La producción de estas citoquinas, así como también de otras proteínas MCPs (Monocyte Chemoattractant Proteins), MIPs (Macrophage Inflammatory Proteins) y GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor) pueden de manera directa o indirecta promover procesos inflamatorios crónicos los cuales están directamente relacionados con enfermedades degenerativas y con hiperplasias (Campisi J, 2013).

Por otra parte, la inflamación, en particular la crónica, puede ser un componente modulador importante del microambiente tumoral y por esto se ha considerado como una de las características distintivas del cáncer (Hanahan D, 2011). Tiene un papel fundamental en la inmunosupresión, la supervivencia del tumor, la proliferación y la angiogénesis (Coussens LM, 2002), procesos que contribuyen de manera importante al desarrollo tumoral y a la metástasis (Kundu JK, 2012). Se ha sugerido que la inflamación evolucionó como una respuesta adaptativa para restaurar la homeostasis, principalmente en condiciones de infecciones o de daño tisular (Medzhitov R, 2008). Cuando esta respuesta se mantiene por un tiempo adecuado tiene consecuencias benéficas para el organismo; sin embargo, si se vuelve crónica puede causar enfermedad. Los datos epidemiológicos indican que más del 25% de todos los cánceres se relacionan con procesos inflamatorios debido a infecciones crónicas o a procesos inflamatorios no resueltos (Vendramini-Costa DB, 2012). La disminución en la recurrencia y la mortalidad que se ha documentado por el uso de anti-inflamatorios no esteroideos, no solo en cáncer colorectal (Rothwell PM, 2011; Sandler RS, 2003), sino también en cáncer de seno, páncreas y próstata, muestra esta relación y sugiere

además que existe un mecanismo común de acción de los mediadores inflamatorios en el desarrollo tumoral (Vendramini-Costa DB, 2012; Fraser DM, 2014; Streicher SA, 2014). En esta condición, un número importante de vías de señalización intracelular se encuentran desreguladas, las cuales incluyen receptores de superficie celular, proteínas quinasas y factores de transcripción que inducen a la expresión anormal de genes involucrados en una respuesta pro-inflamatoria y en la transformación maligna (Wu Y, 2014; Block K, 2012).

En un modelo de células embrionarias de riñón humano (HEK, por sus siglas en inglés) transformadas, mostramos que un microambiente senescente induce transiciones EMT-MET, confiere propiedades de células *stem*, y capacidad tumorigénica a células que por sí solas son incapaces de inducir tumores (Castro-Vega LJ, 2015). El análisis de las células explantadas de los tumores mostró la adquisición de un fenotipo híbrido y heterogéneo, esto es, células expresando marcadores epiteliales y mesenquimales en diferente grado (Nieto MA, 2016; Jolly MK, 2016). Todas las líneas celulares explantadas presentaron una alta expresión de CD44; una de ellas co-expresaba CD24, mientras que otra no; finalmente, la tercera (PC1-Expl-1) presentó una expresión variable de CD24 (Castro-Vega LJ, 2015). Las células HEK aisladas de esos tumores, en comparación con las células pre-malignas, mostraron funciones *stem* (autorrenovación, capacidad de crecimiento independiente de anclaje, capacidad de diferenciación) aumentadas y de manera muy interesante, adquirieron la capacidad autónoma de formar tumores (en ausencia de células senescentes), sugiriendo que el microambiente senescente puede inducir cambios permanentes en células pre-malignas. El medio condicionado de fibroblastos senescentes (MeCoSe) indujo *in vitro* cambios similares a los inducidos por las células senescentes. La evaluación del MeCoSe mostró niveles importantes de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8, sugiriendo que éstas deben jugar un papel importante en estos cambios. Para evaluar la contribución de estas citoquinas en la adquisición de un fenotipo tumoral más agresivo, utilizamos dos líneas celulares de cáncer de seno que no expresan (MCF-7) o expresan de manera constitutiva (MDA-MD-231) IL6 e IL8. En la línea celular MCF-7 tipo luminal, clasificada como poco agresiva, mostramos que IL6 e IL8 indujeron el programa de EMT, con células que adquirieron funciones *stem* importantes como la autorrenovación, la capacidad de diferenciación multipotente, y una mayor migración e invasión. En este caso, el microambiente inflamatorio produjo células con

un fenotipo mucho más agresivo (Ortiz-Montero P, 2017). Las citoquinas activaron las vías de señalización Jak/Sat3, confirmando su funcionalidad. Por otra parte, la neutralización de estas citoquinas por anticuerpos específicos en células MCF-7 mostró la importancia de éstas en la inducción de estas funciones. Aunque las células CD44 presentaron una mayor adherencia y migración que las células que no expresaban CD44, no tuvieron una capacidad de autorrenovación diferente a éstas. En las células MDA-MB-231, la neutralización de estas citoquinas disminuyó la capacidad de migración e invasión, pero no tuvo efecto sobre las propiedades de células *stem*. Al evaluar estas últimas, se mostró que las células MDA-MB-231 presentaron una menor capacidad de autorrenovación y una capacidad de diferenciación multipotente anormal. Estos resultados muestran el efecto diferencial que puede tener un microambiente tumoral, dependiente del tipo celular y que no se puede asociar necesariamente unas funciones de células *stem* robustas con una capacidad tumorigénica. Por otra parte, se mostró la estrecha relación que existe entre la senescencia y la inflamación con estimulación recíproca pro-inflamatoria que aumenta el efecto tumorigénico (Ortiz-Montero P, 2017).

La relación entre el programa de EMT y la presencia de funciones de células *stem* con la capacidad tumorigénica se estudió también en el modelo de células HEK explantadas. Debido a que las líneas celulares explantadas expresaron niveles elevados y similares del marcador CD44, un marcador asociado a un fenotipo de célula *stem*, pero presentaron una expresión variable de CD24, se decidió evaluar la relación entre la expresión de CD24 y las características de células *stem* que podrían ser responsables de la tumorigenicidad. CD24 es un marcador que se relaciona con proliferación, migración e invasión, propiedades que se relacionan con el programa de EMT (Bretz N, 2012; Kwon MJ, 2015; Lim J, 2014). No obstante, la baja expresión de CD24 se ha asociado con progresión tumoral en cáncer de seno (Al-Hajj M, 2003, Ponti D, 2006) y colorectal (Choi D, 2009), mientras que su sobreexpresión se correlaciona con la presencia de metástasis a nódulos linfoides y a estados patológicos avanzados (Kwon MJ, 2015). Esto indica que el papel de CD24 en la adquisición de propiedades *stem* y en la capacidad tumorigénica depende del contexto (tipo de cáncer, célula de origen, estado del desarrollo del cáncer y factores presentes en el microambiente). Las dos subpoblaciones CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> aisladas a partir de la línea celular

explantada PC1-Expl-1, morfológicamente eran muy similares pero diferían en algunos aspectos relacionados con el programa EMT y funciones de CSC. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentaron un fenotipo más claro de EMT, una mayor migración e invasión, y un enriquecimiento en propiedades de células *stem*; a pesar de esto, las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> no formaron tumores en ratones inmunocomprometidos. Por su parte las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> mostraron funciones de células *stem* menos robustas, una mayor capacidad de adhesión, de proliferación celular y fueron muy superiores en el ensayo de clonogenicidad; las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> formaron tumores de manera equivalente a las células parentales (PC1-Expl-1) (Ortiz-Montero P, sometido). Los dos modelos utilizados aquí permitieron separar la robustez de las funciones de células *stem* con la capacidad tumorigénica. Sugerimos que otras características funcionales celulares adicionales pueden ser determinantes en el potencial tumorigénico de células tumorales que presentan algunas características *stem* o las presentan disminuidas o incompletas. La complementación de estas funciones dependería de la etapa de desarrollo del cáncer, del tipo de cáncer y del contexto celular.

La comprensión de la dinámica celular, su plasticidad y heterogeneidad, pero sobre todo la manera como las propiedades de células *stem* de las células tumorales, son impactadas por el microambiente tumoral (como en este caso, la senescencia e inflamación), permitirá entender los eventos que conllevan al desarrollo y progresión tumoral, y eventualmente, encontrar nuevas estrategias terapéuticas.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer, además de ser una de las enfermedades más malignas en los humanos, exhibe un alto grado de complejidad debida en parte a la heterogeneidad de las células que componen el tumor, y a las interacciones de las células tumorales con el microambiente tumoral. Numerosos estudios han sugerido que únicamente una pequeña subpoblación de células de cáncer con una alta capacidad de formar tumores (CSC) se constituye como el centro de origen de la tumorigénesis, por lo cual las investigaciones recientes se han enfocado en el estudio de las CSC, sus capacidades funcionales y la manera como el microambiente tumoral las modula. A la fecha se han identificado numerosos marcadores de CSC, aunque el uso de algunos de ellos es controvertido y requiere de una mayor investigación. El microambiente tumoral influye dramáticamente en la fisiología de las CSC y en la plasticidad del cáncer, el cual no solamente provee de las señales promotoras de la generación, crecimiento y mantenimiento de las células tumorales, sino que también las protege de los daños inducidos por la terapia. Las CSC también contribuyen a la reconstitución del microambiente a través de la inducción de procesos de transdiferenciación hacia diversos linajes celulares que componen el tumor, como células endoteliales, pericitos o fibroblastos, o de diferenciación de células no-CSC a CSC. Esta dinámica entre las diferentes subpoblaciones que componen el tumor les confiere a las CSC una mayor capacidad de adaptación durante los procesos de invasión y metástasis, afectando de esta manera la progresión tumoral. En particular, un microambiente senescente/inflamatorio crónico, a través de la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento relacionados con la inflamación, se ha asociado con proliferación tumoral, invasión y metástasis. Desafortunadamente, no se conocen los eventos que ocurren durante la respuesta inflamatoria crónica localizada o sistémica que desembocan en diferentes condiciones patológicas. Dado que estos microambientes son enriquecidos en citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8, su evaluación de manera individual o simultánea, en la plasticidad epitelial y la inducción de propiedades *stem*, será clave para el entendimiento de la biología tumoral. En el caso de las células de cáncer de seno del subtipo luminal A, que no expresan IL6 ni IL8 un microambiente senescente/inflamatorio podrían estar jugando un papel relevante en la capacidad de modular

las funciones de las células tumorales y las del estroma. Adicionalmente, debido a la complejidad del cáncer, será de gran relevancia establecer la contribución de la heterogeneidad, plasticidad celular y/o la *stemness* a la capacidad tumorigénica. El entendimiento de la dinámica y las características de las células tumorales y los mecanismos moleculares que las inducen o modulan en un microambiente propicio al desarrollo tumoral (senescente/inflamatorio) ofrecería nuevas posibilidades terapéuticas.



## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el papel de la senescencia y de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 y del marcador CD44 en la inducción y mantenimiento de la transición epitelio-mesenquimal, las características y funcionalidad de las células *stem* y la tumorigenicidad.

### Objetivos específicos

1. Evaluar de manera comparativa la EMT producida por la incubación con medios condicionados de fibroblastos senescentes o por la incubación con las citoquinas IL6 e IL8.
2. Identificar la existencia de funciones de células *stem* en células que han hecho la EMT en los sistemas experimentales antes descritos.
3. Determinar el papel de IL6 e IL8, y de CD44 en la inducción y mantenimiento de la EMT y de funciones de células *stem*, y de las vías de señalización involucradas.
4. Evaluar si la persistencia de un microambiente inflamatorio y un estado senescente *in vitro* se asocia con un aumento o adquisición de funciones de células *stem* que podrían contribuir con una mayor capacidad tumorigénica.
5. Determinar si la expresión constitutiva de IL6 y la IL8 contribuye con las propiedades de células *stem* y en la adquisición de un fenotipo más agresivo.
6. Determinar la contribución de la heterogeneidad celular y/o las funciones de células *stem* en la capacidad tumorigénica.

## **HIPOTESIS**

Un microambiente senescente/inflamatorio, rico en las citoquinas IL6 e IL8, induce transiciones EMT-MET y propiedades de células *stem* que en un contexto celular determinado pueden ser relevantes en la tumorigénesis.

# MARCO TEÓRICO

## Heterogeneidad celular en los tumores

La mayoría de los tumores malignos se componen de múltiples subpoblaciones de células neoplásicas fenotípicamente diferentes, células de soporte presentes en el estroma y células infiltrantes del tumor. Esta diversidad fenotípica y funcional es considerada como la principal causa de desarrollo de resistencia a las terapias (Shibue T, 2017). Desde un punto de vista biológico esta heterogeneidad se origina a través de mecanismos genéticos, epigenéticos y por las interacciones con el microambiente que contribuyen a las diferencias observadas entre las distintas subpoblaciones de células neoplásicas que residen dentro de un tumor individual (Wahl GM, 2016).

Los mecanismos genéticos operan en múltiples escalas, que van desde cambios a nivel de un nucleótido (amplificación, delección, translocación, inversión, y mutaciones puntuales) como a nivel de todo un cromosoma dentro de una célula, y revelan no solo la dinámica de los cambios genéticos intratumorales sino también los mecanismos de evolución tumoral. Estos cambios contribuyen significativamente a la capacidad de las células tumorales de adaptarse a un microambiente tumoral aberrante, y de manera recíproca, este microambiente tumoral contribuye a la desestabilización del genoma (Wahl GM, 2016). Los rearrreglos cromosómicos son frecuentes en diferentes tipos de cáncer y contribuyen de manera importante en las primeras etapas de la carcinogénesis a través de la adquisición de un número adicional de copias en ciertos oncogenes o a la pérdida en el número de copias de genes supresores tumorales (Davoli T, 2013). Estos procesos de inestabilidad se pueden desencadenar por estrés replicativo inducido por oncogenes, defectos en la mitosis o desgaste en los telómeros (Gupta RG, 2017). Un ejemplo de la contribución genética a la heterogeneidad intratumoral se observa en el cáncer de seno del subtipo triple negativo (negativo para receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) y Her2) el cual contiene aberraciones en sus cromosomas a gran escala, originadas tempranamente durante la progresión tumoral y asociadas a la inactivación de p53, creando un ambiente permisivo para la desestabilización genómica. Seguido de esta fase inicial de inestabilidad cromosómica, se incrementa la tasa de acumulación de mutaciones a una frecuencia más 10 veces más alta que

una célula normal dando como resultado una heterogeneidad. Por ejemplo, en glioblastoma, se han identificado variaciones en el número de copias de dos receptores tirosina quinasa, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) y PDGFRA (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor A*) en células de la misma muestra tumoral (Szerlip NJ, 2012). También, en muestras obtenidas de pacientes con carcinoma de células claras de riñón (ccRCC), el análisis por secuenciación de todo el exoma en diferentes regiones (9 regiones de tumor primario obtenidos de una nefrectomía y dos regiones metastásicas obtenidas de la pared torácica), reveló la presencia de mutaciones puntuales no-sinónimas, las cuales estuvieron distribuidas de manera diferencial en el tumor (Gerlinger M, 2012).

Los cambios epigenéticos (modificaciones post-traslaciones en las histonas, metilación del ADN y reorganización de la cromatina) constituyen un segundo mecanismo para la generación de heterogeneidad. Estos cambios pueden ser críticos, por ejemplo, para la adaptación de células tumorales a un microambiente de tipo inflamatorio, y pueden ser afectados de manera directa o indirecta por mutaciones en genes supresores tumorales reguladores del ciclo celular como p53 (Levine AJ, 2012; Levine AJ, 2016). En cáncer de seno, mediadores epigenéticos como la histona metiltransferasa, EZH2, ejerce un papel importante en el mantenimiento de células tumorales (Kim KH, 2016) y se ha constituido como un blanco terapéutico potencial. Diferentes estudios sugieren que un pequeño número de células experimenta cambios epigenéticos para dar origen a la diversidad fenotípica de células que componen el tumor. Por ejemplo, en leucemia mieloide aguda (LMA), células de cáncer *stem-like* y *no-stem-like* difieren en sus patrones de modificación de histonas (H3K4me3 and H3K27me3) (Yamazaki J, 2013). Adicionalmente, en glioblastoma, una pérdida en la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) dada por el complejo represor *Polycomb*, resulta en la activación aberrante de múltiples factores de transcripción (Rheinbay E, 2013). De manera importante, y en contraste con las alteraciones genéticas, los cambios epigenéticos pueden cambiar con la división celular, y de esta manera se constituyen como la principal fuente de variación fenotípica. Esta se puede dar en respuesta a cambios intracelulares o en el microambiente, promoviendo la plasticidad de las células tumorales y modificando su capacidad de responder a nuevas señales durante procesos como la metástasis (Wahl GM, 2017).

Por otra parte, cambios en el microambiente tumoral, así como el contacto directo con células del estroma, células del sistema inmune, condiciones de hipoxia, acidez y los cambios en la matriz extracelular, pueden inducir cambios epigenéticos y de esta manera contribuir a la heterogeneidad tumoral. Por ejemplo, factores presentes en el microambiente (TGF- $\beta$ , PDGF-B, MET, EGF Y FGF), secretados por macrófagos o fibroblastos asociados a tumor (TAM o CAF, por sus siglas en inglés), y otras células del estroma, pueden inducir el silenciamiento de genes epiteliales, como E-cadherina. Condiciones especiales dentro del tumor, así como una baja cantidad de oxígeno, hipoxia, inducen un cambio hacia un fenotipo mesenquimal a través de la regulación positiva de factores de transcripción (FTs) como Twist, Snail y Zeb (Kiesslich T, 2013; Gao D, 2012).

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios han revelado la existencia de una variación genética y no genética en diferentes regiones del tumor o en diferentes estados de la progresión tumoral, lo cual se conoce como heterogeneidad intratumoral. Diferentes eventos contribuyen a este fenómeno, que pueden afectar rutas de señalización importantes que regulan el crecimiento del cáncer y generan la diversidad fenotípica dentro del tumor. Una gran parte de esta heterogeneidad tumoral se debe a la presencia de CSC, las cuales presentan alteraciones genéticas y epigenéticas que les permiten diferenciarse en múltiples tipos celulares y de esta manera contribuir a la diversidad fenotípica dentro del tumor.

### **Células *stem* cancerígenas (CSC)**

El tumor contiene una variedad de células que se originan de una pequeña subpoblación de células que tienen la capacidad de autorrenovación, y el potencial de diferenciarse en múltiples linajes celulares. Estas células, conocidas como CSC son responsables de la iniciación y progresión del cáncer, y de la diseminación metastásica (Kim WT, 2017). Por lo general son resistentes a terapias convencionales y responsables de las recaídas (Akrap N, 2016). La presencia de CSC ha sido documentada primero en varias enfermedades del sistema hematopoyético y posteriormente en tumores sólidos (Lapidot T, 1994; Bonnet D, 1997; Matsui W, 2004; Al-Hajj M, 2003; Singh SK, 2004). Se cree que estas células, se pueden generar tanto de células *stem*, como de células progenitoras comprometidas. Existen dos modelos principales acerca del origen de las CSC y por lo tanto de la heterogeneidad

tumoral. El modelo de la evolución clonal, introducido por primera vez por Peter Nowell, define el cáncer como un proceso evolutivo en donde la mayoría de los neoplasmas tienen un origen único celular y la progresión tumoral resulta de la sucesiva adquisición de mutaciones dentro del clon original, lo que les confiere una mayor ventaja proliferativa, permitiendo de esta manera una selección secuencial de sub-clones cada vez más agresivos (Nowell PC, 1976). Este modelo explica la heterogeneidad tumoral como un resultado de la selección natural la cual dependerá de los requerimientos presentes en las diferentes áreas del tumor; regiones próximas a la masa interna del tumor seleccionarán clones de células aptas para condiciones hipóxicas, es decir células quiescentes, mientras que áreas ricas en nutrientes seleccionarán clones con una alta capacidad proliferativa, esto da como resultado una compleja arquitectura celular dentro del tumor (Prasetyanti PR, 2017). El segundo modelo propone que solo una pequeña subpoblación de células dentro del tumor tiene la capacidad de autorrenovación, diferenciación y de generación de nuevos tumores, mientras que el resto consiste en células fenotípicamente diversas con una capacidad proliferativa y potencial tumorigénico limitado. De esta manera las células con un potencial tumorigénico mayor residen en la cima de una jerarquía celular y se denominan CSC. Alternativamente, estas células pueden dividirse asimétricamente para dar origen a células con baja capacidad tumorigénica (no-CSC) que han iniciado un programa de diferenciación (Marjanovic ND, 2013) resultando en los diferentes subtipos celulares que componen un tumor. Dada la complejidad y heterogeneidad del cáncer, estos dos modelos no son mutuamente excluyentes, en efecto, los tumores presentan características que podrían ser generadas por ambos modelos (Shackleton M, 2009). Entonces, un tumor puede comprender varios clones de CSC que tienen un ancestro común (donde han ocurrido las primeras mutaciones oncogénicas), estos sub-clones pueden persistir en el tiempo y acumular cambios genéticos y epigenéticos requeridos para la iniciación y progresión del cáncer; así mismo, cada uno de estos sub-clones puede dar origen a progenitores intermedios, y a células más diferenciadas no tumorigénicas. Estas células que se encuentran en un estado intermedio y que probablemente no presentan capacidades de autorrenovación continuarán acumulando cambios genéticos que posteriormente les va a conferir esta capacidad.

Bajo ciertos estímulos específicos, transformación oncogénica (Chaffer CL, 2011), FTs endógenos asociados al proceso de la EMT, como Zeb1 (Chaffer CL, 2013), a

reprogramación (Oct3/4, Sox2 y Klf4) (Oshima N, 2014), o citoquinas pro-inflamatorias, como la IL6, presente en el microambiente tumoral (Iliopoulos D, 2011), células terminalmente diferenciadas pueden de-diferenciarse y adquirir propiedades de CSC y de esta manera permitir la conversión bidireccional entre diferentes estados de diferenciación, lo que se conoce como plasticidad celular (Marjanovic ND, 2013).

Este concepto añade un grado de complejidad a los modelos de evolución clonal y de CSC y permite explicar de otra manera la heterogeneidad tumoral. Las CSC presentan una plasticidad celular intrínseca o espontánea, más alta que la de las células *stem* normales, que les confiere un grado de *stemness* mayor. La adquisición de *stemness* confiere a las células la habilidad de perpetuar su linaje, y de dar origen a células diferenciadas, así como también de interactuar con su microambiente para mantener un balance entre proliferación, quiescencia y regeneración (Aponte PM, 2017). Estos hallazgos señalan la existencia de una conexión entre la plasticidad celular, *stemness*, la EMT, y la progresión tumoral. Indican además que la *stemness* y la EMT pueden ser dos procesos transitorios y reversibles que ocurren tanto en las poblaciones CSC como en las no-CSC.

Las CSC se distinguen de las células *stem* normales o de otras células presentes en el tumor, por la presencia de marcadores específicos de superficie celular. Como se dijo, la primera evidencia experimental de la identificación de las CSC se obtuvo en un modelo de LMA, mediante la expresión de marcadores de superficie celular (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) (Bonnet D, 1997). En tumores sólidos, la identificación de CSC se realizó por primera vez en cáncer de seno por la expresión de ESA<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>/linaje<sup>Neg</sup> (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup>Lin<sup>-</sup>) (Al-Hajj M, 2003), seguido de la identificación en varios tumores sólidos, cerebro (CD133<sup>+</sup>) (Singh SK, 2004); próstata (CD44<sup>+</sup>/alpha2beta1hi/CD133<sup>+</sup>) (Collins AT, 2005); páncreas (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>ESA<sup>+</sup>) (Li C, 2007); colon (CD133<sup>+</sup>) (O'Brien CA, 2007); pulmón (GLDC, glicina decarboxilasa) (Zhang WC, 2012); estomago (CD44<sup>+</sup>) (Takaishi S, 2009); ovario (CD133<sup>+</sup>) (Curley MD, 2009); hígado (EpCAM<sup>+</sup>) (Terris B, 2010) y piel (CD271<sup>+</sup>) (Boiko AD, 2010). Un aumento en la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) también permite la identificación de CSC (Ginestier C, 2007). Adicionalmente, estas células presentan altos niveles de transportadores de membrana dependientes de ATP, proteínas importantes en los procesos de transporte y detoxificación celular, responsables de la

multirresistencia a fármacos y por lo tanto de la quimioresistencia observada en algunos tipos celulares (Chen K, 2013).

El uso de estos marcadores se ha constituido como el método más común para la identificación y aislamiento de CSC a partir de una población heterogénea de células tumorales. Sin embargo, la mayoría de estos marcadores se han identificado empíricamente, y además también están presentes en células *stem* normales. De tal forma, que el uso de algunos de estos marcadores es controversial y requiere de más investigación. Por ejemplo, CD133 es un marcador de superficie celular presente en células *stem* neuronales y se ha usado de manera general para la identificación de CSC, en muchos tipos de cáncer como glioblastoma, seno, próstata, hígado, tumor de Wilms y neuroblastoma (Mehrazma M, 2013). Sin embargo, en cáncer de pulmón en humanos, subpoblaciones celulares CD133<sup>+</sup> y CD133<sup>-</sup> presentan capacidad clonogénica, de autorrenovación y tumorigénica (Meng X, 2009). Así mismo, conversiones entre estas subpoblaciones, añaden un grado de complejidad a la identificación de CSC; en procesos metastásicos, las células tumorales CD133<sup>+</sup> pueden dar origen a subpoblaciones celulares más agresivas CD133<sup>-</sup> capaces de iniciar nuevos tumores (Shmelkov SV, 2008). Igualmente, trabajos recientes muestran que el microambiente tumoral puede modular la expresión de este marcador (Yang Z, 2012). Estos resultados sugieren que dada la variabilidad fenotípica que existen dentro del tumor, el uso de diferentes combinaciones de marcadores es necesario para el enriquecimiento y aislamiento de CSC. La expresión de CD44 junto con otros marcadores, CD24, CD133, CD34 y EpCAM se ha utilizado también para la caracterización y enriquecimiento de CSC (Yan Y, 2015). Por ejemplo, en cáncer de seno, células con un fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup>Lineage<sup>-</sup> presentan un mayor potencial tumorigénico y una mayor capacidad de autorrenovación (Al-Hajj M, 2003). En cáncer de colon (Su YJ, 2011), glioblastoma (Pietras A, 2014) y gástrico (Takaishi S, 2009), la expresión de CD44 también se asocia con un aumento en las propiedades de las células *stem*; y en cáncer colorectal la expresión de EpCAM<sup>(high)</sup>/CD44<sup>+</sup> permite el enriquecimiento de CSC (Dalerba P, 2007). CD44 es una glicoproteína transmembranal, multifuncional y multiestructural, perteneciente a la clase de moléculas de adhesión, un componente principal de la matriz extracelular y un co-receptor para muchos factores de crecimiento y citoquinas. Su principal ligando es el ácido hialurónico, aunque también puede unirse a otros componentes de la matriz extracelular, como colágeno, fibronectina,



fibrinógeno, laminina, metaloproteínasas y osteopontina (Naor D, 2002; Naor D, 2008). Sin embargo, la evaluación de algunos marcadores puede complicar las conclusiones acerca de su expresión. Por ejemplo, las proteínas de la familia de CD44 en humanos están codificados por un gen que contiene 20 exones y 19 intrones en donde los exones 1 a 16 codifican para la porción extracelular. Los primeros 5 exones se expresan en todas las formas de CD44, y los siguientes 10 (exón 6 al 15) son designados como variables ( $V_1$ - $V_{10}$ ) ya que pueden ser incluidos o excluidos en varias combinaciones en la forma estándar (CD44s), mediante procesos de *splicing* alternativo del ectodominio de CD44, y dan cuenta de la heterogeneidad de esta familia de proteínas (Screaton GR, 1992). La heterogeneidad de CD44 se incrementa además por diferentes modificaciones postraduccionales, así como glicosilación o palmitoilación (Orian-RousseauV, 2010). CD44s se expresan en la mayoría de las células de vertebrados, mientras que CD44v se expresan en algunas células bajo ciertas condiciones específicas, y en particular en diferentes tipos de cáncer, principalmente en estados avanzados (Matsumura Y, 1992). Por ejemplo, en cáncer de colon, la expresión de CD44v6 es un factor de mal pronóstico, debido a su asociación con metástasis (Todaro M, 2014), así mismo la expresión de CD44v8-10 se considera un marcador de CSC en cáncer gástrico (Lau WM, 2014), y la expresión de CD44v3, un marcador de CSC en cáncer de cuello y cabeza (Wang SJ, 2007). El valor pronóstico de CD44s y CD44v también es controversial y varía dependiendo del tipo de cáncer, ya que la expresión de CD44s no siempre se asocia con progresión tumoral. Un estudio previo indicó que la pérdida de CD44s se asoció con un aumento en el potencial metastásico de células de cáncer colorectal a nódulos linfoides e hígado. Así mismo, Un meta-análisis en 3098 pacientes mostró que la expresión de CD44v6 y no de CD44 se asociaba con un aumento en metástasis y baja supervivencia (Fan CW, 2012). Por lo tanto, la discrepancia entre el valor pronóstico de CD44s y CD44v en diferentes tipos de tumores requiere de más clarificación. CD44 media el proceso de tumorigénesis a través de la inducción de señales de crecimiento, la degradación de la matriz extracelular y la lámina basal permitiendo de esta manera la migración y la expansión tumoral. Interactúa con metaloproteínasas, activándolas y facilitando su unión a la superficie de las células tumorales (Herrera-Gayol A, 1999; Sneath RJ, 1998). También, regula procesos como la EMT, la migración e invasión a través de la unión a proteínas del citoesqueleto (Ezrina, radixina y moesina) mediante su dominio citoplasmático, (Morath I, 2016,), o a través de un

cambio en la expresión de isoformas (CD44v a CD44s) lo cual es esencial en la progresión tumoral de cáncer de seno (Brown RL, 2011). Así mismo, regula la supervivencia, autorrenovación, mantenimiento y quimio-resistencia de CSC, a través de la unión a HA y osteopontina, y la activación de vías de señalización como Nanog-Stat3, Oct4-Sox2-Nanog, y quinasas como c-Src (Revisado en Yan Y, 2015).

Por su parte, CD24 es una proteína de superficie celular que contiene residuos de serina y treonina lo que la hace similar a las mucinas; está glicosilada de manera variable y dependiente del tipo celular. CD24 participa en la transducción de señales a través del reclutamiento de proteínas tirosina quinasas miembros de la familia Src (c-Fgr, Lyn, Lck), y de la activación de MAPK. Se expresa en células hematopoyéticas como células B, T, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y macrófagos, así como en células no hematopoyéticas (células neuronales, ganglionares, epiteliales, queratinocitos, pancreáticas, musculares) y en células *stem* tumorales. Su expresión tiende a ser alta en células progenitoras y metabólicamente activas y baja en células terminalmente diferenciadas (Fang X, 2010). Su alta expresión se correlaciona con el grado histológico y tamaño tumoral así como también con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer como seno, pulmón, colorectal, ovario, próstata (Kristiansen G, 2002; Kristiansen G, 2003; Kristiansen G, 2004; Lee JH, 2009; Kristiansen G, 2010; Darwish NS, 2004; Choi YL, 2006; Fogel M, 1999; Cram DS, 1999; Lee TK, 2011; Li C, 2007; Yeung TM, 2010), y en algunos menos frecuentes como carcinoma de células claras de riñón (Lee HJ, 2008; Arik D, 2017). De manera importante, CD24 contribuye con la progresión del cáncer y la metástasis a través de la regulación de la proliferación, migración, invasión, EMT y *stemness* (Baumann P, 2005; Smith SC, 2006; Bretz N, 2012; Kwon MJ, 2015; Lim J, 2014). Sin embargo, su expresión disminuye en algunas CSC comparativamente con su progenie (Ponti D, 2006; Choi D, 2009). En efecto, células de cáncer de seno (Al-Hajj M, 2003; Ponti D, 2006) y colorectal (Choi D, 2009) se caracterizan por presentar una baja expresión de CD24, la cual combinada con una alta expresión de CD44, se asocia con la tumorigénesis (Mani SA, 2008; Morel AP, 2008). Sin embargo, también en cáncer de seno, su sobreexpresión se correlaciona de manera significativa con metástasis hacia los nodos linfoides y con estados patológicos avanzados (Kwon MJ, 2015). En una línea celular de melanoma la co-expresión de CD44<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> permite la identificación de una población con propiedades similares

a CSC (Dou J, 2007). Todo esto indica que el papel de CD24 en la adquisición de propiedades de células *stem* y en la capacidad tumorigénica y metastásica depende del contexto, es decir, del tipo de cáncer, de célula de origen, del estado del desarrollo del cáncer y de factores presentes en el microambiente tumoral.

Además del uso de marcadores de superficie celular, las CSC se pueden identificar mediante ensayos funcionales. La capacidad para formar esferas en condiciones libres de suero se utilizó por primera vez para la obtención de neuroesferas a partir de tejido cerebral (Reynolds BA, 1996). Este método se usa actualmente para el aislamiento de CSC a partir no solo de tumores cerebrales sino también de otros tipos de cáncer (Duan JJ, 2013). Este ensayo se basa en la premisa que únicamente células con capacidad *stem* sobreviven en suspensión y por lo tanto sobreviven a la *anoikis* (muerte celular por apoptosis causada por la ausencia de interacción célula-célula o con la matriz extracelular) (Dontu G, 2003). La capacidad de formar estas estructuras es indicativa de la presencia de CSC y al hacerlo por varias generaciones es una comprobación de su capacidad de autorrenovación. A pesar de ser considerado como uno de los métodos *in vitro* más usado para el enriquecimiento de CSC, presenta algunos problemas: la eficiencia de aislamiento de CSC es baja (1% a 30%); la mayoría de las células en las esferas son diferenciadas y/o progenitores senescentes; las células se pueden diferenciar o sufrir apoptosis después de varias generaciones (Pastrana E, 2011); además, en algunos casos, no existe correspondencia entre la capacidad *in vitro* de formar esferas y la capacidad tumorigénica (Visvader JE, 2008). Por esto, la capacidad de las CSC para formar tumores *in vivo* en ratones inmunocomprometidos se ha constituido como la prueba estándar para su identificación (Collins AT, 2005). En este ensayo la habilidad para formar tumores a bajas densidades (ensayo de dilución limitante) permite estimar la frecuencia de CSC activas (Abbaszadegan MR, 2017). No obstante, a pesar de que estos ensayos permiten determinar el potencial tumorigénico de las células tumorales, estos no necesariamente dan cuenta del efecto del microambiente tumoral. Por lo tanto, los ensayos de seguimiento de linaje, basado en el uso de un gen reportero (proteína fluorescente), se constituyen hoy en día como una herramienta para monitorear el comportamiento *in vivo* de estas células (Nassar D, 2016).

## Transición epitelio-mesenquimal (EMT)

La EMT se definió inicialmente como un proceso de transformación celular desde un estado epitelial a uno mesenquimal importante durante el desarrollo embrionario (Hay ED, 1995). Es un programa importante también en la fibrosis, la curación de heridas y la progresión tumoral. Los cambios morfológicos constituyen una de las principales características de la EMT (Hay ED, 1995; Nieto MA, 2013). Estos se caracterizan principalmente por una perturbación de las uniones intercelulares, una pérdida de la polaridad celular, reorganización del citoesqueleto e incremento en la movilidad (Kalluri R, 2009). Proteínas específicas de las células epiteliales como E-cadherina, ocludina, claudina, desmogleina y desmocolina, se localizan en las uniones celulares y se encargan de mantener la integridad de los tejidos epiteliales y su polaridad apico-basal. A nivel molecular la EMT se caracteriza por una disminución en la expresión de citoqueratinas epiteliales (citoqueratina 8 y 18) y de proteínas de adhesión célula-célula (E-cadherina), lo que lleva a la pérdida de uniones adherentes y a la adquisición de una morfología fibroblastoide. La inactivación de la E-cadherina, se considera un sello distintivo de la EMT, y puede ser causada por la represión de la transcripción a nivel de su promotor, su clivaje proteolítico, mutaciones somáticas o por delección cromosómica (Agiostatidou G, 2007). La disminución en las características epiteliales se acompaña de un aumento en la expresión de marcadores de tipo mesenquimal, incluyendo un aumento en la expresión de Vimentina, fibronectina, N-cadherina y la actina de musculo liso (alfa-SMA) (Hollier BG, 2009). Además de estos cambios morfológicos, las células adquieren una mayor capacidad de migración e invasión y propiedades de células *stem* (Jordan NV, 2011). En condiciones normales, por ejemplo, durante la embriogénesis o la reparación de heridas, la EMT se activa en las células epiteliales a través de señales que reciben de las células vecinas. De manera similar, en condiciones patológicas, como el cáncer, la activación de un programa de EMT latente en células tumorales, esta mediado a través de señales derivadas de células como miofibroblastos, células madre mesenquimales, así como también células del sistema inmune presentes en el microambiente tumoral (Chaffer CL, 2016). Más específicamente, la influencia del microambiente sobre las células de cáncer de tipo epitelial está dada a través de moléculas de señalización que median las interacciones heterópicas célula-célula (células tumorales-células residentes en el microambiente tumoral),

entre las cuales las vías de señalización, Wnt, TGF $\beta$  y Notch ejercen un papel central. Adicionalmente, factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento hepático (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor derivado de plaquetas (PDGF), componentes de la matriz extracelular como colágeno y ácido hialurónico, señales de estrés como el factor inducido por hipoxia-1 (HIF1) y señales de tipo inflamatorias como la activación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL6 e IL8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )) y la activación de FTs como NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y Stat3, desencadenan este programa de EMT (Lamouille S, 2014; Smith BN, 2016; Guo W, 2014). Estos estímulos desencadenan rutas de señalización que convergen en la activación de FTs como Snail, Slug, Zeb1, Zeb2, Twist, los cuales son frecuentemente sobre-regulados en diferentes tipos de cáncer (May CD, 2011; Nieto MA, 2016; Emadi Baygi M, 2010; Denecker G, 2014; Krebs AM, 2017). Estos FTs promueven la adquisición de un fenotipo mesenquimal a través de la regulación de la expresión génica y de pequeños RNA (miRNA), induciendo la estabilización de proteínas y modificaciones epigenéticas e induciendo cambios en la configuración de la cromatina. En general, estos FTs inhiben la expresión de E-cadherina, promoviendo la translocación nuclear de la  $\beta$ -catenina y la subsecuente activación de rutas como Wnt. Adicionalmente promueven la expresión de factores como el TGF- $\beta$ 3, el cual favorece un fenotipo mesenquimal (revisado en Sulaiman A, 2017).

No obstante, de acuerdo con la asociación internacional de la transición epitelio mesenquimal (TEMTIA), este proceso se refiere más a una transición y se asocia con el concepto de plasticidad celular. De esta manera, la EMT se ha redefinido como una transición a través de un espectro de estados intermedios en donde algunas células con una mayor plasticidad celular pueden permanecer en estos estados y de esta manera experimentar, de manera frecuente, un programa de EMT parcial (Nieto MA, 2016). La identificación de estados intermedios o híbridos entre un fenotipo Epitelial y Mesenquimal (E/M) durante la fibrosis de órganos y en células tumorales circulantes (esto es células que han adquirido capacidad de migración e invasión, así como también propiedades de células *stem*, y que se encuentran en la circulación, CTC) proporciona evidencia de su existencia (Nieto MA, 2016). En efecto, CTC aisladas de pacientes con cáncer metastásico avanzado de próstata o seno,

presentan un fenotipo principalmente híbrido y además expresan marcadores de CSC (Armstrong AJ, 2011; Theodoropoulos PA, 2010). Además, células con un fenotipo híbrido en tumores primarios de ovario y próstata muestran una mayor capacidad de autorrenovación y una alta capacidad tumorigénica (Ruscetti M, 2015; Strauss R, 2011).

### **Transición epitelio-mesenquimal (EMT) e inflamación**

Varios procesos biológicos como la inflamación pueden conducir al desarrollo de la EMT. Por ejemplo, el tratamiento durante 2-3 semanas de células epiteliales adyacente al tumor con citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) induce un aumento en la expresión de Zeb1 y Snail, y en su capacidad de migración/invasión a través de la regulación de metaloproteinasas presentes en la matriz extracelular (Leibovich-Rivkin T, 2013). Factores solubles derivados de células *stem* mesenquimales expuestas a IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , inducen la adquisición de un fenotipo mesenquimal y un incremento en la capacidad de migración de células de cáncer de seno tipo luminal, MCF-7 (Trivanović D, 2016). Por otra parte, células de cáncer gástrico expuestas a sobrenadantes obtenidos de células mesenquimales infectadas con *H. Pylori*, ricos en IL6, IL8 y PDGF, adquieren un fenotipo mesenquimal caracterizado por un incremento en la expresión de N-cadherina, Vimentina y una disminución de E-cadherina (Zhang Q, 2016). La producción de estas citoquinas (IL6, IL8) así como también la activación de rutas de señalización asociadas a inflamación (NF-kB/IkBa y Stat3) se observó en células de cáncer de seno triple negativas en respuesta a quimioterapia convencional; además, se relacionó con un enriquecimiento de la población de células *stem* CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> y con un mayor potencial tumorigénico (Jia D, 2016). Estos hallazgos sugieren que el microambiente tumoral influencia la plasticidad celular y la activación de un programa de EMT, el cual contribuye a la adquisición de propiedades *stem* y por lo tanto a la progresión tumoral (Nieto MA, 2016).

### **Transición epitelio-mesenquimal (EMT), CSC y tumorigenicidad**

La EMT se asocia con una serie de eventos relacionados con el cáncer: la invasión, la metástasis, la resistencia a muerte celular, una respuesta refractaria a la quimioterapia e inmunoterapia, la inmunosupresión y la adquisición de propiedades de células *stem* (Lee JM,

2006; Thiery JP, 2009; Frisch SM, 2013; Tam WL, 2013). La conexión entre la activación de la EMT y la progresión tumoral se ha confirmado en una variedad de líneas celulares de cáncer de humano. En efecto, aproximadamente un 80% de los tumores derivan de tejidos epiteliales (pulmón, colon, seno, páncreas, próstata, vejiga, ovario, riñón e hígado). La naturaleza epitelial de la célula de origen, caracterizada por la presencia de marcadores epiteliales (expresión de citoqueratinas y E-cadherina), en las etapas iniciales de la formación del tumor, y la subsecuente adquisición de características mesenquimales en carcinomas avanzados dan soporte a la idea de la activación de un programa de EMT latente durante la progresión del tumor (Ye X, 2015). En cáncer de seno, la adquisición de características mesenquimales se asocia con los subtipos más agresivos de esta enfermedad (triple negativo, claudina bajo) y con la progresión tumoral (Aleskandarany MA, 2014; Blick T, 2008; Choi Y, 2013). Una demostración más directa de la asociación de la EMT con la progresión tumoral se obtuvo de los estudios de ganancia y pérdida de función en modelos de xenoinjerto. En líneas celulares de cáncer de seno, la disminución en la expresión de FTs como Twist y Snail, resultó en la inhibición de la diseminación metastásica. Mientras que su activación ectópica indujo un programa de EMT, un aumento en la progresión tumoral y en la resistencia a agentes quimioterapéuticos (Yang J, 2004; Tran HD, 2014). Por su parte, Zeb1 se constituye como un regulador crítico de la plasticidad epitelial-mesenquimal de células CSC de cáncer de seno. Dada su configuración de cromatina bivalente, Zeb1 puede alternar entre dos estados de activación/represión de la expresión génica y de esta manera regular la conversión de células no-CSC a CSC en respuesta a estímulos como el TGFβ (Chaffer CL, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la EMT y la adquisición de un fenotipo de CSC se relacionan con la progresión tumoral. En efecto, diversos estudios muestran que células con un fenotipo CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> presentan características asociadas a la EMT y que la inducción de este programa por la sobreexpresión de FTs incrementa el número de células con un fenotipo de células *stem* y su capacidad iniciadora de tumor (Mani SA, 2008; Morel AP, 2008). En cáncer de próstata, células con un fenotipo mesenquimal presentan propiedades de células *stem*, un incremento en genes asociados a la reprogramación celular (Sox2, Nanog, Oct4, Lin28), una mayor capacidad clonogénica y de formación de esferas, y además, un aumento en la capacidad tumorigénica *in vivo* (Kong D, 2010). La activación de

Zeb1, regula la EMT y la adquisición de estas propiedades a través de la represión de miembros de la familia de los miR200 y de la inducción de factores como Sox2 y Klf4 (Wellner U, 2009). Igualmente, Twist1 regula directamente Bmi1 (proteína importante para el mantenimiento de la autorrenovación), y de manera conjunta suprimen la expresión de let-7, un microRNA expresado durante la diferenciación de células *stem*, conduciendo de esta manera a un estado de *stemness* (Yang WH, 2012). Estos hallazgos indican que el programa de EMT ejerce un papel importante en la transición desde un estado no-*stem* a uno *stem* tanto en tejidos normales como neoplásicos.

De manera interesante, la adquisición de un programa de EMT también se asocia con inmunosupresión en varios tipos de cáncer. En melanoma, la expresión de Snail inhibe la diferenciación de células T citotóxicas y promueve la formación de células T reguladoras (Kudo-Saito C, 2009). En cáncer de seno, la EMT incrementa la resistencia de células tumorales a la lisis mediada por células T citotóxicas a través de la inducción de autofagia (Akalay I, 2013). En cáncer de pulmón, la activación de Zeb1 incrementa la expresión de PD-L1, una molécula inmunosupresora que bloquea el ataque de los linfocitos infiltrantes de tumor CD8+ (Chen L, 2014).

No obstante, a pesar de que la EMT se ha asociado de manera general con *stemness*, varios estudios contradicen este concepto (Brabletz T, 2012). Sorprendentemente, se ha reportado que la EMT inhibe el desarrollo de células con características *stem* (Celià-Terrassa T, 2012; Sarrío D, 2012). En células humanas de cáncer de seno, la inhibición de la expresión del factor de transcripción (Prrx1), un inductor de la EMT incrementa la formación de mamoesferas, la capacidad de autorrenovación y la proporción de células *stem* CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> (Ocaña OH, 2012). Además, se ha demostrado que Twist1 contribuye a la adquisición de propiedades *stem* de manera independiente de la EMT (Beck B, 2015; Schmidt JM, 2015). La expresión transitoria de Twist1 induce un aumento en la capacidad de colonización y de invasión de células tumorales a través de la coexistencia de características epiteliales y mesenquimales (Schmidt JM, 2015). La existencia del proceso contrario de la EMT, la MET (Transición Mesenquimo-Epitelial), sugiere que la EMT no se requiere en su totalidad para la adquisición de *stemness*. En efecto, la MET, se constituye como un pre-requisito para la reprogramación de fibroblastos a células *stem* pluripotentes



inducidas. Durante esta reprogramación, los FTs Oct4/Sox2 reducen la expresión de Snail, y Klf4 induce la expresión de E-cadherina, dando como resultado la MET (Li R, 2010). Este programa se presenta no solo durante el desarrollo embrionario, en donde células mesenquimales presentes en el mesodermo pueden dar origen a órganos epiteliales, como el riñón y el ovario, sino también durante la re-diferenciación y colonización metastásica, contribuyendo al igual que la EMT en la adquisición de *stemness* (Bonnomet A, 2012; Nieto AM, 2013).

Estos hallazgos ponen de manifiesto la naturaleza heterogénea del programa EMT que ocurre en un microambiente tumoral determinado, y sugieren que la EMT se representa mejor como un espectro de estados intermedios, o lo que se ha denominado EMT parcial, en donde las células que expresan tanto marcadores epiteliales como mesenquimales (híbrido E/M) son más susceptibles de adquirir propiedades de células *stem* (Nieto AM, 2016). Debido a que las CSC se han asociado con el proceso de EMT, y que éste no produce células en estados terminales estables, la asociación de estos estados intermedios con funciones *stem* particulares y su capacidad tumorigénica se constituye en un reto importante en la biología tumoral.

### **Microambiente tumoral, inflamación y CSC**

Las CSC se encuentran en un microambiente específico bajo constante presión de selección, allí diferentes factores paracrinos o el contacto directo célula-célula o célula-matriz extracelular regulan su mantenimiento, así como también sus características de autorrenovación y de diferenciación constituyéndose como uno de los principales mecanismos de generación de CSC (Prasetyanti PR, 2017). El microambiente tumoral, contribuye no solo a la adquisición de un fenotipo *stem* en células normales o no-CSC sino también a la plasticidad celular durante las diferentes etapas del desarrollo tumoral a través de la activación de diferentes rutas de señalización (Albini A, 2015). También induce cambios metabólicos, hipoxia y alteraciones en el pH, condiciones que están fuertemente ligadas y que regulan el comportamiento de células *stem* promoviendo la EMT, e induciendo la expresión de factores asociados a pluripotencia (Oct-3/4, Nanog y Sox-2), y promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis (Philip B, 2013).

Como se mencionó anteriormente, las células del sistema inmunológico también ejercen un papel importante en la progresión tumoral. El papel de la inflamación en el desarrollo del cáncer se describió por primera vez en 1863 por Rudolf Virchow; la presencia de células infiltrantes de tumor asociadas a la inflamación le permitió desarrollar la hipótesis que el cáncer se desarrolla en sitios en donde ha ocurrido inflamación (Balkwill F, 2001; Balkwill F, 2005). En efecto, diferentes estudios demuestran que la inflamación crónica induce cambios en el microambiente tumoral que conllevan a la proliferación de lesiones precancerosas facilitando su tumorigénesis (Antonio N, 2015). Por ejemplo, la infección con *H. pylori* se asocia con el desarrollo de cáncer de estómago, y pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal presentan un alto riesgo de sufrir cáncer de colon (Eaden JA, 2001). Los datos epidemiológicos indican que más del 25% de todos los tipos de cáncer se relacionan con infecciones crónicas o con procesos inflamatorios no resueltos (Vendramini-Costa DB, 2012). Esta relación se refuerza también por la disminución en la recurrencia y la mortalidad en cáncer colorectal, seno, páncreas y próstata por el uso de anti-inflamatorios no esteroideos (Rothwell PM, 2011; Sandler RS; 2003), sugiriendo que existe un mecanismo común de acción de los mediadores inflamatorios en el desarrollo tumoral (Vendramini-Costa DB, 2012; Fraser DM, 2014; Streicher SA, 2014). Se sabe además que la inflamación crónica induce daño en el ADN, inestabilidad cromosómica, resistencia a la apoptosis, proliferación celular y angiogénesis, procesos que contribuyen de manera importante primero, a la inducción de tumores y luego, a la metástasis (Kundu JK, 2012). De esta manera, la inflamación es un componente importante del microambiente tumoral y una de las características principales del cáncer ya que tiene un papel fundamental en la inmunosupresión, la supervivencia del tumor, la proliferación y la angiogénesis (Hanahan D, 2011). La interacción de células de cáncer con el microambiente tumoral, específicamente con células del sistema inmune (macrófagos, neutrófilo, células dendríticas, células asesinas naturales, células supresoras derivadas de células mieloides, linfocitos T y B) son críticas para la progresión tumoral. A través de la producción de múltiples mediadores de la inflamación como citoquinas y quimioquinas (VEGF-A, CSFs, IL1, IL6, IL8, o CXCL1), Ciclooxygenasa 1 y 2 (COX) y la producción de prostaglandinas, estas células pueden iniciar una comunicación con CSC para inducir su adaptación a un microambiente tumoral cambiante al cual se enfrenta en el tumor primario, durante la metástasis y en sitios distantes de

colonización (Chockley PJ, 2016). Por consiguiente, las lesiones genéticas, las alteraciones epigenéticas y los componentes del microambiente pueden en conjunto iniciar el desarrollo y contribuir a la progresión tumoral confiriendo ventajas competitivas a las CSC transformadas. Adicionalmente, un número importante de vías de señalización intracelular se encuentran desreguladas, las cuales incluyen receptores de superficie celular, proteínas quinasas y FTs que inducen a la expresión anormal de genes involucrados en una respuesta pro-inflamatoria y en la transformación maligna (Wu Y, 2014). Estos factores solubles pueden ejercer el efecto sobre las células pre-malignas de manera directa o indirecta a través de la producción de ROS por el daño que estos causan al ADN, a proteínas y a lípidos (Block K, 2012). Por esto, componentes de la inflamación y el microambiente tumoral de manera general, son actualmente también blancos terapéuticos de importancia para lo cual existen en la actualidad diferentes estrategias para neutralizarlos (Smyth MJ, 2017). No obstante, la inflamación también puede tener efectos inhibitorios sobre el cáncer, en parte favoreciendo el ataque inmune (Vesely MD, 2011). En efecto, la presencia de células del sistema inmune, células T citotóxicas y células dendríticas, o mediadores de la inflamación, interferón de tipo I e IL-12, se asocian con un buen pronóstico (Fridman WH, 2012; Gajewski TF, 2013; Vesely MD, 2011), mostrando que las células de cáncer no pasan desapercibidas al sistema inmune.

### **Senescencia celular**

La senescencia celular considerada hace más de 50 años como un proceso que limita el crecimiento de células humanas normales después de varios pases en cultivo (Hayflick L, 1965), se define como un mecanismo biológico caracterizado por una detención irreversible en la proliferación celular que se origina como una respuesta a diversos estímulos (acortamiento de los telómeros, daño en el ADN, estrés oxidativo, medicamentos citotóxicos, activación de oncogenes y estímulos de estrés crónico como niveles altos de especies reactivas de oxígeno) para prevenir la propagación de células dañadas. Este proceso opera durante el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos, la cicatrización de heridas, el envejecimiento celular y, es considerado también como un mecanismo supresor tumoral (Bartkova J, 2006; Xue W, 2007). La senescencia se asocia con cambios en la expresión génica y en los perfiles epigenéticos que conducen a alteraciones fenotípicas, incluyendo la resistencia a apoptosis, y la secreción de múltiples moléculas pro-inflamatorias (citoquinas,

quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas), conocidas como fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, por sus siglas en ingles). Estos estímulos convergen en la activación de una respuesta al daño en el ADN, inducción de genes supresores tumorales p53, o la activación del inhibidor del ciclo celular p16<sup>INK4A</sup>, el cual induce la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb) (Ruhland MK, 2016).

Varias características y marcadores moleculares se utilizan para la identificación de células senescentes. Estas pueden diferir de tejido a tejido o variar de acuerdo con la naturaleza del proceso que desencadena senescencia. Por ejemplo, células senescentes mantenidas en condiciones de cultivo celular experimentan cambios asociados a la adquisición de una morfología más larga y aplanada, con presencia de vacuolas citoplasmáticas, mientras que células senescentes *in vivo* retienen su morfología normal (Lasry A, 2015). Además de su morfología, la identificación de células senescentes se basa en la combinación de marcadores específicos. En general, las células senescentes son inmunoreactivas para beta-galactosidasa (SA-βgal), una enzima presente en los lisosomas que cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos a pH ácido, expresan altos niveles de p53, P21 y p16<sup>INK4a</sup>, y bajos niveles de marcadores asociados a ciclo celular como Ki67. También presentan cambios en la conformación de la cromatina, resultando en focos de heterocromatina asociados a senescencia. De manera importante, las células senescentes son metabólicamente activas, expresan y secretan los SASP que pueden tener un efecto sobre el comportamiento de las células pre- y malignas y la progresión tumoral (Davalos AR, 2010; Coppé JP, 2010). En efecto, mediante la producción de SASP las células senescentes pueden propagar la respuesta al estrés y afectar el microambiente de las células vecinas (Lasry A, 2015). Por ejemplo, proteasas presentes en SASP inducen la pérdida de proteínas asociadas a membranas resultando en la presencia de receptores solubles, degradación de moléculas de señalización y degradación de la matriz extracelular. Estas actividades proporcionan un mecanismo potente por el cual las células senescentes pueden modificar el microambiente afectando las células vecinas, lo cual puede promover múltiples patologías, incluyendo el cáncer (Davalos AR, 2010). SASP estimula la regeneración y/o reparación de los tejidos a través de la secreción de metaloproteinasas y atrae células del sistema inmune, como las células asesinas naturales (NK), para llevar a cabo la erradicación de las células senescentes. Adicionalmente, a través de la producción de citoquinas como la IL6 y la IL8, ayuda al reforzamiento de rutas

supresoras tumorales (Campisi J, 2011). Si bien existe suficiente evidencia que sugiere que la respuesta senescente suprime la tumorigénesis, se ha visto que las células tumorales evaden este mecanismo de diferentes maneras (Hollstein M, 1991; Kim NW, 1994; Shay JW, 1997; Foster SA, 1998; Jarrard DF, 1999). No obstante, a simple vista parece contradictorio que un mecanismo supresor tumoral, el cual es claramente benéfico, pueda tener también efectos deletéreos para el organismo. En efecto, la teoría evolutiva del antagonismo pleiotrópico predice ambos escenarios, en donde procesos que son benéficos en la vida temprana de un organismo se vuelven perjudiciales conforme la edad aumenta; así en etapas tardías de la vida la senescencia puede promover patologías como el cáncer (Krtolica A, 2001).

### **Senescencia celular y progresión tumoral**

La senescencia celular se documentó en primera medida como un mecanismo de supresión celular que impide la transformación celular. Sin embargo, diversos estudios sugieren un papel relevante de la senescencia en la tumorigénesis (Pribluda A, 2013). Uno de los primeros hallazgos del papel de las células senescentes en la progresión tumoral se relacionó con el efecto de los fibroblastos senescentes en la estimulación de la proliferación de diferentes células pre-malignas y líneas celulares completamente transformadas y la aceleración de la tumorigénesis en modelos de xenoinjerto (Krtolica A, 2001), a través de un efecto mitogénico paracrino o metastásico sobre células pre-malignas (Parrinello S, 2005), o por la interacción con células endoteliales, células estromales y tejidos, mediante la secreción de proteínas como las metaloproteinasas (Liu D, 2007). Otros hallazgos soportan la asociación de las células senescentes con etapas pre-malignas del desarrollo tumoral (Collado M, 2007; Campisi J, 2011; Bhatia B, 2008; Bartholomew JN, 2009; Bavik C, 2006; Castro-Vega LJ, 2015). Lesiones pre-neoplásicas a nivel del pulmón en ratones que sobre-expresan la versión mutada del oncogén K-Ras (K-RASV12) contienen células senescentes en abundancia, mientras que lesiones de adenocarcinoma de pulmón carecen completamente de células positivas para estos marcadores de senescencia (Collado M, 2007). La asociación de células senescentes con lesiones pre-malignas proporcionan una oportunidad única para usar la senescencia como un indicador de estadios tempranos de la tumorigénesis, esto teniendo en cuenta que las células senescentes son abundantes en las lesiones neoplásicas pre-malignas, y están completamente ausentes en los tumores más avanzados (Collado M, 2006).

Por otra parte, factores solubles presentes en SASP ejercen un papel importante en la progresión tumoral. Por ejemplo, osteopontina y GRO $\alpha$  inducen la proliferación de células pre- y neoplásicas; metaloproteínasas (MMP)-3 promueven la invasión, y el VEGF promueve la angiogénesis y el crecimiento tumoral (revisado en Ruhland MK, 2016). Además, estos factores promueven, no solo la proliferación, supervivencia y progresión tumoral de células pre-malignas o transformadas, sino también la inducción y propagación de un estado senescente. En un modelo murino de cáncer de próstata, la pérdida de la tirosina fosfatasas PTEN (gen supresor tumoral) resultó en la generación de lesiones pre-malignas, la propagación de la senescencia y la producción de SASP, principalmente de CXCL2 y GM-CSF, dos citoquinas inmunosupresoras típicamente activadas por el factor de transcripción Stat3. Por otra parte, la infiltración de células inmunosupresoras a sitios dentro del tumor resultó en la inhibición de la proliferación de células NK y células T CD8<sup>+</sup> y en la producción de IL1RA, la cual antagonizó la señalización mediada por la IL1 y de esta manera promovió la inducción de la senescencia y el desarrollo de un tipo de carcinoma invasivo (Rao SG, 2016). Esto indica que la progresión tumoral puede ser inducida por un mecanismo dependiente de la senescencia, ya sea a través del contacto directo célula-célula o por la secreción de factores, o indirectamente por la modificación del microambiente en que estas células se desarrollan.

### **Senescencia celular, inflamación y progresión tumoral**

La activación de SASP está en gran parte mediada por FTs como el factor NF- $\kappa$ B y la proteína beta de unión a regiones CCAAT (C/EBP $\beta$ ) los cuales inducen, un microambiente de tipo pro-inflamatorio a través de la secreción de citoquinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6 e IL8) y factores de crecimiento (HGF, TGF $\beta$  y GM-CSF), y el reclutamiento de células del sistema inmune que conllevan no solo a la propagación de la senescencia, sino también pueden tener efectos sobre el cáncer. Estos factores también pueden interactuar con células del sistema inmune (de origen linfóide o mielóide) a través de mecanismos de señalización paracrina (Hubackova S, 2012; Acosta JC, 2013) contribuyendo con la erradicación del tumor o promoviendo un microambiente inmunosupresor. Progenitores linfoides pueden dar origen a células T colaboradoras CD4<sup>+</sup>, células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>, y a células NK, las cuales están involucradas en la inmunovigilancia. Por su parte, progenitores mieloides pueden dar origen

a células supresoras derivadas de mieloides y a macrófagos, los cuales promueven un microambiente inmunosupresor y están asociadas con la progresión tumoral. Los macrófagos de tipo M1 promueven la inflamación y son por lo tanto supresores tumorales, mientras que los macrófagos M2 liberan citoquinas anti-inflamatorias promotoras del tumor (IL1RA, IL10, IL6 y TGF- $\beta$ ) (Revisado en Rao SG, 2016).

La inflamación puede tener diferentes efectos en la tumorigénesis dependiendo de si su activación es transitoria o crónica. Una señal inflamatoria transitoria claramente es insuficiente para desencadenar una transformación en células normales. Sin embargo, esta señal puede iniciar la transformación de células pre-cancerígenas, y puede desencadenar la generación de una señal inflamatoria crónica, que es importante para la consolidación y mantenimiento de un estado maligno. La inflamación crónica, además de estar implicada en la progresión del cáncer, es una de las características distintivas del envejecimiento celular. Evidencia en modelos murinos demuestra que la ablación de las subunidades p50 y p105 de NF-kB condujo a la disfunción telómerica y al envejecimiento acelerado caracterizado por un incremento en la tasa de senescencia celular (Bernal GM, 2014). En humanos, la inflamación inducida por el envejecimiento celular se asocia con un gran número de enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson (Blasko I, 2004; Perry VH, 2012), osteoartritis, aterosclerosis y cáncer (Brennan FM, 1995; Brod SA, 2000; Caruso C, 2004); En efecto, las células senescentes se acumulan con la edad en múltiples tejidos como la piel, seno, hígado y pulmón (Jeyapalan JC, 2007; Ruhland MK, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias es una característica clave de la senescencia. En particular, las citoquinas IL6 e IL8 son componentes frecuentes del SASP y parecen ser responsables del mantenimiento y la propagación de la respuesta inflamatoria/senescente en el microambiente tumoral (Schäfer M, 2008; Coppé JP, 2008; Coppé JP; 2010; Acosta JC, 2013; Chien Y, 2011; Campisi J, 2011).

## **Papel de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 en la progresión tumoral**

La IL6 es una citoquina multifuncional que regula la proliferación, supervivencia, diferenciación, y participa en diversas funciones celulares, incluyendo la respuesta inmune, inflamación, hematopoyesis, la migración, invasión, proliferación, apoptosis, y la progresión, angiogénesis y diferenciación de células tumorales (Guo Y, 2012; Santer FR, 2010; Keller ET, 1996; Akira S, 1993). El incremento en la producción de IL6 se asocia con diversos tipos de cáncer como mieloma múltiple (Lauta VM, 2001; Fulciniti M, 2009), cáncer de endometrio (Bellone S, 2005), pulmón (Songur N, 2004), colorectal (Belluco C, 2000), renal (Negrier S, 2004), cervical (Wei LH, 2003), seno (Salgado R, 2003; Bachelot T, 2003; Knüpfer H, 2007) y ovario (Penson RT, 2000). Así mismo, la sobreexpresión de la citoquina IL6 como de su receptor IL6R se asocia con un mal pronóstico en cáncer de seno (Garcia-Tunon I, 2005) próstata (Culig Z, 2005) y carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (Shinriki S, 2009). La IL6 señala a través de dos tipos de receptor: de membrana y soluble; el primero es un complejo receptor asociado a la membrana celular (IL6R), que consiste en dos cadenas alfa de unión a ligando (CD126) o IL-6R $\alpha$  y de dos subunidades  $\beta$  traductoras de señales (CD130) o gp130. El receptor soluble de IL6 (sIL-6R) se genera por *splicing* alternativo o como un producto de clivaje del ectodominio de la cadena alfa del receptor de membrana (IL-6R $\alpha$ ), mediado por metaloproteinasas de la familia ADAM (Heinrich PC, 1998). La unión de IL6 a sIL-6R o IL-6R $\alpha$  y su posterior unión a gp130 desencadena la activación de la tirosina quinasas, como Janus quinasa (JAK), la cual conduce a la activación del factor de transcripción Stat3, el cual inicia la transcripción de genes reguladores de apoptosis (Bcl-XL, MCL-1, XIAP, c-Myc y Fas) (Chung JK, 1997). La IL6 también activa rutas de señalización como RAS, MAPK, Cox-2, Wnt y PI3K/AKT (Ara T, 2010; Jee SH, 2004). A través del complejo receptor IL6R/gp130 y la consecuente activación de Stat3, la IL6 regula la autorrenovación de células *stem* de cáncer de seno (Iliopoulos D, 2009; Iliopoulos D, 2010; Korkaya H, 2011), y además desempeña un papel central en el equilibrio dinámico entre CSC y no-CSC y en el mantenimiento y enriquecimiento de mamoesferas en condiciones normales y malignas (Sansone P, 2007; Iliopoulos D, 2011; Korkaya H, 2012; Kim SY, 2013). Teniendo en cuenta que la IL6 y su receptor sIL-6R se secretan de manera abundante en tejidos con inflamación, envejecimiento y con alto grado de infiltración tumoral, se estableció



una fuerte asociación entre la IL6 y la patogénesis de una variedad de enfermedades asociadas con el proceso de senescencia e inflamación y en particular en la regulación del balance entre senescencia y tumorigénesis (Hirano T, 1997; Hirano T, 2000; Kojima H, 2013). Este balance es mantenido a través de la activación, principalmente de la vía de señalización Jak/Stat3, la cual regula procesos como la EMT, proliferación, supervivencia, angiogénesis, inducción de células CSC y la metástasis (Sanguinetti A, 2015; Guo Y, 2012). Adicionalmente, la IL6 se constituye como un vínculo entre la señalización mediada por Stat3 y la liberación de citoquinas de inflamación (IL-1, TNF- $\alpha$ ) dependiente de la activación de NF-kB, que en conjunto participan en la conversión de un fenotipo celular normal estable a un fenotipo neoplásico estable sin cambios evidentes en la secuencia de ADN (Iliopoulos D, 2009). Stat3 interactúa con NF-kB en múltiples niveles, además de ser persistentemente activados en las mismas células tumorales y en células mieloides asociadas a tumor, induciendo la expresión de un repertorio de genes asociados con la promoción, crecimiento y desarrollo tumoral (Yu H, 2009), estableciendo de esta manera un vínculo entre inflamación, tumorigénesis y la activación de NF-kB (Ernst M, 2012; Esquivel-Velázquez M, 2015).

Por su parte, la IL8 es una citoquina quimioatrayente producida por una variedad de tejidos y células sanguíneas, incluyendo linfocitos, monocitos, células endoteliales, fibroblastos, hepatocitos y queratinocitos (Herbert CA, 1993), así como también por células malignas presentes en cáncer de ovario (Yoneda J, 1998), próstata (Kim SJ, 2001), seno (Benoy IH, 2004 Yao C, 2007) y cáncer gástrico (Kitadai Y, 1998). La IL8 pertenece a la familia de quimioquinas CXC, la cual activa múltiples vías de señalización a través de dos receptores acoplados a proteínas G (CXCR1 y CXCR2). Existen dos formas de IL8, la derivada de monocitos y macrófagos, que consiste en 72 aminoácidos; y la derivada de células endoteliales y fibroblastos que contiene 5 aminoácidos adicionales en su porción amino terminal (Terui Y, 1998). Diferentes estímulos regulan la expresión de IL8 (citoquinas pro-inflamatorias, exposición a agentes quimioterapéuticos, hipoxia, acidosis, óxido nítrico, densidad celular y hormonas como estrógenos, andrógenos) (Waugh DJ, 2008; Xie K, 2001).

Los receptores de IL8 se origina por duplicación génica y difieren en su capacidad de unión a ligando. Mientras que CXCR1 es activada por IL8 y por la proteína 2 quimioatrayente de granulocitos (GCP-2) /CXCL6, CXCR2 es más promiscuo y puede ser activado por otras quimioquinas como el oncogén regulado por crecimiento (GRO)-a/ CXCL1, GRO-b/CXCL2, GRO-g /CXCL3, CXCL5, GCP-2 y la proteína 2 activadora de neutrófilos (NAP-2) /CXCL7 (revisado en Singh JK, 2013). Estos receptores se caracterizan por su asociación con proteínas G heterotriméricas, las cuales consisten en tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). La activación de estas subunidades ( $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$ ) desencadena, principalmente la activación de tres rutas de señalización: fosfatidil-inositol-3 quinasa/AKT (PI3K/Akt), fosfolipasa C y proteína quinasa C (PLC/PKC), y miembros de la familia de las MAPK quinasas (Erk1/2) (Wu D, 1993; Knall C, 1996; Knall C, 1997). Además, IL8 puede inducir también la activación de Jak/Stat3 y promover la translocación al núcleo de Stat3 y  $\beta$ -catenina. La activación de estas rutas de señalización en conjunto promueve la angiogénesis, supervivencia, proliferación e invasión (Waugh DJ, 2008).

La IL8 presenta una alta especificidad por los neutrófilos, atrayéndolos y activándolos en sitios en donde ha ocurrido inflamación y promoviendo su degranulación (Bickel M, 1993); además, su sobreexpresión y la de sus receptores en células tumorales, neutrófilos, y macrófagos asociados al tumor, sugiere que IL8 puede funcionar como un factor regulador dentro del microambiente tumoral (Waugh DJ, 2008). La IL8 se ha estudiado no sólo por su papel como quimioquina en la invasión y la metástasis (Lin Y, 2004; Waugh DJ, 2008), sino también por su capacidad de inducir células CSC en cáncer de mama HER+ (Singh JK, 2013) y por su capacidad de formar mamoesferas en varias líneas celulares provenientes de diferentes orígenes (Charafe-Jauffret E, 2009).

Dada la relevancia de estas citoquinas en cáncer, su evaluación es de gran interés para entender el desarrollo y la progresión tumoral.

## **METODOLOGÍA**

### **Líneas celulares y condiciones de cultivo**

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de seno tipo luminal (MCF-7) y basal/mesenquimal Claudina bajo (MDA-MB-231), las cuales se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y la línea celular inmortalizada de células explantadas embrionarias de riñón humano (HEK, Human Epithelial Kidney Cells) PC1-Expl-1, la cual se obtuvo del laboratorio del Dr. Arturo Londoño (Instituto Curie). Las subpoblaciones CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> presentes en la línea celular PC1Expl-1 se separaron por citometría de flujo y se cultivaron en medio MEM-alfa, suplementado con SFB al 10%, aminoácidos no esenciales al 1% y piruvato de sodio al 1%, como se describió previamente (Castro-Vega LJ, 2013; Castro-Vega LJ, 2015). Para algunos experimentos también se utilizó la línea de fibroblastos senescentes HCA2 (PD65) y jóvenes (PD35) (Castro-Vega LJ, 2013). Estas se cultivaron en medio IMDM (Iscove's modified Dulbecco's media + Glutamax, Invitrogen) suplementado con SFB 10%. Todas las líneas celulares se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo celular (5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

### **Obtención del medio condicionado senescente (MeCoSe)**

El medio condicionado senescente (MeCoSe) se colectó a partir del cultivo de fibroblastos HCA2 senescentes (>PD65) a una confluencia del 80%. Para la preparación del MeCoSe, los fibroblastos se lavaron dos veces con PBS 1X y se mantuvieron sin SFB por 48 h en presencia de medio de cultivo IMDM. Posteriormente, el MeCoSe se colectó, centrifugó (10 min 1500 x g) y se filtró por una membrana de 0,22 µm. Este medio se utilizó inmediatamente después de su colecta o se almacenó a 4 °C por un periodo máximo de 2 días.

### **Inducción de la transición epitelio-mesenquimal**

La inducción de la EMT se realizó por la adición de MeCoSe a las células MCF-7 o por la incubación con citoquinas recombinantes de humano IL6 e IL8, las cuales se adicionaron

juntas o por separado a las células.

### **1. Tratamiento de las líneas celulares derivadas de cáncer de seno con MeCoSe**

Para todos los experimentos, el MeCoSe se utilizó fresco. Su concentración se normalizó con respecto al número de células utilizadas en cada experimento. Las células MCF-7 y MDA-MB-231 se trataron con medio normal suplementado con 0,5% de SFB (control) o MeCoSe por 5 días. Durante la inducción de la EMT, los medios se reemplazaron cada tercer día. Se realizó una evaluación morfológica y se tomó registros fotográficos periódicamente.

### **2. Tratamiento de las líneas celulares derivadas de cáncer de seno con citoquinas y anticuerpos neutralizantes**

Las células MCF-7 o MDA-MB-231 se cultivaron en cajas de 75 cm<sup>2</sup> pozos a una densidad de 50,000 células/ml a una confluencia aproximada de 30% o en placas de 24 pozos a una confluencia de 50%. Una vez las células estuvieron adheridas se adicionaron las citoquinas humanas recombinantes IL6 (50 ng/ml) o IL8 (50 ng/ml) o la mezcla de estas (IL6+IL8) en medio MEM $\alpha$  suplementado con 0,5% SFB. Para los experimentos de neutralización las células, MDA-MB-231 y MCF-7 estimuladas o no con MeCoSe, se trataron con 1  $\mu$ g/ml de anticuerpos neutralizantes CXCL8/IL8 (AF-208-NA, R&D SYSTEMS), anti-IL6 (MAM206, R&D SYSTEMS) o la mezcla de los dos anticuerpos (anti-IL6 + anti IL8). Las células cultivadas en medio MEM $\alpha$  suplementado con 0,5 % SFB o con MeCoSe se usaron como control. Adicionalmente, como control positivo de la inducción de la EMT se utilizó el TGF-beta (5 ng/ml). Las células se incubaron por 5 días con los respectivos tratamientos. Las citoquinas y los anticuerpos se adicionaron cada 2 días.

### **3. Tratamiento de las líneas celulares derivadas de cáncer de seno con el inhibidor de Stat3**

Para determinar el papel de Stat3 en la inducción de la EMT en las células MCF-7 se utilizó el inhibidor de Stat3, WP1066 (Santa cruz Biotechnology). Para esto, las células sembradas a una confluencia de 70% se incubaron durante 2 h en presencia del inhibidor a una

concentración de 5  $\mu$ M, posteriormente se lavaron dos veces, y se incubaron por 2 h más con 50 ng/ml de las citoquinas (IL6+IL8), las células se mantuvieron en condiciones estándar (37°C y 5% CO<sub>2</sub>) durante el tratamiento. La inhibición de Stat3 se corroboró por Western blot (WB).

## **Evaluación y caracterización de la EMT**

En todos los ensayos se hizo inicialmente una valoración morfológica tomando registros fotográficos periódicamente. A diferentes tiempos, de acuerdo con los experimentos, se tomaron muestras para los diferentes análisis fenotípicos (caracterización de marcadores asociados a EMT y a reprogramación) y funcionales (evaluación de la capacidad de proliferación, migración, invasión y de adhesión) y evaluación de características asociadas a un fenotipo *stem* (formación de esferas, colonias y capacidad iniciadora de tumor).

## **Determinación de la proliferación celular**

Para la evaluación de la capacidad de proliferación celular se utilizaron diferentes aproximaciones metodológicas: el recuento celular, la expresión del marcador de proliferación Ki67 y por la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) y de 5-Etínil-2'-desoxiuridina (EDU).

### **1. Determinación de la proliferación celular por recuento celular**

Se sembraron 5000 células/ml por pozo, por triplicado en placas de 16-mm-diametro en medio MEM $\alpha$  suplementado con 0,5 % SFB y se dejaron adherir por 24 h. Las células se colectaron por tripsinización y se contaron diariamente en cámara de Neubauer durante 5 días consecutivos.

### **2. Evaluación de la expresión del marcador de proliferación Ki-67**

La capacidad de proliferación celular se determinó también por la expresión de la proteína Ki67, la cual ejerce un papel importante en la regulación del ciclo celular, alcanza niveles

altos de expresión durante la mitosis y es ausente en células estacionarias o sin replicación. Las células tratadas o no, se fijaron con etanol y se marcaron con un anticuerpo anti-human Ki-67 conjugado con aloficocianina (APC) (Biolegend) o con su respectivo control de isotipo mouse IgG APC, por 30 minutos a 4°C en la oscuridad, posteriormente se lavaron para remover el exceso de anticuerpo, y se suspendieron en PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Aria-II, leyendo alrededor de 10.000 eventos. Los análisis se realizaron utilizando el software FlowJo.

### **3. Determinación de la proliferación celular por la marcación con BrdU**

Para determinar el efecto de las citoquinas en la proliferación celular, la línea celular MCF-7 se sembró a una confluencia del 40-50% en placas de 25 cm<sup>2</sup> y se dejó adherir toda la noche. Después de 24 h de incubación con medio sin SFB se trataron por 12 h con las citoquinas (IL6, IL8, IL6+IL8 y TGF- $\beta$ ) (tiempo de máxima duración del experimento de migración) o con MeCoSe durante 5, 7 y 10 días. Después del tratamiento, las células se marcaron con 30  $\mu$ M BrdU (Eurobio) por 25 minutos, se lavaron y permeabilizaron con 100% de etanol y se almacenaron a 4 °C por 1 h. Después del tratamiento con pepsina y HCl 2 N para desnaturalizar el ADN, las muestras se incubaron con anticuerpo primario anti-BrdU (Invitrogen) y con anticuerpo secundario anti-BrdU-FITC (Invitrogen). Las muestras se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

### **4. Determinación de la proliferación celular con EDU**

EDU es un análogo de la timidina el cual es incorporado dentro del ADN en células en división, lo que permite la detección de células que han duplicado su ADN. La incorporación de EDU se detectó mediante el uso del kit “Click-iT® EdU Imaging Kits” (Invitrogen). Las células se sembraron en láminas microscópicas (Cell line diagnostic microscope slides, ref: 30-2565-green CE-24, 4 well, 10 mm, Thermo Scientific) a una densidad celular de 40,000 células por pozo, y se permitieron adherir toda la noche. Después de 24 h de incubación con medio sin SFB se trataron por 12 h con las citoquinas (IL6, IL8, IL6+IL8 y TGF- $\beta$ ). Para la marcación con EDU se siguió el protocolo y las instrucciones del fabricante. Después de la

estimulación, se prosiguió a la preparación de la solución de trabajo de EDU (20  $\mu$ M) la cual se adicionó en volúmenes iguales a la suspensión celular para obtener una concentración final de 10  $\mu$ M. Las células se incubaron por 30 minutos, se lavaron, fijaron y permeabilizaron con 0.5% con Triton X-100. Posteriormente, se adicionó 500  $\mu$ L de la solución con el reactivo Click-iT®, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. La visualización y análisis de las imágenes se realizó en un microscopio de fluorescencia.

## **Evaluación de las características fenotípicas asociadas a la EMT**

### **1. Evaluación de la expresión de marcadores asociados a la EMT por citometría de flujo**

Las células se caracterizaron por la expresión de los marcadores de superficie celular asociados a un fenotipo mesenquimal, CD44, y epitelial CD24, y por la expresión de marcadores asociados a un fenotipo *stem*: EpCAM (CD326), CD105 (Endoglina) y CD133 (Prominina) (Miltenyi Biotec).  $1-2 \times 10^6$  células se colectaron por tratamiento enzimático, se lavaron y se suspendieron en PBS 1X con BSA al 0.5%. Las células se incubaron durante 45 minutos con los respectivos anticuerpos conjugados a fluorocromos. CD44-FITC (G44-26, BD Biosciences) y CD24-PE (ML5, BD Biosciences) se utilizaron para la caracterización de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 y CD24-PE (clon SN3, Invitrogen), CD44-FITC (Invitrogen) para la caracterización de las subpoblaciones celulares derivadas de la línea celular HEK (PC1-Expl-1). Posteriormente, se lavaron para remover el exceso de anticuerpo. Las muestras se analizaron en un citómetro FACS Aria-II (BD Bioscience), leyendo alrededor de 10.000 eventos.

### **2. Separación celular por citometría de flujo**

La separación por citometría de flujo se realizó en las células MCF-7 que habían experimentado la EMT por la estimulación con las citoquinas o con el MeCoSe y que presentaba por lo tanto un aumento en la expresión de CD44, y, en la línea celular HEK (PC1-Expl-1) por la expresión del marcador CD24. Las líneas celulares se mantuvieron en condiciones estériles durante la separación y su pureza se determinó después de cada

selección. Las subpoblaciones celulares se observaron al microscopio inmediatamente se seleccionaron y se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo celular. Los análisis se realizaron utilizando el software FlowJo.

### 3. Análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real (qRT-PCR)

El estudio de la expresión de los genes asociados a células epiteliales o mesenquimales y de los factores de transcripción (FTs) asociados a la EMT y a la reprogramación celular se realizó por qRT-PCR. Las células se colectaron por tripsinización, y el RNA se aisló utilizando el método Trizol/Cloroformo (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA total se determinó por espectrofotometría (ND-1000 NanoDrop), y 1  $\mu$ g de RNA se trató con DNAase I (Invitrogen) y se usó para la transcripción reversa y la obtención del cDNA usando un kit comercial (*High capacity cDNA reverse transcription kit*-Applied Biosystems). El cDNA resultante, se utilizó para los ensayos de qRT-PCR utilizando *Power Syber Green Master Mix* (Applied Biosystems). El volumen final de cada reacción fue de 25  $\mu$ l. La obtención de los datos se realizó en un equipo de PCR en tiempo real 7500. Para cada muestra, las reacciones se realizaron por triplicado y todo el análisis se realizó dos veces de manera independiente. El cambio en la expresión génica se calculó como la expresión relativa con respecto a GAPDH o con respecto a las células no tratadas (control), utilizando el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . El análisis de la expresión de miembros de la familia miR-200 (miR-200a, miR200b, miR200c, miR429, miR141) se realizó utilizando el sistema miRCURY (EXIQON) por qRT-PCR. Se utilizó 250 ng de RNA tratado con DNasas para preparar la secuencia de DNAs complementario en dos reacciones independientes utilizando secuencias específicas de ácidos nucleicos (*miR-specific locked nucleic acid primers*) en un sistema de PCR en tiempo real 7500. La expresión media de miembros de la familia hsa-Let7 se usó como un control endógeno para realizar la normalización. La cuantificación de la expresión relativa se realizó por el método del  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Las secuencias de los genes utilizados se muestran en la **TABLAS**

#### **Tabla suplementaria 1.**



#### 4. Evaluación de la expresión de marcadores asociados a EMT y de los FTs Stat3 y NF-kB por Western Blot

La activación de la vía de señalización Stat3 y NF-kB en las subpoblaciones seleccionadas (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>) y en la línea celular MCF7 se determinó por Western blot, mediante la evaluación de residuos fosforilados específicos para cada proteína. Las células MCF7 tratadas o no (control) por 2 h con 5  $\mu$ M de WP1066 y estimuladas con citoquinas por 2 h adicionales se lisaron con *buffer* de lisis RIPA (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1.2% aprotinina, 5 mM leupeptina, 4mM antipaina, 1mM PMSF, y 0.1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Cantidades iguales de proteína (35-40  $\mu$ g) se separaron por 10% de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Como marcador de peso molecular de proteínas se utilizó *The PageRuler Plus Prestained Protein marker* (Thermo Scientific). La transferencia se realizó en un sistema semiseco por 30 minutos a 15 voltios. El bloqueo de la membrana, para evitar uniones inespecíficas se realizó con 5% de leche descremada o 5 % de albumina de suero bovino por 1-2 h a temperatura ambiente (TA). Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C durante toda la noche, y los anticuerpos secundarios por 1 h a TA. La detección se realizó utilizando el kit BCIP/NBT (Promega). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios obtenidos de ratón: anticuerpo monoclonal anti-E-cadherina (BD Biosciences; Ref. 610182), dilución 1:5000; anti-beta actina (Santa Cruz Biotechnology; Ref. sc-47778), dilución 1:1000; anti-Vimentina (Sigma; Ref. V5255) dilución 1:1000; anti-Stat3 (Sigma; Ref: SAB1404414), dilución 1:1000; y anticuerpos policlonales obtenidos de conejo: anti-Zeb1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) (Abcam; Ref. ab64098), dilución 1:500; anti- Twist1 (Sigma; Ref: T6451), dilución 1:1000; anti-NF-kB (Abcam; Ref: ab16502), dilución 1:500; anti-NF-kB-fosfo-S536 (Abcam; Ref: ab86299) dilución 1:500; anti- Stat3 fosfo-Tyr705 (Sigma; Ref: SAB4504541), dilución 1:1000. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina anti-IgG de ratón y conejo (toda la molécula) (Sigma; Ref: A3562 y A3687, respectivamente). La captura y el análisis de las imágenes se realizó utilizando el software Gene Snap y Gene Tools respectivamente en un equipo de fotodocumentación de geles (Bio Image System).

## **5. Análisis por inmunohistoquímica (IHC) de marcadores asociados a la EMT**

Las biopsias obtenidas a partir de los tumores formados por la inyección de las células PC1-Expl-1, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y Mix se analizaron por la presencia de lesiones malignas y premalignas usando la tinción hematoxilina-eosina. También se evaluó por inmunohistoquímica la expresión de marcadores asociados a la EMT (E-cadherina, antígeno epitelial de membrana (EMA: Epithelial Membrane Antigen), Vimentina y actina de músculo liso (SMA: Smooth Muscle Antibody), y a lesiones neoplásicas de tejidos renales (Pax8) (Ozcan A, 2012; Knoepp SM, 2012). Las láminas con las respectivas marcaciones se analizaron al microscopio y se determinó la proporción e intensidad de la marcación en las células tumorales. Tanto el procedimiento como el análisis se realizó en el laboratorio de Patología de la Universidad Nacional de Colombia.

## **Evaluación de las características funcionales asociadas a la EMT**

### **1. Determinación de la capacidad de migración celular**

Las diferentes líneas celulares, control y tratadas con citoquinas o con MeCoSe, se dejaron crecer hasta lograr una confluencia del 80-90% y se mantuvieron en medio sin SFB toda la noche antes de iniciar los ensayos funcionales. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, se colectaron por tripsinización y se suspendieron en medio sin SFB. Para el ensayo de curación de heridas, las células se sembraron por triplicado a una confluencia del 100%, posteriormente se realizó una “herida” con la punta de una pipeta de 10 µl, y se evaluó el cierre de la herida a las 0, 6 y 12 h. En cada uno de los tiempos se realizó registro fotográfico. El cálculo del porcentaje del cierre de la herida se realizó con la ayuda del programa *Image J* teniendo en cuenta al menos 10 imágenes para cada uno de los tiempos evaluados.

Para el ensayo de migración dirigido, se utilizó la cámara de Boyden (*Transwell*) en un formato de 24 pozos con un tamaño de poro del filtro de 8.0 µm (BD Biosciences). Las cámaras se lavaron con medio de cultivo sin SFB 1 h antes del ensayo. Las células se sembraron por triplicado en el compartimento superior (CS) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pozo en 0.1 ml de medio sin SFB. Como quimioatrayente en el compartimento inferior

(CI), se utilizó medio completo + 50 ng/mL hrIL8 o medio completo + 20% SFB. La evaluación de la capacidad de migración se realizó a las 48 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células presentes en el CS que no migraron se removieron delicadamente con un hisopo, y se realizaron dos lavados con PBS 1X para lograr una mayor remoción. Se evaluaron las células que migraron al compartimiento inferior por conteo microscópico o las células que quedaron adheridas a la parte inferior del filtro por coloración con cristal violeta (0,5%). Un total de 10 imágenes se usaron para la cuantificación usando un microscopio invertido.

## **2. Determinación de la capacidad de invasión celular**

El ensayo de invasión se realizó de manera idéntica al ensayo de migración descrito previamente, excepto que los filtros se cubrieron por 1 h con 100 µL de matrigel (BD Bioscience) diluido en medio sin SFB. Transcurrido este tiempo,  $1 \times 10^5$  células suspendidas en medio sin SFB se sembraron en el compartimiento superior y se dejaron invadir por 48 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células presentes en el CS que no invadieron se removieron delicadamente con un hisopo. Se evaluaron las células que lograron atravesar el filtro en el compartimiento inferior por conteo microscópico o las células que quedaron adheridas a la parte inferior del filtro por coloración con cristal violeta (0,5%). Un total de 10 imágenes se usaron para la cuantificación usando un microscopio invertido.

## **3. Evaluación de la capacidad de adhesión celular**

Se evaluó la capacidad de adhesión celular utilizando como soporte placas recubiertas con fibronectina o colágeno. 20 µg/ml de fibronectina (Invitrogen) o 10 µg/ml de colágeno (Sigma) se adicionaron a placas de 96 pozos y se incubaron por 2 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se removió la solución, se lavaron los pozos con PBS 1X y se incubó por 1 h en presencia de solución de bloqueo (0.5 % de BSA en medio), esto con el objetivo de evitar uniones inespecíficas. Después de remover esta solución,  $4 \times 10^4$  células se sembraron por triplicado a los pozos recubiertos previamente, y se incubó por 40 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células no adheridas se lavaron tres veces con PBS 1X y las adheridas se tiñeron con cristal violeta. Se hizo conteo y registro fotográfico de las células adheridas.

Adicionalmente, el cristal violeta incorporado por las células adheridas se disolvió en 2 % de SDS y se realizó lectura de la absorbancia a 550  $\mu\text{m}$ .

## **Evaluación de características asociadas a un fenotipo de células *stem***

### **1. Evaluación de la capacidad clonogénica**

Las células se sembraron a una densidad de 500 células/ml en placas de 6 pozos y se dejaron en cultivo por 8 días para permitir la formación de colonias. Las colonias se lavaron con PBS 1X se fijaron y marcaron con cristal violeta (0.1% en 20% metanol) por 15 min. Se realizó registro fotográfico.

### **2. Evaluación de la capacidad de autorrenovación**

Las diferentes líneas celulares tratadas o no, se suspendieron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/ml y se sembraron por triplicado en placas de baja adherencia (MW6) (Nalge Nunc Interanational), en medio DMEM/F12 (1:1) libre de SFB suplementado con 20 ng/ml de bFGF y EGF, suplemento B27 (GIBCO), ITS (Insulin + Transferrin + Selenium, Sigma), y 1% metilcelulosa, este medio se adiciono fresco a los pozos cada dos días (sin remover el medio). Para determinar la eficiencia en la formación de esferas se realizaron evaluaciones tempranas (3-4 días) o tardías (8-9 días) de la formación de esferas en presencia de medio definido. Para el análisis, se tuvieron en cuenta esferas de tamaño superior a 100  $\mu\text{m}$  las cuales se seleccionaron después de pasar por un “cell strainer” (BD Bioscience) y por conteo microscópico con ayuda de un micrómetro. Se realizó registro fotográfico en cada uno de los tiempos establecidos.

### **3. Evaluación de la capacidad de proliferación de las células presentes en las mamoesferas**

Para evaluar la capacidad de proliferación de las células MCF-7 presentes en las mamoesferas, las células se marcaron con el colorante intracelular fluorescente CFSE (Carboxifluoresceína succinimidil ester), el cual penetra fácilmente a las células y se une de manera covalente, a través de su grupo succinimidil, a moléculas intracelulares,

principalmente a residuos de lisina, permaneciendo en su interior por largos periodos de tiempo. Este colorante se diluye tras cada ciclo de división celular por lo que permite la diferenciación de células con una alta capacidad de proliferación *versus* células quiescentes. Para la marcación con CFSE,  $1 \times 10^6$  células MCF-7 se suspendieron en 1 ml de la solución CFSE a una concentración final de  $5 \mu\text{M}$ . Después de 20 minutos de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , se realizaron dos lavados con PBS 1X. Las células marcadas con CFSE se observaron al microscopio de fluorescencia.

#### **4. Evaluación de la capacidad de diferenciación multilinaje**

El ensayo de diferenciación se realizó siguiendo procedimientos ya establecidos (Rodríguez VM, 2013). Brevemente, para la diferenciación adipogénica y osteogénica  $2 \times 10^4$  células y para la diferenciación condrogénica  $5 \times 10^4$  células se sembraron por triplicado en placas de 24 pozos y se cultivaron en medio completo. 24 h después, el medio se reemplazó con los respectivos medios de inducción por 10 días. Para la diferenciación osteogénica (dexametasona, beta-glicerofosfato, ácido ascórbico y SFB); para la diferenciación adipogénica (dexametasona, insulina, indometacina, isobutilmetilxantina y SFB) y para la diferenciación condrogénica TGF- $\beta$ 1, el cual induce la síntesis de fibronectina. Las evaluaciones se realizaron utilizando coloraciones específicas para cada diferenciación (aceite rojo O, para la diferenciación adipogénica; Safranina O, para la diferenciación condrogénica y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina como un indicador de la diferenciación osteogénica). Las células se observaron al microscopio invertido. Se realizaron registros fotográficos durante la diferenciación y después de las coloraciones específicas. Adicionalmente, se determinó por qRT-PCR el nivel de expresión génica de factores de transcripción asociados a la diferenciación osteogénica (RUNX2 y APL), adipogénica (PPAR $\gamma$ , C/EBP) y condrogénica (SOX9 y Aggrecan).

## **5. Determinación de la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1)**

La actividad de la enzima ALDH1 se detectó mediante el uso del kit ALDEFLUOR (StemCell Technologies) siguiendo el protocolo y las instrucciones de manufactura.  $1 \times 10^6$  células, se marcaron e incubaron por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con el colorante (BIODIPY-aminoacetaldehído, BAAA), este difunde de manera pasiva a todas las células y es convertido mediante la enzima ALDH a un aminoacetato fluorescente con carga negativa (BIODIPY-aminoacetato, BAA-) que es retenido en el citoplasma. Como control negativo, y para establecer la fluorescencia basal, otra muestra equivalente se trató con DEAB (diemethylamino-benzaldehyde), un inhibidor específico de la ALDH1. Las células con alta actividad ALDH se analizaron por citometría de flujo y los datos se analizaron utilizando el programa Flow Jo.

## **6. Evaluación de la capacidad tumorigénica**

Las subpoblaciones celulares seleccionadas por citometría de flujo ( $\text{CD44}^+\text{CD24}^{\text{Pos}}$  y  $\text{CD44}^+\text{CD24}^{\text{Neg}}$ ) y la línea celular PC1-Expl-1 se expandieron y colectaron por tripsinización. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X, centrifugaron por 5 minutos a 800 g, y se suspendieron en medio de cultivo sin SFB. La manipulación de los animales, así como también la inyección de las células, se realizó en el laboratorio de telómeros y cáncer del Instituto Curie, Paris, por Win Yan Bordes. Un volumen de 0.2 ml de la suspensión celular conteniendo  $5 \times 10^5$  células se usó para la inyección subcutánea la cual se realizó en los flancos de ratones (6 a 8 semanas de edad), con inmunodeficiencia combinada severa (*SCID: Severe Combined Immunodeficiency*). Para los experimentos de co-inyección, se usó una suspensión celular conteniendo  $2.5 \times 10^5$  células de cada subpoblación (Mix). Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales libres de patógenos. El tamaño del tumor se monitoreo dos veces por semana por un periodo total de 3 meses. El volumen del tumor se calculó con la siguiente formula: Volumen del tumor [ $\text{mm}^3$ ] = (longitud [mm])  $\times$  (ancho [mm])<sup>2</sup>  $\times$  0.52. Los animales se sacrificaron al finalizar el periodo de observación o cuando los tumores alcanzaron un volumen de  $1200\text{mm}^3$ . Para la manipulación de los animales se

tuvo en cuenta la guía institucional y nacional para el cuidado y uso de los animales. Adicionalmente todos los protocolos se aprobaron por el consejo de comité de ética institucional del Instituto Curie (CEEA-IC).

## **Evaluación de la inducción de senescencia e inflamación.**

### **1. Ensayo $\beta$ -galactosidasa asociado a senescencia (SA- $\beta$ GAL)**

La actividad SA- $\beta$ GAL se evaluó en fibroblastos jóvenes y senescentes después de 2 días de cultivo utilizando el kit (KAA002, Millipore). Esta actividad también se determinó en células MCF-7 tratadas o no por 5 o 10 días con alta (50 ng/ml) o baja (0,5 ng/ml) concentración de citoquinas o MeCoSe. Las células se observaron en un microscopio invertido. El desarrollo de un color perinuclear azul es indicativo de la presencia de células senescentes. En algunos experimentos el estado senescente se corroboró por qRT-PCR, evaluando la expresión de genes relacionados con senescencia, p53, p16 y p21 por qRT-PCR (Tabla suplementaria 1).

### **2. Evaluación de la producción de ROS intracelular y mitocondrial**

Teniendo en cuenta que durante procesos inflamatorios se liberan radicales libres de oxígeno, que pueden eventualmente generar senescencia, se evaluaron los niveles de producción de ROS en células MCF-7 estimuladas con las citoquinas (IL6+IL8) o con MeCoSe durante 4, 6 y 8 días. Como control de la producción de ROS las células se trataron con Luperox a 250  $\mu$ M durante 2 h (Sigma). Para la detección de ROS intracelular se empleó el compuesto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y para la detección de ROS mitocondrial se utilizó el mitosox. Las células se incubaron por 30 minutos con estos compuestos a una concentración de 5  $\mu$ M, después se colectaron por tripsinización, se lavaron con PBS + BSA 0,5 % y se mantuvieron en hielo protegido de la luz para su detección inmediata por citometría de flujo. El mitosox se detectó en el canal PE-Texas Red y el DCFH-DA en FITC.

### **3. Evaluación de citoquinas inflamatorias humanas**

La cantidad de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12-p70, IL-6, IL-8, IL-10), presentes en los sobrenadantes de fibroblastos senescentes (>PD65) y jóvenes (PD35) y en las líneas celulares utilizadas, con o sin tratamiento con MeCoSe, se determinó por citometría de flujo siguiendo las instrucciones del protocolo de BD™ Cytometric Bead Array (CBA). La adquisición de los datos se realizó en un citómetro de flujo FACS Aria-II. El análisis de la cantidad de citoquina en pg/ml se realizó utilizando el software FACSArray Bioanalyze, BD.

### **4. Evaluación del nivel de expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias**

Se utilizó un kit de arreglo de anticuerpos que permite la detección simultánea de 40 proteínas relacionadas con la inflamación (# ARY005B, R&D Systems). Para su detección, se utilizó 700  $\mu$ l de sobrenadante libre de suero de las células en condiciones normales de cultivo y se siguió el protocolo y las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las membranas se visualizaron por electroquimioluminiscencia (ECL) y autorradiografía. En la membrana cada punto representa la expresión por duplicado de una proteína específica.

### **Evaluación del papel de IL6 e IL8 en la línea celular MDA-MB-231**

El papel de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 en la línea celular MDA-MB-231 se evaluó mediante ensayos de pérdida de función. Para disminuir la expresión de la IL8, 10<sup>6</sup> células MDA-MB-231 se transfectaron con 2,5  $\mu$ l de esiRNAs (endoribonuclease-prepared small interfering), control esiFLUC (Firefly luciferase, Ref: EHUFLUC) y específico para IL8 (esiRNA human IL8, EHU048321). Para la transfección se utilizó el sistema de electroporación “Amaxa Nucleofection system” (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones recomendadas en el kit y el programa X-013. La disminución de la expresión de IL6 se realizó utilizando pequeños RNA, pSuperRetropuro-IL-6 shRNA1 (ADDGENE); Ref: 19959. La purificación del plásmido se realizó con el kit (QIAprep Spin Miniprep kit, Ref: 27106; QIAGEN). Para su verificación se realizó un corte con la enzima de restricción, Nhe I (#131S), y el producto generado se visualizó en un gel de agarosa al 1%



en solución TBE. La línea celular Phoenix-Ampho sembrada a una confluencia de 70% se utilizó para la producción del retrovirus. La transfección se realizó con 25 µg de plásmido y 50 µl de lipofectamina 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) diluidos en medio Optimem 1X (Gibco). La solución conteniendo el complejo de transfección se incubó por 6 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se removió esta solución y se adicionó medio fresco completo (DMEM + Glutamax/Gibco 10% SFB, piruvato de sodio y aminoácidos no esenciales) el cual se incubó durante toda la noche. 24 h después, el medio conteniendo el virus se centrifugó (1500 rpm 4°C) y filtró a través de una membrana de nylon de 0.45 µm. Este medio se adicionó a las células MDA-MB-231 sembradas a una confluencia de 60% para iniciar la primera ronda de infección. Después de 4 rondas de infección, se adicionó 10 ml de medio fresco más el antibiótico de selección (Puromicina). La disminución de la expresión de IL6 e IL8 se confirmó por qRT-PCR.

### **Análisis estadístico**

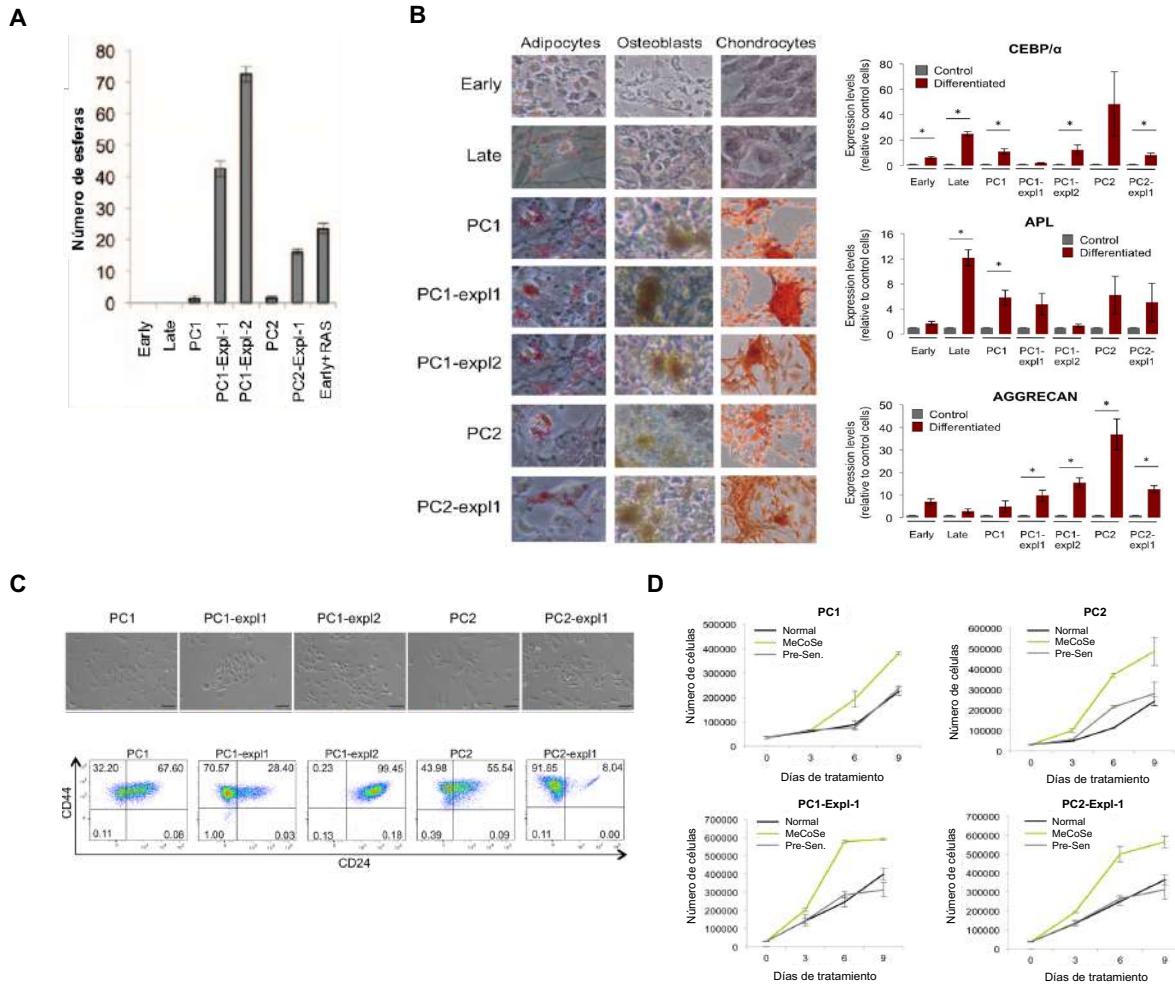
Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces y por triplicado. Las comparaciones de nivel de expresión génica, la capacidad crecimiento celular, formación de esferas, adhesión, migración e invasión se analizó utilizando el software GraphPad Prims v5 usando una prueba t no paramétrica de dos colas (Mann-Whitney) y un ANOVA de dos vías y un pos-test de Bonferroni. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con un valor de p de \* <0.05; \*\* <0.01 o \*\*\* <0.001.

## RESULTADOS

### CAPITULO I. Un microambiente senescente induce un fenotipo EMT, propiedades de células *stem* y capacidad tumorigénica

#### Un microambiente senescente induce plasticidad epitelial (EMT-MET) y capacidad tumorigénica

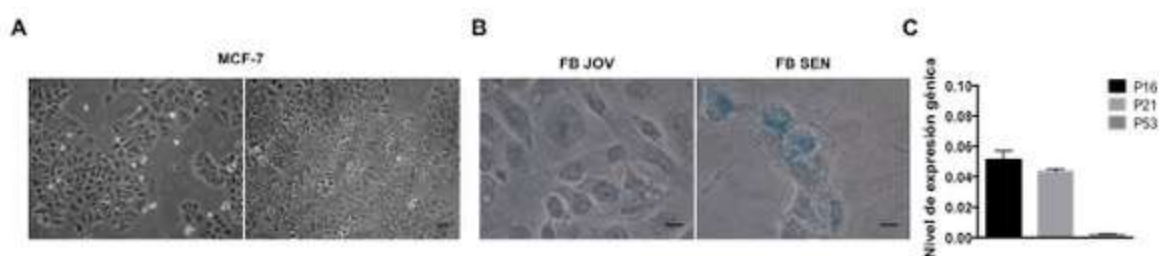
Inicialmente se mostró que células HEK pre-malignas inmortalizadas (pos-crisis, PC) adquirirían el potencial de llegar a ser completamente tumorigénicas exclusivamente en presencia de un microambiente senescente (Castro-Vega LJ, 2015); el análisis de las células explantadas de los tumores mostró la adquisición de un fenotipo híbrido y heterogéneo, esto es, células expresando marcadores epiteliales y mesenquimales en diferente grado (Castro-Vega LJ, 2015). De manera interesante, estas células adquirieron propiedades de células *stem*: un aumento en la capacidad de formar esferas (**Figura 1A**) y en la capacidad de diferenciación multipotente a linajes mesenquimales (**Figura 1B**), la cual se corroboró por el análisis de expresión génica de marcadores asociados a diferenciación. La caracterización fenotípica de estas células mostró que estas experimentaban transiciones EMT-MET. Todas las líneas celulares explantadas presentaron una alta expresión de CD44, mientras que los niveles de expresión de CD24 variaron entre las diferentes líneas, dando como resultado intermedio (PC1-Expl-1), alto (PC1-Expl-2) o bajo nivel de expresión (PC2-Expl-1) (**Figura 1C**) (Castro-Vega LJ, 2015). En conjunto, estos resultados sugirieron que el microambiente senescente puede inducir cambios permanentes en células pre-malignas. En efecto, el tratamiento con el MeCoSe indujo *in vitro* cambios similares a los inducidos por las células senescentes, además un aumento en la capacidad de proliferación (**Figura 1D**) (Castro-Vega LJ, 2015).



**Figura 1. Un microambiente senescente induce un aumento en la heterogeneidad y en las capacidades de células stem en un modelo de células HEK immortalizadas.** (A) Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido de formación de esferas (EGF, FGF y 1% metilcelulosa) en células pos-crisis y en explantadas. Las barras de error indican SEM (n=3). (B) la diferenciación hacia linajes mesenquimales (Adipo-, Osteo- y Condrocitos) se realizó mediante la incubación con medios de inducción específicos durante 13 días. La gráfica de barras muestra los niveles de expresión génica de marcadores asociados a la diferenciación. CEBP/ $\alpha$  (Adipo-); APL (Osteo-) y AGGRECAN (Condrocitos). (C) Análisis por microscopía de contraste de fases indica la adquisición de un fenotipo intermedio E/M en las células explantadas. El nivel de expresión de CD24 y CD44 se analizó por citometría de flujo. (D) Para la determinación de la cinética de crecimiento, se sembró la misma cantidad de células por triplicado y se trataron con medio normal o medio condicionado de fibroblastos pre-senescentes (Pre-Sen) o senescentes (MeCoSe). Las células se contaron en cada tiempo indicado, Barra de error indica SEM (n=3).

## El tratamiento con el MeCoSe induce un programa de EMT en células MCF-7

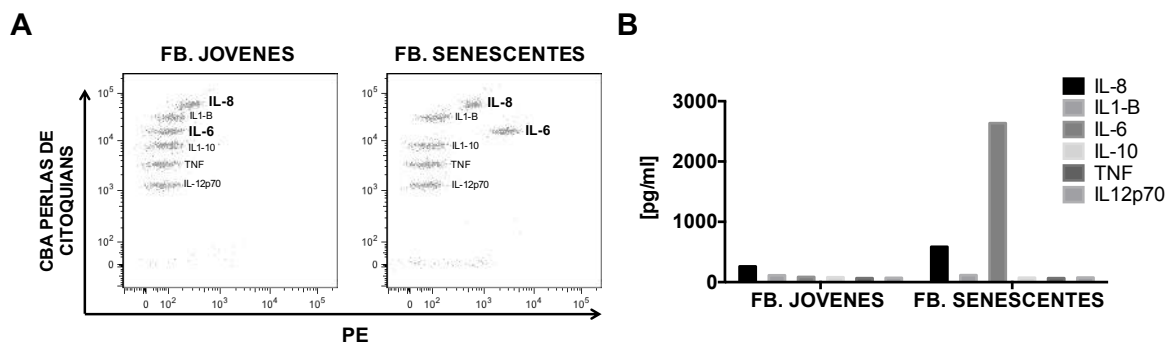
Teniendo en cuenta que un microambiente senescente puede inducir una capacidad tumorigénica en células pre-malignas y que el MeCoSe también induce transiciones EMT-MET y células con un fenotipo más agresivo, quisimos determinar si esto se aplicaba a otros modelos de cáncer. Se utilizó una línea celular de cáncer de seno de tipo luminal A (MCF-7). Esta se caracteriza por ser positiva para el receptor de estrógeno y progesterona (ER+/PR+) y negativa para Her-2; su morfología es de tipo epitelial, con células dispuestas en forma de adoquín y fuertemente adheridas (**Figura 2A**). Además, presenta baja capacidad tumorigénica y expresa bajos niveles o niveles no detectables de las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 (Chavey C, 2007; Sasser AK, 2007), lo cual se corroboró por análisis de citometría de flujo mediante el uso de un arreglo que detecta citoquinas pro-inflamatorias de humano (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL12-p70, IL6, IL8, IL10) (Cytokine Bead Array (CBA), Becton Dickinson) (**Figura 40A**). El estado senescente se caracterizó por la adopción de una morfología de células aplanadas, la aparición de vacuolas citoplasmáticas y por un aumento en la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- $\beta$ Gal), la cual en un medio ácido (pH 6.0) hidroliza el sustrato X-gal produciendo una coloración azul característica de células senescentes (**Figura 2B**). Adicionalmente, la evaluación de marcadores asociados al establecimiento y mantenimiento de la senescencia, como p53, p21 y p16 (Althubiti M, 2014) confirman la inducción del estado senescente (**Figura 2C**).



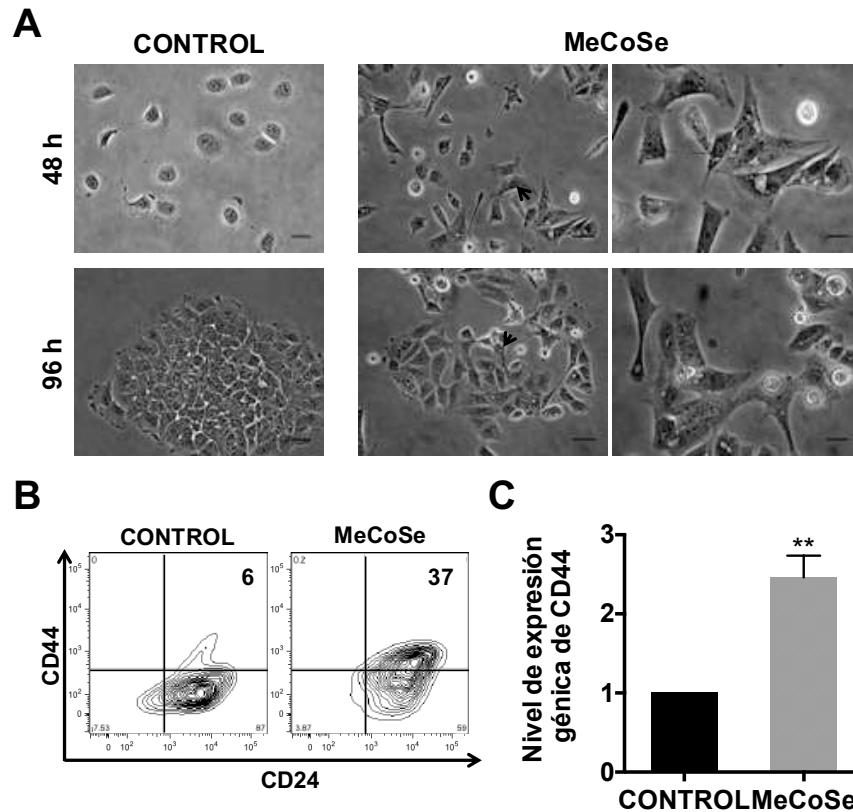
**Figura 2. Línea celular y caracterización de fibroblastos senescentes.** Morfología de la línea celular de cáncer de seno de tipo epitelial MCF-7. Fotografía tomada a 10X. Barra de escala 5  $\mu$ m. (B) Imágenes (40X) de fibroblastos (FB) jóvenes (JOV) (PD30) y senescentes (SEN) (>PD60) mostrando actividad SA- $\beta$ Gal únicamente en fibroblastos senescentes. (C) Nivel de expresión génica de marcadores asociados a senescencia determinados qRT-PCR. Los valores se normalizaron al control interno GAPDH.

Los niveles de estas citoquinas en el MeCoSe se cuantificaron por análisis de citometría de flujo (CBA, Morgan, 2004). Para comparación se utilizó un medio condicionado de

fibroblastos jóvenes los cuales, como se muestra en la **Figura 3A**, y en la gráfica de barras (**Figura 3B**), secretan muy bajas cantidades de estas citoquinas. El MeCoSe presentó altos niveles de estas citoquinas, principalmente IL6.

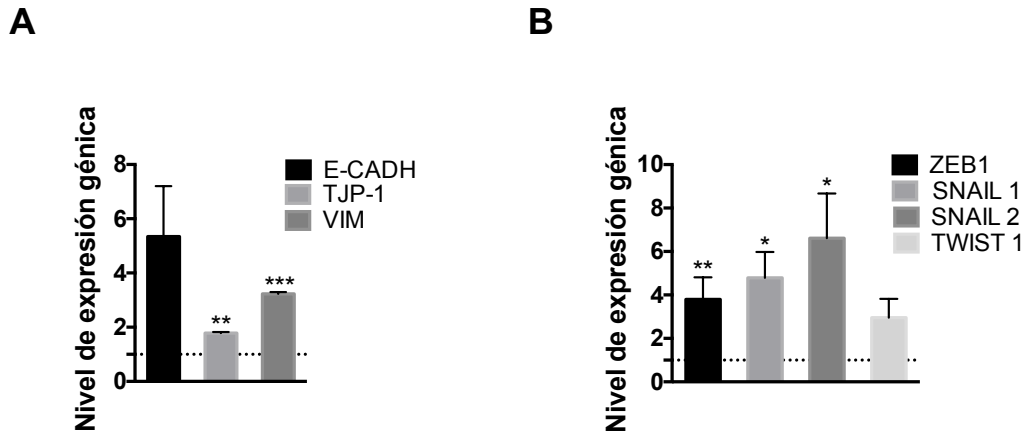


Como se observa en la **Figura 4A**, las células MCF-7 cultivadas en presencia de MeCoSe, experimentaron un cambio morfológico bien definido, caracterizado por una pérdida en la adhesión célula-célula con la consecuente adquisición de una morfología fusiforme, con células alargadas que crecen de forma separada, la cual es típica de las células fibroblastoides. Estos cambios se observaron tempranamente (48 h) (**Figura 4A, panel superior**) y se mantuvieron por 5 días (**Figura 4A, panel inferior**). Asociado a este fenotipo, las células MCF-7 mostraron un incremento en el marcador de superficie celular CD44, evaluado tanto por citometría de flujo (**Figura 4B**) como por qRT-PCR (**Figura 4C**). Estos cambios y la expresión elevada de CD44 se han asociado con la EMT y la presencia de CSC, sugiriendo que el MeCoSe induce funciones de células *stem*.



**Figura 4. El tratamiento con el MeCoSe indujo cambios morfológicos asociados a un programa de EMT en células MCF-7.** (A) Las células MCF-7 se cultivaron en medio con 0,5% de SFB (control) o con MeCoSe. Las evaluaciones morfológicas se realizaron a las 48 y 96 h después del tratamiento con el MeCoSe. Se muestran imágenes representativas. Las flechas indican células con morfología fibroblastoide. Barra de escala, 10  $\mu$ m. (B) Gráfica representativa de la expresión de marcadores de superficie celular determinada por citometría de flujo (FACS) con anticuerpos monoclonales CD44-FITC (marcador mesenquimal) y CD24-PE (marcador epitelial) en células MCF-7 estimuladas con MeCoSe durante 5 días (n=2). (C) Evaluación de la expresión de CD44 por qRT-PCR; los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control. Las barras de error representan la SEM. (n=2).

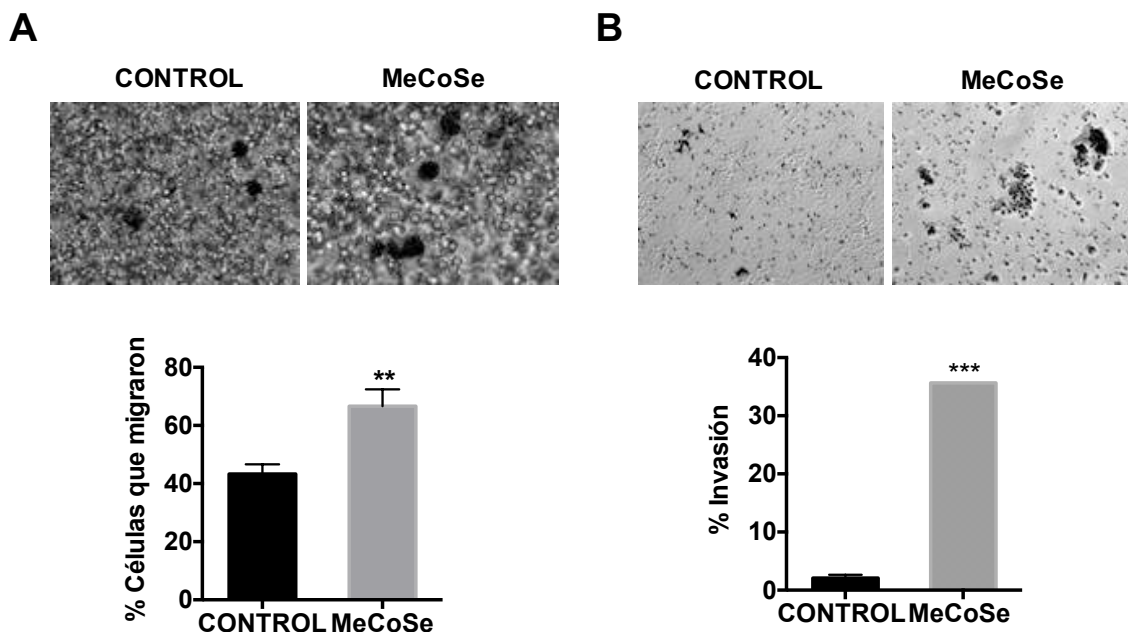
Por lo tanto, se determinó la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales después del tratamiento con el MeCoSe. Las células MCF-7 presentaron un incremento en la expresión de FTs y marcadores asociados a un fenotipo mesenquimal, Zeb-1, Snail-, Snail-2/Slug y Vimentina, sin perder la expresión de marcadores de tipo epitelial (E-cadherina y TJP-1) (**Figura 5**), es decir, un fenotipo híbrido



**Figura 5.** El tratamiento con el MeCoSe indujo cambios en la expresión de marcadores y FTs asociados a la EMT. Nivel de expresión génica de marcadores y, (B) de FTs asociados a EMT determinados por qRT-PCR. Los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control (línea punteada). Las barras de error representan la SEM. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) (n=2).

Estos cambios se acompañaron de un incremento en la capacidad de migración (**Figura 6A**) y de invasión en matrigel (**Figura 6B**) de las células MCF-7. De manera importante, el aumento en la capacidad de migración e invasión, no se debió a un aumento en la capacidad de proliferación de las células, ya que como se muestra en la **Figura suplementaria 1**, después de 4-5 días de incubación con el MeCoSe las células MCF-7 presentaron un menor número de células que las células control. Además, el nivel de expresión del marcador de proliferación, Ki-67, fue similar entre las células tratadas o no con el MeCoSe durante 5 días. Estos resultados sugieren que las células MCF-7 en presencia de MeCoSe, pueden adoptar un programa similar a la EMT.





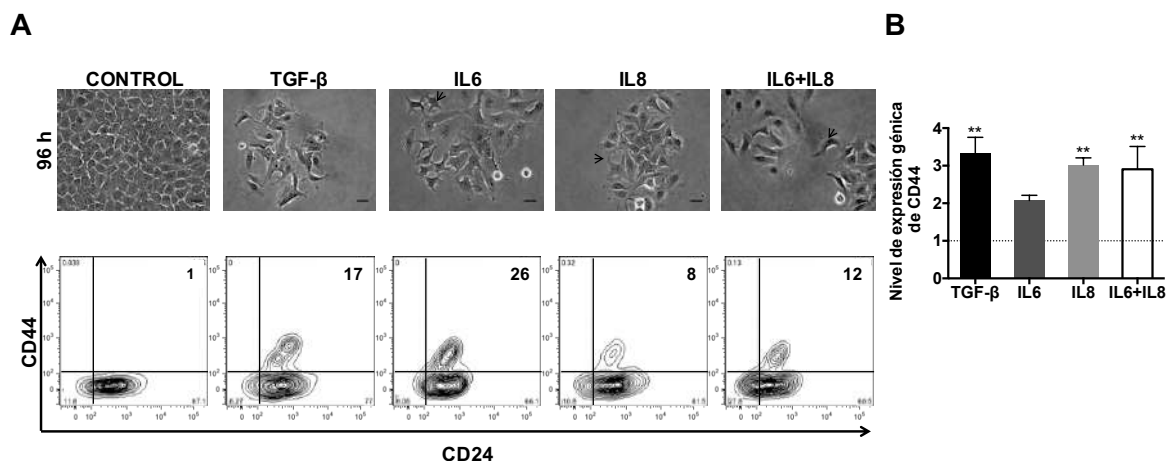
**Figura 6.** El tratamiento con el MeCoSe indujo un aumento en la capacidad de migración de células MCF-7. (A) Ensayo de migración en Transwell y (B) de invasión en matrigel realizado en células MCF-7 control y tratadas con MeCoSe. Se utilizó 20% de SFB como quimioatrayente en el compartimento inferior. Los histogramas muestran el número de células presentes en el compartimento inferior como una medida de la capacidad de estas células de migrar (derecha) y el número de células presentes en el compartimento superior de la cámara (superficie externa del filtro) (izquierda) de por lo menos 15 imágenes como una medida de la capacidad de estas células de invadir. Las barras de error indican SEM. (\*\* $p < 0.01$ ) (n=2).

### El tratamiento con IL6 e IL8 reproduce los cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales inducidos por el MeCoSe en las células MCF-7

Teniendo en cuenta que el MeCoSe mostró niveles altos de IL6 e IL8, evaluamos el efecto de estas citoquinas sobre las células MCF-7. Se utilizaron citoquinas humanas recombinantes, las cuales se adicionaron juntas o por separado al medio de cultivo de crecimiento de las células MCF-7. El TGF- $\beta$  se usó como control positivo de la inducción del programa de EMT (Xu N, 2009; Katsuno Y, 2013). Después de 5 días de tratamiento con las citoquinas, de manera individual o conjunta, las células MCF-7 adquirieron una morfología más fibroblastoide y presentaron un incremento en la expresión del marcador CD44, muy similar a lo obtenido con el TGF- $\beta$  y el MeCoSe (**Figura 7A**, panel superior). Los cambios en la expresión del marcador CD44, fueron evaluados tanto por citometría de

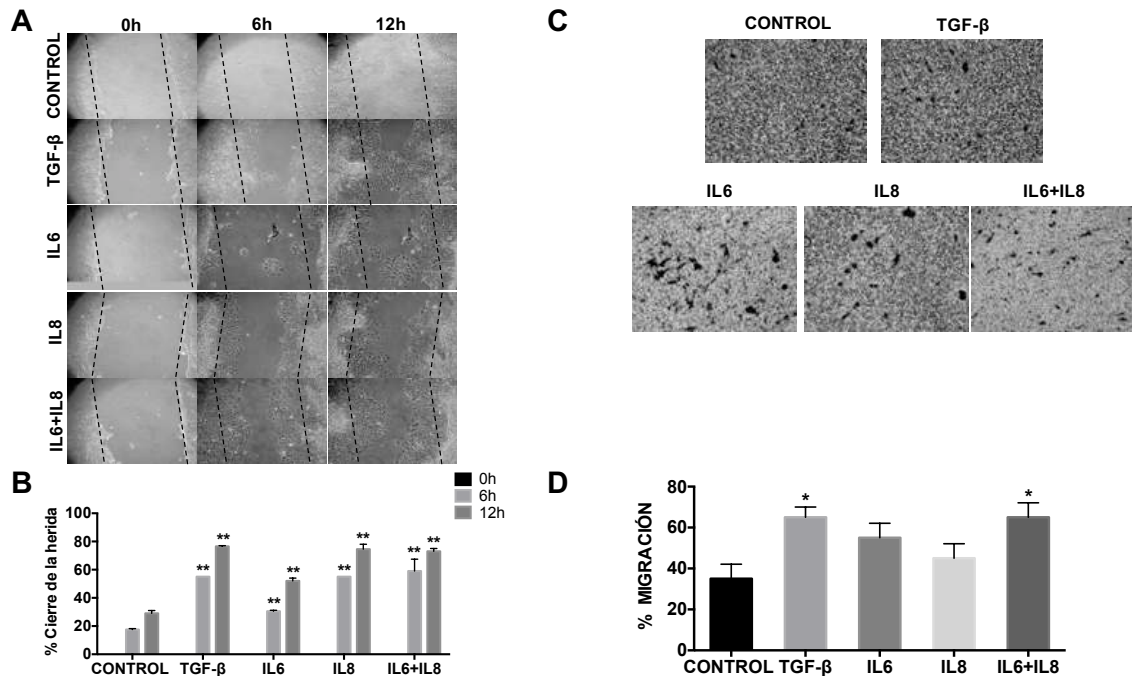


flujo (**Figura 7A**, panel inferior) como por qRT-PCR (**Figura 7B**), y muestran que no fueron aditivos o sinérgicos cuando se usaron las dos citoquinas simultáneamente.



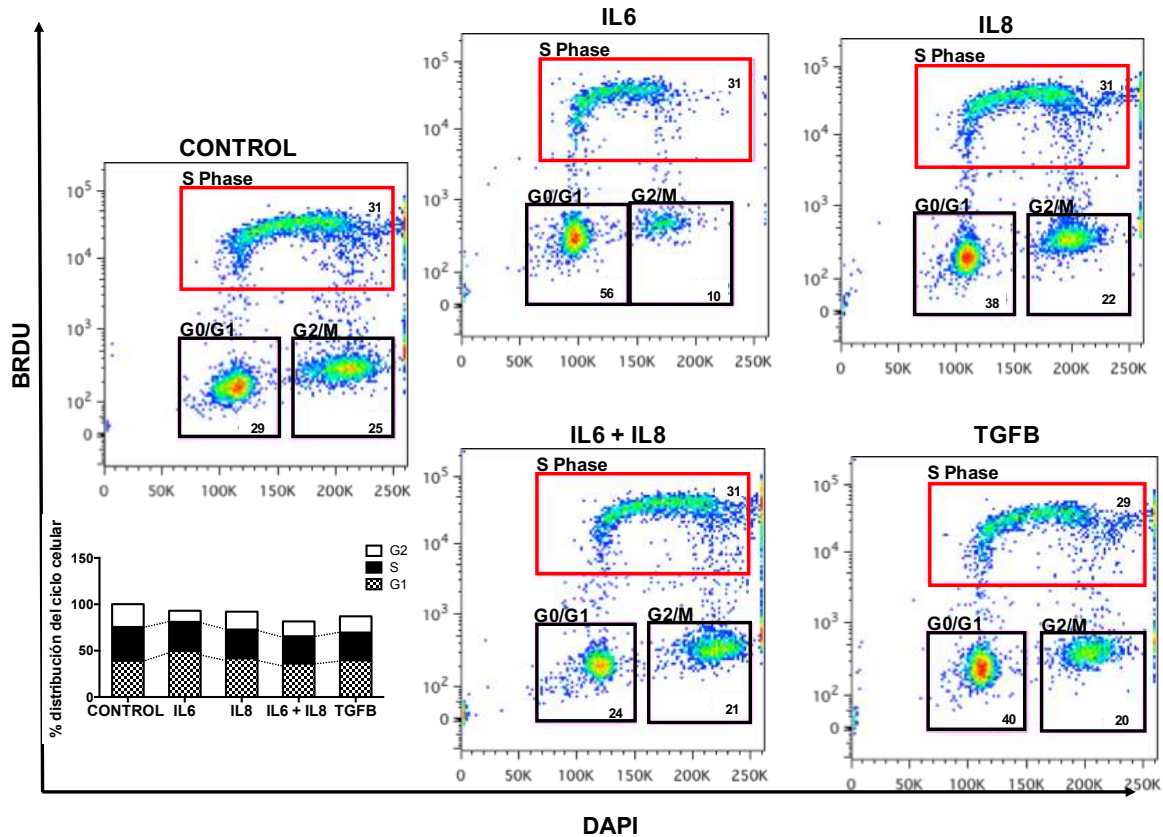
**Figura 7. El tratamiento con la IL6 y la IL8 indujo cambios morfológicos y fenotípicos asociados con un programa de EMT.** (A) Células MCF-7 estimuladas con 50 ng/ml de las citoquinas IL6, IL8 o IL6 + IL8. Como control positivo se utilizó 5 ng/ml de TGF-β y como control negativo células MCF-7 cultivadas en medio MEM-α suplementado con 0,5 % de SFB. Las evaluaciones se realizaron después de 96 h de tratamiento con las citoquinas. Se muestran imágenes representativas de las células (panel superior). Las flechas indican células con morfología fibroblastoide. Barra de escala, 10 μm. Se muestran imágenes representativas de la intensidad de fluorescencia de marcadores de superficie celular asociados a la EMT determinados por FACS mediante el uso de anticuerpos monoclonales CD44-FITC y CD24-PE en células MCF-7 estimuladas durante 5 días con citoquinas (n=2). (B) El nivel de expresión de CD44 se determinó por qRT-PCR.

De manera similar al MeCoSe, las células MCF-7 mostraron una mayor capacidad de migración en respuesta al tratamiento con las citoquinas, tanto en el ensayo de curación de heridas (migración espontánea) (**Figura 8A y B**), como en el sistema *transwell* (migraron dirigida) (**Figura 8C y D**).



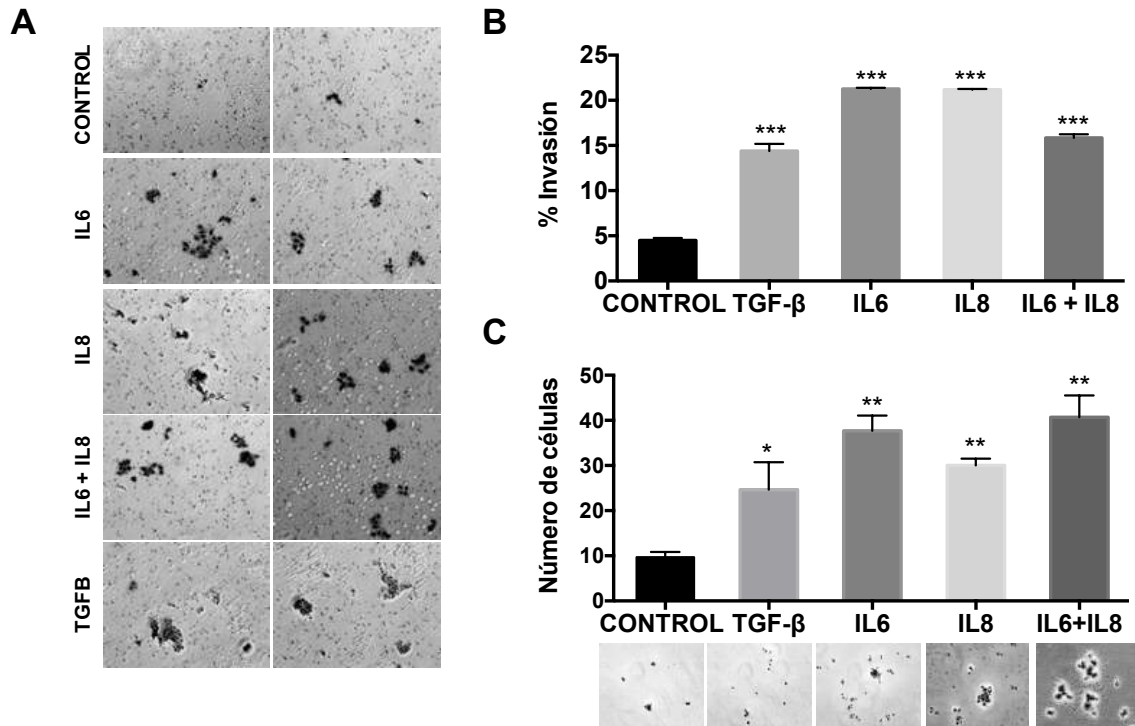
**Figura 8.** El tratamiento con IL6 e IL8 indujo un aumento en la capacidad de migración de células MCF-7. (A) Ensayo de curación de heridas realizado en células MCF-7 estimuladas con citoquinas. Se realizó registro fotográfico a las 0, 6 y 12 h. Las imágenes representativas (10X), muestran un incremento en la capacidad de migración de células MCF-7 estimuladas. La línea negra punteada indica el área de la herida. (B) Cuantificación del área del cierre de la herida de por lo menos 10 imágenes haciendo uso del programa Image J. Las barras de error indican SEM. (\*\* $p < 0.01$ ). (C) Ensayo de migración en *transwell*, utilizando como quimioatrayente 20% de SFB, realizado en células MCF-7 control y tratadas con citoquinas. Micrografías representativas (20X) tomadas del filtro de la membrana (superficie externa del filtro) coloreado con cristal violeta. (D) Cuantificación del ensayo de migración en *transwell* a través del conteo del número de células presentes en el compartimento inferior. Barra de error indica SEM (\* $p < 0.05$ ).

La marcación con EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) muestra que en todas las condiciones las células MCF-7 incorporaron de manera similar este análogo de la timidina a su DNA, lo cual se evidenció por un patrón de intensidad similar (**Figura suplementaria 2**). De la misma manera, la marcación con BrdU (bromo-deoxyuridine) después de 12 h de contacto con las citoquinas **Figura 9**, muestra que no se presentó ningún cambio en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular (recuadro rojo, en la figura) y que además presentaron una distribución similar en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular (gráfica de barras), comprobando que durante este tiempo de estimulación con las citoquinas las células no están proliferando.



**Figura 9. Evaluación de la proliferación de las células MCF-7 durante el ensayo de migración.** Incorporación de BrdU en células MCF-7 tratadas o no con citoquinas durante el ensayo de migración (tiempo de evaluación, 12 h). Las células se incubaron con 5-bromo-2'-deoxyuridine (30  $\mu$ M) durante 25 minutos, se marcaron con DAPI y se analizaron por FACS. Se muestra el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular.

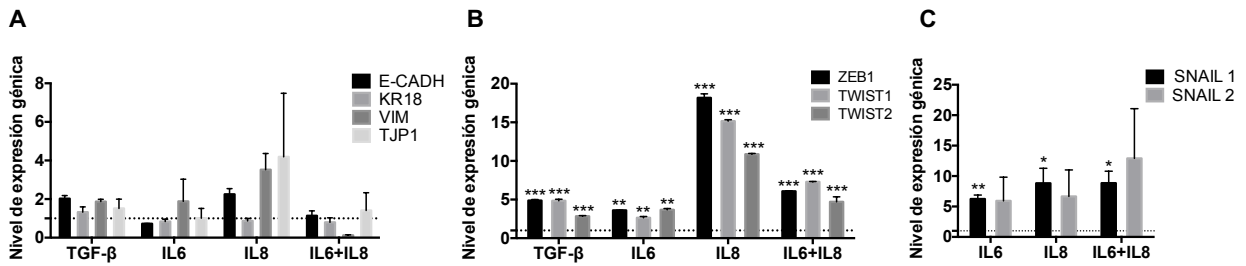
El aumento en la capacidad de migración inducido por el tratamiento con las citoquinas se relacionó también con un aumento en la capacidad de invasión en matrigel (**Figura 10A y B**) y de adhesión a fibronectina (**Figura 10C**), este último un proceso asociado al programa de EMT (Park J, 2014). Aunque no se observaron diferencias significativas en términos de la capacidad de migración y de invasión entre los diferentes tratamientos, este fue significativamente diferente con respecto al control.



**Figura 10.** El tratamiento con IL6 e IL8 indujo un aumento en la capacidad de invasión y de adhesión en las células MCF-7. (A) Ensayo de invasión en matrigel realizado en células MCF-7 control y tratadas con citoquinas. Se muestran imágenes representativas de las células que lograron atravesar los filtros recubiertos con matrigel. (B) El histograma muestra la cuantificación del número de células presentes en el compartimento superior del filtro (superficie externa del filtro) de por lo menos 15 imágenes. Barras de error indican SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$  ( $n=2$ ). (C) Ensayo de adhesión a fibronectina de células MCF-7 después del tratamiento con citoquinas. Micrografías representativas (20X) tomadas de pozos coloreados con cristal violeta. Se cuantificó el número de células adheridas. Barra de error indica SEM. (\* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

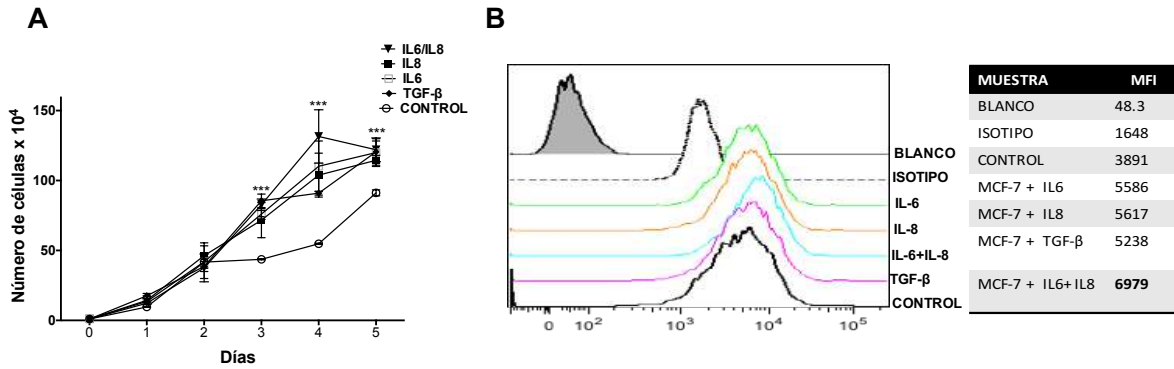
Para confirmar la inducción de la EMT en respuesta a las citoquinas, se evaluó la expresión de marcadores asociados a EMT, incluyendo E-cadherina, citoqueratina 18 (CK18), TJP1 (*tight junction protein 1*) y Vimentina. De manera similar a lo obtenido con el tratamiento con el MeCoSe, no se observó un patrón bien definido en relación con los cambios en la expresión de estos marcadores y la EMT (**Figura 11A**). No obstante, el análisis de expresión de factores de transcripción asociados a EMT (Snail-1, Snail-2, Zeb-1, Twist-1 y Twist-2) mostró de manera consistente un patrón de expresión génica consecuente con el programa de EMT. Como se muestra en la **Figura 11C**, el nivel de expresión de Snail-1 y Snail-2, dos factores de transcripción corriente arriba de Zeb-1, Twist-1 y Twist-2, aumentó con respecto al control, aunque este solo fue significativo para Snail-1. Así mismo, Zeb-1, Twist-1 y

Twist-2, aumentaron de manera similar en respuesta a TGF- $\beta$ , IL6 y a las dos citoquinas (aproximadamente 3 veces) y su nivel de expresión fue significativamente más alto por la estimulación con IL8 (aproximadamente 10 a 15 veces) (**Figura 11B**). En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con las citoquinas (IL6 o IL8, o la mezcla), induce cambios morfológicos, moleculares y funcionales compatibles con el proceso de EMT, aunque el fenotipo en términos de los marcadores epiteliales o mesenquimales es híbrido. Estos hallazgos fueron similares a lo obtenido previamente con el MeCoSe.



**Figura 11. El tratamiento con citoquinas proinflamatorias indujo un aumento en el nivel de expresión génica de factores de transcripción asociados a EMT.** Nivel de expresión génica de marcadores asociados a EMT (A), de factores de transcripción Zeb1, Twist 1 y Twist 2 (B) y Snail 1 y Snail/Slug (C) en células MCF-7 estimuladas con citoquinas como se indicó previamente y determinados por qRT-PCR. Los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control (línea punteada). Barra de error indica SEM. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) ( $n = 2$ ).

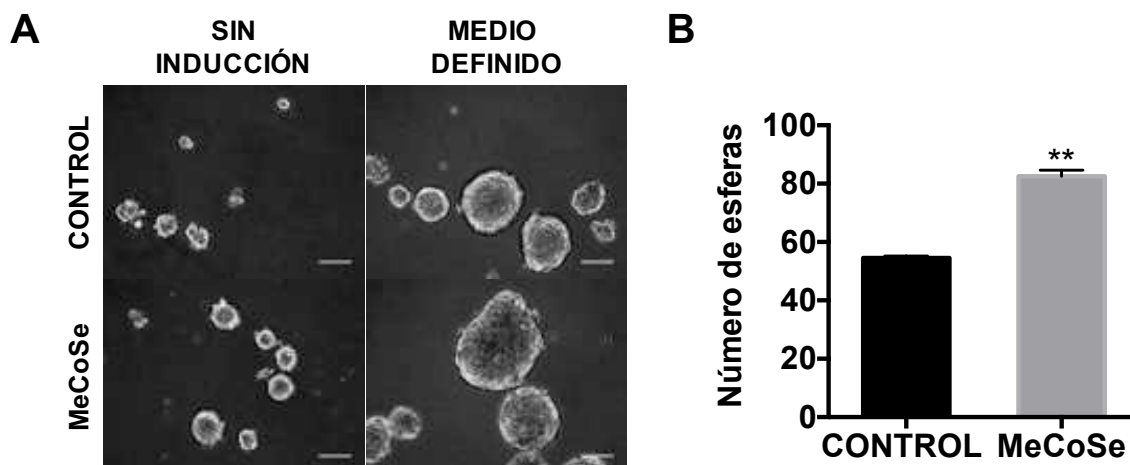
Por otra parte, el tratamiento por 5 días con las citoquinas juntas o por separado y con el TGF- $\beta$  indujo un aumento en la capacidad de proliferación de las células MCF-7. Este aumento se relacionó con un aumento en la expresión del marcador de proliferación Ki-67, cuya expresión fue más alta en respuesta al tratamiento con ambas citoquinas (**Figura 12**). Este aspecto difirió con respecto al tratamiento con MeCoSe (que indujo una menor proliferación). Sin embargo, de manera global, las citoquinas simulaban adecuadamente el efecto del MeCoSe.



**Figura 12. El tratamiento con IL6 e IL8 indujo cambios en la proliferación de células MCF-7 y en la expresión del marcador de proliferación Ki-67.** (A) Cinética de crecimiento de células MCF-7 tratadas o no con citoquinas. Se sembró la misma cantidad de células por triplicado, se trataron con medio control o con medio suplementado con citoquinas. Las células se contaron en cada uno de los puntos de tiempo indicados. Las barras de error indican SEM. \*\*\* $p < 0.001$  indica diferencias estadísticamente significativas entre células control y tratadas ( $n=2$ ). (B) Histogramas representativos de FACS mostrando la expresión de Ki-67 en las diferentes condiciones evaluadas. Los histogramas rellenos corresponden al blanco y los histogramas punteados al control de isotipo. La tabla muestra los valores de intensidad media de fluorescencia obtenidos en cada condición.

### Células MCF-7 estimuladas con MeCoSe o con IL6 o IL8 muestran propiedades de células stem

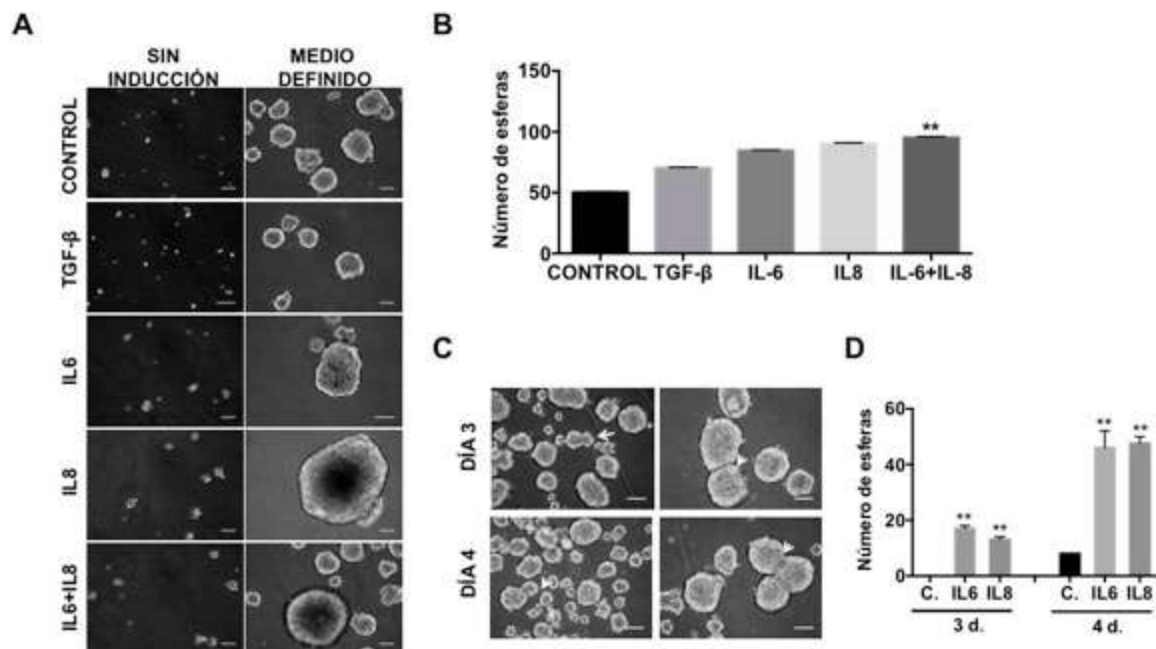
Varios reportes han demostrado que las células que siguen un programa de EMT pueden adquirir características de células stem (Mani SA, 2008; Morel AP, 2008; May CD, 2011). Por consiguiente, se estudió primero el efecto del MeCoSe en la capacidad de autorrenovación de las células MCF-7 mediante el ensayo de formación de esferas (Dontu G, 2005). Las células MCF-7 en el medio definido de formación de esferas (control) presentaron una capacidad de formar esferas, limitada a un tamaño menor a 100  $\mu\text{m}$ . Esta capacidad incrementó significativamente (alrededor de un 50%) cuando las células se trataron previamente con el MeCoSe (**Figura 13A y B**). De manera interesante, las esferas formadas en esta condición alcanzaron tamaños muy grandes, superiores a 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 13.** Las células MCF-7 estimuladas con MeCoSe adquieren propiedades de autorrenovación. (A) Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido (EGF+ FGF) en células MCF-7 que se trataron previamente o no (control) con MeCoSe durante 5 días. Las micrografías representativas (10X) muestran la formación de esferas después de 8 días de inducción. Barra de escala, 100  $\mu$ m. (B) Se cuantificó el número de esferas totales mayores a 100  $\mu$ m en el día 8. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.01$ ) (n = 2).

De la misma manera, el pre-tratamiento con las citoquinas incrementó el número (casi en un 50%) y el tamaño (5 veces) de las mamoesferas, cuando se comparó con las células control, es decir células en presencia de medio definido o pre-tratadas con TGF- $\beta$  (Figura 14A y B). El incremento en el tamaño de las esferas visto con MeCoSe y particularmente con IL6 e IL8 sugirió un grado de fusión en estas. Por lo tanto, se realizó una evaluación temprana y diaria de la formación de estas. Como se observa en la Figura 14C y D, el tratamiento previo con IL6 o IL8 indujo un aumento en la formación de mamoesferas con respecto a las células control de aproximadamente 10 y 15 veces más después de 3 y 4 días de inducción, respectivamente. Como se anticipó, se detectaron tempranamente algunos eventos de fusión de esferas, lo que podría indicar que las células adquirieron funciones particulares por la estimulación con citoquinas. Al igual que el MeCoSe, IL6 e IL8 son capaces de inducir de manera eficiente la formación de mamoesferas y evidenciar por lo tanto la autorrenovación.

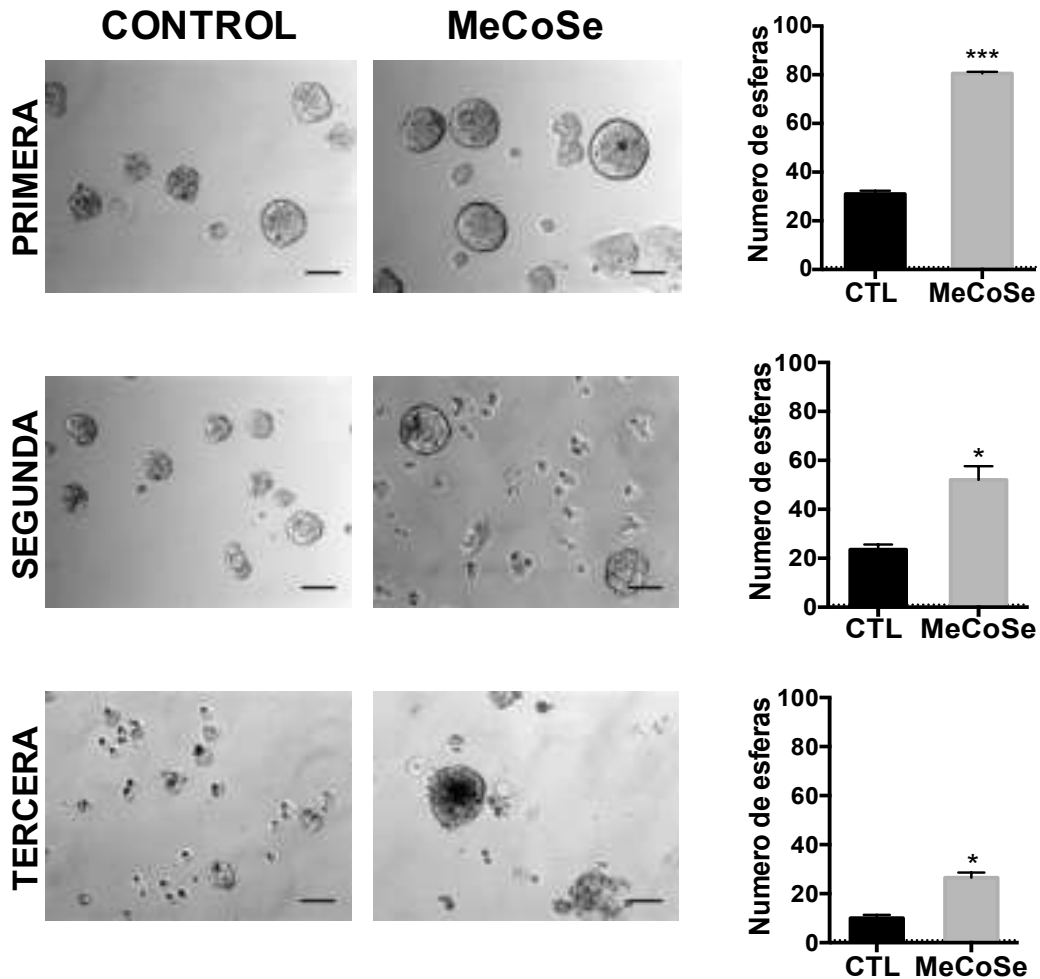




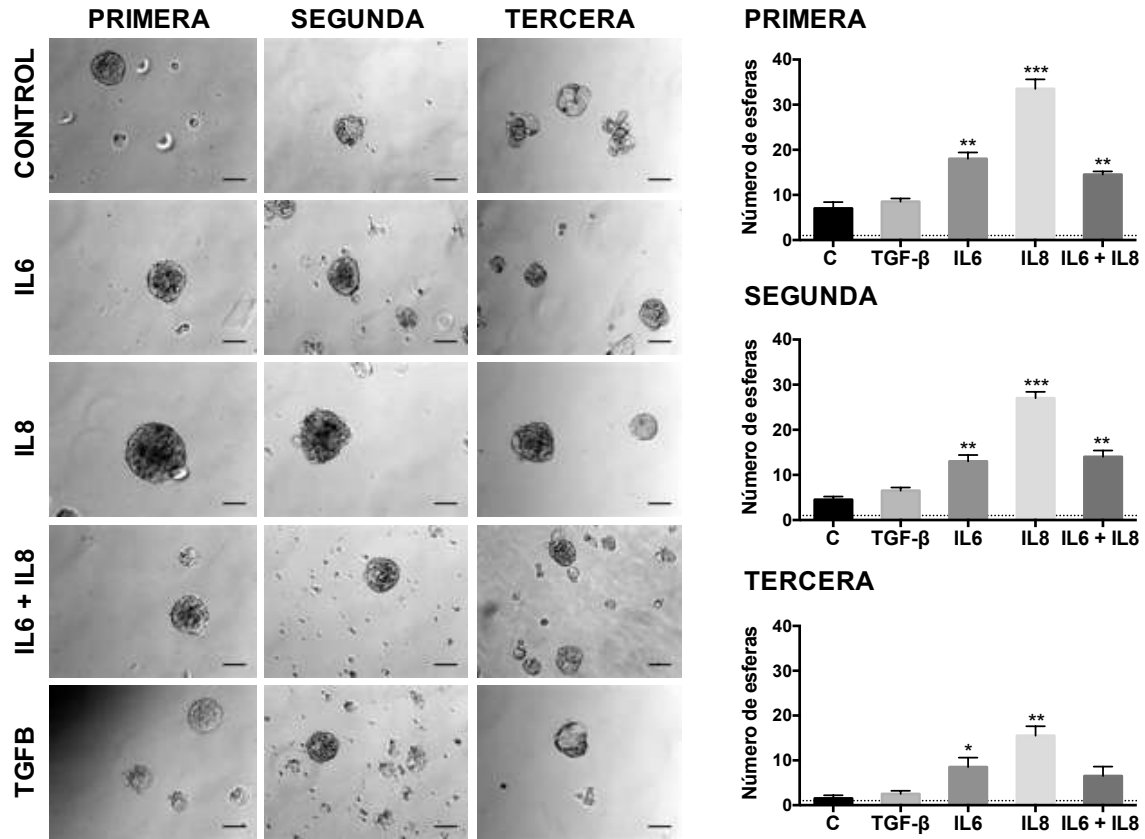
**Figura 14. Las células MCF-7 estimuladas con citoquinas adquirieron propiedades de autorenovación.** (A) Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido (EGF+ FGF) en células MCF-7 que se trataron previamente o no con citoquinas durante 5 días. Las micrografías representativas (10X) muestran la formación de esferas después de 8 días de inducción. Barra de escala, 100  $\mu$ m. (B) Se cuantifico el número de esferas totales mayores a 100  $\mu$ m en el día 8. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 3$ ). La capacidad de formación de esferas en respuesta al tratamiento con la IL6 y la IL8 se evaluó después de 3 y 4 días como se indicó previamente. (C) Imágenes representativas (10X) de la fusión de esferas después de 3 y 4 días de inducción. Barra de escala, 100  $\mu$ m. (D) Se cuantifico el número de esferas totales mayores a 100  $\mu$ m en el día 3 y 4. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 3$ ).

Esto se confirmó realizando el ensayo de esferas en varias generaciones. Como se observa en la **Figura 15** el tratamiento con el MeCoSe mantuvo la capacidad de autorrenovación de las células MCF-7 por tres generaciones, similar al tratamiento con las citoquinas juntas o por separado (**Figura 16**). El tratamiento con IL8 produjo esferas de mayor tamaño, que se mantuvieron hasta por tres generaciones. El TGF- $\beta$ , a pesar de haber sido descrito como un inductor de la EMT, no tuvo el mismo efecto en nuestro modelo. Por otra parte, la capacidad inicial de las células control para formar esferas no se mantuvo después de tres generaciones, lo que indica, que la presencia de un microambiente inflamatorio persistente permite revelar el potencial pro-tumorigénico de las células MCF-7.



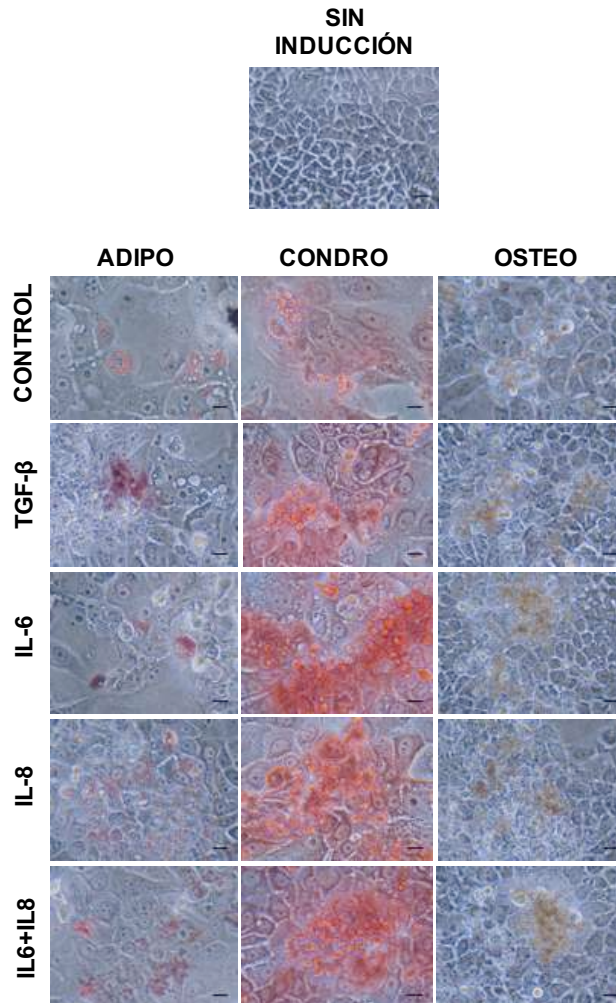


**Figura 15. Células MCF-7 estimuladas con MeCoSe adquieren propiedades de autorenovación.** Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido (EGF+ FGF) en células MCF-7 que se trataron previamente o no (control) con MeCoSe. la capacidad de formación de esferas se evaluó después de tres generaciones. Después de 5 días las esferas obtenidas de la primera generación se disociaron completamente y se sembraron en las mismas condiciones y a la misma densidad inicial. Se muestran imágenes representativas (10X). Barra de escala, 100  $\mu$ m. El número de esferas que presentaban un tamaño superior a 100  $\mu$ m se cuantificó en la primera, segunda y tercera generación. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ ; (\*) $p < 0.05$  (n = 2).



**Figura 16. Células MCF-7 estimuladas con citoquinas mantienen sus propiedades de autorenovación.** Ensayo de formación de mamoesferas en presencia de medio definido (EGF+ FGF) en células MCF-7 que se trataron previamente o no (control) con IL6 e IL8 o simultáneamente con las dos citoquinas. La capacidad de formación de esferas se evaluó después de tres generaciones. Después de 5 días, las esferas obtenidas de la primera generación se disociaron completamente y se sembraron nuevamente en las mismas condiciones y a la misma densidad inicial. Se muestran imágenes representativas (10X). Barra de escala, 100  $\mu$ m. El número de esferas que presentaban un tamaño superior a 100  $\mu$ m se cuantificó en la primera, segunda y tercera generación. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) (n = 2).

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de diferenciación multilineaje de las células MCF-7 tratadas con MeCoSe o citoquinas. Se encontró, que después del tratamiento con las citoquinas **Figura 17** o con el MeCoSe (**Figura suplementaria 3**), las células se diferenciaron hacia linajes mesenquimales (Adipo-, Osteo- y Condrocitos). Esta diferenciación ocurrió rápidamente, 10 días comparado con las 2 a 3 semanas necesarias para la diferenciación de células *stem* mesenquimales de médula ósea (Halleux C, 2001; Yang W, 2011) y muy eficiente (como se muestra por la coloración homogénea e intensa en las placas de cultivo).

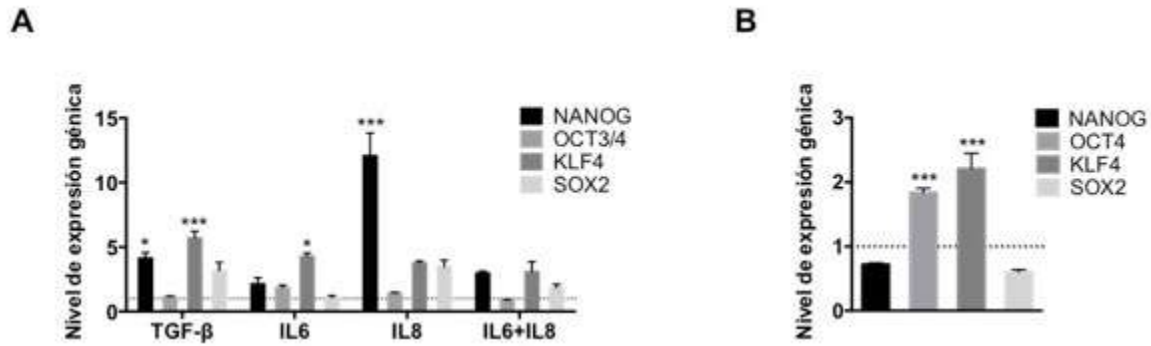


**Figura 17. Células MCF-7 tratadas con IL6 e IL8 presentan características asociadas a un potencial de diferenciación.** La diferenciación hacia linajes de tipo mesenquimal de células MCF-7 pretratadas o no (control) con citoquinas se indujo por la incubación con medios de inducción específicos como se describió en materiales y métodos, y se evaluó después de 10 días de inducción. La diferenciación hacia Osteocitos (Actividad de la enzima fosfatasa alcalina), Adipocitos (Aceite rojo-O) y condrocitos (Safranina-O) se determinó mediante coloraciones específicas. Se muestran imágenes representativas. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Interesantemente, las células MCF-7 control (sin tratamiento con MeCoSe o citoquinas) mostraron una capacidad de diferenciación basal, sugiriendo la existencia de características *stem* que se refuerzan por un microambiente pro-inflamatorio asociado a senescencia, resultado similar a lo observado en el ensayo de formación de esferas (**Figura 14**).

Debido a que los tumores pobremente diferenciados tienden a tener más propiedades de

células *stem*, y presentan una sobre-expresión preferencial de FTs asociados a reprogramación (Ben-Porath I, 2008), se evaluó su nivel de expresión en respuesta al tratamiento con MeCoSe o con citoquinas (**Figura 18A y B**).



**Figura 18. Células MCF-7 estimuladas con citoquinas o MeCoSe expresan FTs asociados a reprogramación.** Nivel de expresión génica de factores de transcripción asociados a reprogramación determinados por qRT-PCR en células MCF-7 estimulas con IL6, IL8, IL6+IL8 (A) o con MeCoSe (B) como se indicó previamente. Los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control (línea punteada). Barra de error indica SEM. (\*\*\*)p < 0.001; (\*)p < 0.05) (n=2).

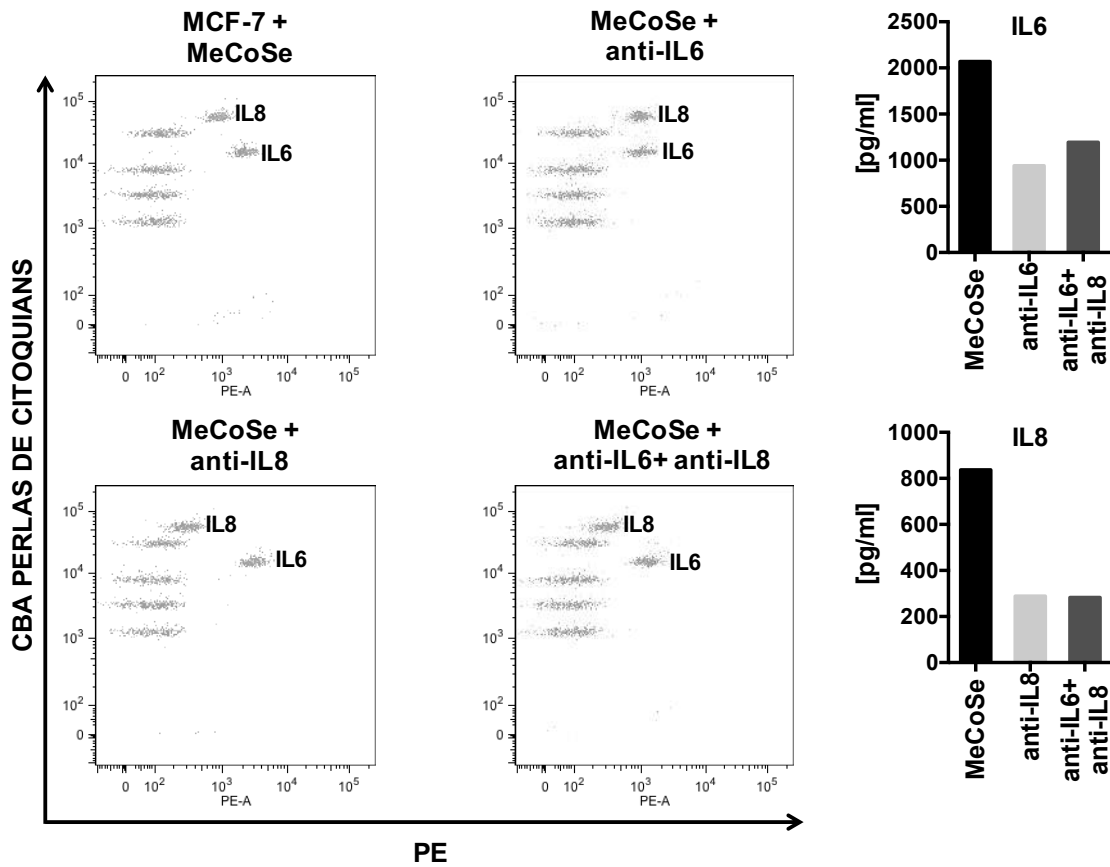
De manera interesante, el tratamiento con IL8 incrementó la expresión de NANOG, KLF-4 y SOX2, mientras que la IL6 incrementó únicamente la expresión de KLF-4, de manera similar al tratamiento con TGF-β y MeCoSe. El tratamiento simultáneo con las dos citoquinas produjo un ligero incremento en la expresión de estos FTs. La expresión de OCT-4 se modificó únicamente en respuesta al MeCoSe. De esta manera, similar a lo observado en los FTs asociados a EMT, el tratamiento con IL8 indujo una fuerte respuesta en los factores de reprogramación, especialmente en NANOG, en las células MCF-7.

En conjunto estos resultados muestran que un microambiente pro-inflamatorio senescente refuerza la existencia de funciones asociadas a un fenotipo *stem*.

## CAPITULO II. La neutralización de IL6 e IL8 y las vías de señalización activadas determinan su papel en la EMT, en la expresión de CD44 y en la adquisición de funciones específicas

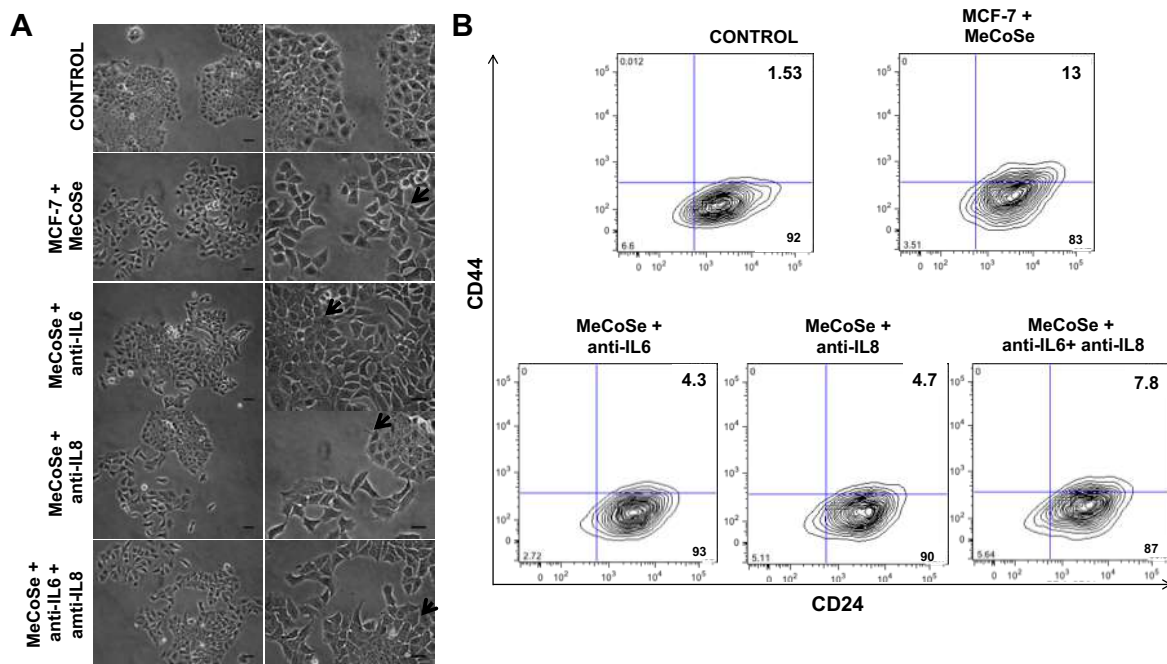
### Anticuerpos neutralizantes de IL6 e IL8 revierten el efecto del MeCoSe

La relevancia y la especificidad de la IL6 y la IL8 en la adquisición de estas características y propiedades funcionales se comprobó por la incubación del MeCoSe con anticuerpos monoclonales neutralizantes contra estas citoquinas. La inhibición de estas citoquinas por estos anticuerpos específicos fue alrededor de 50-65 % como se muestra en la **Figura 19**.



**Figura 19. Neutralización de las citoquinas IL6 e IL8 presentes en el MeCoSe.** Neutralización de IL6 e IL8 con 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo monoclonal dirigido contra IL6 (Ref: MAB206, R&D systems) o IL8 (Ref: AF-208-NA, R&D systems). Los niveles de estas citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 se evaluaron por citometría de flujo mediante un arreglo de citoquinas (CBA, Becton Dickinson), utilizando medios condicionados libres de SFB obtenidos a partir de células MCF-7 que fueron tratadas con MeCoSe o con MeCoSe en presencia de anticuerpos neutralizantes específicos para cada citoquina. La gráfica de barras muestra la cantidad de citoquina en pg/ml.

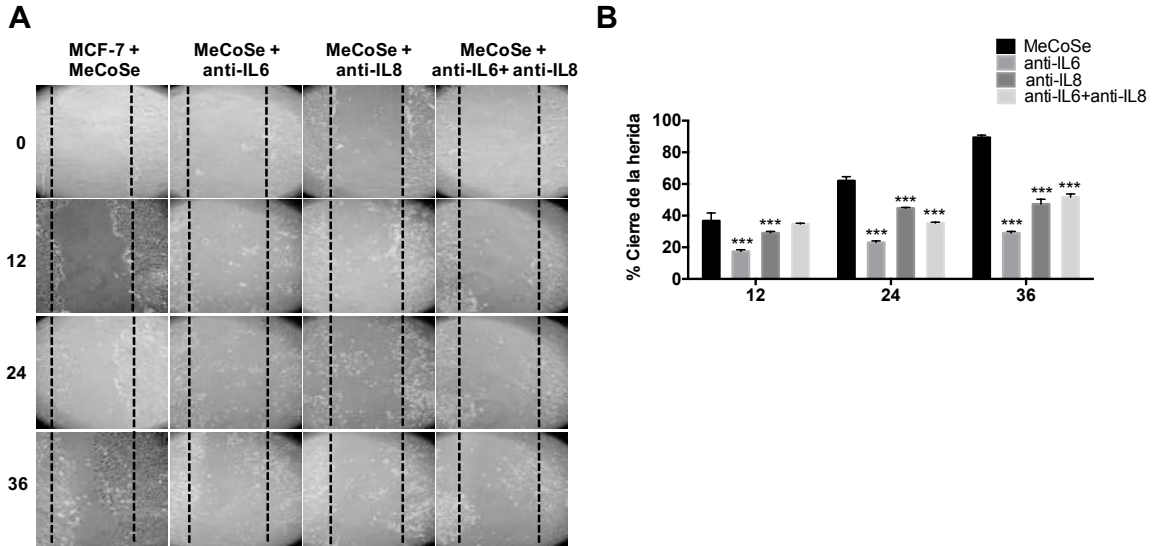
Esta inhibición indujo la readquisición de una morfología de células epiteliales, con la presencia de células en forma de adoquín. Estos cambios se observaron tanto al inhibir IL6 como IL8, aunque fueron más notorios por la inhibición de IL6. El tratamiento simultáneo con los anticuerpos monoclonales neutralizantes, y con anti-IL8 produjo un fenotipo intermedio, con células que crecieron de forma separada y células que recuperaron su fenotipo epitelial como se indica en la **Figura 20A**. De la misma manera, los anticuerpos indujeron una disminución en la expresión de CD44 (**Figura 20B**), la cual no es tan evidente debido a que la población de células MCF-7 que aumenta la expresión por el MeCoSe es una población reducida que oscila en nuestros experimentos entre el 10 y 40%.



**Figura 20.** Las citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 son requeridas para la inducción de cambios morfológicos y fenotípicos asociados con el programa de EMT. Células MCF-7 estimuladas o no (control) con MeCoSe o con MeCoSe más anticuerpos neutralizantes (1  $\mu$ g/ml) contra IL6, IL8 o IL6+IL8 durante 5 días. (A) Imágenes representativas (10 y 20 X) de los cambios morfológicos inducidos por la neutralización de las citoquinas. Las flechas indican una readquisición de la morfología epitelial. Barra de escala, 5  $\mu$ m. (B) Figuras representativas de la expresión de marcadores de superficie celular (CD44 y CD24) determinado por citometría de flujo en células MCF-7 tratadas o no con los anticuerpos neutralizantes.

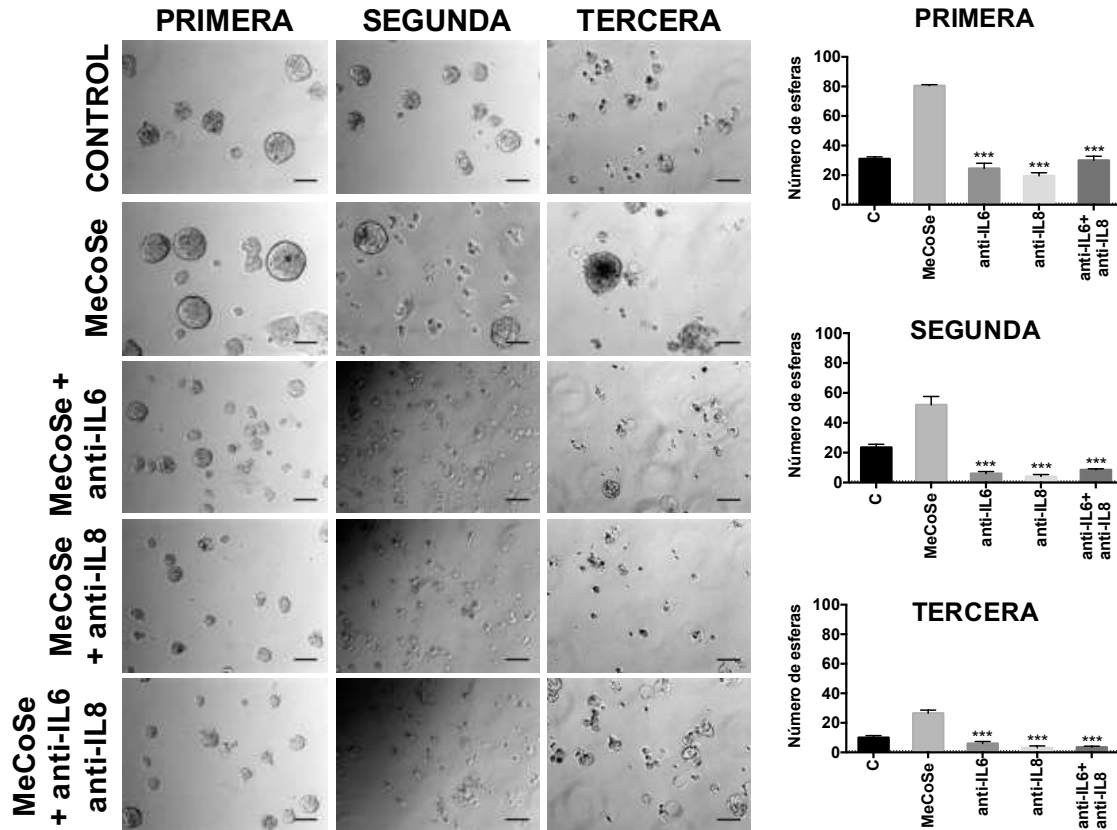
La neutralización de las citoquinas también disminuyó la capacidad de migración de las

células MCF-7 (**Figura 21**). Esta inhibición fue similar al inhibir las citoquinas juntas o por separado.



**Figura 21. El tratamiento con anticuerpos neutralizantes inhibió la capacidad de migración de las células MCF-7.** Células MCF-7 incubadas con MeCoSe o con MeCoSe en presencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo monoclonal neutralizante dirigido contra IL6 o IL8. (A) Imágenes representativas (10 X) del ensayo de curación de heridas que muestra una disminución en la capacidad de migración de células MCF-7 tratadas con los anticuerpos neutralizantes. (B) El histograma muestra la cuantificación del área del cierre de la herida de por lo menos 10 imágenes tomadas a las 12, 24 y 36 h, y analizadas con el programa Image J. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ .

Así mismo, la capacidad de autorrenovación de las células MCF-7 en presencia de los anticuerpos neutralizantes se redujo de manera importante (60%). Esta reducción se observó tanto en la primera como en las subsiguientes. El efecto fue similar al adicionar los anticuerpos de manera individual o conjunta (**Figura 22**).



**Figura 22.** El tratamiento con anticuerpos neutralizantes inhibió la capacidad de autorrenovación de las células MCF-7. Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido (EGF + FGF) en células MCF-7 que fueron previamente tratadas o no (control) con MeCoSe o con MeCoSe en presencia de 1 µg/ml de anticuerpos neutralizantes. Se muestran micrografías representativas (10X) de las mamoesferas obtenidas en la primera, segunda y tercera generación. Barra de escala, 100 µm. La gráfica de barras muestra la cuantificación al día 5to del número de esferas mayores 100 µm a obtenidas en las tres generaciones. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$  ( $n = 2$ ).

Al evaluar la expresión de marcadores asociados a la EMT, se observó que el tratamiento simultáneo con los anticuerpos indujo un aumento estadísticamente significativo en la expresión del marcador de células epiteliales E-cadherina, sin perder la expresión de marcadores mesenquimales (Vimentina y Zeb1) lo cual fue consistente con el fenotipo heterogéneo observado. Así mismo, el nivel de expresión de factores de transcripción Snail-1, Snail-2/Slug y KLF-4 se redujo de manera consistente por el tratamiento con los anticuerpos neutralizantes (**Figura suplementaria 4**).

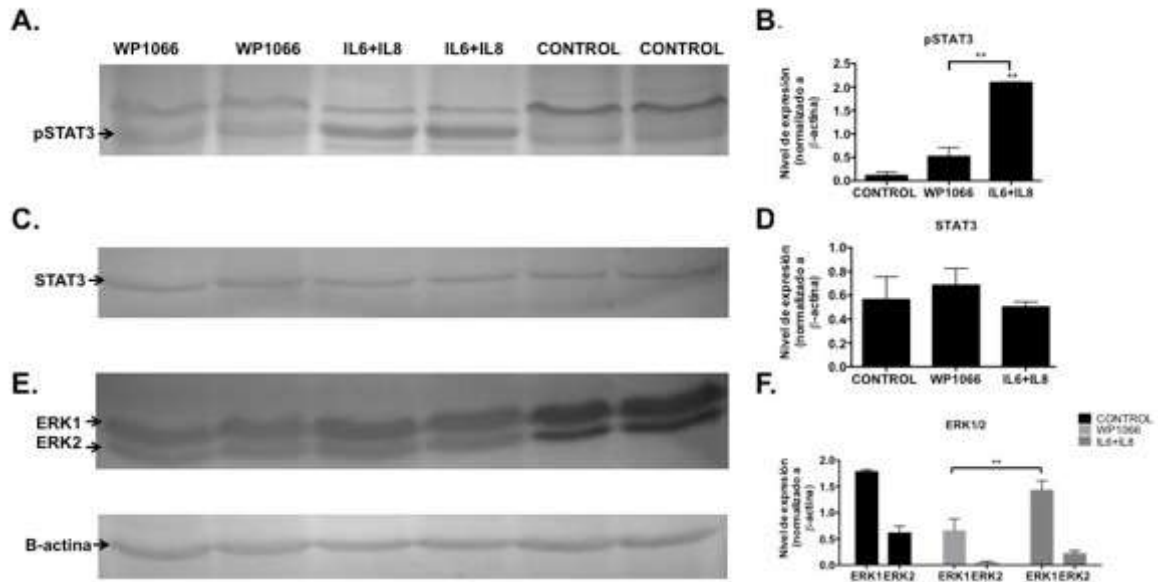
En conjunto, estos resultados muestran que las células de cáncer de seno MCF-7 en presencia de un microambiente senescente pueden adquirir características de células más agresivas:



morfología de tipo mesenquimal, una mayor movilidad un aumento en la expresión de CD44 y de marcadores asociados a la EMT, lo que señala a la adquisición de un programa de EMT por la senescencia. Adicionalmente, las células presentaron una mayor capacidad de autorrenovación, de diferenciación multipotente y una mayor expresión de factores de reprogramación, es decir, células con funciones *stem*. De manera importante, las citoquinas pro-inflamatorias IL6 y la IL8, presentes en altos niveles en el MeCoSe, simulaban adecuadamente el efecto del MeCoSe, sugiriendo un papel importante central en estas adquisiciones funcionales. Su neutralización por anticuerpos específicos, y la disminución de estas funciones comprueba este hallazgo.

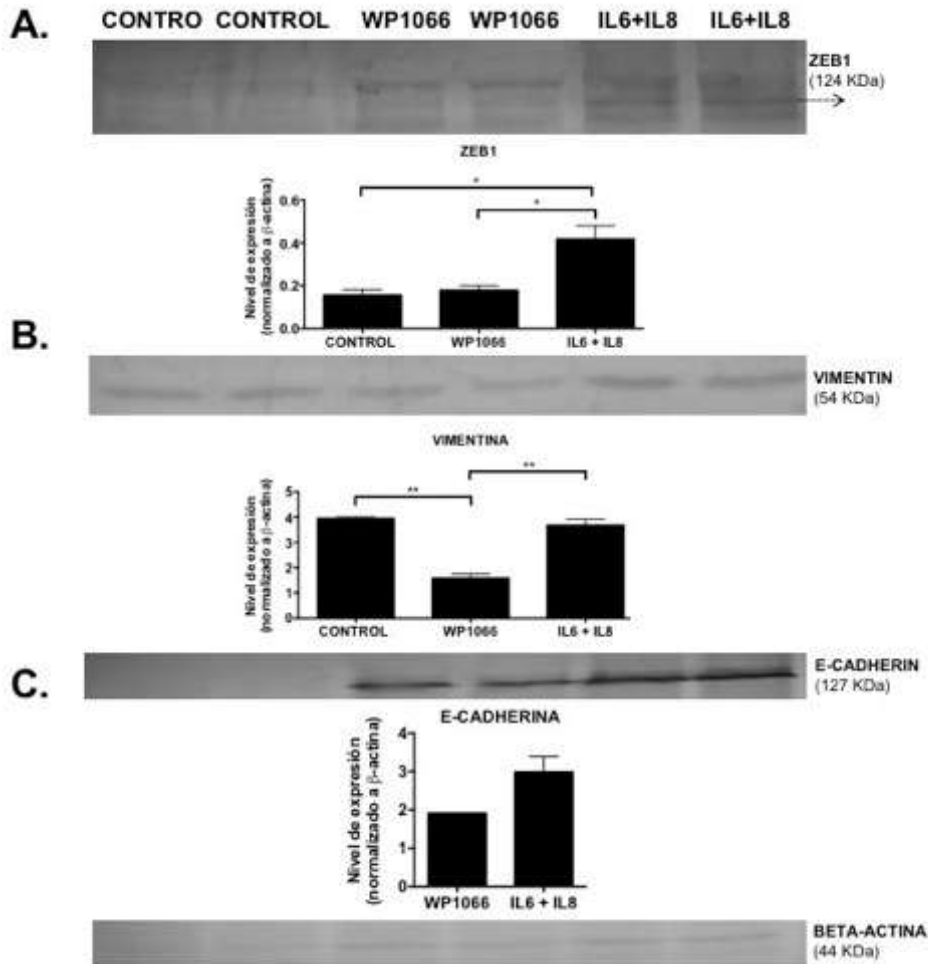
### **Stat3 participa en la inducción de la EMT y en la generación de células *stem*.**

Los efectos del SASP están mediados por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B asociado a la inflamación (Rao SG, 2016) o por la activación de la vía de señalización Jak/Stat3 (Karnoub AE, 2007; Cahu J, 2012). La IL6, y la IL8 en menor grado, puede inducir la activación de Jak/Stat3 (Cui Y, 2016) y esto puede determinarse por el estado de fosforilación del residuo tirosina 705 (Y705), necesario para su dimerización y translocación nuclear (Wakahara R, 2012). Se evaluó la activación de esta vía de señalización estimulando las células MCF-7 con IL6 e IL8, lo cual mostró un aumento de la fosforilación de Stat3 que se revirtió por la utilización del inhibidor (**Figura 23A y B**) (Iwamaru A, 2007). De manera interesante, esta inhibición se relacionó con una disminución en los niveles de ERK1 fosforilado (**Figura 23E y F**), miembro de la familia de serina treonina MAPK quinasas, que regula diferentes procesos como la adhesión, progresión del ciclo celular, migración, supervivencia celular y diferenciación (Roskoski R, 2012), y que concomitantemente con Stat3 regula la proliferación celular en algunos carcinoma (Li L, 2008).



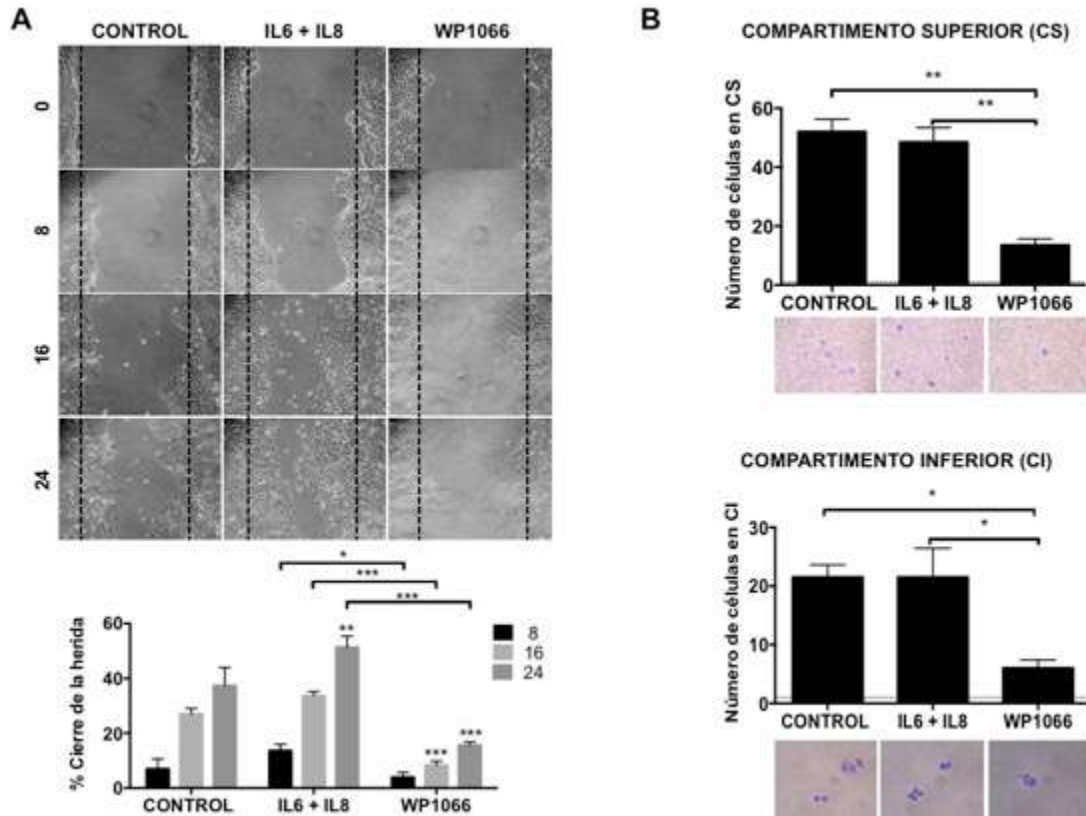
**Figura 23. Efecto de WP1066 en la activación de Stat3 en células MCF-7 estimuladas con citoquinas.** Células MCF-7 tratadas con WP1066 por 2 h y estimuladas posteriormente con IL6+IL8 por 1 h se utilizaron para la preparación de proteína. 50 µg de proteína se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas para la detección por WB de pStat3 (A y B), Stat3 (C y D) o pERK1/2 (E y F). Los niveles de expresión se normalizaron a β-actina (control de carga). Las barras de error indican SEM. (\*\*p<0.05).

El tratamiento con WP1066 también produjo una disminución en los niveles de proteínas asociadas con un fenotipo mesenquimal (Zeb-1 y Vimentina) con respecto a las células estimuladas con las citoquinas (**Figura 24A y B**). Al igual que en los resultados obtenidos previamente, no se observaron cambios en la expresión de E-cadherina (**Figura 24C**) lo que indica que Stat3 regula parcialmente la EMT o que este proceso ocurre de manera incompleta.

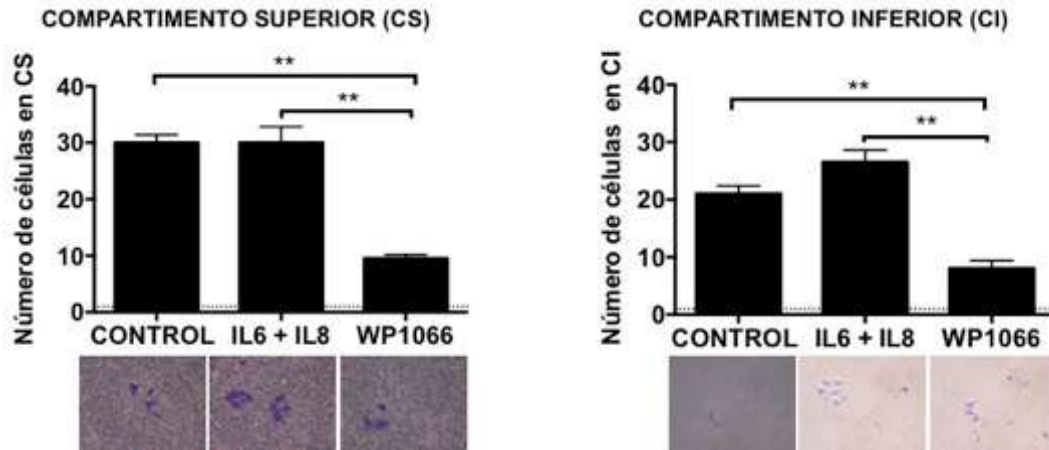


**Figura 24. Stat3 regula parcialmente el programa de EMT en células MCF-7 estimuladas con citoquinas.** Células MCF-7 tratadas con WP1066 por 2 h y estimuladas posteriormente con IL6+IL8 por 1 h adicional se utilizaron para la preparación de proteína. 50  $\mu$ g de proteína se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas para la detección por WB de Zeb1 (A); Vimentina (B) y E-cadherina (C). Los niveles de expresión se normalizaron a  $\beta$ -actina (control de carga). Barra de error indica SEM. (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.0).

A nivel funcional, la inhibición de Jak/Stat3 resultó en una disminución en la capacidad de migración espontánea (**Figura 25A**) y dirigida hacia SFB (**Figura 25B**). De la misma manera, la capacidad de invasión también disminuyó significativamente con respecto al control y a las células estimuladas con las citoquinas (**Figura 26**).

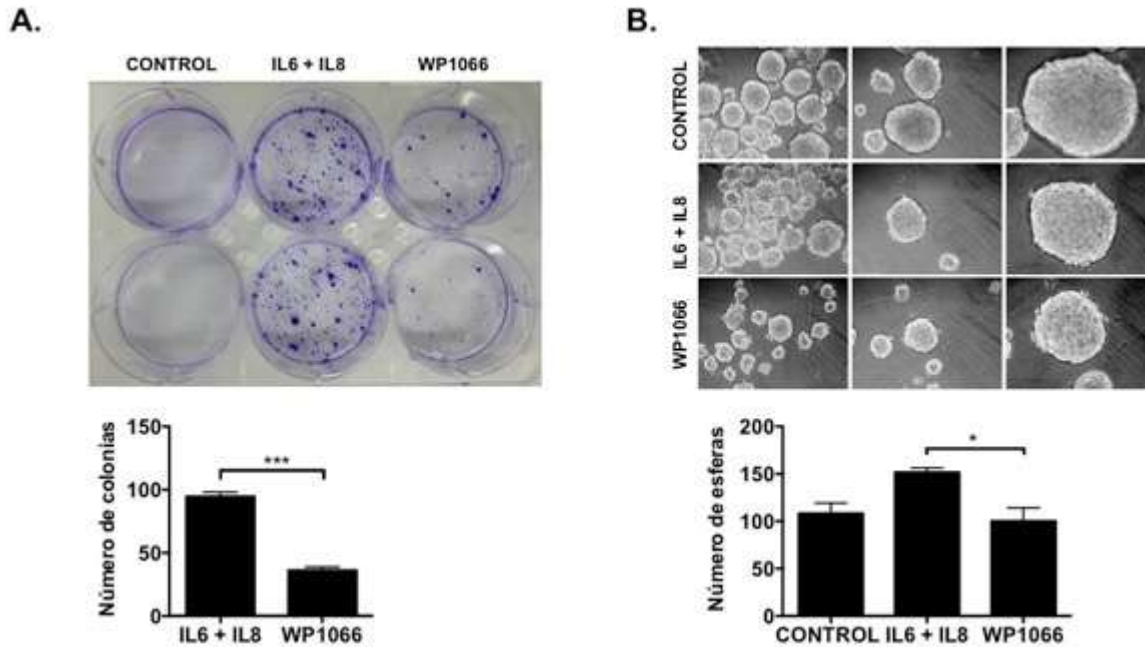


**Figura 25. El tratamiento con WP1066 inhibió la capacidad de migración de las células MCF-7.** (A) Ensayo de curación de heridas realizado en células MCF-7 tratadas o no con WP1066 por 2 h y estimuladas posteriormente con IL6+IL8 por 1 h. La gráfica de barras muestra una disminución en la capacidad de migración en presencia del inhibidor. Por lo menos 10 imágenes se usaron para la cuantificación del área del cierre de la herida haciendo uso del programa Image J. Las barras de error indican SEM. (\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). (B) Ensayo de migración en transwell, utilizando como quimioatrayente 20% de SFB, realizado en células MCF-7 tratadas o no (control) con el inhibidor o con las citoquinas. Micrografías representativas (20X) tomadas del filtro de la membrana (superficie externa del filtro) coloreado con cristal violeta. La gráfica de barras muestra la cuantificación del número de células presentes en el compartimento superior del transwell. Barra de error indica SEM (\*\* $p < 0.01$ ).



**Figura 26.** El tratamiento con WP1066 inhibió la capacidad de invasión de las células MCF-7. Ensayo de invasión en matrigel realizado en células MCF-7 control o tratadas con citoquinas o con el inhibidor. Se muestran micrografías representativas (20X) tomadas del compartimento superior (CS) (Superficie externa del filtro) y el compartimento inferior, CI (células que atravesaron el filtro) coloreadas con cristal violeta. La gráfica de barras muestra la cuantificación del ensayo de invasión a través del conteo del número de células presentes tanto en el CS como en el CI. Barra de error indica SEM (\*\*p<0.01).

Finalmente, se evaluó el papel de Stat3 en la capacidad clonogénica de las células MCF-7 mediante un ensayo de formación de colonias (**Figura 27A**) y en la capacidad de formación de mamoesferas (**Figura 27B**). En ambos casos se observó una disminución en estas capacidades en presencia del inhibidor, lo que muestra la importancia de este factor en la adquisición de las funciones pro-tumorigénicas. Además, se observó un aumento en los niveles de NF-κB en las células MCF-7 tratadas con IL6 + IL8, pero ningún cambio en células tratadas con el inhibidor (**Figura suplementaria 5**).

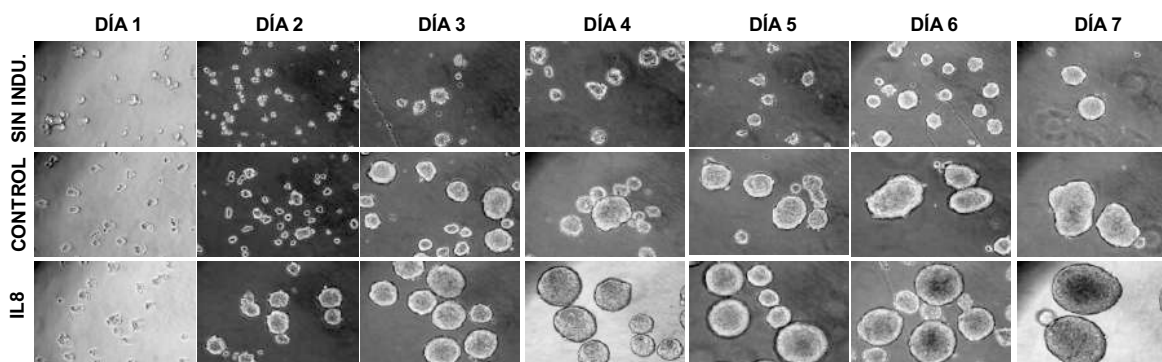


**Figura 27. Stat3 juega un papel importante en la adquisición de propiedades pro-tumorigénicas.** La inhibición de Stat3 disminuyó la capacidad de formación de colonias y de esferas en células MCF-7. (A) Ensayo de formación de colonias en células MCF-7 estimuladas o no con citoquinas o con WP1066. Las colonias formadas después de 2 semanas de cultivo se visualizaron con cristal violeta. La grafica de barras corresponde al número de colonias. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$  ( $n = 2$ ). (B) Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido (EGF+ FGF) en células MCF-7 que se trataron previamente o no (control) con citoquinas o con WP1066. Las micrografías representativas (10, 20 y 40X) muestran la formación de esferas después de 8 días de inducción. Barra de escala, 100  $\mu\text{m}$ . Se cuantifico el número de esferas totales mayores a 100  $\mu\text{m}$  en el día 8. Barra de error indica SEM. (\* $p < 0.05$ ) ( $n = 2$ ).

En conjunto, estos resultados comprueban que las vías de señalización activadas por IL6 e IL8, las citoquinas pro-inflamatorias más enriquecidas en el MeCoSe, son responsables de la adquisición de las características funcionales que les confieren a las células MCF-7 una mayor agresividad. De esta manera se puede concluir que la vía Jak/Stat3 es fundamental en este proceso y puede conferir propiedades funcionales importantes en diferentes etapas de la progresión tumoral. De destacar una capacidad clonogénica muy aumentada, que como mostraremos también en el modelo de HEK se acompaña de un aumento en la capacidad tumorigénica.

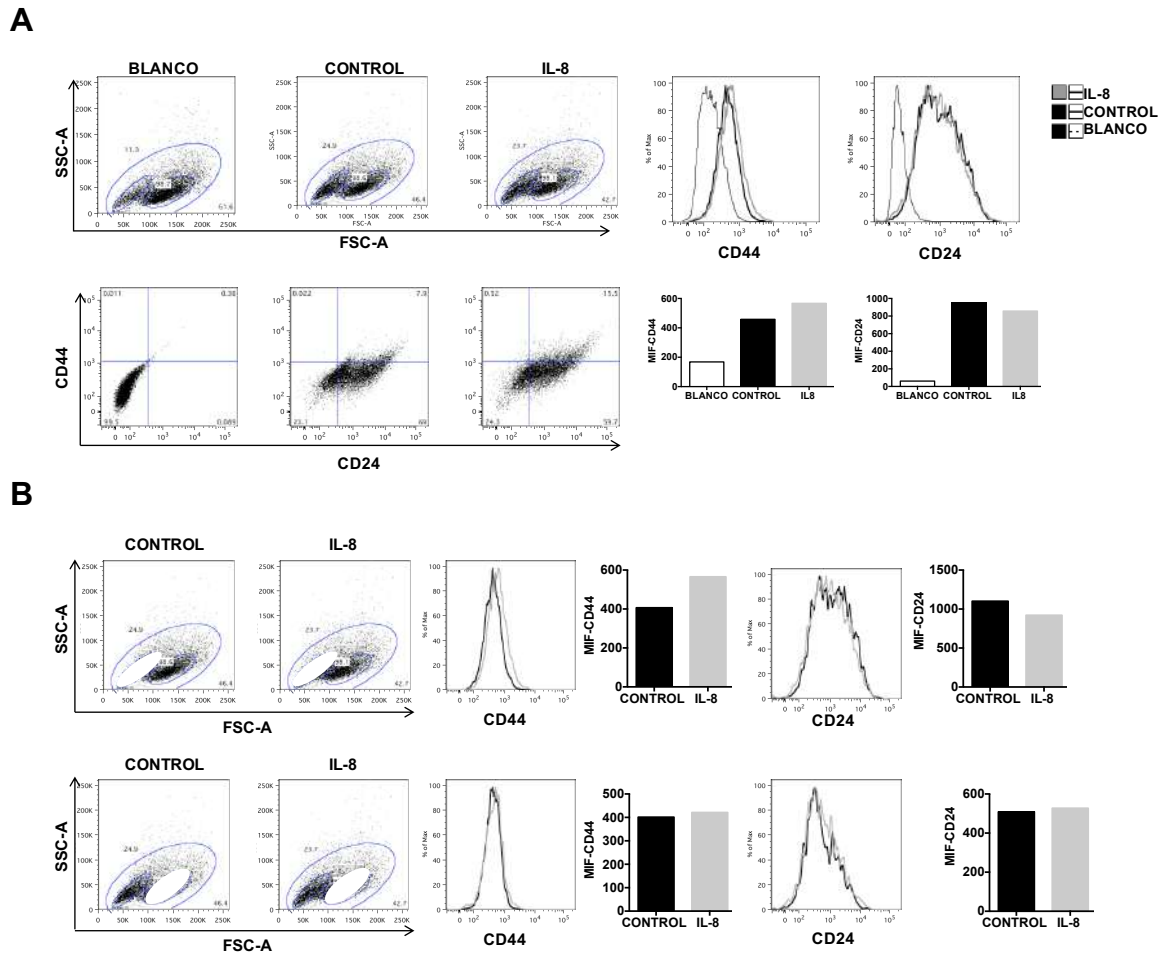
## La expresión de CD44 inducida por IL6 e IL8 se asocia con la inducción de algunas propiedades funcionales, pero no de autorrenovación

Teniendo en cuenta el mayor efecto de la IL8 en el ensayo de formación de esferas, se caracterizaron las células disociadas de estas esferas en términos de la expresión de CD44 y CD24. Inicialmente, se monitoreó diariamente y durante 7 días, la capacidad de formación de esferas en células MCF-7 pre-tratadas o no (control) con IL8, adicionando la citoquina fresca cada 2 días. La **Figura 28** muestra que el tratamiento con IL8, indujo tempranamente (2 días) esferas de mayor tamaño y de forma más regular que las formadas en el control. Como se muestra en la **Figura 29A**, el análisis por citometría de flujo mostró claramente dos poblaciones celulares de diferente tamaño y complejidad. El análisis de la expresión simultánea de CD44 y CD24 en toda la población muestra que el tratamiento con IL8 indujo un leve incremento en la expresión del marcador de células *stem* CD44; el análisis por separado de estas poblaciones indica que la población que presenta un mayor tamaño y complejidad presenta más células que expresan el marcador CD44 y podrían corresponder eventualmente a las células con potencial *stem* (**Figura 29B**, panel superior).



**Figura 28.** El tratamiento con IL8 potenció la capacidad de formación de esferas de las células MCF-7. Imágenes representativas de la evaluación diaria (7 días) de la capacidad de formación de esferas de células MCF-7 pre-tratadas o no (control) durante 5 días con IL8 y cultivadas por 7 días más en presencia de medio definido de formación de esferas (control) y en medio definido suplementado con IL8 (50 ng/ml). La condición sin inducción hace referencia a células en presencia de medio con 1% de metilcelulosa.





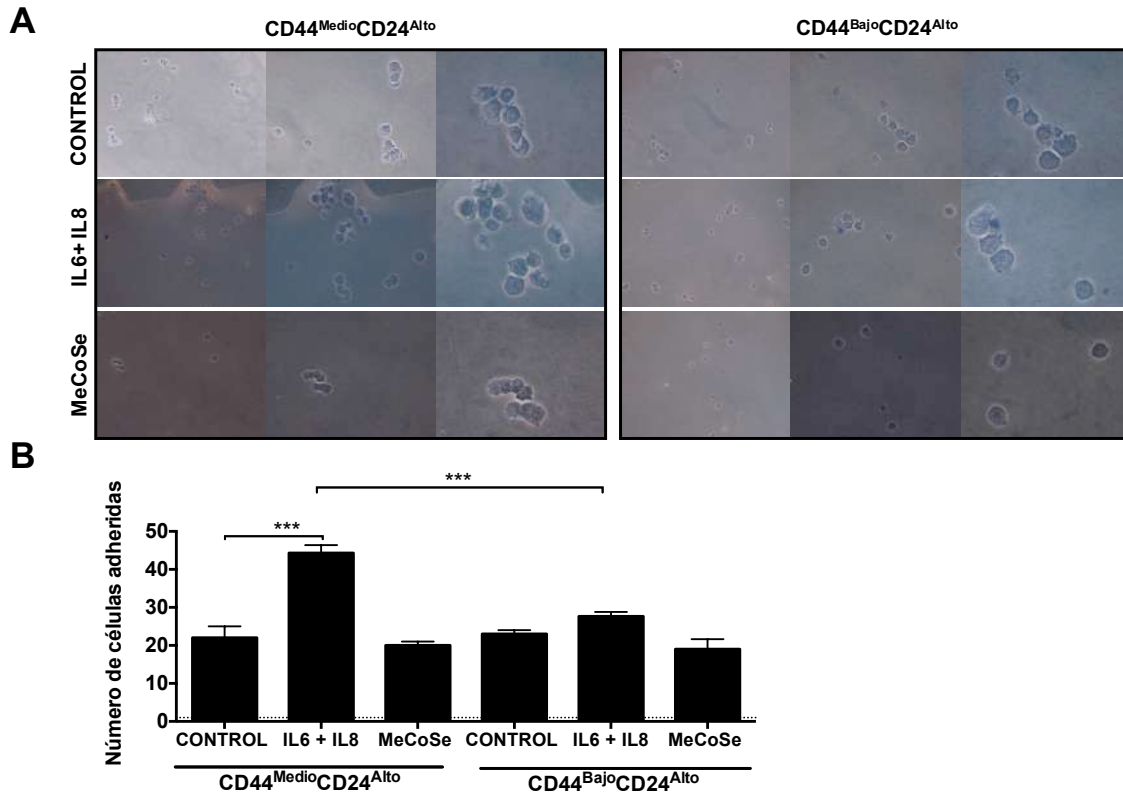
**Figura 29. El tratamiento con IL8 indujo un ligero incremento en la población de células stem (CD44+).** Evaluación por citometría de flujo del nivel de expresión de CD44 y CD24 en esferas obtenidas de células MCF-7 estimuladas o no con IL8 durante 7 días. (A). Evaluación en toda la población del tamaño y complejidad (FSC-A y SSC-A) (Panel superior) y de la expresión de CD44 y CD24 (panel inferior). (B). Análisis de la expresión de CD44 y CD24 en las dos poblaciones seleccionadas (denotadas en óvalos). Las gráficas de barras indican el índice de intensidad media de fluorescencia para CD44 y CD24 en cada condición.

Intentando tener una evidencia más clara de esto, se realizó una separación celular por citometría de flujo basada en la expresión de CD44, a partir de células MCF-7 que habían sido estimuladas con citoquinas o con MeCoSe (**Figura suplementaria 6**). Se observó un incremento en la población  $CD44^{Medio}CD24^{Alto}$  en las células estimuladas con respecto a las células control en donde únicamente el 1,8 % de la población fue positiva para CD44. Este incremento fue similar en las condiciones de estimulación con IL6, IL8, TGF- $\beta$  y MeCoSe, y un poco mayor cuando se adicionaron las citoquinas simultáneamente (6,5%) (**Figura suplementaria 6C**). Con respecto al porcentaje de células  $CD44^{Medio}CD24^{Alto}$  recuperadas después de la separación (post-sorting), este fue similar en todas las condiciones. Las células



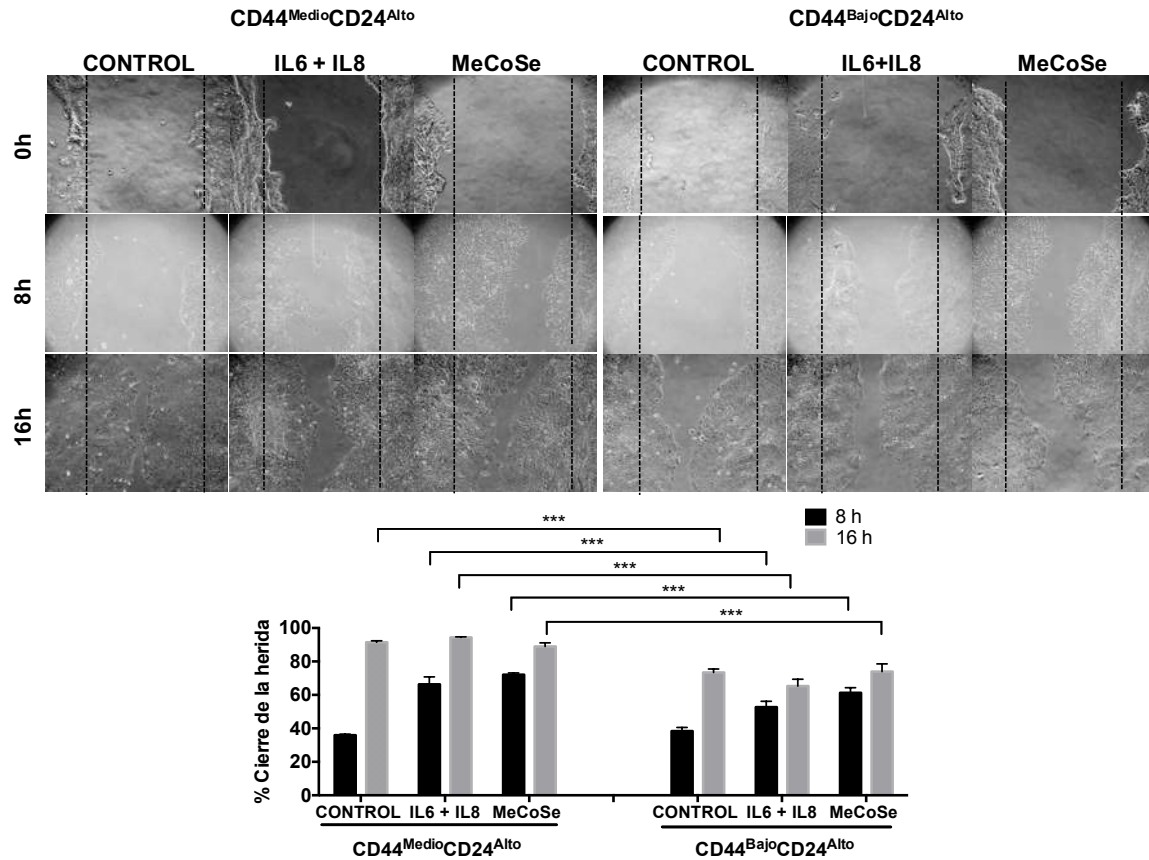
se mantuvieron en condiciones de cultivo celular hasta alcanzar una confluencia del 80-100%. Como se observa en la **Figura suplementaria 7**, después de 11 días en cultivo, estas células conservaron su fenotipo fibroblastoide, con células que crecían de forma separada y que presentaban una morfología de células alargadas; Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de la población manifestó esta morfología, siendo más frecuente el fenotipo epitelial. Se caracterizó molecular y funcionalmente estas células con el fin de determinar la contribución de CD44 a este programa. Se seleccionaron las células que habían sido estimuladas con las dos citoquinas simultáneamente y con el MeCoSe, ya que fueron las que mejor crecieron en cultivo y mantuvieron en su mayoría el fenotipo mesenquimal. En primera medida, se determinó si estas poblaciones que habían sido previamente separadas mantenían la expresión del marcador CD44. La expresión de CD44 se evaluó por FACS (**Figura suplementaria 8A**) y por qRT-PCR (**Figura suplementaria 8B**). Aunque los niveles de expresión fueron muy bajos, se observó que el nivel de CD44 fue mayor en la población con un fenotipo CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> tanto en células estimuladas con las citoquinas (11% vs 4%) como con MeCoSe (5% vs 1.6%). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de CD44 determinados por qRT-PCR. Debido al leve incremento en la expresión de CD44, no logramos identificar claramente dos poblaciones distinguibles por la presencia de este marcador. Hay que tener en cuenta que en este caso el fenotipo predominante es el epitelial y solo una pequeña proporción de células se mantiene como mesenquimal, y por consiguiente los niveles de CD44 no se evidencian como muy elevados. No obstante, evaluamos la EMT producida por esta población de células CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> en relación con la expresión de marcadores asociados a la EMT (E-cadherina, TJP1, Vimentina y Zeb1), sin encontrar diferencias con respecto a las células CD44<sup>Bajo</sup>CD24<sup>Alto</sup> (**Figura suplementaria 9A**). Solo se observaron diferencias en la expresión de E-cadherina (normalizada a GADPH), en donde observamos una disminución en células CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> tratadas con IL6+IL8 y un ligero aumento en las tratadas CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> con MeCoSe (**Figura suplementaria 9B**). También se evaluó la capacidad de adhesión y migración de estas células: las células CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> estimuladas con IL6+IL8 presentaban una mayor capacidad de adhesión que las células control y que las células CD44<sup>Bajo</sup>CD24<sup>Alto</sup> (**Figura 30**). Esto indica que CD44, además de ser importante en el mantenimiento de las características funcionales asociadas a la EMT,

requiere de la señalización de IL6 e IL8 para el mantenimiento de su función, y sugiere que la presencia de un microambiente pro-inflamatorio podría potenciar las características asociadas a la EMT.



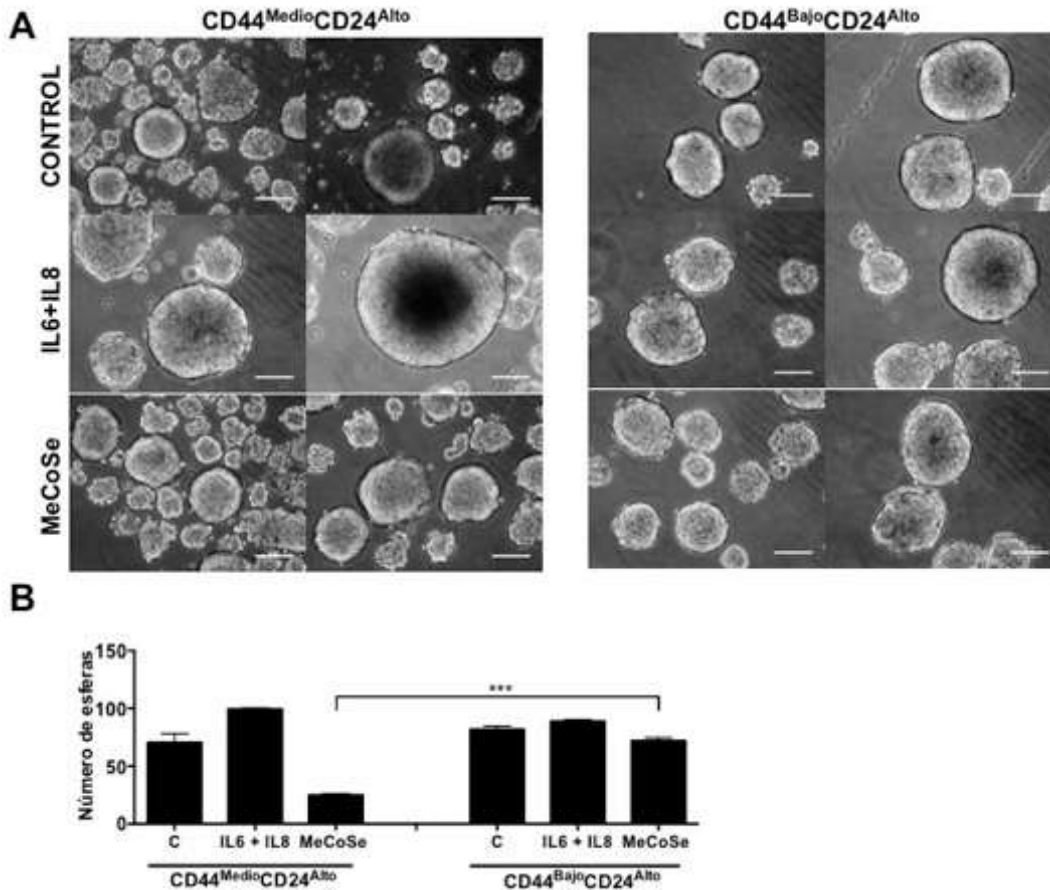
**Figura 30. Citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 inducen una mayor capacidad de adhesión en las células MCF-7 CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup>.** Ensayo de adhesión de células MCF-7 a placas cubiertas con fibronectina. (A) Imágenes representativas (10X) de las células adheridas a fibronectina y teñidas con cristal violeta. (B) Se cuantificó el número de células adheridas. Barras de error indican SEM (\*\*\*) p<0.001)

Así mismo, estas células, CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup>, presentaron una mayor capacidad de migración, como se evaluó mediante un ensayo de curación de heridas, sin embargo, como se observa en la **Figura 31**, la estimulación simultánea con las citoquinas o con el MeCoSe no modificó esta capacidad, lo que sugiere un papel predominante de CD44 en esta función. Resultado que concuerda con lo reportado en la literatura, en donde CD44 a través de la interacción con su ligando, induce una mayor capacidad de migración en células MCF-7 (Hiscox S, 2012; Yan W, 2013).



**Figura 31. Citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 inducen una mayor capacidad de migración en las células MCF-7 CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup>.** Ensayo de curación de heridas realizado en células MCF-7 después de la separación celular. Se muestran imágenes representativas (10X) de por lo menos 10 imágenes. La gráfica de barras indica el porcentaje del cierre de la herida a las 0, 8 y 16 h el cual se determinó con el programa Image J. Barras de error indican SEM. (\*\*\*) p<0.001).

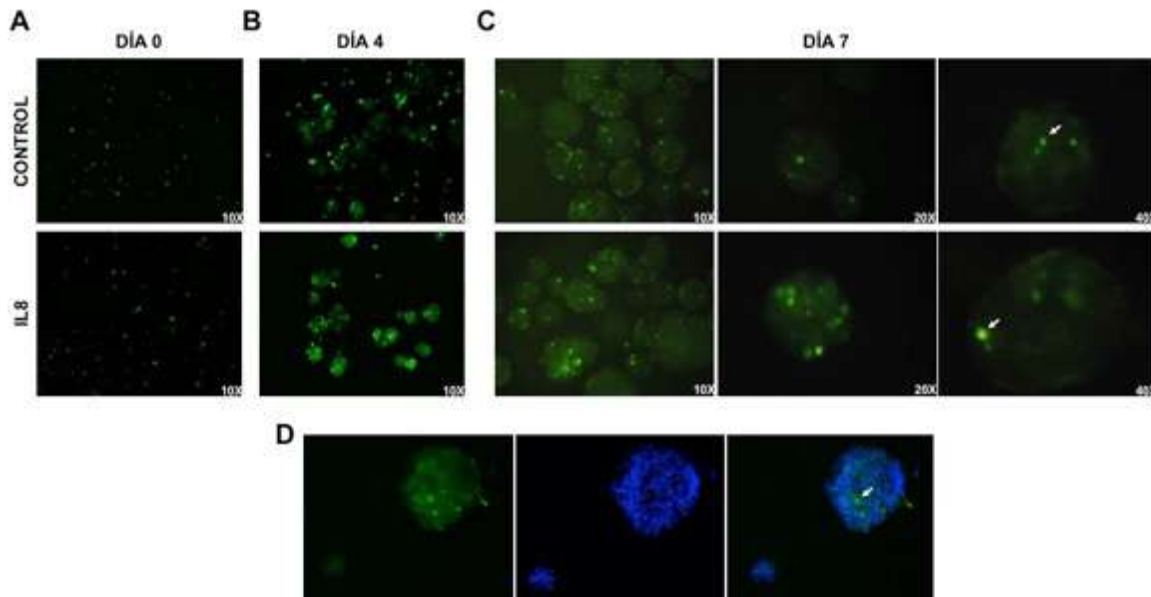
Posteriormente se evaluó si las células MCF-7 clasificadas como CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> presentaban una mayor capacidad de formar mamoesferas. La evaluación se realizó después de 7 días de inducción con medio definido encontrándose un número similar de esferas pero una heterogeneidad en términos del tamaño y la forma de las esferas (**Figura 32**). A pesar de que las células con mayor expresión de CD44 formaron esferas grandes  $\geq 100 \mu\text{m}$ , la mayoría de ellas fueron irregulares, con una apariencia translúcida y con presencia de vacuolas. Un resultado similar obtuvimos al estimular con MeCoSe, en donde también se observaron células con una apariencia translúcida, de forma irregular, pero en este caso, el número de esferas formadas por las células CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> fue significativamente menor, como lo indica la gráfica de barras (**Figura 32B**).



**Figura 32. Citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 indujeron células con características stem en las células MCF-7 CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Low</sup>.** Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido en células MCF-7 separadas por citometría de flujo y tratadas con citoquinas (IL6 + IL8) o MeCoSe. Control (C) hace referencia a esferas formadas únicamente en presencia de medio definido (EGF + bFGF). (A) Imágenes representativas (10X) de las esferas formadas después de 7 días. Barra de escala 100  $\mu$ m. (B) La gráfica de barras indica el número de esferas que presenta un tamaño  $\geq 100$   $\mu$ m. El tamaño se determina con un micrómetro. Las barras de error indican SEM. (\*\*\*)  $p < 0.001$

En la estimulación con IL6+IL8 se observó para las células CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> un número similar de esferas pero estas alcanzaron un tamaño  $\geq 400$   $\mu$ m. La presencia de esferas más grandes en la población con mayor expresión de CD44, podría indicar un enriquecimiento de células stem. En efecto, la marcación de células MCF-7 previo al ensayo de formación de esferas, día 0 (**Figura 33**), con el colorante fluorescente CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), el cual emite una fluorescencia que se va perdiendo después de cada división celular (día 4 y 7) durante el ensayo de formación de mamoesferas (**Figura 33B-C**) corrobora el enriquecimiento en una pequeña población de células con propiedades stem. De

manera interesante, se observó una pequeña cantidad de células (1-3 células) (ver flechas) que retenían el colorante CFSE, lo que en efecto indicaría la presencia de células con una baja capacidad proliferativa, o células quiescentes, que corresponderían a las células *stem* por definición (Figura 33C y D).



**Figura 33. Las mamoesferas contienen una pequeña población de células que retienen el marcador de proliferación CFSE.** Imágenes representativas de mamoesferas derivadas de células MCF-7 tratadas o no (control) con IL8 y marcadas con CFSE (verde). La evaluación de la fluorescencia emitida por el CFSE se realizó al día 0 (A), día 4 (B) y día 7(C). Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul) para visualizar las células que componen la esfera (D).

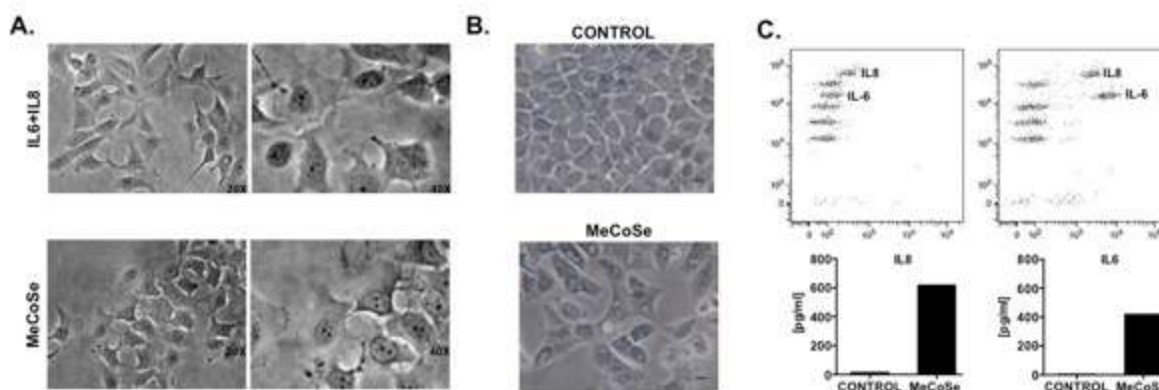
Estos resultados sugieren que las esferas se componen de una población heterogénea de células, con células *stem* que se dividen de manera asimétrica generando células hijas que conservan su naturaleza *stem* por autorrenovación y células progenitoras que experimentarían además procesos de diferenciación. Se mostró que, tanto las células MCF-7 con una mayor expresión de CD44 ( $CD44^{Medium}CD24^{Alto}$ ) como con una menor expresión ( $CD44^{Bajo}CD24^{Alto}$ ) presentaron una capacidad inherente de formar esferas, lo que soporta la idea que no existe un consenso en cuanto a restringir la caracterización de células *stem* basada únicamente en la expresión de este marcador. Sumado a los resultados obtenidos previamente, estos ensayos de formación de mamoesferas, manifiestan la naturaleza

heterogénea de las células *stem*, en términos fenotípicos y funcionales que hace necesario una mejor caracterización.

### CAPITULO III. Senescencia e inflamación se refuerzan recíprocamente y se asocian con la generación de células *stem*

#### El tratamiento con el MeCoSe induce un mecanismo autocrino de producción de IL6 e IL8 y senescencia en las células MCF-7

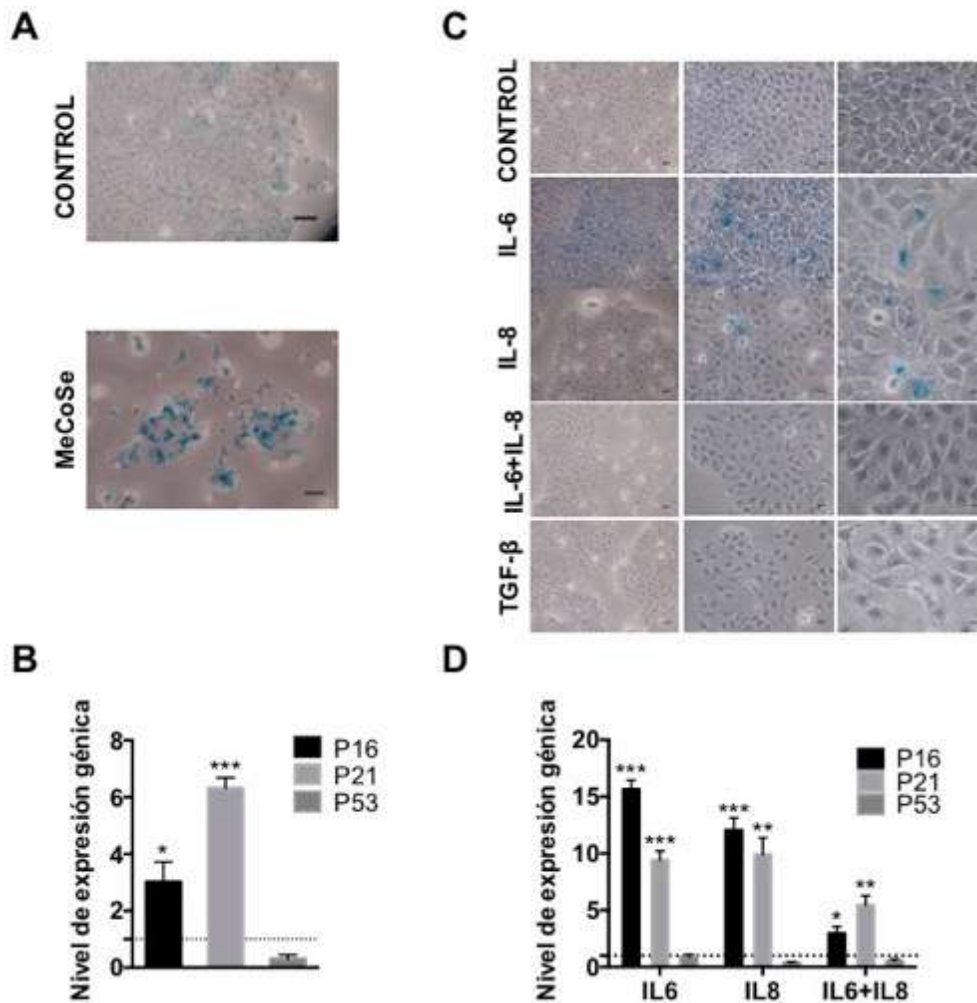
Durante la realización de estos experimentos, se observó que las células MCF-7 adquirirían una morfología de células aplanadas después del tratamiento con citoquinas y con MeCoSe (**Figura 34A**). Por esta razón se evaluó la actividad de SA- $\beta$ Gal, la cual fue negativa después de 5 días de exposición a MeCoSe (**Figura 34B**). Sin embargo, la incubación de células MCF-7 con MeCoSe indujo un incremento adicional en la expresión de IL8 e IL6 (6 y 2 veces, respectivamente) (**Figura 34C, comparar con la Figura 3**). Esta observación sugiere la participación de un mecanismo autocrino que podría reforzar el efecto del MeCoSe.



**Figura 34. El MeCoSe incrementa la expresión de IL6 e IL8 en células MCF-7.**(A) Imágenes representativas (20 y 40X) de células MCF-7 tratadas con MeCoSe y con IL6+IL8 durante 5 días. (B) Evaluación de la actividad SA- $\beta$ -GAL en células estimuladas o no por 5 días con MeCoSe. (C) Los niveles de IL6 e IL8 se determinaron por citometría de flujo, CBA, utilizando medio condicionado libre de suero obtenido de células MCF-7 tratadas como se indicó previamente.

De manera notoria, la exposición prolongada (10 días) al MeCoSe indujo la generación de células senescentes, evaluadas por la actividad (SA- $\beta$ Gal) (**Figura 35A**) o por la expresión

de los marcadores asociados a senescencia p16 y p21 (**Figura 35B**). Un resultado similar se obtuvo por la estimulación durante 5 días de las células MCF-7 con IL6 y con IL8, pero no con TGF- $\beta$  o la combinación de las citoquinas (**Figura 35C y D**).

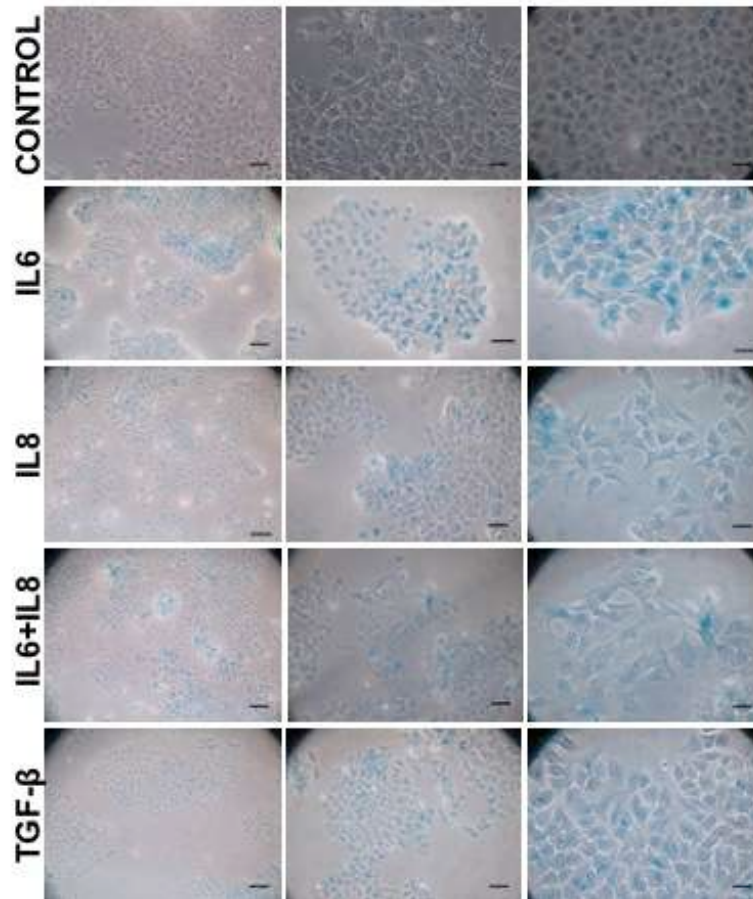


**Figura 35. El tratamiento con IL6 e IL8 indujo senescencia en las células MCF-7.**(A) Imágenes representativas de células MCF-7 tratadas con MeCoSe durante 10 días o (C) citoquinas (50 ng/ml) durante 5 días y marcadas para la actividad SA- $\beta$ -GAL. Barra de escala, 10  $\mu$ m. (B) Perfil de expresión génica de p16, p21 y p53 en células MCF-7 estimuladas con MeCoSe o (D) citoquinas, como se indicó. Los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control (línea punteada). Barra de error indica SEM. (\* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001) (n=2).

También, la exposición a una concentración más baja de IL6 e IL8 (100 veces menos) durante 10 días indujo un aumento en la actividad de SA- $\beta$ Gal en células MCF-7 (**Figura 36**), de la



misma manera que lo hizo una exposición prolongada a una alta concentración de TGF- $\beta$ . En el caso de IL6 e IL8, la exposición prolongada a una baja concentración de citoquinas fue más efectiva en la inducción de senescencia que la estimulación por un periodo de tiempo más corto con una alta concentración de citoquinas.

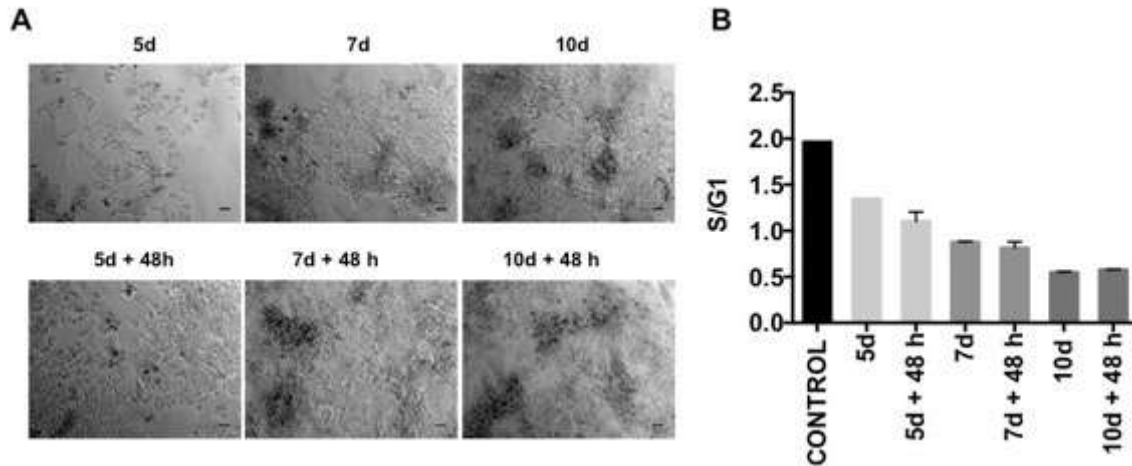


**Figura 36.** El tratamiento prolongado con citoquinas pro-inflamatorias indujo un aumento en la senescencia de células MCF-7. valuación de la actividad SA- $\beta$ -GAL en células MCF-7 tratadas con citoquinas a baja concentración (0,5 ng/ml) durante 10 días. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Adicionalmente, mediante un análisis de la proliferación celular determinado por la incorporación de BrdU al DNA, se encontró que la proporción de células senescentes inducida por la incubación con MeCoSe no se modificó (**Figura 37A**). La actividad SA- $\beta$ Gal fue positiva e incrementó gradualmente después de 5, 7 y 10 días de contacto con MeCoSe (panel superior), esta actividad fue similar 48 h después de contacto con medio suplementado más SFB (10%) (panel inferior) (**Figura suplementaria 10**). La cuantificación del porcentaje de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular (**Figura 37B**), muestra que el número de células en fase de síntesis (S/G1) no cambió, lo que sugiere que el estado de



senescencia es irreversible. En conjunto, los resultados muestran que el tratamiento con citoquinas pro-inflamatorias o MeCoSe, induce un estado de senescencia en las células MCF-7.

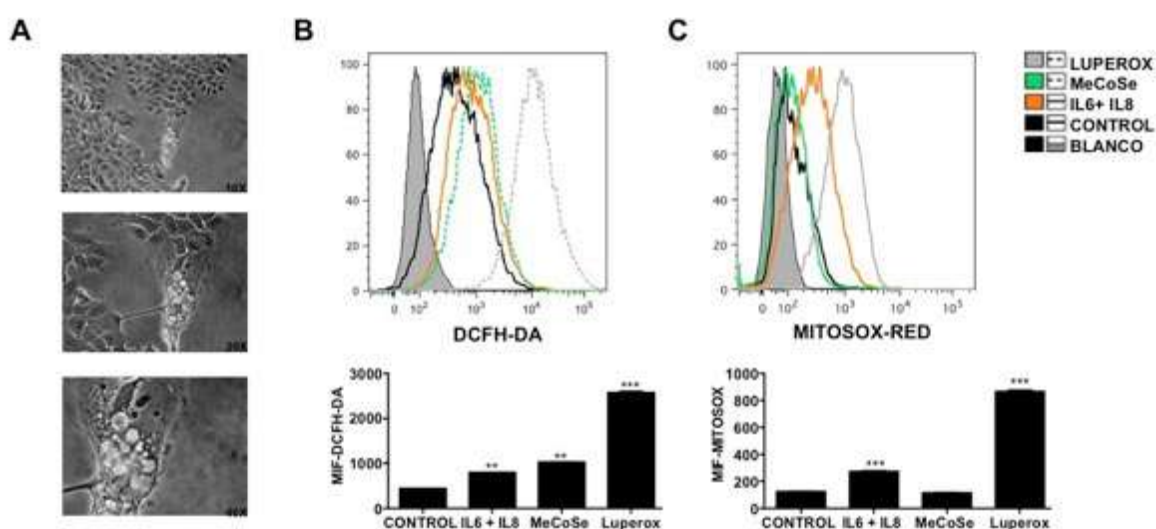


**Figura 37. El MeCoSe incrementó la expresión de IL6 e IL8 en células MCF-7 lo cual se asoció a un estado de senescencia irreversible.**(A) Imágenes representativas (10X) de células MCF-7 marcadas para SA-β-GAL después de 5, 7 y 10 d de contacto con MeCoSe y después de 48 h de contacto con medio de crecimiento (RPMI-1640 + SFB 10%). (B) El histograma muestra la relación entre la fase S y G1 del ciclo celular. Barra de error indica SEM.

### Un microambiente pro-inflamatorio induce senescencia a través de un aumento en la producción de ROS

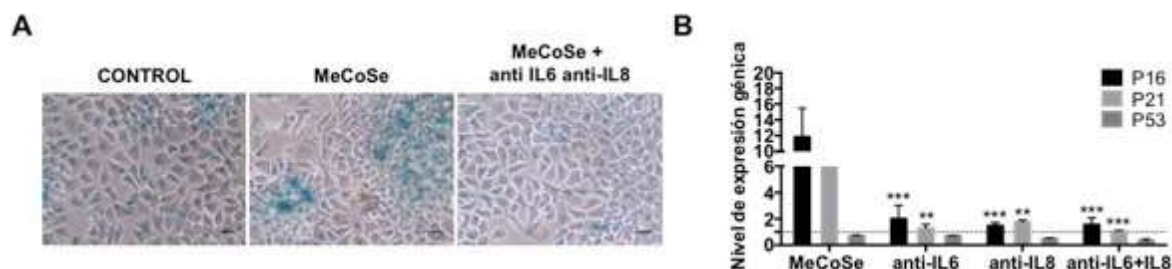
La IL6 y la IL8 pueden inducir una senescencia celular prematura con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species), daño en el DNA y aumento en SASP (IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6 e IL8) (Kojima H, 2013). Se evaluó el nivel de producción de ROS tanto a nivel intracelular como mitocondrial en células MCF-7 después de 5 días de contacto con IL6+IL8 o MeCoSe (**Figura 38**). Como control positivo de la producción de ROS se utilizó el peróxido orgánico (Luperox), el cual indujo cambios en la morfología de las células MCF-7, esto es células más grandes, alargadas y vacuoladas (**Figura 38A**). Los niveles de ROS se determinaron por citometría de flujo, mediante el uso de dos compuestos: DCFH-DA (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate), compuesto no polar fluorogénico que difunde fácilmente a las células y detecta los niveles de peróxido de

hidrogeno intracelular (**Figura 38B**). *Mitosox Red*, que detecta los niveles de superóxido producidos por la mitocondria generando un producto altamente fluorescente (**Figura 38C**). El tratamiento con las dos citoquinas simultáneamente (línea naranja), indujo un aumento en los niveles de ROS tanto intracelular como mitocondrial con respecto a las células control. El tratamiento con el MeCoSe indujo únicamente un aumento en los niveles de ROS intracelular. Como se esperaba, el tratamiento con Luperox (control positivo) indujo un aumento en los niveles de ROS intracelular y mitocondrial. Una mayor estimulación (8 días) no indujo un aumento en los niveles de ROS mitocondrial en células tratadas con MeCoSe o con citoquinas (**Figura suplementaria 11A**). La mayor producción de ROS mitocondrial se obtuvo después de 4 días de estimulación con las citoquinas (**Figura suplementaria 11B**).



**Figura 38. El tratamiento con citoquinas o con MeCoSe indujo un aumento en los niveles de ROS.**(A) Imágenes representativas (10, 20 y 40X) de células MCF-7 tratadas con Luperox (400  $\mu$ M) por 2 h. Se observan células aplanadas y presencia de vacuolas. Los niveles de ROS intracelular (B) y mitocondrial (C) se determinaron por citometría de flujo mediante el uso de sondas específicas (DCFH-DA y Mitosox-red, respectivamente) en células MCF-7 estimuladas o no (control) con citoquinas (línea naranja) o con MeCoSe (línea verde) durante 5 días. Células sin marcar se utilizaron como blanco, y células tratadas con Luperox como control positivo (Línea gris). Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) ( $n = 2$ ). Los resultados corroboran los obtenidos en la **Figura 35C**, en donde la estimulación temprana con citoquinas a diferencia del MeCoSe fue más eficiente en la inducción de un estado senescente el cual se puede explicar por un aumento en la producción de ROS intracelular.

Para confirmar el papel de la IL6 y la IL8 en la inducción de la senescencia, se incubó el MeCoSe con anticuerpos anti-IL6 y anti-IL8 (**Figura 19**). La incubación con estos anticuerpos suprimió la actividad SA-βGal (**Figura 39A**). Además, suprimió el incremento observado en la expresión de p16 and p21 (**Figura 39B**). El nivel de expresión de estos marcadores se redujo de manera similar al inhibir las citoquinas de manera individual y simultánea corroborando el papel de estas citoquinas en la inducción de un estado senescente.



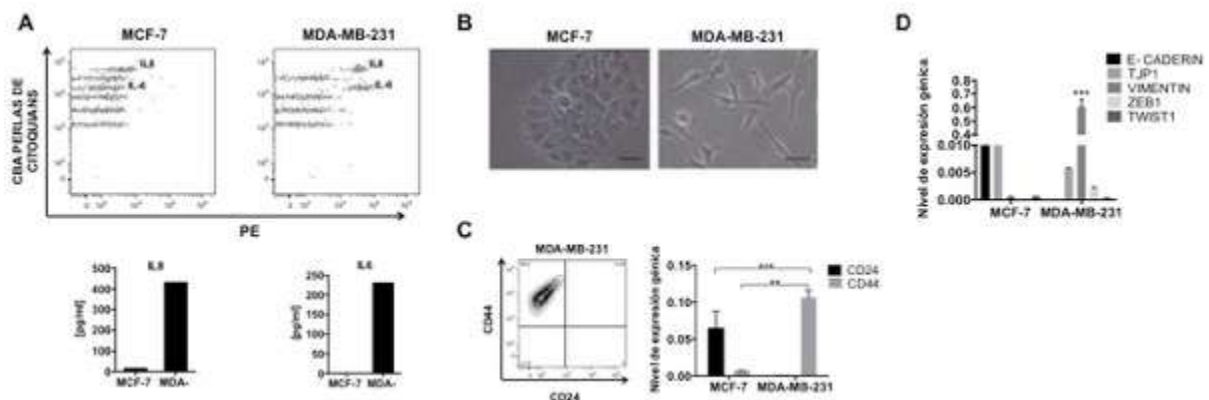
**Figura 39. La neutralización de IL6 e IL8 redujo la senescencia observada en las células MCF-7.** La incubación del MeCoSe con anticuerpos neutralizantes anti-IL6 y anti-IL8 suprime la actividad SA-βGal (A) y reduce la expresión de marcadores asociados a senescencia p16, p21 y p53 (B) determinada por qRT-PCR. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) (n=2).

Estos resultados sugieren, que un microambiente pro-inflamatorio inducido por senescencia desencadena un mecanismo celular por el cual senescencia e inflamación son reforzadas a nivel de la población celular. Este efecto podría estar mediado por los niveles de producción de ROS y de citoquinas pro-inflamatorias, y por el balance entre las dos. Esto, teniendo en cuenta que una producción crónica prolongada de citoquinas y de ROS se asocia fuertemente con la progresión de enfermedades asociadas a inflamación. En efecto, se observó en un ensayo de migración en *transwell*, que las células MCF-7 incubadas con MeCoSe migraron de manera más eficiente hacia IL8 (**Figura suplementaria 12**), lo que les proporcionaría la capacidad de ocupar nuevos nichos y expandir de esta manera la formación del tumor.

## **CAPITULO IV. Relación entre las características de células stem, la agresividad tumoral y la capacidad tumorigénica**

**Células MDA-MB-231 secretoras de IL6 e IL8 muestran un fenotipo similar a la EMT, pero exhiben propiedades parciales/incompletas de células stem**

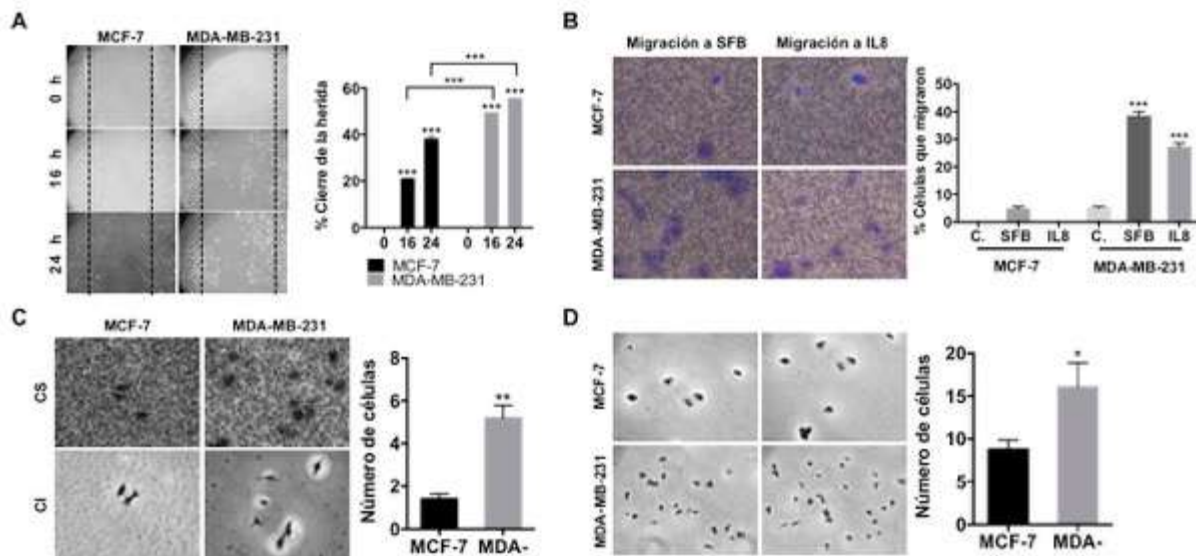
Teniendo en cuenta lo anterior, un microambiente inflamatorio inducido por la senescencia puede inducir un fenotipo tumoral más agresivo. Efectivamente, células derivadas de cáncer de seno de tipo basal/mesenquimal que expresan constitutivamente IL6 e IL8 son más agresivas que las células de cáncer de seno de tipo luminal (Holliday DL, 2011; Sheridan C, 2006; Jung K, 2015). Con el fin de evaluar las propiedades de células *stem* en una línea celular con fenotipo EMT, y las citoquinas IL6 e IL8, utilizamos la línea celular de cáncer de seno de tipo basal, MDA-MB-231. Primero, se confirmó que estas células expresan constitutivamente IL6 e IL8 (**Figura 40A**); a diferencia de las células MCF-7 de tipo luminal, presentan una apariencia de células fusiformes (**Figura 40B**), además de expresar CD44 en ausencia de CD24 (**Figura 40C**). Como se esperaba para una línea celular de tipo mesenquimal, también expresó niveles elevados de Vimentina, Zeb1 y Snail-1, y bajos niveles de E-cadherina (**Figura 40D**) y presentó una menor capacidad de proliferación comparativamente con las células MCF-7 (**Figura suplementaria 13A**); Sin embargo, la expresión del marcador Ki-67 fue ligeramente más alta en la línea celular MDA-MB-231 cuando se evaluó durante una fase de crecimiento exponencial (3rd día) (**Figura suplementaria 13B, panel izquierdo**) y no muy diferente en el día 5<sup>to</sup> cuando el crecimiento celular disminuyó (**Figura suplementaria 13B, panel derecho**).



**Figura 40. Células MDA-MB-231 son ricas en citoquinas pro-inflamatorias y presentan un fenotipo similar a la EMT.** (A) El nivel de citoquinas pro-inflamatorias se determinó por citometría de flujo, CBA, utilizando medios condicionados libres de suero obtenidos de células MCF-7 y MDA-MB-231 (MDA-). (B) Imágenes representativas (20X) de la morfología celular obtenidas por microscopía de contraste de fases. Las flechas indican células con morfología fibroblastoide. Barra **Figura 41** de escala 10  $\mu$ m. (C) Expresión de marcadores de superficie celular CD44 y CD24

evaluados por FACS (izquierda) y por qRT-PCR (derecha). (D) Nivel de expresión génica de marcadores asociados a EMT. El histograma muestra la expresión de estos marcadores relativos a GAPDH. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.001$ ). E-cadherina y TJP1 (marcadores epiteliales) y Vimentina, Zeb1, Twist1, Snail1 and Snail2/Slug (marcadores mesenquimales). (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

En términos funcionales, las células MDA-MB-231 migraron más de manera espontánea (**Figura 41A**), y dirigida hacia SFB e IL8 (**Figura 41B**) que las células MCF-7. Adicionalmente, estas células presentaron una mayor capacidad de invasión a filtros cubiertos de matrigel (**Figura 41C**) y mayor adherencia a fibronectina (**Figura 41D**); lo que indica efectivamente que las células MDA-MB-231 muestran un fenotipo asociado a la EMT. De cierta manera, las células MCF-7 que han sido tratadas con las citoquinas o con el MeCoSe se parecen a las células MDA-MB-231.

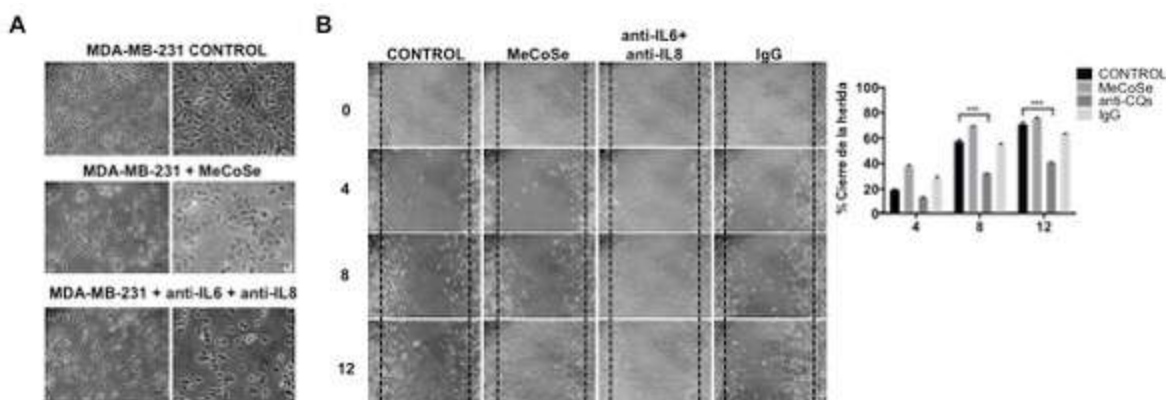


**Figura 41. Las células MDA-MB-231 presentan una alta capacidad de migración.**(A) Ensayo de curación de heridas realizado en células MCF-7 y MDA-MB-231. Las micrografías representativas (10X) tomadas a las 0, 16 y 24 h, muestran un incremento en la capacidad de migración de las células MDA-MB-231 (izquierda). La línea punteada negra indica el área de la herida. Se cuantificó el área de cierre de la herida (derecha) de aproximadamente 10 imágenes, utilizando el programa Image J. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.001$ ) (n=2). (B) Ensayo de migración en transwell realizado en células MCF-7 y MDA-MB-231 utilizando como quimioatrayente 20% de SFB o 50 ng/ml de IL8. Las imágenes (20X) corresponden a células presentes en la superficie externa de la membrana del filtro y la gráfica de barras al número de células que migraron. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.001$ ). (C) Ensayo de invasión en matrigel; las células invadieron durante 48 h a 37°C.



Micrografías representativas (20X) de la membrana del filtro (Compartimento superior (CS), superficie externa del filtro) y del compartimento inferior (CI) teñidos con cristal violeta. El histograma muestra el número de células en el compartimento inferior (CI). Barra de error indica SEM. (\*\*p<0.01) (n=2). (D) Ensayo de adhesión de células MDA-MB-231 y MCF-7 a placas de 96 pozos cubiertas con fibronectina. Micrografías representativas (20X) tomadas de los pozos teñidos con cristal violeta (izquierda). Se contó el número de células adheridas. Barras de error indican SEM. (\*p<0.05) (n=3). MDA-MB-231 se denota como MDA-

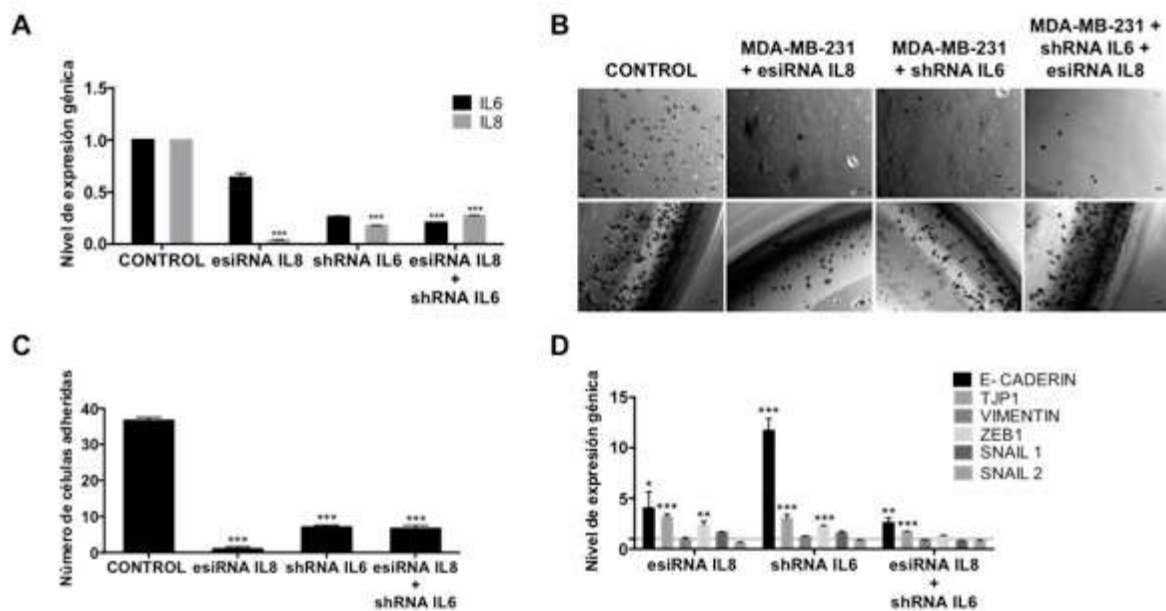
De manera interesante, el tratamiento con el MeCoSe no tuvo ningún impacto en la morfología (**Figura 42A**) o capacidad de migración de las células MDA-MB-231 (**Figura 42B**), sugiriendo que la propia secreción de IL6 e IL8 es suficiente para producir células con esa morfología y esa capacidad de migración.



**Figura 42. La IL6 y la IL8 son relevantes en la adquisición de propiedades funcionales asociadas al programa de EMT en células MDA-MB-231.** Células MDA-MB-231 tratadas o no (control) con MeCoSe o con 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal neutralizante o control de isotipo IgG en medio RPMI sin SFB. (A) La evaluación morfológica se realizó después de 72 h de tratamiento. Se muestran imágenes representativas (10 y 20X). Barra de escala, 10 µm. (B) Ensayo de curación de heridas realizado en células MDA-MB-231. Se muestran imágenes representativas (10X) tomadas a las 0, 4, 8 y 12 h, las cuales indican una disminución en la capacidad de migración de las células MDA-MB-231. La línea punteada negra indica el área de la herida. La gráfica de barras muestra la cuantificación del área de cierre de la herida de aproximadamente 10 imágenes y se realizó utilizando el programa Image J. Barra de error indica SEM. (\*\*p<0.001) (n=2).

Para determinar la relevancia de la IL6 y de la IL8 en las células MDA-MB-231 en algunas de las propiedades relevantes en el desarrollo tumoral se utilizaron anticuerpos neutralizantes y el uso de moléculas pequeñas de RNA de interferencia shRNA y esiRNA dirigidos contra IL6 e IL8 (**Figura 43A**). La incubación de las células MDA-MB-231 con anticuerpos neutralizantes indujo cambios morfológicos en las células MDA-MB-231, las células

adquirieron una morfología de células más redondas y de menor tamaño (**Figura 42A**) y una disminución en la capacidad de migración con respecto a las células control. Los resultados obtenidos en las células tratadas con el control de isotipo muestran que este efecto fue específico (**Figura 42B**). Por otra parte, el *knockdown* de IL6 y de IL8 se asoció con un incremento en la expresión de marcadores de tipo epitelial (E-cadherina y TJP1) (**Figura 43D**). Así mismo, el *knockdown* de estas citoquinas disminuyó la capacidad de adhesión a colágeno de las células MDA-MB-231 (**Figura 43B y C**). Estos resultados muestran que IL6 e IL8 juegan un papel importante en el fenotipo y funcionalidad de las células MDA-MB-231.

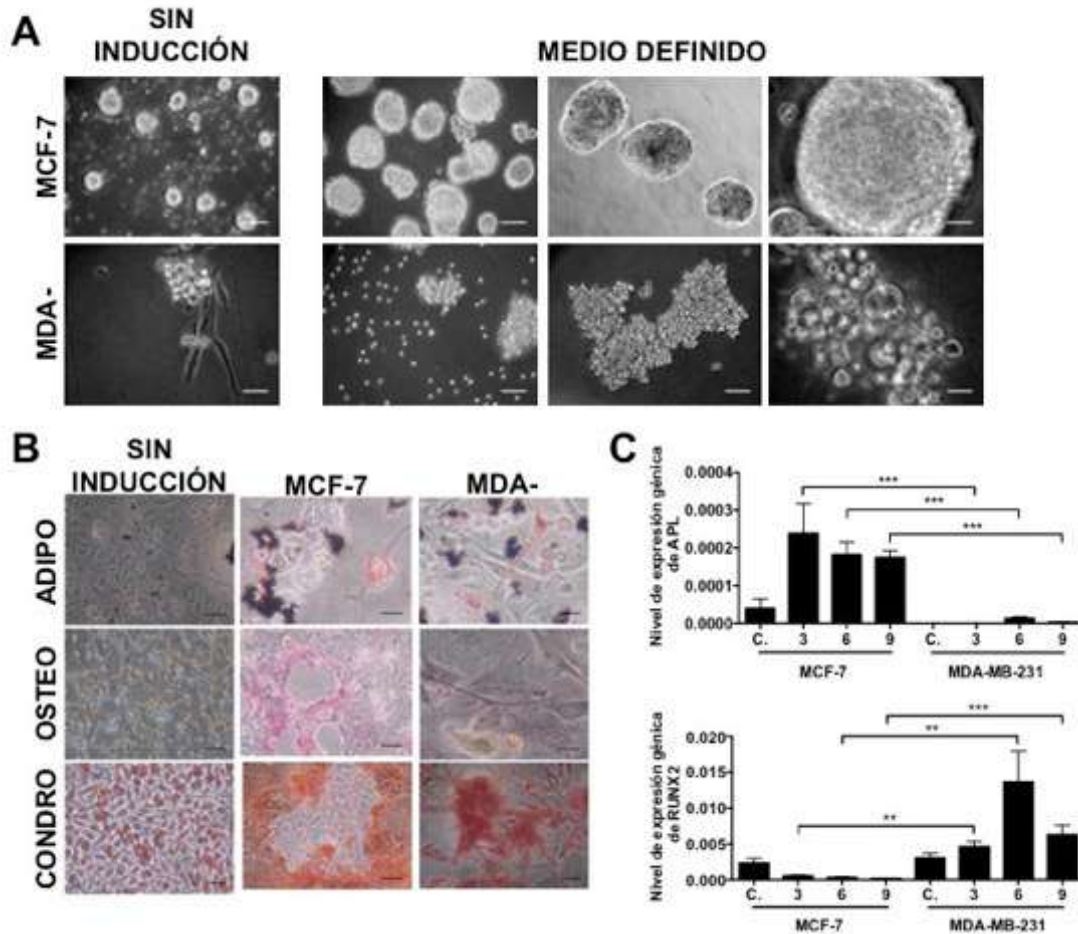


**Figura 43. IL6 e IL8 son importantes para el mantenimiento de características asociadas a la EMT en células MDA-MB-231.** La disminución de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias se realizó mediante el uso de pequeñas moléculas de RNA, esiRNA para IL8 y shRNA para IL6. Como control se utilizó el esiRNA-FLUC y shRNA puro vector, respectivamente. (A) la disminución en la expresión de estas citoquinas y (D) de marcadores de EMT se confirmó por qRT-PCR. Los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control (línea punteada). barras de error indican SEM. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ ). (B) Imágenes representativas (10X) de la capacidad adhesión de células MDA-MB-231, normales y que presentaban disminución en la expresión de IL6 e IL8, a placas de 96 pozos cubiertas con colágeno. Los pozos se tiñeron con cristal violeta. (C) la gráfica de barras corresponde al número de células adheridas. Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.001$ ).

Posteriormente, se investigó la coexistencia de propiedades de las células *stem* y el proceso de EMT en la línea celular MDA-MB-231, como se ha reportado previamente en otros

modelos de cáncer (Zacarias-Fluck MF, 2015; Lin Y, 2004; Waugh DJ, 2008; Singh JK, 2013; Charafe-Jauffret E, 2009; Hartman ZC, 2013) y como se mostró en las células MCF-7 tratadas con las citoquinas. Contrario a lo que se esperaba, las células MDA-MB-231 pre-tratadas con citoquinas no formaron mamoesferas, y en lugar de esto, formaron agregados celulares, los cuales fueron muy irregulares, translucidos y de diferente tamaño (**Figura 44A**). Este resultado contrasta claramente con la alta capacidad de formar esferas de las células MCF-7 pre-tratadas con citoquinas (**Figura 13; Figura 14 y Figura 44A**). Adicionalmente, aunque la diferenciación hacia linajes condro- y adipogénico fue normal (**Figura 44B, panel superior e inferior**), de manera sorprendente las células MDA-MB-231 no presentaron capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico (**Figura 44B, panel intermedio y Figura suplementaria 14A**). En contraste con las células MCF-7, las células MDA-MB-231, no expresaron APL bajo el tratamiento con el medio de inducción osteogénica (**Figura 44C**). De manera interesante, las células MDA-MB-231 expresaron altos niveles de RUNX2, el cual puede ser un inhibidor de la diferenciación osteogénica. En relación con la expresión de FTs asociados a reprogramación, no se observaron diferencias entre las células MCF-7 y las MDA-MB-231 (**Figura suplementaria 14B**).





**Figura 44. Células MDA-MB-231 presentan características de células stem incompletas/aberrantes.** (A) Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido (EGF + FGF) en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Micrografías representativas (10, 20 y 40X) muestran la formación de esferas después de 9 días de inducción. Barra de escala, 100  $\mu$ m (B) Ensayo de diferenciación de las células MCF-7 y MDA-MB-231. La capacidad de diferenciación se determinó después de 10 días de inducción y se evaluó como se indicó previamente. Se muestran imágenes representativas. Barra de escala 10  $\mu$ m. (C) El nivel de expresión de RUNX2 y APL se determinó por qRT-PCR, al día 3, 6 y 9 de diferenciación. Los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control, denotado como C. Barra de error indica SEM. (\* $p$ <0.01; \*\* $p$ <0.001) (n=2).

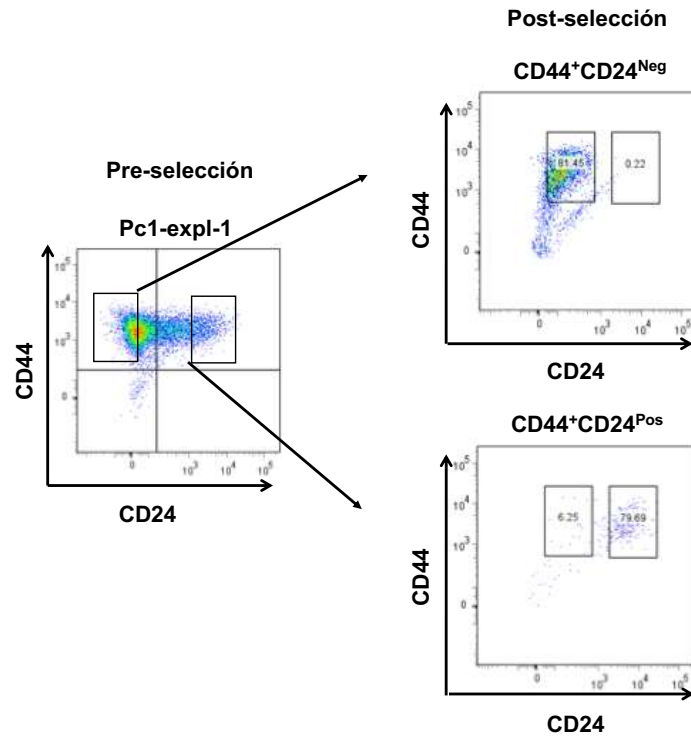
En conjunto el tratamiento con las citoquinas IL6 e IL8 o con MeCoSe en la línea celular MCF-7 reveló un fenotipo de EMT e indujo un microambiente senescente/inflamatorio responsable de la emergencia de características asociadas a un fenotipo *stem*, además de conferir plasticidad epitelial confiriendo de esta manera un fenotipo más agresivo a las células de cáncer de seno luminal. Este fenotipo es propio de las líneas celulares de tipo basal/mesenquimal como la MDA-MB-231. Sin embargo, parece ser que ambas líneas difieren en aspectos importantes relacionadas a sus capacidades *stem* sugiriendo que la adquisición de la EMT y de estas propiedades, no siempre se adquieren de manera conjunta

(Ortiz-Montero P, 2017). Por otra parte, sugiere que no es necesario presentar funciones de células *stem* completas, para mostrar una gran capacidad tumorigénica.

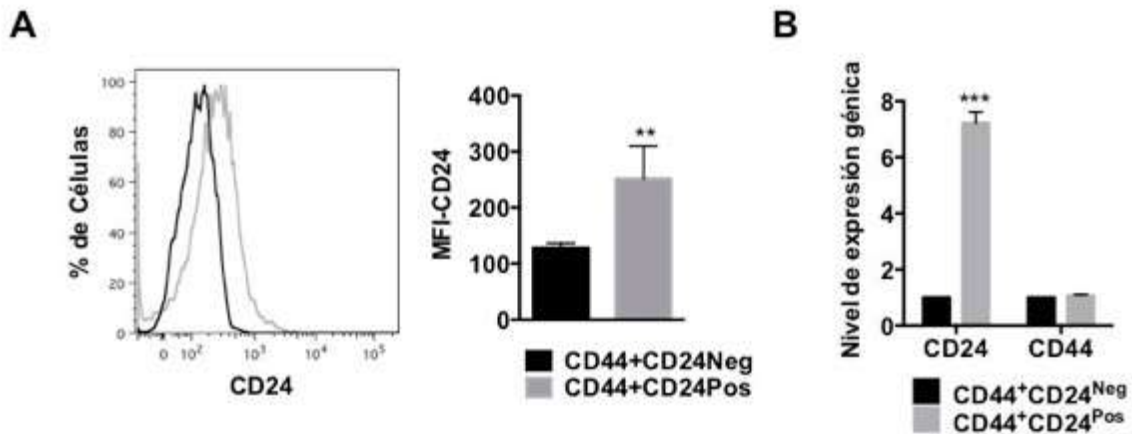
### **El modelo de células HEK corrobora que la adquisición de un fenotipo *stem* no se relaciona con una mayor tumorigenicidad**

Como se mostró arriba, las células HEK pre-malignas adquirieron el potencial de llegar a ser completamente tumorigénicas exclusivamente en presencia de un microambiente senescente, rico en IL6 e IL8, adquiriendo plasticidad epitelial (EMT-MET), propiedades de células *stem*, y sorprendentemente potencial tumorigénico autónomo (Castro-Vega LJ, 2015). No obstante, las esferas inducidas por células HEK con inestabilidad cromosómica (CIN+: Chromosomal instability) en presencia de MeCoSe, no presentaron capacidad de formar tumores (Castro-Vega LJ, 2015), indicando que un incremento en la capacidad tumorigénica no siempre se relaciona con un aumento en las propiedades de células *stem*. Por otra parte, las células que se recuperaron o extrajeron de los tumores promovidos por fibroblastos senescentes (células explantadas) presentaron una alta capacidad autónoma tumorigénica y un incremento en propiedades de células *stem*. Estas células presentaron un amplio espectro de heterogeneidad en su estado de diferenciación, expresión génica, así como también en la forma en que ellas responden a estímulos del microambiente, incluyendo SASP (Castro-Vega LJ, 2015). De manera interesante, una de las líneas celulares explantadas (PC1-Expl-1) derivada de tumores PC1, presentó una expresión heterogénea en la expresión del marcador CD24, una proteína de superficie celular asociada a la progresión tumoral (Lee TK, 2011; Li C, 2007; Yeung TM, 2010) que regula diversos procesos como la proliferación, migración e invasión (Baumann P, 2005; Bretz N, 2012; Kwon MJ, 2015) así como también la EMT y características de células *stem* en muchos tipos de carcinomas (Lim J, 2014); Sin embargo, la relación entre la expresión de CD24 y la expresión de características de células *stem*, y su capacidad tumorigénica no es muy clara. Para entender esto, se seleccionaron por citometría de flujo dos poblaciones celulares de acuerdo con la expresión de CD24 (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>) (**Figura 47**) y se evaluaron sus propiedades fenotípicas, moleculares y funcionales relacionadas con las características de células *stem*. Estas subpoblaciones seleccionadas, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>, se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo por tres meses. El aumento en el nivel de expresión de CD24 obtenido por FACS

(Figura 46A) se corroboró por análisis de qRT-PCR (Figura 46B).

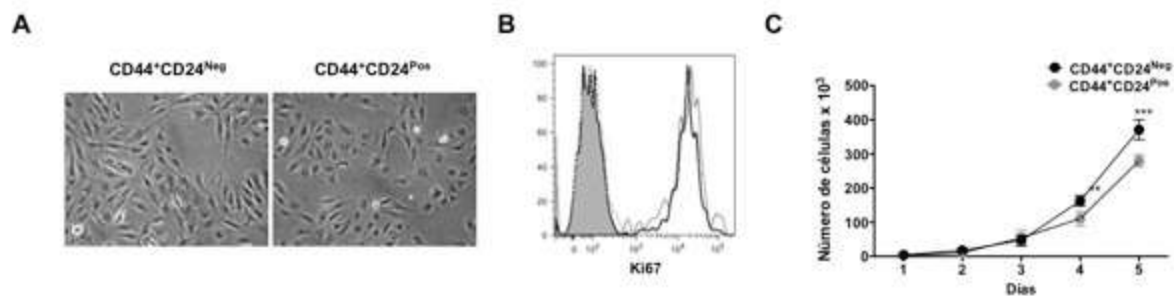


**Figura 45.** Células HEK explantadas, PC1-Expl-1, presentan una expresión heterogénea del marcador CD24. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD44 y CD24. Se realizó separación celular por citometría de flujo teniendo en cuenta el nivel de expresión de CD24. Se muestra la pureza de las poblaciones seleccionadas (recuadro rojo).



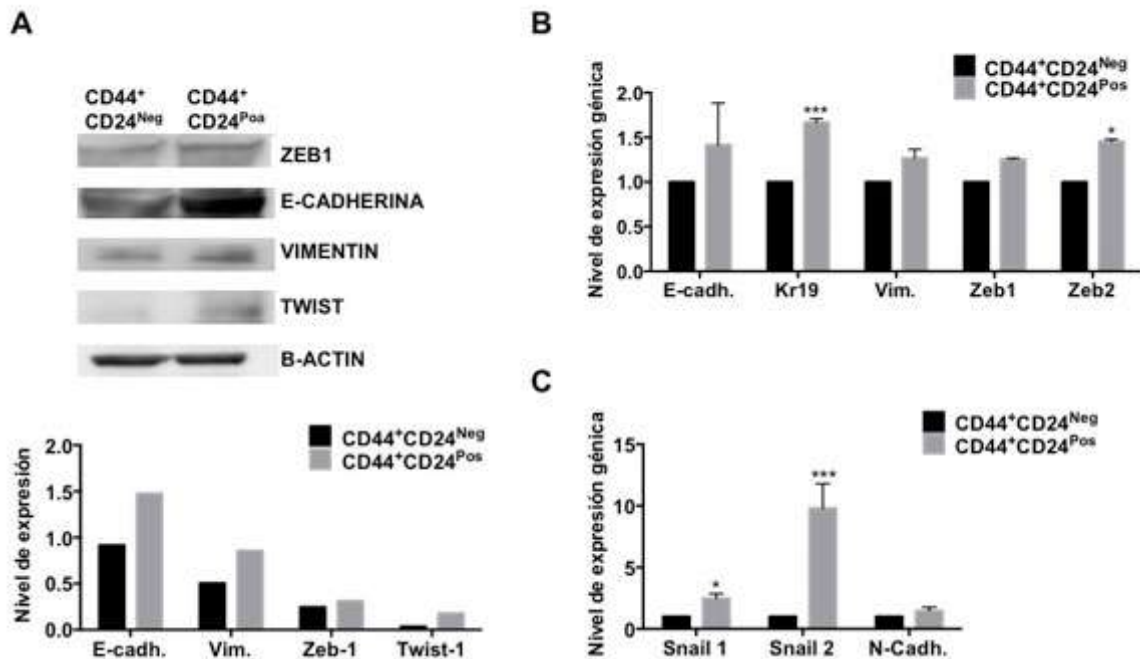
**Figura 46.** Evaluación de la expresión de CD24 Y CD44. Análisis de la expresión de CD44 y CD24 por citometría de flujo (A) y por qRT-PCR (B) en células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>. Barras de error indican SEM de tres reacciones independientes. (\*\*p<0.01; \*\*\* p<0.001).

Se observó que, aunque las dos subpoblaciones celulares seleccionadas fueron similares en morfología, con células alargadas que mantienen el contacto celular entre ellas (**Figura 47A**), ambas subpoblaciones expresaron el marcador de proliferación Ki-67 (**Figura 47B**), no obstante, presentaron algunas diferencias en su capacidad proliferativa y en la expresión de marcadores mesenquimales y epiteliales. Las curvas de crecimiento muestran que la tasa de proliferación fue muy similar en ambas subpoblaciones en los primeros tres días de cultivo (**Figura 47C**), sin embargo, después de 4-5 días las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  mostraron una mayor capacidad de proliferación que las positivas (**Figura 47C**). Lo cual fue consistente en los siguientes sub-cultivos celulares.



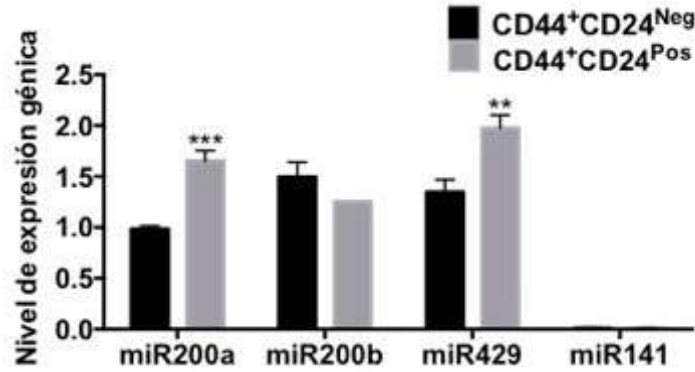
**Figura 47. Células  $CD44^+CD24^{Pos}$  y  $CD44^+CD24^{Neg}$  difieren en su capacidad de proliferación.** (A) Imágenes representativas (20X) de la morfología de estas células. (B) Histogramas representativos del nivel de expresión de Ki-67 determinado por FACS (C) Cinética de crecimiento. Se sembró la misma cantidad de células por triplicado. Las células se contaron en cada uno de los puntos de tiempo indicados. Las barras de error indican SEM. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 indica diferencias estadísticamente significativas entre las células  $CD24^{Pos}$  y  $CD24^{Neg}$  (n=3).

Teniendo en cuenta que estas células se originan a partir de células que han experimentado la EMT y la MET, se procedió a evaluar marcadores asociados a EMT, así como también la expresión de pequeños RNA (miRNA), específicamente de la familia miR-200. Los resultados obtenidos por WB (**Figura 48A**) y qRT-PCR (**Figura 48B y C**) indican que la expresión tanto de marcadores epiteliales (E-cadherina y Kr19) como mesenquimales (Vimentina, Zeb1, Zeb2, Twist, Snail1, Snail2 y E-Cadherina) fueron ligeramente altos en células  $CD44^+CD24^{Pos}$ .



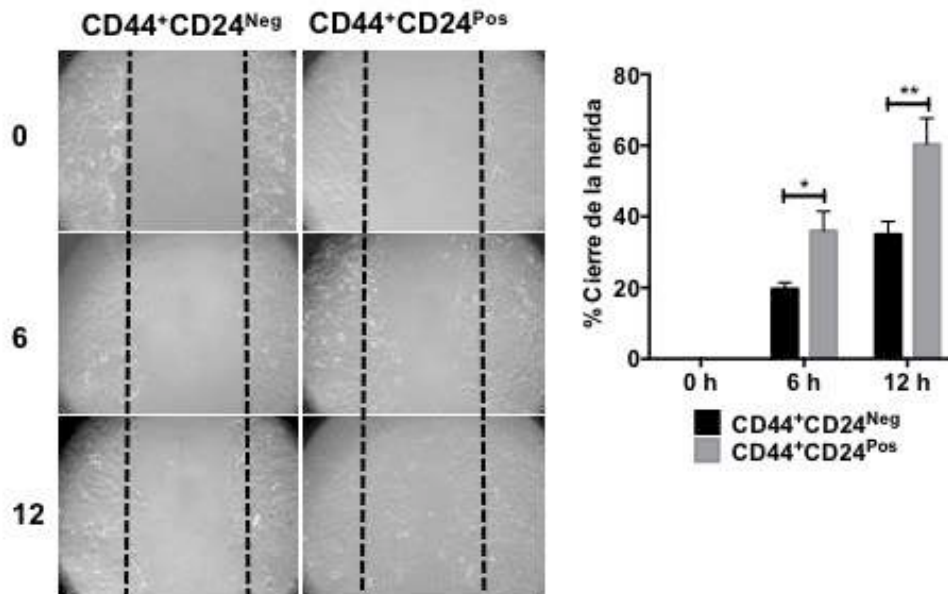
**Figura 48. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> expresan marcadores asociados a la EMT.** (A) Nivel de expresión génica de marcadores asociados a EMT evaluados por WB y qRT-PCR (B-C). Los valores se normalizaron a actina o GAPDH respectivamente. Las barras de error representan la SEM. (\*p<0.05; \*\*\*p<0.001) (n=2). E-cadh: E-cadherina; N-Cadh: N-cadherina.

De manera interesante, se observó que la expresión de miembros de la familia de miR200 (miR-200a, miR-429 y miR145) fue también alta en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> (**Figura 49**). Estos resultados sugieren que las células tienen características asociadas a un programa de EMT parcial, caracterizado por la co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales que da como resultado un fenotipo híbrido.



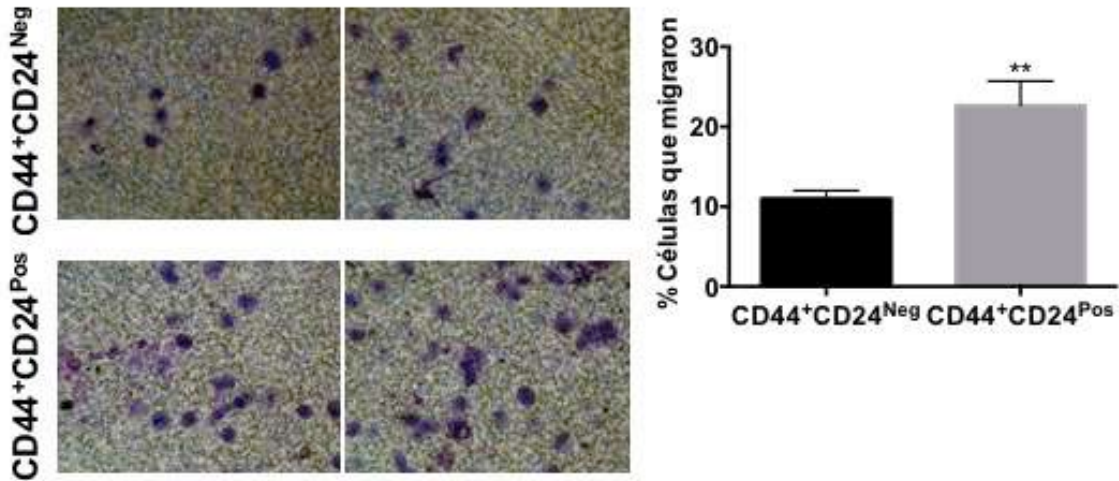
**Figura 49. Nivel de expresión génica de miembros de la familia miR200.** Nivel de expresión de miembros de la familia miR-200 relativo a la expresión de la familia de miR hsa-Let-7 determinados por qRT-PCR. Barras de error indican SEM. (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) ( $n=2$ ).

Se procedió a la evaluación de algunas de las propiedades funcionales asociadas a la EMT, como la capacidad de migración, invasión y de adhesión. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentaron una mayor capacidad de migración evaluada a través de dos sistemas: ensayo de curación de heridas (**Figura 50**) y ensayo de migración dirigida a SFB mediante un sistema *transwell* (**Figura 51**).



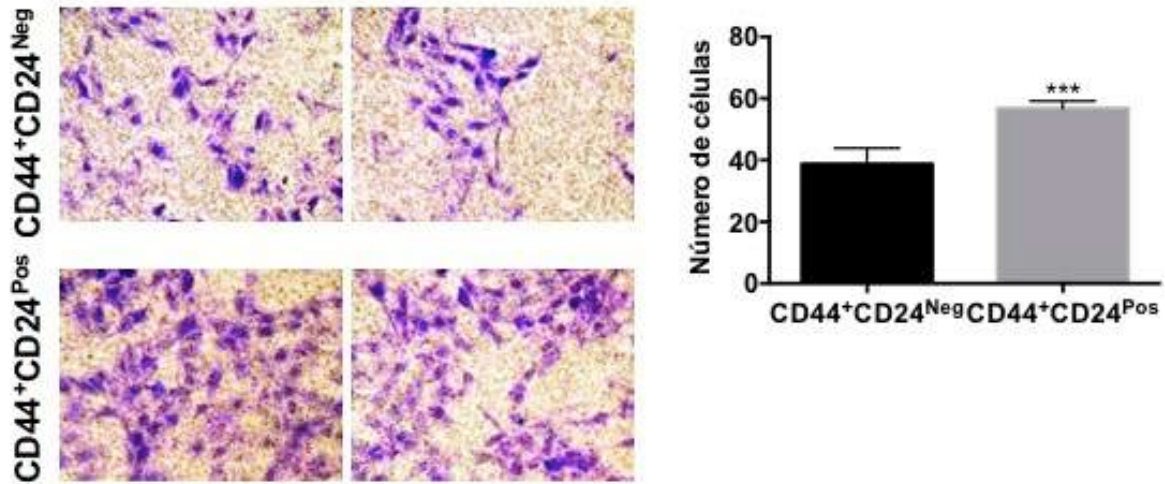
**Figura 50. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de migración espontánea.**(A). Ensayo de curación de heridas. Se realizó registro fotográfico a las 0, 6 y 12 h. Las imágenes representativas (10X), muestran un incremento en la capacidad de migración de células

CD24<sup>Pos</sup>. La línea negra punteada indica el área de la herida. La grafica de barras muestra la cuantificación del área del cierre de la herida de por lo menos 10 imágenes haciendo uso del programa Image J. Las barras de error indican SEM. (\*p<0.05; \*\*p<0.01).

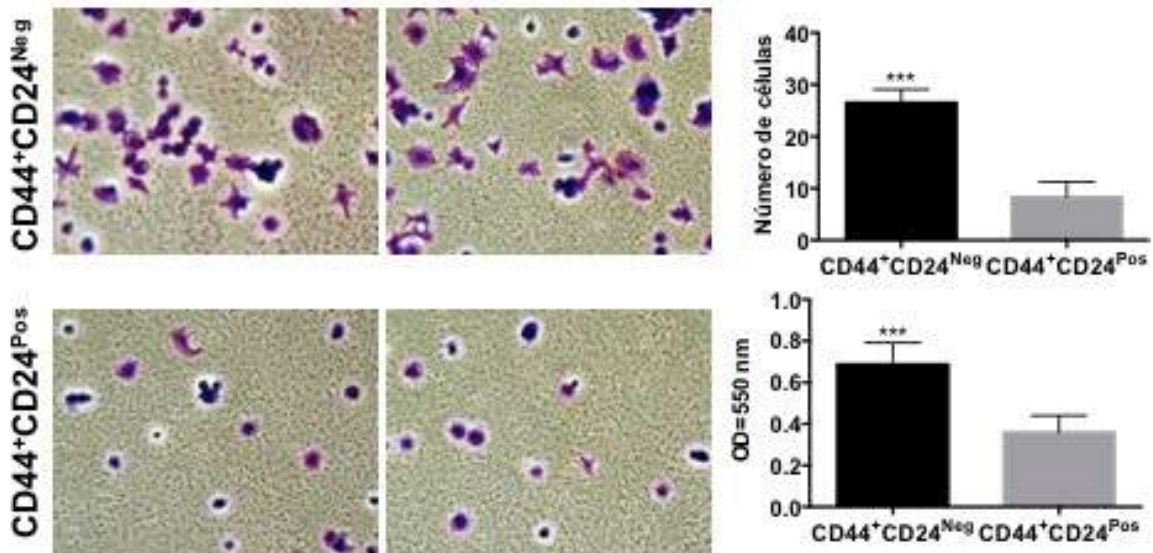


**Figura 51. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de migración dirigida.** Ensayo de migración en *transwell* utilizando como quimioatrayente 20% de SFB. Micrografías representativas (20X) tomadas del filtro de la membrana (superficie externa del filtro) coloreado con cristal violeta. (D) Cuantificación del ensayo de migración en *transwell*. Se contó el número de células presentes en el compartimento inferior. Barra de error indica SEM (\*\*p<0.01). También, se observó un aumento significativo en la capacidad de invasión a filtros cubiertos con matrigel (**Figura 52**); De manera interesante, las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> presentaron una mayor capacidad de adhesión a placas cubiertas con fibronectina (**Figura 53**). en conjunto, estos resultados sugieren que las células con una mayor expresión de CD24 presentan un fenotipo asociado a EMT parcial que les confiere ciertas características funcionales como una mayor capacidad de migración e invasión, sugiriendo un incremento en el potencial tumorigénico.





**Figura 52.** Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan una mayor capacidad de invasión. Ensayo de invasión en matrigel. Micrografías representativas (20X) tomadas del filtro de la membrana (superficie externa del filtro) coloreado con cristal violeta. El histograma muestra la cuantificación del número de células presentes en el compartimento superior del filtro (superficie externa del filtro) Barras de error indican SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$  (n=2).

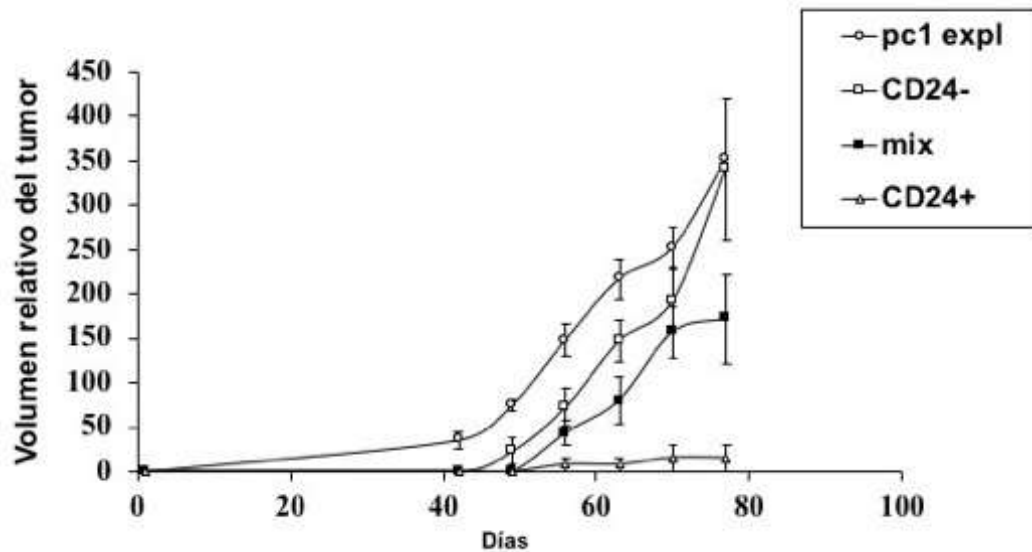


**Figura 53.** Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> presentan una mayor capacidad de adhesión. Ensayo de adhesión a placas cubiertas con fibronectina. Micrografías representativas (20X) tomadas de pozos coloreados con cristal violeta. Se cuantificó el número de células adheridas. Barra de error indica SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ . Se determinó la densidad óptica del cristal violeta incorporado por las células adheridas, la cual fue proporcional al número de células adheridas.



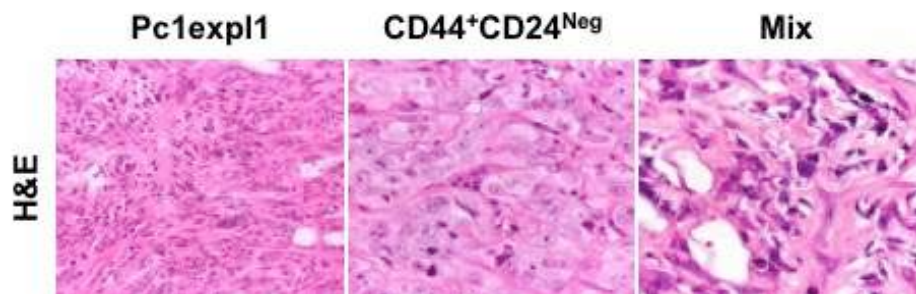
## Las subpoblaciones celulares CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> difieren dramáticamente en su potencial tumorigénico

Una de las principales distinciones de las células *stem* es su habilidad para formar tumores en ratones inmunosuprimidos. Previamente se mostró que células explantadas PC1-Expl-1 adquirirían una capacidad autónoma de formar tumores. Teniendo en cuenta la presencia de dos subpoblaciones distinguibles por la expresión del marcador CD24, el cual se ha asociado con progresión tumoral en muchos tipos de carcinoma (Lee TK, 2011; Yeung TM, 2010; Lim J, 2014), se determinó la capacidad tumorigénica de estas subpoblaciones separadas por citometría de flujo, a través de la inyección subcutánea de células ( $5 \times 10^3$  células) CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> o CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> de manera individual o simultánea (igual proporción) en ratones SCID para evaluar la existencia de algún tipo de cooperación celular durante el proceso tumorigénico. Como control positivo de la capacidad de formar tumores, se inyectaron células PC1-Expl-1 que habían presentado previamente esta capacidad (Castro-Vega LJ, 2015). Estos animales se monitorearon por tres meses. Después de 40-50 días, contrario a lo que esperábamos, se observó formación de tumores únicamente por las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> de una manera similar y eficiente a como lo hizo la línea celular parental PC1-Expl-1. En contraste, las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> las cuales muestran un fenotipo más mesenquimal y un incremento en las capacidades de migración e invasión no presentaron esta capacidad de formar tumores, aun después de un periodo de tiempo de más de tres meses (**Figura 54**). La mezcla de las subpoblaciones CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> requirió un poco de más tiempo para que el desarrollo del tumor fuera evidente. También, en este caso y después de dos meses y medio, los tumores fueron más pequeños (50%) que los obtenidos por la línea celular parental o por las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> (**Figura 54**).



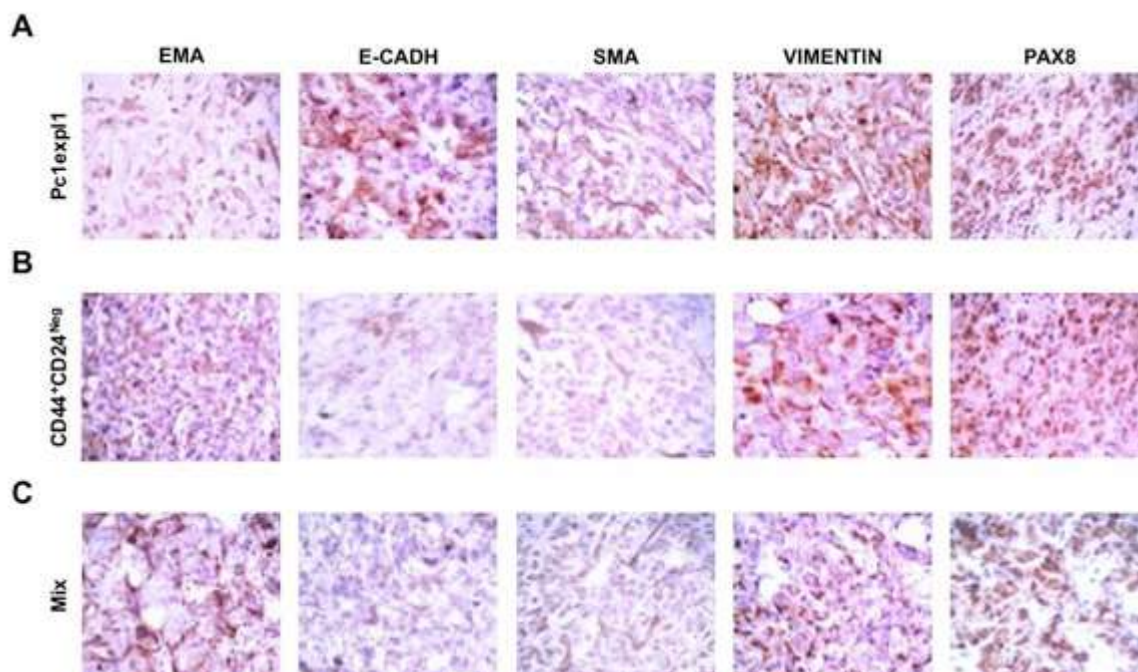
**Figura 54. Las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  muestran una mayor capacidad tumorigénica.** Las líneas celulares indicadas se inyectaron subcutáneamente ( $5 \times 10^3$  células por inyección) en ratones inmunosuprimidos SCID. Como control positivo de la formación de tumores se utilizó la línea celular PC1-Expl-1. Las células se inyectaron de manera individual o simultánea (Mix). No se observó formación de tumor en la línea  $CD44^+CD24^{Pos}$  en 100 días, mientras que las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  formaron tumores visibles a los 40 días. Barras de error indican SEM

La caracterización histológica de los tumores muestra claras diferencias entre ellos (**Figura 55**). Los tumores derivados de las células Pc1expl1 y de la mezcla de las dos subpoblaciones, presentan células con una morfología principalmente fusiforme y una menor proporción, células con una morfología epitelial y pequeños vasos sanguíneos dilatados. Las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  presentan una morfología principalmente epitelial y vasos sanguíneos con una mayor dilatación en algunas partes del tejido.



**Figura 55. Caracterización histológica de tumores derivados de células HEK.** Análisis histopatológico de los tumores formados por las células PC1-Expl-1, CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y Mix. La marcación con hematoxilina y eosina (H&E) muestra los aspectos morfológicos de estas células

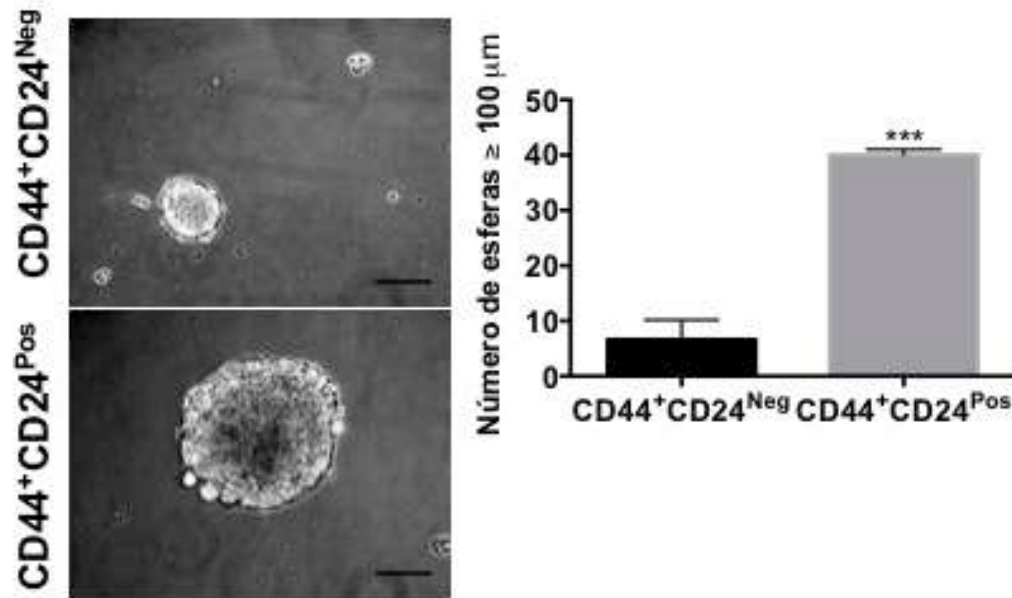
Basado en el análisis de marcadores asociados a la EMT, la reactividad de los tumores mixtos fue muy similar a la de los tumores obtenidos por las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>, esto es positivas para EMA y vimentina, y baja o ninguna expresión de E-cadherina y alfa-SMA (**Figura 56B y C**), lo cual fue muy diferente al patrón de expresión observado en los tumores obtenidos por la inyección de las células PC1-Expl-1 (**Figura 56A**). En relación con la tumorigenicidad, estos resultados indican que la mezcla de células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> no fue equivalente a la línea celular parental original de la cual ellas derivaron y que el crecimiento del tumor en las poblaciones de células mixtas debe ser el resultado de la capacidad de crecimiento de las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>. De manera interesante, todas las células fueron positivas para Pax8, un factor de transcripción asociado con tejidos renales neoplásicos (Ozcan A, 2012; Knoepp SM, 2012). Teniendo en cuenta, que una de las características distintivas de las CSC es su habilidad para formar tumores en ratones inmunosuprimidos (O'Brien CA, 2010), la subpoblación celular CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> además de presentar un perfil de EMT y capacidad de migración e invasión debe tener ciertas anomalías o particularidades en otras propiedades funcionales de las CSC.



**Figura 56. Caracterización inmunohistoquímica de marcadores asociados a EMT.** imágenes representativas de las tinciones realizadas para marcadores epiteliales (EMA y E-cadherina), mesenquimales ( $\alpha$ SMA y vimentina), así como también marcadores tumorales de células renales (PAX8). En todos los casos se observó un fenotipo heterogéneo con la co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales.

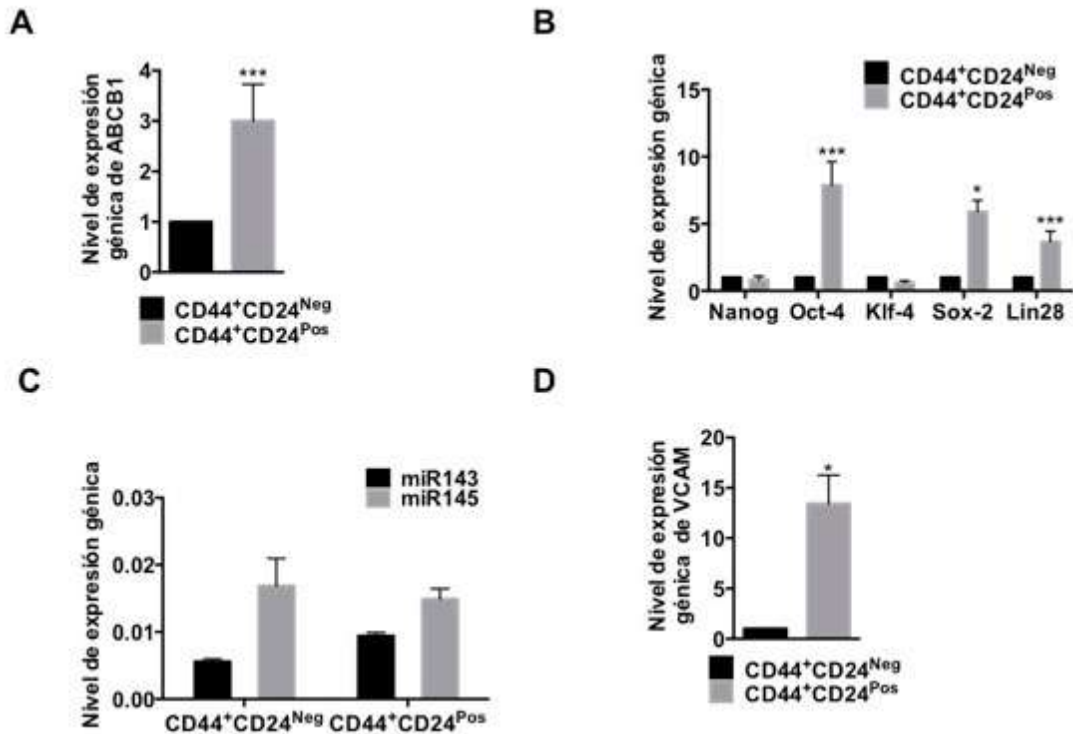
### **Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> muestran características de células *stem***

Para determinar si estas células que presentaban un fenotipo EMT presentaban propiedades de células *stem*, se realizó un ensayo de formación de mamoesferas y de diferenciación a linajes mesenquimales, como se describió previamente para las líneas celulares de cáncer de seno. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> se sembraron en placas de 6 pozos de baja adherencia (5,000 células/pozo) en presencia de medio definido por 8 días. Las dos subpoblaciones presentaron capacidad de formar esferas, sin embargo, se observaron algunas diferencias en términos del número y tamaño de las esferas formadas, el cual fue más grande (>100  $\mu$ m) en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> indicando que estas células son enriquecidas en propiedades de células *stem* (**Figura 57**).



**Figura 57. Células HEK explantadas CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan propiedades stem.** Ensayo de formación de esferas en presencia de medio definido (EGF+ FGF). Las micrografías representativas (10X) muestran la formación de esferas después de 8 días de inducción. Barra de escala, 100 μm. Se cuantificó el número de esferas totales mayores a 100 μm en el día 8. Barra de error indica SEM. (\*\*\*)p<0.001) (n = 2).

Para confirmar este fenotipo, se evaluó la expresión de genes relacionados con un fenotipo *stem* (ABCB1) y factores reprogramación (Nanog, Oct-4, Klf-4, Sox2, Lin28) así como también la expresión relativa de miRNAs (miR-143/145), los cuales tienen como blancos factores de reprogramación que controlan propiedades de células *stem* en algunos tipos de cáncer (Xu N, 2009; Huang S, 2012). Los análisis de qRT-PCR reafirman que las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> expresan altos niveles de uno de los miembros de la superfamilia de transportadores (ABC) o *cassette* de unión a ATP, el cual está asociado a la resistencia a multi-drogas (Dean M, 2005) (**Figura 58A**). Adicionalmente, se observó un aumento significativo en la expresión de factores de reprogramación Oct4, Sox2 y LIN28 (**Figura 58B**). En cuanto a la expresión de miR143 y miR145 esta fue similar en las dos subpoblaciones (**Figura 58C**). También se observó un incremento en la expresión génica de VCAM-1, una molécula de adhesión celular que puede ser activada por citoquinas pro-inflamatorias como la IL6 (Wang PC, 2014) en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> (**Figura 58D**).

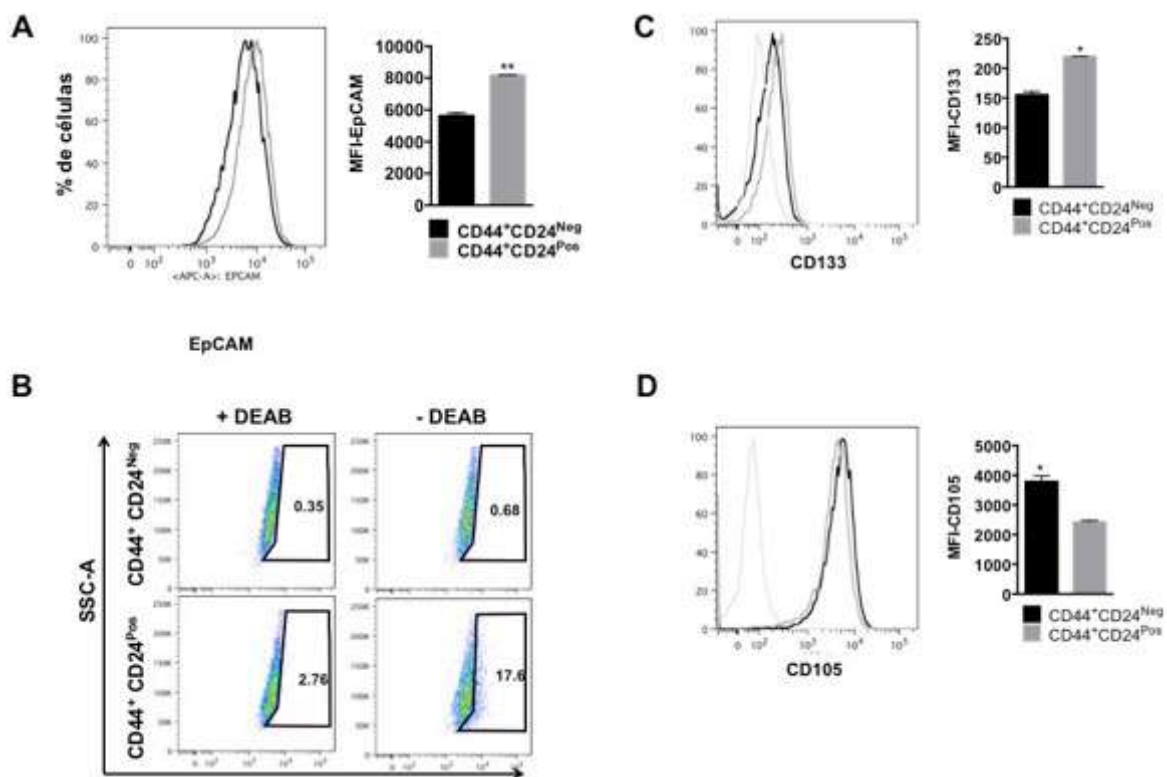


**Figura 58. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> expresan FTs asociados a características de células stem.** (A). Evaluación por qRT-PCR de marcadores asociados a quimioresistencia (ABCB1), (B) de FTs y (C) miRNA (miR143, miR145) asociados a reprogramación (D) y de moléculas de adhesión (VCAM). Barra de error indica SEM. (\*p<0.05; \*\*p<0.01\*\*\*p<0.001) (n = 2).

El nivel de expresión de ABCB1, así como también de la molécula de adhesión VCAM-1 se mantuvo alto en las mamoesferas derivadas de las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> (**Figura suplementaria 15A**) indicando por una parte, que este ensayo enriquece en células CSC que adquieren características asociadas a la quimioresistencia, y que la adhesión es importante para el mantenimiento de esferas de gran tamaño. Adicionalmente, para corroborar si las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentaban otras características relacionadas con el fenotipo *stem*, se midió la expresión por citometría de flujo de proteínas asociadas a vías de señalización importantes para su mantenimiento, así como la expresión de EpCAM, una proteína de membrana glicosilada expresada en diferentes tejidos epiteliales de humano, carcinomas y tanto en células *stem* como progenitoras (Imrich S, 2012; Munz M;2009); la expresión de la enzima aldehído deshidrogenasa de clase 1A1 (ALDH1), la cual se expresan en altos niveles en tejidos embrionarios así como también en células *stem* de adultos y cuya expresión, se determinó por citometría de flujo (Ginestier C, 2007; Xu X, 2015); el marcador CD133, el

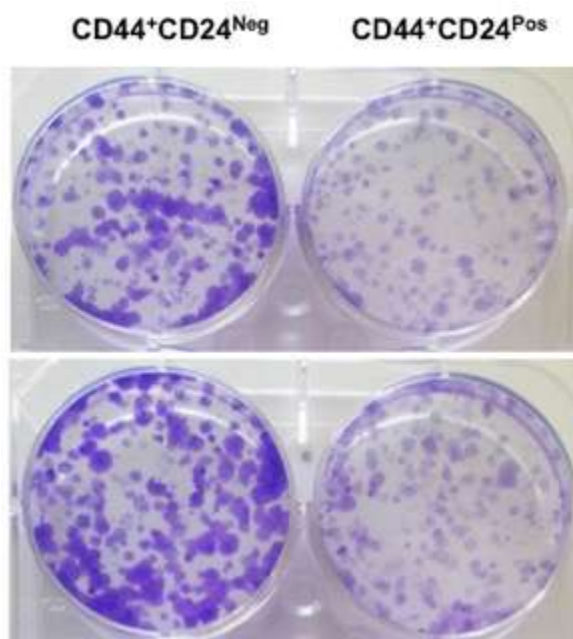


cual se usa para la identificación de células de cáncer de colon, próstata y sistema nervioso, y como un factor de mal pronóstico en pacientes con carcinoma de células renales (RCC: renal cell carcinoma) (Singh SK, 2004; Ricci-Vitiani L, 2007; Li C, 2007; Collins AT, 2005; Bruno S, 2006; Bussolati B, 2013) y la proteína CD105, definida como un marcador de RCC de células claras (ccRCC) (Bussolati B, 2008). La proporción de células EpCAM<sup>+</sup> y CD133<sup>+</sup> fue más alta en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> (Figura 59A y C), mientras que la de CD105<sup>+</sup> fue más alta en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> (Figura 59D). Por otra parte, la relación de células ALDH1 marcadas con BAAA fue de 17,6% y 0,68 % en CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> respectivamente, mientras que la relación de células marcadas con BAAA y DEAB (control negativo) fue de 2,76% y 0,35%, respectivamente. De esta manera, la verdadera relación de células ALDH<sup>+</sup> fue de 14,84% y 0,33% respectivamente (Figura 59B).



**Figura 59. Expresión de marcadores de células stem.** Los niveles de expresión de expresión de EpCAM (A), CD133 (B), CD105 (C) y de ALDH1 en presencia o no del inhibidor DEAB (D) se determinaron por análisis de citometría de flujo. Las graficas de barras muestra la cuantificación del índice de fluorescencia media para cada una de las proteínas evaluadas. La línea negra en el histograma denota las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> y la línea gris las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>. Barra de error indica SEM. (\*\*p<0.01).

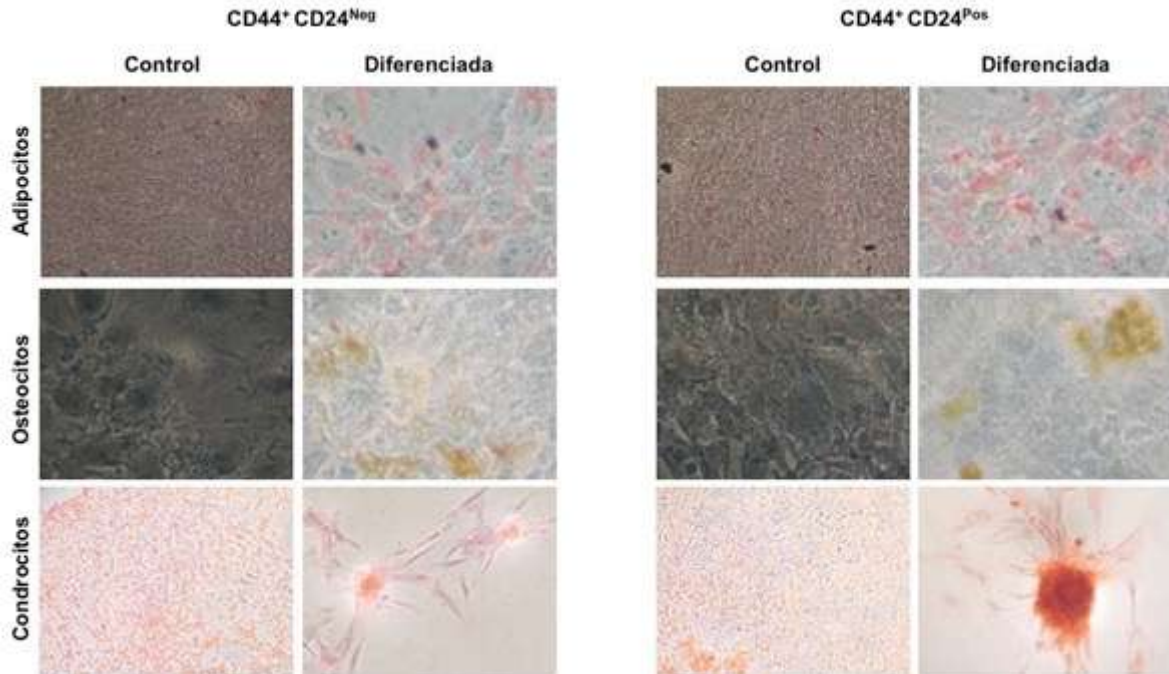
También se realizó un ensayo de formación de colonias, un ensayo de supervivencia basado en la habilidad que tiene una célula de crecer y de formar una colonia. Este ensayo determina esencialmente la capacidad que tiene cada célula dentro de una población de experimentar una división celular ilimitada (Franken NA, 2006). Al igual que los resultados obtenidos previamente en la capacidad de proliferación, las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  formaron un mayor número de colonias (**Figura 60**).



**Figura 60.** Las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  presentan una mayor capacidad clonogénica. Ensayo de formación de colonias. Se sembraron 500 células en placas de 6 pozos. Las colonias formadas después de 2 semanas de cultivo se visualizaron con cristal violeta.

Posteriormente, se evaluó el potencial de diferenciación de estas células. De manera notoria, ambas subpoblaciones se diferenciaron a los tres linajes mesenquimales descritos previamente, de manera rápida (9 días) y eficiente (**Figura 61**). Sin embargo, se observó un leve incremento en la capacidad de diferenciación de las células  $CD44^+CD24^{Pos}$  específicamente, hacia los linajes adipo- y condrogénico, lo que se evidenció por la intensidad de la marcación.

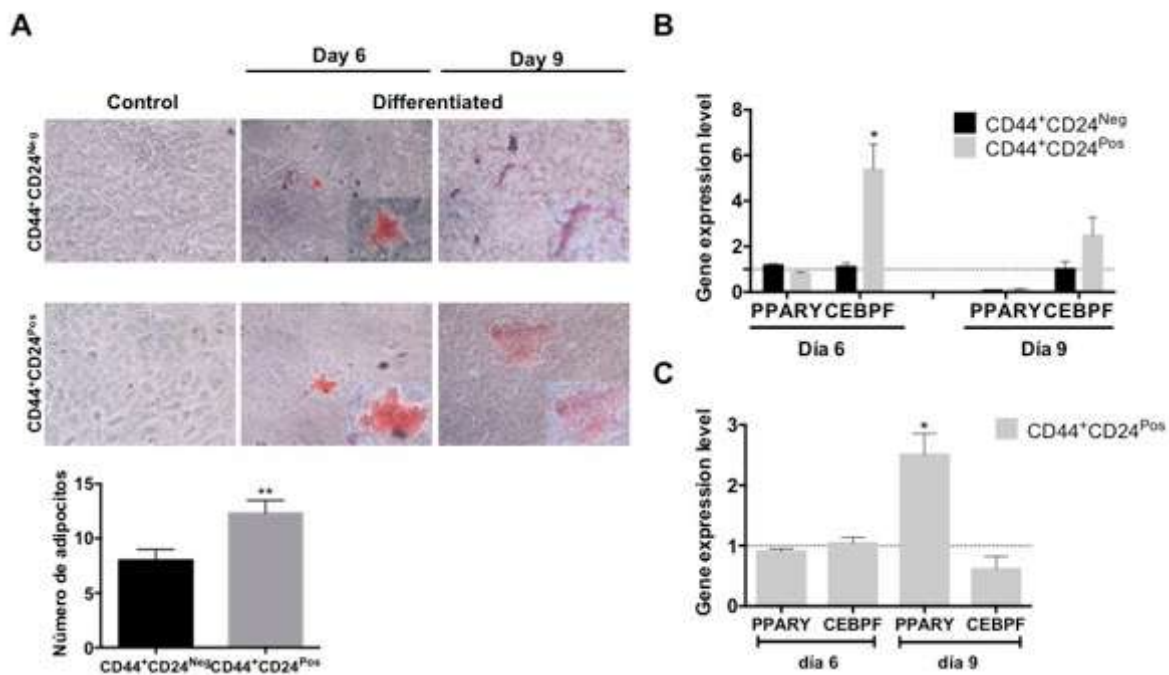




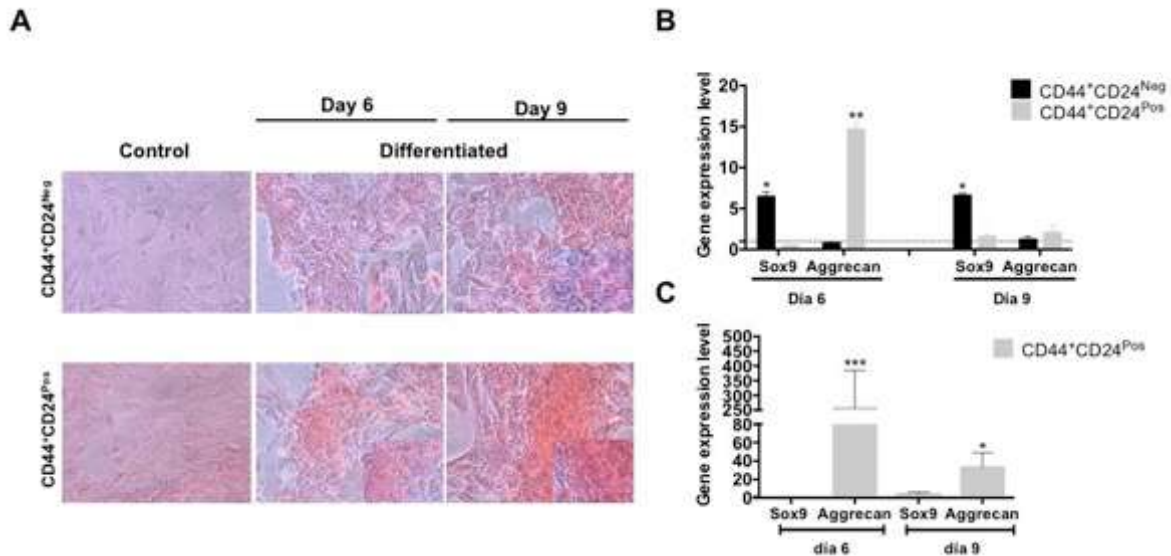
**Figura 61.** Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan un leve incremento en la capacidad de diferenciación. La capacidad de diferenciación se determinó después de 9 días de inducción y se evaluó como se indicó previamente. Se muestran imágenes representativas.

Para validar esta aparente diferencia, se evaluó la capacidad de diferenciación (tinciones específicas) y la expresión de genes asociados a diferenciación (qRT-PCR) en diferentes puntos de tiempo. Se realizó una cinética de diferenciación a los 3, 6 y 9 días. La evaluación temprana (día 3) no mostró, diferencias claras en la capacidad de diferenciación de las dos subpoblaciones (**Figura suplementaria 16**) aunque se observó, en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>, un ligero incremento en la capacidad de diferenciación adipo- y condrogénico visualizado por una marcación más intensa. Las evaluaciones realizadas al día 6 y 9 muestran que, aunque ambas subpoblaciones presentaron capacidad de diferenciación (**Figura 62A-64A**), como se determinó también por el incremento en factores de transcripción (PPAR $\gamma$ ; APL; Aggrecan; Sox9) en células diferenciadas con respecto al control (células sin diferenciar) (**Figura 62B-64B**), las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> se diferenciaron de manera más eficiente hacia adipocitos (**Figura 62**) y condrocitos (**Figura 63**) que las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> como se confirmó por el análisis de expresión génica de factores de transcripción comúnmente usados para determinar la capacidad de diferenciación de células mesenquimales hacia adipocitos (PPAR $\gamma$ ; C/EBP-alpha) y condrocitos (Aggrecan;

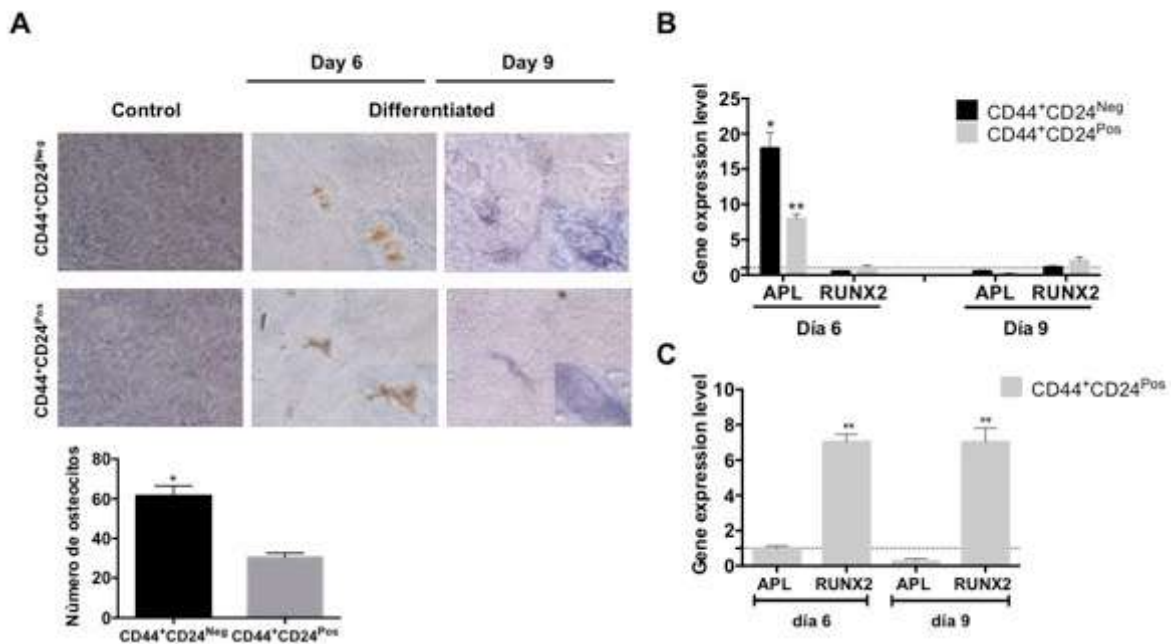
Sox9) (**Figura 62C**; **Figura 63C**). De manera sorprendente, las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  presentaron mayor capacidad de diferenciación hacia osteocitos (**Figura 64**), lo cual se confirmó por un incremento en la expresión de APL. En las células  $CD44^+CD24^{Pos}$  se observó un aumento en la expresión de RUNX2, el cual como se indicó previamente inhibe el proceso de osteogenesis, lo que en nuestro modelo explicaría la menor capacidad de diferenciación. En conjunto, estos resultados sugieren que las células  $CD44^+CD24^{Pos}$  presentan células con propiedades *stem*.



**Figura 62.** Las células  $CD44^+CD24^{Pos}$  presentan una mayor capacidad de diferenciación adipogénica. La capacidad de diferenciación a adipocitos se determinó después de 6 y 9 días de inducción y se evaluó por la coloración con aceite rojo O. Se muestran imágenes representativas. La grafica de barras corresponde al número de adipocitos presentes en el pozo. El nivel de expresión de PPAR $\gamma$  y CEBPF se determinó por qRT-PCR al día 6 y 9 de diferenciación, se normalizó a GAPDH y es relativo a células control (sin diferenciar) (B) o relativo a las células  $CD44^+CD24^{Neg}$ . Barra de error indica SEM. (\* $p < 0.05$ ) (n=2).



**Figura 63. Las células  $CD44^+CD24^{Pos}$  presentan una mayor capacidad de diferenciación condrogénica.** La capacidad de diferenciación a condrocitos se determinó después de 6 y 9 días de inducción y se evaluó por la coloración con safranina O. Se muestran imágenes representativas. El nivel de expresión de Sox9 y aggrecan se determinó por qRT-PCR al día 6 y 9 de diferenciación se normalizó a GAPDH y es relativo a células control (sin diferenciar) (B) o relativo a las células  $CD44^+CD24^{Neg}$ . Barra de error indica SEM. (\* $p < 0.05$ ; (\*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ ) (n=2).

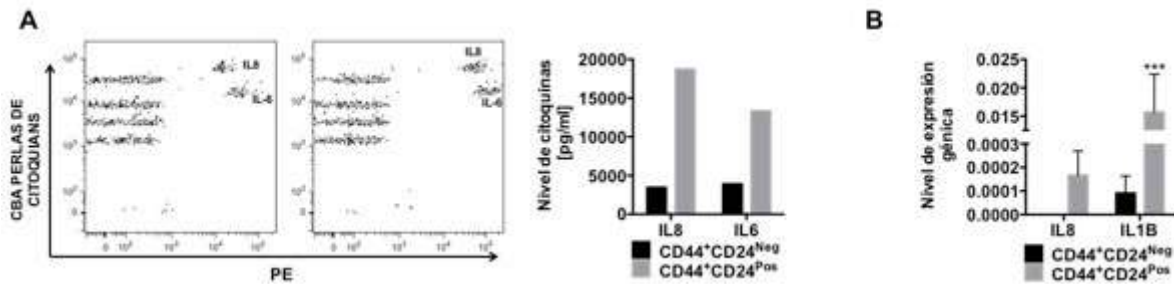


**Figura 64. Las células  $CD44^+CD24^{Neg}$  presentan una mayor capacidad de diferenciación osteogénica.** La capacidad de diferenciación a osteocitos se determinó después de 6 y 9 días de inducción y se evaluó por la coloración con el kit de fosfatasa alcalina. Se muestran imágenes representativas. La grafica de barras muestra el número de osteocitos presente en el pozo. El nivel de expresión de APL y RUNX2 se determinó por qRT-PCR al día 6 y 9 de diferenciación, se normalizó

a GAPDH y es relativo a células control (sin diferenciar) (B) o relativo a las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>. Barra de error indica SEM. (\*p<0.05; \*\*p<0.01) (n=2).

### Células HEK CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan un perfil de expresión génica asociado a inflamación

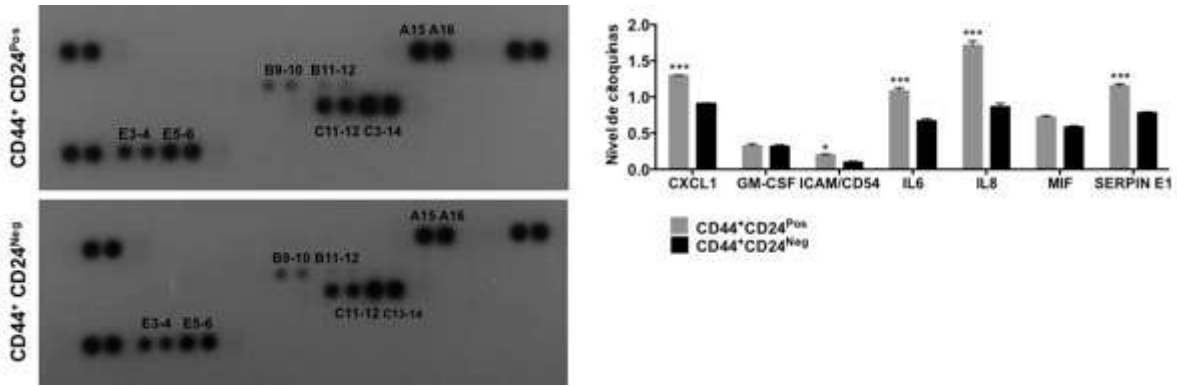
Previamente se mostró, mediante el ensayo tumorigénico, que la co-inoculación de la mezcla de ambas subpoblaciones celulares no era equivalente a la inoculación de la línea celular parental PC1-Exp1-1 de la cual ellas derivaron. Esto podría sugerir, que las condiciones de cultivo *in vitro*, podría modificar alguna de las dos subpoblaciones, bien sea por el sistema de cultivo *per se* o por la pérdida de la influencia recíproca que ambas subpoblaciones ejercen una sobre la otra. Se investigó si factores solubles podrían ser responsables de estos efectos. Se encontró que las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> secretaron altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias IL6 e IL8 (**Figura 65A**). Además, los niveles de expresión génica de IL8 e IL1 $\beta$  fueron significativamente más altos en estas células (**Figura 65B**).



**Figura 65. Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias.** (A) Los niveles de IL6 e IL8 se evaluaron por citometría de flujo mediante un arreglo de citoquinas (CBA, Becton Dickinson), utilizando medios condicionados libres de SFB. La gráfica de barras muestra la cantidad de citoquina en pg/ml antes y después del tratamiento. (B) Análisis por qRT-PCR de IL8 e IL1- $\beta$ . Los valores se normalizaron a GAPDH. Barra de error indica SEM. (\*\*\*)p<0.001)

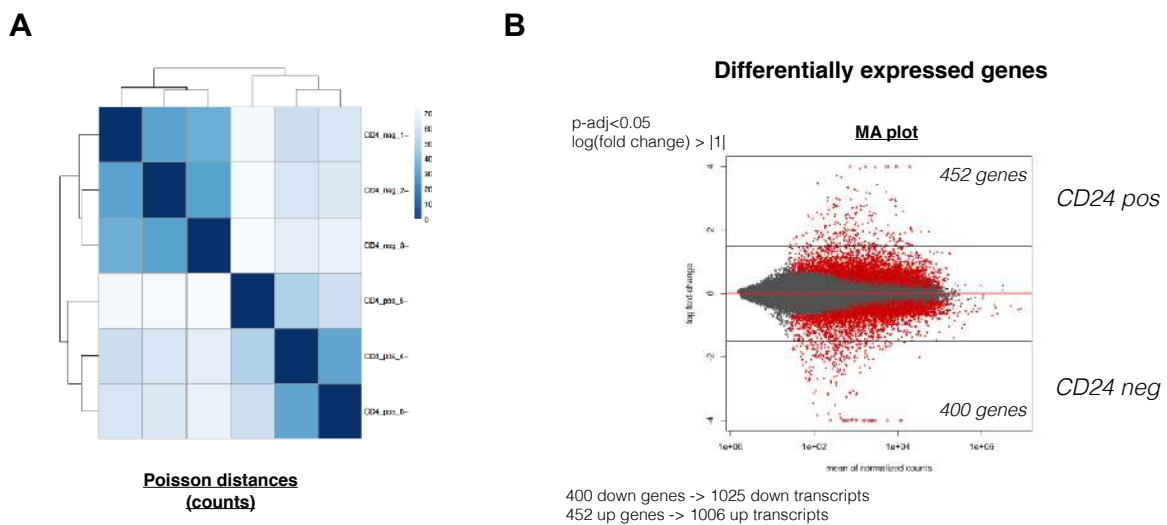
Para corroborar si estas células presentaban un perfil pro-inflamatorio, se usó un arreglo de anticuerpos para la detección simultánea de 36 citoquinas de humano (ARY005B). Nuevamente se encontró un incremento en la expresión de IL6 e IL8, así como también en otras proteínas como CXCL-1, ICAMs y SERPININ E1 en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> (**Figura 66**), sugiriendo que estos factores solubles podrían ser responsables de conferir

propiedades especiales al microambiente en donde las células crecen o a las células vecinas, incluyendo las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>.



**Figura 66. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> secretan citoquinas asociadas a la inflamación.** Evaluación de la expresión de citoquinas inflamatorias de humano mediante el uso de un arreglo de citoquinas (ARY005B). Se siguieron las indicaciones del kit.

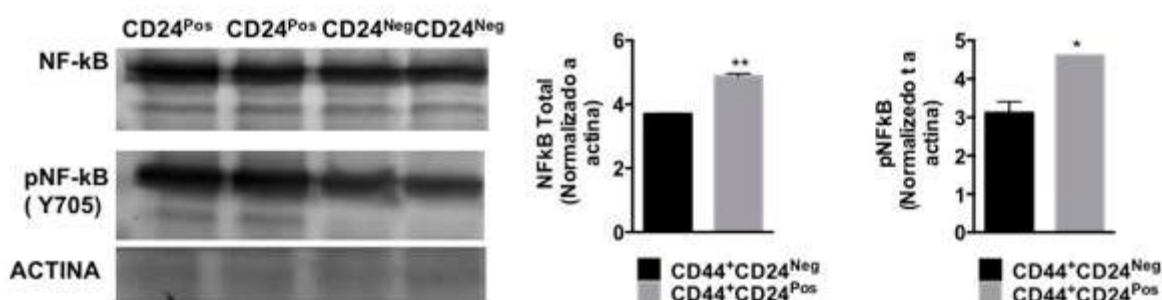
Adicionalmente, los análisis de secuenciación de RNA total de muestras por triplicado, confirman que estas células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> representan dos poblaciones diferentes que difieren en sus perfiles de expresión (**Figura 67**), 452 genes presentaron una expresión significativamente elevada en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> mientras que 400 genes se regularon a la baja en células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>.



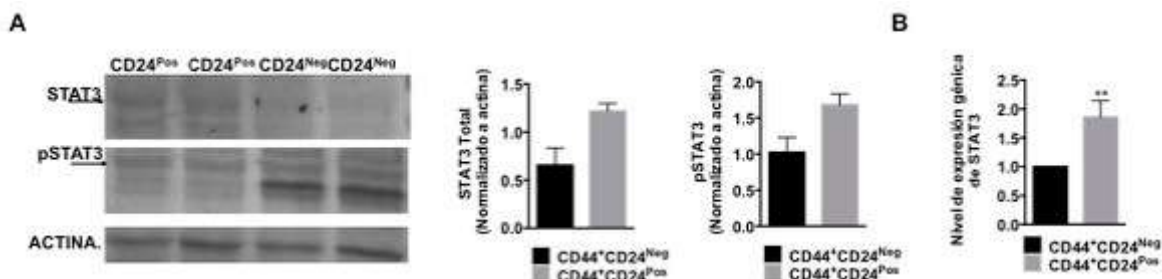


**Figura 67.** Las células representan dos subpoblaciones que difieren en sus perfiles de expresión génica. a distribución de Poisson muestra que CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> y CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> corresponden a dos subpoblaciones diferentes. (B) Gráfico de dos dimensiones MA. El eje Y muestra las diferencias entre las dos subpoblaciones y el eje X las veces de cambio entre los diferentes genes evaluados.

El análisis de enriquecimiento génico (GO) mostró que los genes que se regularon a la alta están asociados con funciones relacionadas con la interacción receptor-citoquina, la adhesión, la EMT, KRAS, respuesta inflamatoria, TNF- y NF-κB, y los genes regulados a la baja están asociados principalmente con funciones relacionadas con la adhesión. Como se indicó, algunas de estas rutas de señalización (IL6, IL8, etc.) están relacionadas con la activación de NF-κB. Notablemente, las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> mostraron un aumento en el nivel de expresión de NF-κB total y fosforilado (**Figura 68**), mientras que pSTAT3 no se modificó (**Figura 69**).

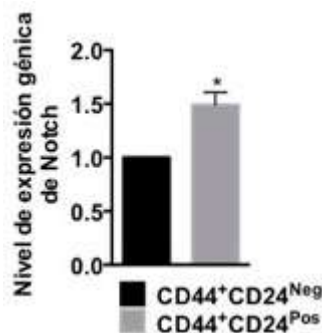


**Figura 68.** Las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan altos niveles de NF-κB. El nivel de expresión de NF-κB total y fosforilado se determinó por WB. 50 μg de proteína se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas para la detección de las proteínas. Los niveles de expresión se normalizaron a β-actina (control de carga). Las barras de error indican SEM. (\*p<0.05; \*\* p<0.01).



**Figura 69.** Evaluación del nivel de expresión de STAT3. Los niveles de expresión de STAT3 total y fosforilado (residuo Y705) se determinaron por WB como se indicó previamente (A) y por qRT-PCR (B) Los valores de Ct se normalizaron a GAPDH. Barra de error indica SEM. (\*\*p<0,01).

De manera interesante, se observó un aumento en el nivel de expresión de Notch en células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> (**Figura 70**), una vía de señalización implicada en angiogénesis, el programa EMT, *stemness* y en la interacción entre células estromales, tumorales y el microambiente tanto en tumores primarios como en sitios metastásicos (Espinoza I, 2013).



**Figura 70. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentan niveles altos de Notch.** Evaluación por qRT-PCR de la expresión génica de Notch. Los valores de Ct se normalizaron a GAPDH. Barra de error indica SEM. (\*p<0,05).

En conjunto estos resultados indican que diferentes poblaciones con propiedades *stem* específicas y atributos relacionados con la EMT, coexisten dentro del mismo tumor, con células que presentan una mayor ventaja proliferativa, o alternativamente un potencial metastásico mayor. Además, la adquisición de otros atributos adicionales a un estado completo de *stemness* en ciertas subpoblaciones celulares (adhesión, proliferación y clonogenicidad) y la comunicación entre ellas o con el microambiente tumoral podría influenciarlas de tal manera que puedan llegar a ser más o menos susceptibles a la formación de tumores.

## DISCUSIÓN

## **Un microambiente senescente/pro-inflamatorio induce un fenotipo híbrido en las células MCF-7 asociado a la adquisición de una EMT parcial**

Existe suficiente evidencia que muestra que la senescencia celular es un mecanismo potente de supresión tumoral, ya que puede ser inducida por diferentes estímulos oncogénicos (Telómeros disfuncionales, daño en el DNA, expresión de ciertos oncogenes, entre otros) (Campisi J, 2000; Campisi J, 2003; Campisi J, 2007; Braig M, 2006). Por otra parte, mutaciones en genes supresores tumorales que regulan la senescencia celular (p53 y p16INK4a/pRB) pueden eventualmente conferir resistencia a la senescencia e incrementar el riesgo de desarrollar cáncer (Collins CJ, 2003). Previamente se había demostrado que factores derivados de fibroblastos senescentes, por secreción de IL6 e IL8, inducían una EMT clásica en dos líneas de cáncer de seno no agresivas (T47D y ZR75.1) (Coopé, JP 2008). Estas dos citoquinas están presentes de manera constitutiva en SASP (Coppe JP 2010; Coppe JP 2008) sugiriendo la existencia de un efecto inflamatorio común asociado a senescencia en células pre-malignas y malignas. Aquí mostramos que el MeCoSe obtenido a partir de fibroblastos senescentes era el responsable de revelar, al menos parcialmente, la plasticidad de las células epiteliales y sus propiedades *stem* en células HEK pre-malignas, además de conferirles un aumento en la capacidad tumorigénica a células que por sí solas son incapaces de inducir tumores (Castro-Vega LJ, 2015). El análisis de las células explantadas de los tumores mostró la adquisición de un fenotipo híbrido y heterogéneo, y en comparación con las células pre-malignas, mostró funciones *stem* aumentadas y de manera muy interesante, un aumento en la capacidad autónoma de formar tumores. Se mostró igualmente que el MeCoSe estaba enriquecido principalmente en IL6 e IL8 y que el tratamiento con el MeCoSe y con las citoquinas de manera individual o simultánea inducía un programa de EMT en células MCF-7. Este programa se adquirió de manera parcial ya que la expresión de los marcadores asociados a la EMT mostró una respuesta variable (aumento en la expresión de los marcadores mesenquimales Zeb y Snail sin pérdida total de marcadores epiteliales como E-cadherina).

Estos resultados soportan la idea de que la EMT no es un cambio binario entre dos estados definidos, sino una transición de células desde un estado totalmente epitelial a un estado que



es parcialmente mesenquimal con retención de ciertos marcadores epiteliales (Ye X, 2015). Durante esta transición, las células pueden adoptar un fenotipo híbrido epitelial/mesenquimal, lo que se ha denominado una EMT parcial. De esta manera, las células presentan una mezcla entre características epiteliales (ej. adhesión célula-célula) y mesenquimales (ej. migración) que además de brindarles cierto grado de plasticidad celular, les facilita un movimiento colectivo durante procesos como la curación de heridas (Jolly MK, 2016). Células en este estado transitorio, pueden entrar y salir de manera más eficiente del sistema sanguíneo, son resistentes a la *anoikis* y a la apoptosis, presentan mayor capacidad de formar tumores y son 50 veces más metastásicas que las células que han experimentado un programa completo de EMT y que se mueven de manera individual (Aceto N, 2015; Joosse SA, 2015). Adicionalmente, la expresión conjunta de estos marcadores se ha asociado con un mayor grado de agresividad en cáncer de seno del subtipo claudina bajo y en melanoma (Jolly MK, 2015). En nuestro modelo de células HEK, la adquisición de un fenotipo híbrido y heterogéneo se asoció también con un aumento en la capacidad autónoma de formar tumores. Por otra parte, las células MCF-7 claramente adoptaron una morfología de células de tipo mesenquimal, asociada a una mayor capacidad de migración dirigida y de invasión, una mayor expresión de los FTs asociados a la EMT (Vimentina, Zeb1, Snail 1 y Snail2 y Twist 1 y 2) y un incremento en la capacidad de adhesión a fibronectina. En los dos tratamientos, se observó un aumento en los niveles de Zeb1 y Snail, dos FTs que son considerados como reguladores maestros de la EMT y cuyos niveles de expresión determinan la existencia de una EMT completa o parcial (Jolly MK, 2015). Niveles bajos de Zeb y Snail se asocian con un fenotipo epitelial (E), mientras que su alta expresión con un fenotipo mesenquimal (M), y un estado intermedio (E/M) corresponderá a bajos niveles de Zeb y altos niveles de Snail (Tian X-J, 2013). Esto se debe a que Snail puede iniciar la represión de E-cadherina pero su completa inhibición se logra únicamente por la expresión de Zeb (García de Herreros A, 2012). Nuestros hallazgos son compatibles con la adquisición de un fenotipo híbrido en las células MCF-7.

Las células MCF-7 tratadas con la IL6, IL8 o IL6+IL8, mostraron un incremento en su capacidad de proliferación y un aumento en el nivel de expresión de Ki67, una proteína nuclear asociada a proliferación celular (Urruticoechea A, 2005), considerada recientemente como un marcador importante para el mantenimiento de las propiedades de células *stem*

(Cidado J, 2016) y utilizada como un marcador pronóstico de cáncer de seno (Inwald EC, 2013). Este resultado es consecuente con el efecto de estas citoquinas en la promoción de la proliferación (Jiang XP, 2011; Schneider MR, 2000; Dethlefsen C, 2013; Esquivel-Velázquez M, 2015; Ning Y, 2011; Freund A, 2003).

Nuestros resultados muestran en ambos modelos (células HEK y MCF-7) la adquisición de un fenotipo híbrido o EMT parcial por un microambiente senescente. Las células tratadas con MeCoSe adoptaron un estado metastable, un estado intermedio entre el epitelial y el mesenquimal, que permite adquirir algunas competencias particulares en estas células. En efecto, el programa de EMT es relevante en la adquisición y mantenimiento de células con características de células *stem*. Además, las células *stem* a menudo exhiben características asociadas a la EMT, lo que sugiere una relación recíproca entre estos dos programas que pueden, eventualmente, tener implicaciones en la progresión tumoral (Mani SA, 2008; Morel AP, 2008; Shibue T, 2017; Liu X, 2015).

### **Un microambiente senescente/pro-inflamatorio se asocia con la generación de células con propiedades de células *stem***

Se observó que el tratamiento con IL6 e IL8 indujo características típicas de células *stem* en las células MCF-7, es decir un aumento en la capacidad de autorrenovación y diferenciación multipotente, dos características asociadas con malignidad que no están presentes en células de cáncer de seno poco agresivas. La importancia de esta observación se refuerza por resultados recientes que muestran que la capacidad tumoral se origina y mantiene por subpoblaciones tumorales particulares que muestran propiedades de células *stem* (Li F, 2007; Luo F, 2016; Zhi XS, 2016). De manera notoria, a pesar de su bajo potencial tumorigénico, las células MCF-7 sin estimulación mostraron propiedades *stem* basales (baja capacidad basal de formar esferas y cierto grado de diferenciación), que se reforzaron de manera sustancial por la presencia de un microambiente senescente/inflamatorio. Lo que indica que en un tumor pueden existir células con mayor o menor capacidad de célula *stem*, y que dependiendo del contexto celular o de las interacciones con el microambiente tumoral, algunas de estas propiedades se podrían potenciar. En efecto, el análisis de expresión génica

a nivel de una célula combinado con un ensayo de formación de mamoesferas para el enriquecimiento de CSC reveló la presencia de distintos grupos de células *stem* en tumores positivos para el receptor de estrógeno y en la línea celular MCF-7 (Polyak K, 2011). Estas distintas subpoblaciones celulares presentaban diferentes fenotipos de CSC, una organización jerárquica y experimentaban transiciones graduales entre diferentes estados de diferenciación, mostrando en cierta medida la heterogeneidad intra-tumoral. En línea con esto, las propiedades de células *stem* no constituyen características inherentes de unas pocas células privilegiadas, en lugar de esto, las células *stem* y las no-*stem* se inter-convierten (Gupta PB, 2011; Yang G, 2012).

A pesar de que se ha sugerido una fuerte asociación entre células que experimentan una EMT completa (pérdida total de marcadores epiteliales y ganancia de marcadores y atributos de células mesenquimales) y la ganancia de atributos *stem* en varios tipos de carcinoma, pancreático, hepatocelular y colorectal (Scheel C, 2012), estudios recientes sugieren que estados asociados a la adquisición de una EMT parcial adquieren con más probabilidad atributos de células *stem*. Por ejemplo, la co-expresión de genes epiteliales y mesenquimales en la misma célula promueve la formación de mamoesferas y un fenotipo *stem* de manera independiente del subtipo de cáncer de seno (Grosse-Wilde A, 2015); también contribuye al potencial iniciador de tumores en un modelo murino de cáncer de próstata (Ruscetti M, 2015) y a su capacidad multipotente (Strauss R, 2011). La asociación entre un estado híbrido con un fenotipo *stem* no solo se restringe a la progresión tumoral, sino que también ha sido reportado en condiciones fisiológicas. Células adultas progenitoras renales se encuentran en un estado metastable durante el daño tisular y de esta manera son capaces de mediar la reparación y la regeneración de los tejidos de una manera más efectiva (Swetha G, 2011). Por lo tanto, células estimuladas con las citoquinas o con el MeCoSe, además de presentar un fenotipo híbrido, adquieren propiedades de células *stem*, que podrían eventualmente facilitar la progresión tumoral.

### **Las citoquinas IL6 e IL8, la activación de vías de señalización, y la expresión de CD44 participan en la inducción de la EMT y el mantenimiento de células *stem***

El papel de las citoquinas IL6 e IL8 se ha estudiado en general de manera independiente en diferentes líneas de cáncer de seno, debido al papel que puede tener cada una en la biología

del tumor, a las diferencias del origen celular y al papel de la inflamación en el desarrollo de cáncer (Guo Y, 2012; Sanguinetti A, 2015; Xie K, 2001; Yuan A, 2005). Por ejemplo, el efecto de la IL6 se ha estudiado en la dinámica de la conversión celular entre las poblaciones *stem* y *no-stem* (Iliopoulos D, 2011; Kim SY, 2013) o en el mantenimiento y enriquecimiento de las poblaciones *stem* mediante un ensayo de formación *in vitro* de mamoesferas (Sansone, 2007). Por otra parte, y debido a su función como quimioquina, la IL8 se ha estudiado en el contexto de la migración y la invasión de células en cáncer de mama (Freund A, 2003) y más recientemente, también se ha asociado con la presencia de CSC y con el proceso de la metástasis (Charafe-Jauffret E, 2009).

En este trabajo se estudió el efecto de estas citoquinas de manera individual y simultánea. Aunque se observaron algunas diferencias entre los tratamientos con IL6 e IL8, se ve que en general el efecto es muy parecido, tal vez con un mayor efecto de la IL8 en la simulación del efecto del MeCoSe y en la capacidad de inducción de propiedades *stem*. De manera interesante, la IL8 imitó muy bien los efectos observados con el MeCoSe e indujo de manera consistente características asociadas a un fenotipo *stem*. Se observó que la estimulación con IL8 además de inducir un mayor número y tamaño de mamoesferas, indujo el enriquecimiento de una pequeña población de células que expresa el marcador CD44. Este resultado es interesante, teniendo en cuenta que las células tumorales que secretan IL8 tienen un potencial metastásico mayor (De Larco JE, 2001), y que la activación del eje IL8/IL8R, en un modelo de cáncer de seno, es esencial para la adquisición de un fenotipo invasivo (Fernando RI, 2011). Además, la adición de IL8 humana recombinante y su interacción con el receptor CXCR1 en líneas de cáncer de seno ALDEFLUOR positivas incrementó la formación de mamoesferas (Charafe-Jauffret E, 2009; Ginestier C, 2010). Por lo tanto, en células que secretan poca IL8, como es el caso de la línea MCF-7, la secreción por células estromales o la existencia de un microambiente senescente, como proponemos aquí podría suplir esta deficiencia, induciendo un fenotipo más agresivo por acción paracrina de esta citoquina. Por otra parte, aunque los resultados aquí descritos muestran un papel menos relevante para IL6, se ha descrito el efecto de esta citoquina en la inducción de la EMT en cáncer de ovario (Colomiere M, 2009) y de seno (Sullivan NJ, 2009) a través de la activación de la vía de señalización Jak2/STAT3. Importante, no se ve un efecto aditivo o sinérgico entre las dos citoquinas; por el contrario, parece que la IL6 puede inhibir, paradójicamente

en algunos casos, el efecto de IL8 (por ejemplo, la expresión de FTs asociados a EMT (Figura 11B y C), el FTs asociado a reprogramación Nanog (Figura 18), la inducción de la actividad SA- $\beta$ -GAL (Figura 35C) y la expresión de p21 (Figura 35D). El significado de esto no es muy claro, pero sería interesante determinar si existe alguna conexión entre los diferentes efectos observados en el contexto de citoquinas inflamatorias y si es la misma subpoblación celular la que responde a IL6 o a IL8. La IL6 se encuentra en la mayoría de tumores receptor de estrógeno positivos y de manera sinérgica con los estrógenos incrementa la actividad transcripcional del ER (Speirs V, 2000; Fontanini G, 1999), mientras que IL8 se correlaciona de manera inversa con la expresión ER (Freund A, 2003). La expresión de IL6 se ha relacionado con el mantenimiento de un ciclo de retroalimentación entre CSC y no-CSC a través de la inducción de la EMT (Iliopoulos D, 2011), mientras que la IL8 se ha relacionado más con la autorrenovación de células tumorales de cáncer de seno (Charafe-Jauffret E, 2009), esto explicaría en parte los diferentes efectos observados para cada citoquina.

La neutralización con anticuerpos monoclonales específicos contra estas dos citoquinas inhibió algunos de los efectos observados previamente, confirmando el papel de IL6 e IL8 en estos procesos. Se encontró que una gran parte de las células readquirieron una morfología de tipo epitelial, disminuyeron la expresión de CD44, y su capacidad de migración y de formación de mamoesferas (esferas de forma irregular). Este resultado sugiere una relación entre estas citoquinas y el marcador CD44, la cual se ha descrito previamente en mieloma múltiple (Vincent T, 2004) y en cáncer de colon (Barshishat M, 2002). Se ha propuesto que moléculas de adhesión pueden modular la secreción y la actividad biológica de citoquinas. En efecto los altos niveles de IL6 presente en el microambiente de células estromales inducidos por células de mieloma requiere la interacción célula-célula mediada a través de moléculas de superficie celular como CD44, sugiriendo la existencia de un circuito de amplificación CD44/IL6 (Vincent T, 2004). Además, en el modelo de cáncer de colon, la IL8 regula la expresión de las isoformas variables de CD44 (Barshishat M, 2002).

Para evaluar el papel de CD44 en las actividades biológicas descritas, realizamos una separación celular por citometría de flujo. La población celular caracterizada como CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup>, presentó una mayor capacidad de adhesión y de migración, así como también una mayor capacidad de formar esferas (esferas de mayor tamaño). En la mayoría

de las condiciones evaluadas aquí, esta capacidad junto con el incremento observado en el tamaño de las mamoesferas solo se evidenció en presencia de las citoquinas pro-inflamatorias, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación por parte de estas. En efecto, se ha reportado la existencia de mecanismos de regulación epigenética de la expresión de CD44 por la IL6 en células MCF-7, a través de la disminución de la metilación del promotor proximal de CD44 (D'Anello L, 2010). Nuevamente, la presencia de un fenotipo híbrido en nuestro sistema de cultivo en estas condiciones, es decir, células con apariencia epitelial y mesenquimal y probablemente células en transición entre estos fenotipos, sugiere la existencia de una variabilidad no solo fenotípica sino funcional, producto de la plasticidad de las células epiteliales de responder a diferentes estímulos presentes en el microambiente. Por otra parte, la presencia de esferas más grandes en la población con mayor expresión de CD44, podría indicar nuevamente un enriquecimiento en células con características *stem*, el cual es potenciado en presencia de un microambiente inflamatorio (Hinohara K, 2010); sin embargo, nuestros resultados refuerzan la idea que no existe un conjunto de marcadores específicos para caracterizar esta población de células *stem*. En efecto, se ha mostrado que un fenotipo CD44+CD24- no necesariamente se relaciona con tumorigenicidad (Fillmore CM, 2008), lo que refuerza la evidencia de que células con un fenotipo híbrido (CD44+CD24+) presentan un mayor potencial tumorigénico (Azzam DJ, 2013; Bhat-Nakshatri P, 2010; Yang CH, 2014; Zhang C, 2011).

El papel de la inflamación en la iniciación y en la progresión tumoral es cada vez más foco de atención por los investigadores. Condiciones inflamatorias pueden iniciar o promover una transformación oncogénica, y cambios genéticos o epigenéticos en células malignas podrían generar un microambiente de tipo inflamatorio que adicionalmente daría soporte a la progresión tumoral (Mantovani A, 2008). En este contexto, el factor de transcripción Stat3 es una de las principales rutas intrínsecas asociada con esta inducción y con la iniciación de la transformación maligna y la progresión tumoral a través de la regulación de genes como (IL6, IL8, MYC, MMP9, MMP2, CCND1, ICAM, HIF1 $\alpha$ , TWIST1, IL-17, IL-23, VEGF, INF- $\gamma$ ) (Mantovani A, 2008; Bollrath, J, 2009; Kujawski M, 2008, Yu H, 2009). Su actividad puede ser inducida por diferentes factores extrínsecos asociados a inflamación como la exposición a luz UV, infección, estrés, cigarrillo y agentes carcinogénicos (Arredondo J, 2006; Aziz MH, 2007; Bronte-Tinkew DM, 2009; Landen CN, 2007). La activación de la vía

de señalización IL6/Jak/Stat3 es una de las principales vías de señalización asociada a la inflamación y al crecimiento y supervivencia de células tumorales (Catlett-Falcone R, 1999). Nuestros resultados muestran que las citoquinas IL6 e IL8 inducen la activación de esta vía de señalización intracelular, la cual regula algunas de las funciones asociadas a la EMT (migración e invasión) así como también las propiedades de células *stem* (formación de colonias y de mamoesferas), indicando, de manera indirecta un efecto pro-tumorigénico de estos factores solubles (Zhang C, 2015, Rao SG, 2016). En efecto la estimulación de Jak/Stat con IL6 promovió la metástasis en modelos de xenotrasplante y en células pre-malignas (Di GH Liu Y, 2014; Zacarias-Fluck MF, 2015). También se observó un aumento en el nivel de expresión génica de Erk1 un gene asociado con la proliferación, la supervivencia, la movilidad y la transformación celular, eventos esenciales para el desarrollo y la progresión de carcinomas humanos que pueden ser regulados por Stat3 (Wendt MK, 2014). En el modelo utilizado aquí, es claro que la presencia de citoquinas pro-inflamatorias asociadas a la senescencia favorece la transformación, el crecimiento tumoral y la adquisición de propiedades que contribuyen a la metástasis. En otros tipos de cáncer, se ha visto además que la activación de Stat3 produce otras citoquinas como CXCL2 y GM-CSF que son fuertemente inmunosupresoras (Toso A, 2014).

### **Senescencia e inflamación se refuerzan recíprocamente a través de la producción de IL6 e IL8 y se asocian con la generación de células *stem***

La secreción de citoquinas y quimioquinas por células asociadas con un proceso inflamatorio crónico o por la presencia de células senescentes desencadenan/ o refuerzan el proceso de senescencia a través de varios mecanismos (Coppé JP, 2008; Kuilman T, 2009). En este contexto, la IL6, que se secreta en abundancia en tejidos con procesos inflamatorios, de envejecimiento o con infiltración tumoral (Hirano T, 2000), podría estar implicada en la regulación del balance entre senescencia y tumorigénesis a través de la activación de vías de señalización como Stat3. Adicionalmente, se ha mostrado que la IL8 es responsable de la propagación de la senescencia a través de la interacción con su receptor CXCR2 (Kuilman T, 2008; Acosta JC, 2008).

En este trabajo se mostró que el tratamiento con el MeCoSe puede inducir la secreción de IL6 e IL8 por las células MCF-7, permitiendo el establecimiento de un circuito que refuerza la inflamación. De manera interesante, la exposición a estas citoquinas indujo un aumento en la actividad SA- $\beta$ -GAL en células MCF-7 creando de esta manera un segundo circuito que podría contribuir a la potenciación y propagación del efecto del microambiente senescente/inflamatorio. Esta inducción paracrina de senescencia se ha descrito recientemente para otros factores como el TGF- $\beta$ , VEGF Y CCL2 sugiriendo la existencia de un mecanismo general de propagación de senescencia que involucra tanto células tumorales como células estromales vecinas (Acosta JC, 2013). De resaltar, la adición simultánea de IL6 e IL8 o de TGF- $\beta$ , a alta concentración, en las células MCF-7 no indujo senescencia después de 5 días de estimulación. Por el contrario, la adición de una concentración menor (100 veces menos) de estas citoquinas, y la incubación por un periodo más prolongado de tiempo (10 días) indujo células MCF-7 positivas para SA- $\beta$ -GAL. El efecto neto de esta estimulación paracrina y su re-inducción es la propagación de un microambiente senescente/inflamatorio, donde las células que son crónicamente expuestas a estos factores solubles deben tener una relevancia fisiológica enorme en el desarrollo tumoral. Estos procesos podrían además verse favorecidos por la presencia de progenitores senescentes en las células MCF-7 (Mumcuoglu M, 2010).

La neutralización con anticuerpos monoclonales específicos contra estas dos citoquinas anuló el efecto senescente (al igual que la expresión de p16 y p21), confirmando el papel de IL6 e IL8 en estos procesos. Estos resultados son consistentes con reportes previos sobre el incremento en la expresión de IL6 e IL8 en células senescentes (Kuilman T, 2008; Mason DX, 2004; Schnabl B, 2003), y muestran la relevancia que estas dos citoquinas podrían tener en la progresión del cáncer de seno y seguramente en la metástasis (Karnoub AE, 2007) en células supuestamente no tan agresivas y en un tipo de cáncer que en general no se relaciona con la inflamación. De esta manera, la presencia de una baja proporción de células progenitoras senescentes en la línea celular MCF-7 (Mumcuoglu M, 2010), podría crear una condición basal que iniciaría la producción de un estímulo de refuerzo que conduciría a la formación de focos de células senescentes rodeadas por células tumorales e inflamatorias (Nelson G, 2012). En este contexto, la propagación de procesos de senescencia e inflamación



y su persistencia en el microambiente tumoral podrían influir sobre el microambiente mismo y sobre las características biológicas de las células tumorales y de otras presentes en el estroma. En este microambiente, células de cáncer de seno de tipo luminal que muestran baja agresividad, podrían convertirse en células altamente tumorigénicas. Queda claro entonces, que de manera independiente o simultánea estas citoquinas juegan un papel importante en la propagación y mantenimiento de la senescencia y de un microambiente pro-inflamatorio, y en la adquisición de funciones especializadas por parte de las células tumorales. Esta observación es importante si se tienen en cuenta la gran diversidad de tipos celulares que pueden sintetizar estas dos citoquinas. De acuerdo con esto, se ha mostrado que las citoquinas pueden reforzar la senescencia en tejidos que están parcialmente dañados o cerca de la senescencia (Rodier F, 2009), escenario que se puede encontrar fácilmente en un microambiente tumoral.

Por otra parte, trabajos recientes sugieren que la producción aberrante de ROS puede inducir senescencia prematura tanto en células *stem* como en células progenitoras y de esta manera desencadenar un desequilibrio en la homeostasis de tejidos normales. En este trabajo, se observó una alta producción de ROS intracelular y mitocondrial en células MCF-7 tratadas con IL6+IL8 y con MeCoSe. Recientemente se mostró la inducción de senescencia en células mesenquimales de medula ósea normales y la producción de ROS mitocondrial por la estimulación con el TGF- $\beta$ 1 (Wu J, 2014). Este puede inducir también la producción de ROS mitocondrial en células tumorales (Yoon YS, 2005). La producción de ROS mitocondrial es una de las principales causas de envejecimiento prematuro y de desarrollo de enfermedades asociadas a cáncer (Cui H, 2012) y a la inflamación (Mittal M, 2014), y contribuye a la producción de citoquinas como la IL1- $\beta$ , IL6, and TNF- $\alpha$  (Bulua AC, 2011). Los resultados obtenidos aquí son consecuentes con lo reportado previamente, en donde la activación de IL6 y de Stat3 indujeron la producción de ROS y posteriormente la senescencia (Kojima H, 2013).

La persistencia de la senescencia debe estar mucho más dirigida hacia lograr un efecto más pro-tumorigénico que anti-tumoral, y de la inflamación debe apuntar mucho más a un efecto inmunosupresor. En este ambiente senescente/inflamatorio, las células tumorales deben

adquirir una dinámica particular con propiedades definidas. En efecto, se muestra, que acompañado de los cambios señalados arriba y del programa EMT, las células adquieren propiedades de células *stem*, esto es una mayor capacidad de autorrenovación y diferenciación multipotente, con la expresión de factores de reprogramación, es decir, células más primitivas y muy seguramente indicadoras de un peor pronóstico. El hecho de que hayamos evidenciado estos fenómenos en líneas celulares no tan agresivas sugiere que los procesos de senescencia e inflamación pueden ser mucho más relevantes en algunos tipos de cáncer generalmente no asociados con procesos inflamatorios (como el cáncer de seno). En estos casos la adquisición de funciones *stem* y de subtipos más mesenquimales debe influir significativamente sobre su agresividad.

### **Relación entre las características de células *stem*, la agresividad tumoral y la capacidad tumorigénica**

La producción de IL6 e IL8 es importante para la inducción y mantenimiento de características asociadas a la EMT y a las propiedades de células *stem*, y confiere características más agresivas tanto a las células MCF-7 como a las células derivadas del modelo HEK. Sin embargo, de manera sorprendente, esta situación fue muy diferente para la línea celular de cáncer de seno de tipo basal/mesenquimal claudina bajo, MDA-MB-231. En primer lugar, esta línea se clasifica como un subtipo de células progenitoras inmortalizadas (Mumcuoglu M, 2010), sin un componente senescente. La ausencia de progenitores senescentes podría dificultar el establecimiento de la propagación y potenciación de la senescencia. En segundo lugar, secreta altas cantidades de IL6 e IL8, está preestablecida en un programa basal/mesenquimal, y expresa constitutivamente características malignas asociadas con una mayor tumorigenicidad (Sasser AK, 2007). Estas características incluyen una alta capacidad de migración e invasión, y presumiblemente, la presencia de propiedades de células *stem*, como la autorrenovación y la capacidad de diferenciación multipotente. A pesar de que estas células presentaron características asociadas con un fenotipo EMT, no presentaron capacidad de formar mamoesferas, como se ha reportado previamente (Liu Y, 2014; Wang R, 2014). Esta incapacidad no se modificó por la adición anticuerpos neutralizantes contra las citoquinas IL6 e IL8 (resultados no

mostrados). Se ha descrito que células MDA-MB-231 que crecen en suspensión pierden la expresión del marcador CD44 cuando se compara con cultivos en monocapa, lo que podría resultar en una disminución en el número de células *stem* (Liu Y, 2014). Por otra parte, se ha reportado que la capacidad de formación de mamoesferas, depende de la expresión de moléculas de adhesión como la E-cadherina (Manuel Iglesias J, 2013). Además, se ha sugerido que no necesariamente existe una relación entre la expresión de marcadores de células *stem* y la habilidad de formar mamoesferas, ya que líneas que carecen de la expresión del marcador ALDH o de CD44+/CD24<sup>-Low</sup> pueden crecer en suspensión por varias generaciones (Lehmann C, 2012). Sin embargo, las razones de esta observación son desconocidas y requieren de una mejor evaluación.

Se podría considerar que parte de la agresividad de células de cáncer de seno basal/mesenquimal está más relacionada con su heterogeneidad, inducida en parte por una capacidad anormal de diferenciación, que con sus propiedades de células *stem*. En efecto, las células MDA-MB-231 mostraron una reducida capacidad de diferenciación osteogénica cuando se comparó con las células MCF-7. Evaluaciones posteriores mostraron que este defecto en la capacidad de diferenciación de las células MDA-MB-231 se asociaba a una baja expresión de APL comparativamente con las células MCF-7, las cuales mostraron una cinética de expresión de APL similar a la de las células *stem* mesenquimales (Aubin JE, 2001). Adicionalmente, las células MDA-MB-231 mostraron un incremento en la expresión de RUNX2, un factor de transcripción requerido para la definición del linaje de osteoblastos en pre-osteoblastos, pero un inhibidor de la maduración osteoblástica y de la formación de hueso (Komori T, 2010; Mendoza-Villanueva D, 2011). Aunque el significado de esta diferenciación osteogénica anormal aún no es muy claro, se cree que una capacidad aberrante de diferenciación podría contribuir a la heterogeneidad de células de cáncer de seno (Wicha MS, 2008). Además, esta heterogeneidad puede ser producto de la dinámica de las poblaciones de células *stem* presentes dentro de un subtipo de cáncer de seno, la cual puede ser influenciada por factores presentes en el microambiente tumoral (Korkaya H, 2011; Scheel C, 2011; Chaffer CL, 2013). Por consiguiente, las células de cáncer de seno MCF-7 presentan capacidades basales de células *stem* (capacidad de autorenovación y potencial de diferenciación), aunque tienen un potencial tumorigénico menos agresivo.

Células epiteliales derivadas de diferentes tipos de cáncer, adoptan un programa de EMT como una estrategia eficiente para promover la invasión local y la diseminación a órganos distantes. Aunque la existencia de células *stem* se ha asociado con la EMT, como se describió previamente, existe controversia acerca del papel que ejerce cada una de las células que componen el tumor, es decir células con un fenotipo único (epitelial o mesenquimal) o con un fenotipo híbrido en los diferentes tipos de cáncer. En efecto, dada la naturaleza heterogénea de los tumores, caracterizada por un frente invasivo de naturaleza mesenquimal y por una masa tumoral interna epitelial, y del microambiente tumoral, la EMT debe ser vista como un espectro de estados intermedios. Trabajos recientes apoyan la idea de que el programa inverso, la transición mesenquimo-epitelial (MET), se requiere para una colonización metastásica eficiente y que la EMT no necesariamente se asocia con *stemness* (Ombrato L, 2014). Sorprendentemente, varios estudios recientes han mostrado que la EMT inhibe el desarrollo de características de células *stem* (Celia-Terrassa T, 2012; Korpál M, 2011; Sarrío D, 2012). Se ha sugerido que células con un fenotipo epitelial presentan mayor capacidad tumorigénica que las células con un fenotipo mesenquimal, y que estas dos subpoblaciones cooperan de tal manera que células con un fenotipo mesenquimal no metastásico inducen un potencial más invasivo a las células epiteliales iniciadoras de tumor (Celia-Terrassa T, 2012). Parecería por lo tanto que a pesar de que la EMT está asociada fuertemente a un fenotipo *stem*, no es necesaria para la adquisición de *stemness*, lo que indica que estos dos procesos pueden ser reguladas por distintos mecanismos. De esta manera, las interacciones dinámicas entre un fenotipo epitelial y mesenquimal, así como la capacidad de autorrenovación determinan la plasticidad de las células iniciadoras de tumor.

### **La adquisición de *stemness* es dependiente del contexto celular, y define el potencial tumorigénico de células derivadas del modelo HEK**

Previamente, en el modelo de células HEK, se demostró, que células pre-malignas adquirirían un potencial tumorigénico, únicamente en presencia de un microambiente senescente, responsable de conferir un potencial tumorigénico autónomo a las células explantadas obtenidas de esos tumores. De manera notoria, esta adquisición se acompañó de la inducción de un programa MET dando como resultado células con un fenotipo híbrido (Nieto MA,

2016; Jolly MK, 2015), y un incremento en *stemness* y plasticidad celular (Castro-Vega LJ, 2015). Teniendo en cuenta que no se conoce completamente la relevancia de los estados intermedios en las transiciones EMT/MET, ni de la heterogeneidad fenotípica en el desarrollo y progresión tumoral, se investigó si una expresión variable de CD24, como se observó en una de las líneas celulares de células explantadas (PC1-Expl-1), se podía asociar con la ganancia o la pérdida de ciertas propiedades asociadas a la tumorigénesis. La comparación de las dos subpoblaciones seleccionadas mostró que estas células eran muy similares en tamaño y morfología, pero diferían ligeramente en la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales; la subpoblación CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> mostró un incremento en la expresión de E-cadherina, Vimentina y del FT Zeb2, y presentó una expresión variable de miembros de la familia miR-200, los cuales se han asociado al programa de EMT. Este enriquecimiento en características mesenquimales se asoció con una mayor capacidad de migración e invasión, lo que podría indicar que estas células presentarían un potencial tumorigénico mayor (Wolf K, 2006; Clark AG, 2015).

De manera sorprendente, el ensayo *in vivo* de la evaluación de la capacidad tumorigénica en ratones inmunosuprimidos mostró que las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> fueron incapaces de formar tumores, mientras que las células con una menor expresión de CD24 (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>) presentaron un potencial tumorigénico mayor, comparable al de las células parentales (PC1-Expl-1). En términos de la capacidad tumorigénica, la inoculación de la mezcla de las dos subpoblaciones (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> + CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>) en proporciones iguales no fue equivalente a la inoculación de las células parentales originales; además, los tumores formados en esta condición (Mix) se asemejaron en el análisis histológico a los inducidos por las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>, corroborando el alto potencial tumorigénico de esta subpoblación. Estos resultados indicaron que en este modelo no hubo cooperación entre las subpoblaciones celulares para producir tumores, como se ha evidenciado en otros sistemas (Axelrod R, 2006). De manera interesante, las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> con un mayor potencial tumorigénico, presentaron una mayor capacidad de proliferación, de adhesión a fibronectina, y de formación de colonias. Estos resultados sugieren que la EMT y *stemness* deben ser vistos como dos procesos que ocurren de manera parcialmente separada, a pesar de ser regulados por los mismos FTs. En efecto, se ha mostrado que la disminución de FTs que regulan la EMT, como Snail, Twist y Prrx1, es un requisito para la atenuación de la EMT

y para permitir de esta manera la colonización y formación de tumores en sitios nuevos (Ocaña OH, 2012, Tsai JH, 2012, Tran HD, 2014). La activación de miR-424, un blanco de Snail, así como de Twist, promueve la adquisición de características asociadas a la EMT, pero al mismo tiempo inhibe la capacidad tumorigénica (Drasin DJ, 2015). La activación constitutiva de Snail, en un modelo de cáncer de próstata, suprime la *stemness* (Celia-Terrassa T, 2012); así mismo, bajos niveles de Twist inician la formación de tumores, mientras que niveles altos se requieren para la inducción de la EMT (Beck B, 2015; Schmidt JM, 2015). Estos resultados sugieren que una mayor capacidad de proliferación y de adhesión, en lugar de la adquisición de un fenotipo completo de EMT, se asocia con una mayor capacidad tumorigénica. Adicionalmente, dada la heterogeneidad intratumoral, las distintas subpoblaciones que componen un tumor pueden diferir en sus propiedades *stem/progenitoras*. Por ejemplo, líneas celulares de cáncer de seno de tipo basal, presentan características intrínsecas asociadas a la EMT; sin embargo, este fenotipo mesenquimal no se correlaciona con la adquisición global de características *stem*, como se observó en los resultados obtenidos aquí con la línea celular MDA-MB-231. Estas propiedades *stem* están más asociadas con un fenotipo epitelial, corroborando nuevamente la noción que la adquisición de un fenotipo mesenquimal no siempre se requiere para la adquisición de *stemness* (Sarrío D, 2012).

La caracterización inmunohistoquímica de los tumores mostró que células derivadas de los tumores formados por la subpoblación CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> presentaron una morfología principalmente epitelial, aunque también expresaron marcadores asociados a un fenotipo epitelial y mesenquimal (EMA y Vimentina). Por otra parte, la caracterización de las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> reveló que estas células presentaron un fenotipo asociado a una EMT parcial, lo que se relacionó con una mayor capacidad de migración e invasión. No obstante, este aumento en la capacidad de migración, no se acompañó de un aumento en la capacidad tumorigénica. Como se reportó previamente, la activación constitutiva de FTs asociados a la EMT inducen un fenotipo migratorio, pero no necesariamente tumorigénico (Schmidt JM, 2015). Además, estas propiedades de migración e invasión son incompatibles con la división celular (Floor S, 2011).

Estos hallazgos en nuestro modelo sugieren la presencia de un fenotipo híbrido en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> caracterizado por la co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales y por una alta expresión de Snail y de algunos miembros de la familia miR-200. Células con un fenotipo híbrido E/M están estrictamente controladas por factores de estabilidad acoplados a circuitos de activación y de represión de factores esenciales para la inducción de la EMT como miR-200/ZEB y miR-34/Snail (Tian X-J, 2013). En relación con la expresión de estos marcadores, un fenotipo epitelial se obtiene con una alta expresión de miR-200 y miR-34, y baja expresión de Zeb y Snail, y un fenotipo mesenquimal con una baja expresión de miR-200 y miR-34, y alta expresión de Zeb y Snail. Una EMT parcial o fenotipo híbrido presenta una baja expresión de miR-34 y Zeb y una alta expresión de Snail y miR-200 o se muestra niveles intermedios de expresión de miR-200 y Zeb1. Esta caracterización se basa en los diferentes mecanismos de regulación de la transcripción; por ejemplo, Snail puede iniciar la represión de E-cadherina pero Zeb1 se requiere para su completa inhibición (De Herreros AG, 2012); además, la mayoría de los genes que son reprimidos durante la EMT son inhibidos por Zeb1 de manera independiente de la señal inductora de la EMT (Taube JH, 2010). Esto indica que la activación de Zeb1 es necesaria para llevar a cabo una EMT completa. De manera importante, el número de sitios de unión de miR sobre su mRNA blanco es crucial para determinar las veces de cambio en la represión de una proteína. Por ejemplo, la sobreexpresión de miR-34 reduce el nivel de expresión de Snail a un 50 % con respecto a su nivel inicial, mientras que la sobreexpresión de miR-200 reduce los niveles a un 10% (Kim NH, 2011; Gregory PA, 2008). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la manifestación de un estado de EMT parcial puede ser específico para cada linaje celular (Schliekelman MJ, 2015), debido a que no todas las líneas celulares tienen el mismo número de sitios de unión disponibles para miR-200 sobre el mRNA de Zeb1. Hallazgos previos sugieren que células *stem* de seno co-expresando marcadores epiteliales y mesenquimales muestran alta plasticidad, autorrenovación y formación de mamoesferas. Consecuente con nuestros resultados, se encontró que la adquisición de estas características en la subpoblación CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> se asoció, excepto para la capacidad clonogénica y la expresión del marcador CD105, con un aumento en las propiedades *stem* como la capacidad de autorrenovación, diferenciación, un aumento en los factores asociados a reprogramación, Oct4, Sox2, Lin28, y en marcadores asociados a *stemness* como ALDH1 y ABCB-1. En este sentido, es

inquietante que, a pesar de que estas células mostraron un fenotipo EMT, una mayor migración e invasión, y un enriquecimiento en propiedades *stem*, no presentaron capacidad de formar tumores (Chang JC, 2016; Ginestier C, 2007; Nishi M, 2014). Esto podría indicar, que estas células muestran más un fenotipo con potencial metastásico (Giampieri S, 2009), y por lo tanto presentan una capacidad limitada para colonizar tejidos y establecer un crecimiento celular robusto, debido a su baja capacidad de adhesión y reducida tasa de proliferación, y de manera muy importante, debido a su baja capacidad clonogénica, comparativamente con las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> (Hai J, 2012; Turaga SM, 2016).

En cuanto al modelo de células HEK y la expresión del marcador de células de carcinoma de riñón, CD105 (Bussolati B, 2008), y del marcador asociado con neoplasia de células renales, PAX8 (Ozcan A, 2012; Knoepp SM, 2012), esta fue similar en ambas subpoblaciones, aunque se observó un ligero aumento en el nivel de expresión de CD105 en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup>. A este respecto, es interesante resaltar que células positivas para este marcador, aisladas de pacientes con RCC, presentan un alto potencial tumorigénico cuando se inyectan en ratones inmunosuprimidos, y muestran una alta capacidad clonogénica, resultado muy similar al obtenido con las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> (Bussolati B, 2008). Sin que estos hallazgos pretendan validar a las células HEK inmortalizadas como un modelo de cáncer de riñón, muestran similitudes interesantes, que podrían explotarse en un futuro.

Como se describió anteriormente, la co-inoculación de las dos subpoblaciones no fue equivalente, en términos de la capacidad de formar tumores, a la de la línea celular parental. Las razones de esto son desconocidas; sin embargo, el análisis de factores solubles producidos por las dos subpoblaciones mostró que las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> presentaron un perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias, caracterizado por una mayor expresión de IL6, IL8 e IL1-beta principalmente, sugiriendo que por este mecanismo estas células podrían ser afectadas o alternativamente influenciar el microambiente tumoral. En efecto, estas citoquinas ejercieron un efecto autocrino sobre las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>, que se evidenció por un incremento en los niveles de NF-kB total y fosforilado y en un ligero aumento en los niveles de Stat3. NF-kB controla la expresión de LIN28/let-7 e induce un



fenotipo E/M con características *stem* (Jolly MK, 2014). Esto es importante teniendo en cuenta que el nivel de expresión de LIN28 fue elevado también en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>.

La vía de señalización en la que participa NF-κB, es una de las principales para la regulación de la transcripción génica relacionada con la inflamación, e importante para el mantenimiento de las células *stem* de cáncer de seno (Hinohara K, 2010). Esta ruta también se ha asociado a la carcinogénesis inducida por la inflamación. Por ejemplo, el bloqueo de la activación de NF-κB, suprime el desarrollo de cáncer colorectal que resulta de la enfermedad inflamatoria intestinal y colitis ulcerosa inducida por agentes químicos como azoximetano y sulfato de dextrán (Greten FR, 2004). Estudios recientes en modelos de ratón de cáncer colorectal asociado a colitis han demostrado una relación directa entre la activación del factor transcripción STAT3 mediada por IL6 y el desarrollo de cáncer inducido por inflamación, a través de la regulación de genes asociados con proliferación y supervivencia (Grivennikov S, 2009). Interesantemente, las vías de señalización Stat3 y NF-κB son activadas de manera frecuente y persistente en estas células tumorales y también en células mieloides asociadas a tumor (Colotta F, 2009; Yu H, 2009). Además, la migración de células tumorales y la diseminación metastásica dependen de la interacción integrada y coordinada de citoquinas y factores de crecimiento, liberados por el microambiente tumoral o por las células tumorales, determinando en gran medida la capacidad de adaptación de las células tumorales a nuevos nichos metastásicos (Friedl P, 2011; Odenthal J, 2016). En células epiteliales tubulares de riñón, la adquisición de una EMT parcial se asoció con la secreción de exosomas y citoquinas que indujeron el reclutamiento de células madre mesenquimales de médula ósea y su diferenciación hacia miofibroblastos para promover fibrogénesis o hacia macrófagos para promover inflamación. Además, la inhibición de la EMT se asoció con la inhibición de la infiltración de células del sistema inmune (Borges FT, 2013, Grande MT, 2015, Lovisa S, 2015).

De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible hablar en nuestro modelo de un gradiente de EMT, en donde el resultado de la activación de un programa de EMT en células epiteliales puede ser bimodal, esto es, acoplado a *stemness* durante la activación inicial, pero cuando es forzado a alcanzar un estado mesenquimal o avanzado, este llega a ser incompatible con las características de las células *stem* (Ombrato L, 2014; Chaffer CL, 2016). Por otra parte, el

perfil pro-inflamatorio de las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> sugiere que estas pueden estar induciendo un microambiente tumoral en constante evolución que les confiere un fenotipo híbrido y plasticidad celular. Como resultado de esto, las células tumorales adquieren un mayor potencial de migración, de invasión y de intravasación para llegar a ser células tumorales circulantes.

Por otra parte, debido a la separación de las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> de las CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup>, y por lo tanto a la pérdida de la estimulación paracrina entre ellas, es probable que las células diverjan en términos de su funcionalidad. En efecto, se sabe que las CSC, existen en diversos estados fenotípicos dentro de un tumor individual y difieren en sus atributos funcionales, potencial de autorrenovación, capacidad iniciadora de tumor, multipotencia y plasticidad (Clarke MF, 2006; Nguyen DX, 2012). Esta plasticidad puede ser influenciada por la comunicación entre las células que componen el tumor o entre ellas y el microambiente tumoral confiriéndoles la ganancia o pérdida de funciones de células *stem* (Shirakawa K, 2002; Passalidou E, 2002; Lim E, 2009).

Además, se conoce muy bien que mediadores de la inflamación pueden desencadenar tanto efectos anti-tumorigenicos como pro-tumorigenicos (Hefetz-Sela S, 2014; Grivennikov SI, 2010; Bornstein S, 2016). Previamente se mostró que el tratamiento con las citoquinas IL6 e IL8 confería a las células no agresivas un aumento en las características *stem* y en su fenotipo asociado a tumorigenicidad (Ortiz-Montero P, 2017). En otra línea celular más agresiva, la expresión constitutiva de estas citoquinas, se asoció con un fenotipo *stem* incompleto o anormal, dando soporte a la idea que un estado de *stemness* completo no es necesario para la tumorigénesis, y que estos atributos son necesarios dependiendo del tipo celular, sus características funcionales y del estado de desarrollo del cáncer.

Un resultado que requerirá de mayor atención es el aumento en los niveles de Notch en las células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> ya que éste está implicado en el mantenimiento de propiedades *stem* (Sansone P, 2007), en la EMT (Espinoza I, 2013), en la curación de heridas (Chigurupati S, 2007) y en procesos metastásicos (Sethi N, 2011).

Finalmente, en este trabajo se mostró que la propagación de la senescencia y la inflamación y su persistencia en el microambiente tumoral deben influir sobre el microambiente mismo

y sobre las características biológicas de las células tumorales y de otras presentes en el estroma. Esta estimulación continua y recíproca de ambos procesos inducidos por las citoquinas potencia la plasticidad de las células epiteliales y la adquisición de propiedades de células *stem*. Sería interesante poder descifrar la contribución exacta de la heterogeneidad y de las capacidades de las células *stem* a la agresividad del cáncer y el papel que el microambiente tumoral podría tener en estas propiedades. Así el conocimiento profundo sobre los mecanismos moleculares responsables de conferir propiedades particulares al microambiente, a las células tumorales y a otras del estroma, permitirá el desarrollo de terapias novedosas que permitan modular estas actividades.

## CONCLUSIONES

1. Un microambiente pro-inflamatorio senescente, además de conferir plasticidad epitelial, refuerza el desarrollo de funciones asociadas a un fenotipo de células *stem*, confiriendo un fenotipo más agresivo en células de cáncer de seno luminal.
2. Las citoquinas IL6 e IL8, presentes en altos niveles en el MeCoSe, semejaron muy bien los cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales inducidos por el MeCoSe; además su neutralización por anticuerpos específicos sugiere un papel central en la adquisición de estas funciones.
3. La expresión de CD44 es importante en el mantenimiento de las características funcionales asociadas a la EMT (migración y adhesión), pero no para la generación de células con características *stem* basados en la capacidad de autorrenovación.
4. La vía Jak/Stat3 activada por la IL6 e IL8 es fundamental en la adquisición de las características funcionales que les confirió a las células MCF-7 una mayor agresividad.
5. El tratamiento con citoquinas pro-inflamatorias o con MeCoSe, indujo un estado de senescencia en las células MCF-7.
6. Senescencia e inflamación se refuerzan a nivel de la población celular a través del balance en la producción de ROS y de citoquinas pro-inflamatorias.
7. Las células MDA-MB-231 mostraron un fenotipo asociado a la EMT, en donde las citoquinas IL6 e IL8 jugaron un papel importante algunas funciones (migración, invasión), pero no sobre sus propiedades de células *stem*.
8. Las células MDA-MB-231 presentaron propiedades de células *stem* incompletas, sugiriendo que la adquisición de la EMT y de estas propiedades, no siempre se adquieren de manera conjunta.
9. La subpoblación HEK CD24<sup>Pos</sup> presentó características asociadas a un programa de EMT parcial, que se relacionó con una mayor capacidad de migración e invasión, un aumento en las propiedades de células *stem*, un perfil de secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL6 e IL8), pero no presentó capacidad de formar tumores.
10. El potencial tumorigénico de CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Neg</sup> mostró que otros atributos adicionales (adhesión, proliferación y clonogenicidad) a un estado completo de *stemness* fueron suficientes para inducir tumorigenicidad.
11. Ambos modelos mostraron que un estado de *stemness* completo, no se requiere necesariamente para iniciar un proceso tumorigénico efectivo.

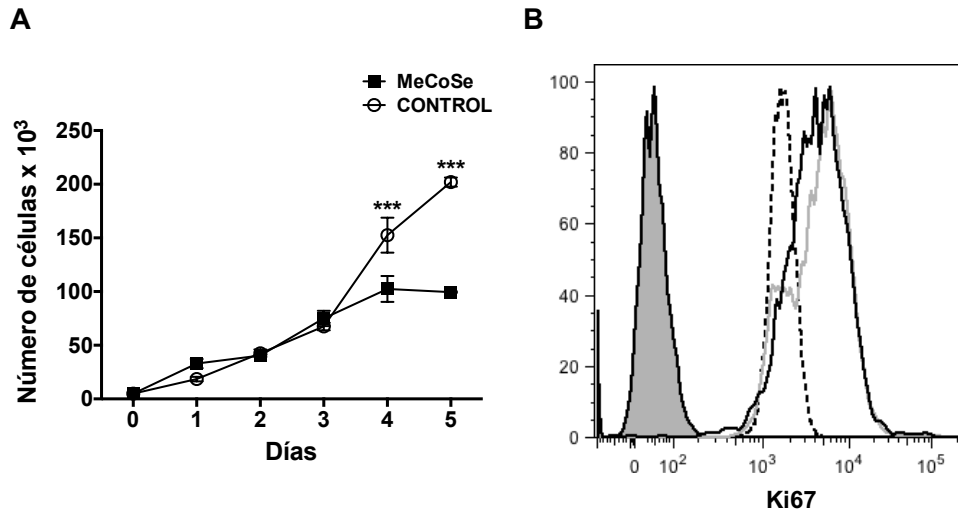
## PERSPECTIVAS

Algunos de los resultados obtenidos en este trabajo sientan las bases para profundizar en algunos aspectos relacionados con la adquisición de características de células *stem*. En particular, profundizar acerca del papel sobresaliente de la IL8 en la formación de mamoesferas y en la generación de subpoblaciones con diferentes capacidades *stem* y eventualmente tumorigénicas. Si se lograra asociar un grado (un índice) de *stemness* con la capacidad tumorigénica o la agresividad tumoral sería de gran interés.

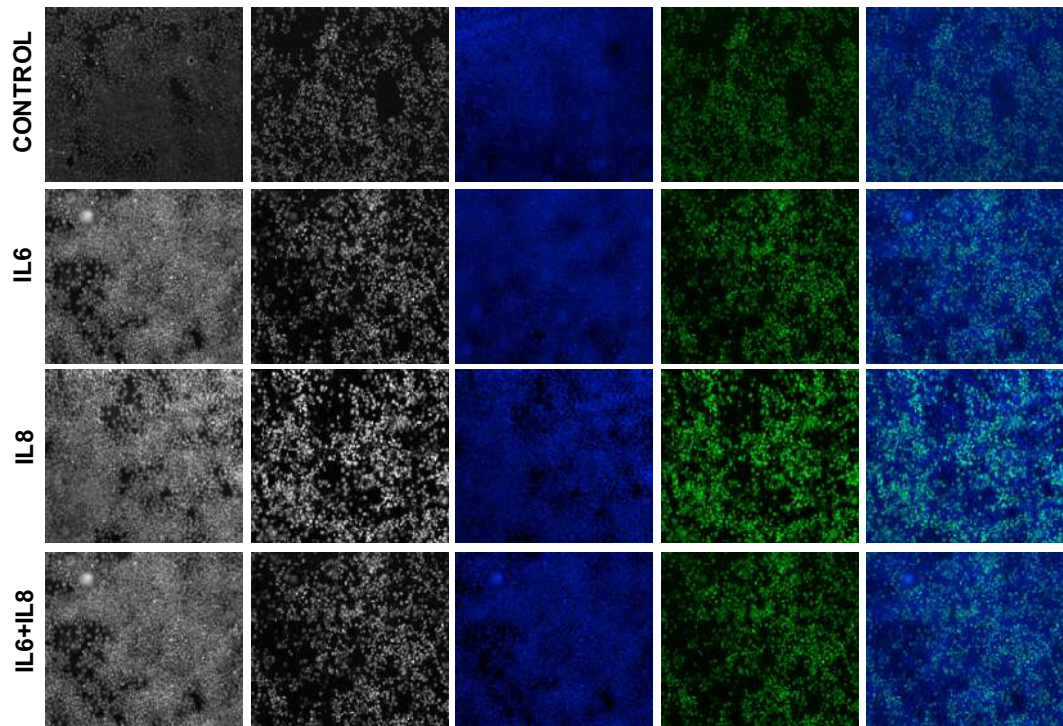
El modelo de células HEK y los hallazgos en las células MDA-MB-231 permiten suponer que en una misma población de células tumorales pueden existir subpoblaciones con capacidades funcionales diferentes. Unas con capacidades tumorigénica evidentes, pero con características de células *stem* no tan robustas, como se muestra en este trabajo. Y otras que desde el punto de vista de la *stemness* son más completa, no son tumorigénicas, pero podrían ser más metastásicas y que valdría la pena evaluar.

Los análisis de secuenciación y de enriquecimiento génico en las células HEK mostraron un enriquecimiento en genes relacionadas con la interacción receptor-citoquina, la adhesión, la EMT, kRAS, respuesta inflamatoria, TNF- y NF-kB. Un análisis detallado de los genes implicados mostró un enriquecimiento de IL8, CXCL-1, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, CXCL-2, ADAM, SERPNINA10, VCAM, ICAM y NF-Kb (Resultados no mostrados). Estos resultados, abren una nueva ventana de investigación encaminada a determinar si algunos de estos genes son los responsables de las diferencias observadas en términos de la capacidad tumorigénica de las dos subpoblaciones seleccionadas aquí.

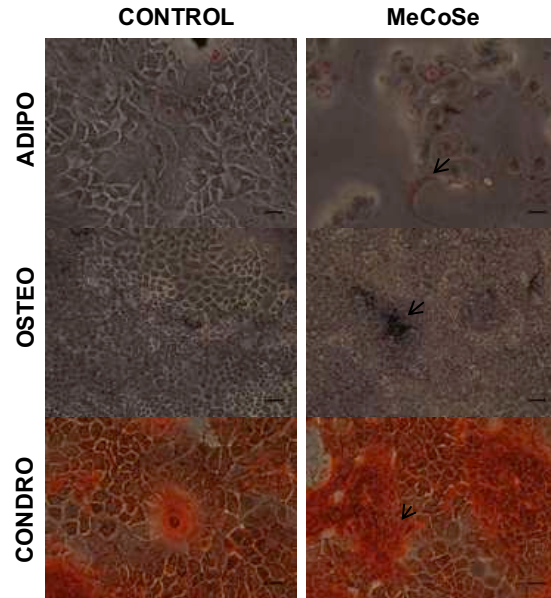
## FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura suplementaria 1. Cinética de crecimiento de las células MCF-7 bajo el tratamiento con MeCoSe.** (A) Cinética de crecimiento de células MCF-7 tratadas o no con MeCoSe. Se sembró la misma cantidad de células por triplicado y se contaron en cada uno de los puntos de tiempo indicados. Las barras de error indican SEM. (\*\*\*)  $p < 0.001$  ( $n=2$ ). (B) Histogramas representativos de FACS mostrando la expresión de Ki-67 en células control y tratadas con MeCoSe (Histogramas negro y gris, respectivamente). Los histogramas rellenos corresponden al blanco y los histogramas punteados al control de isotipo.

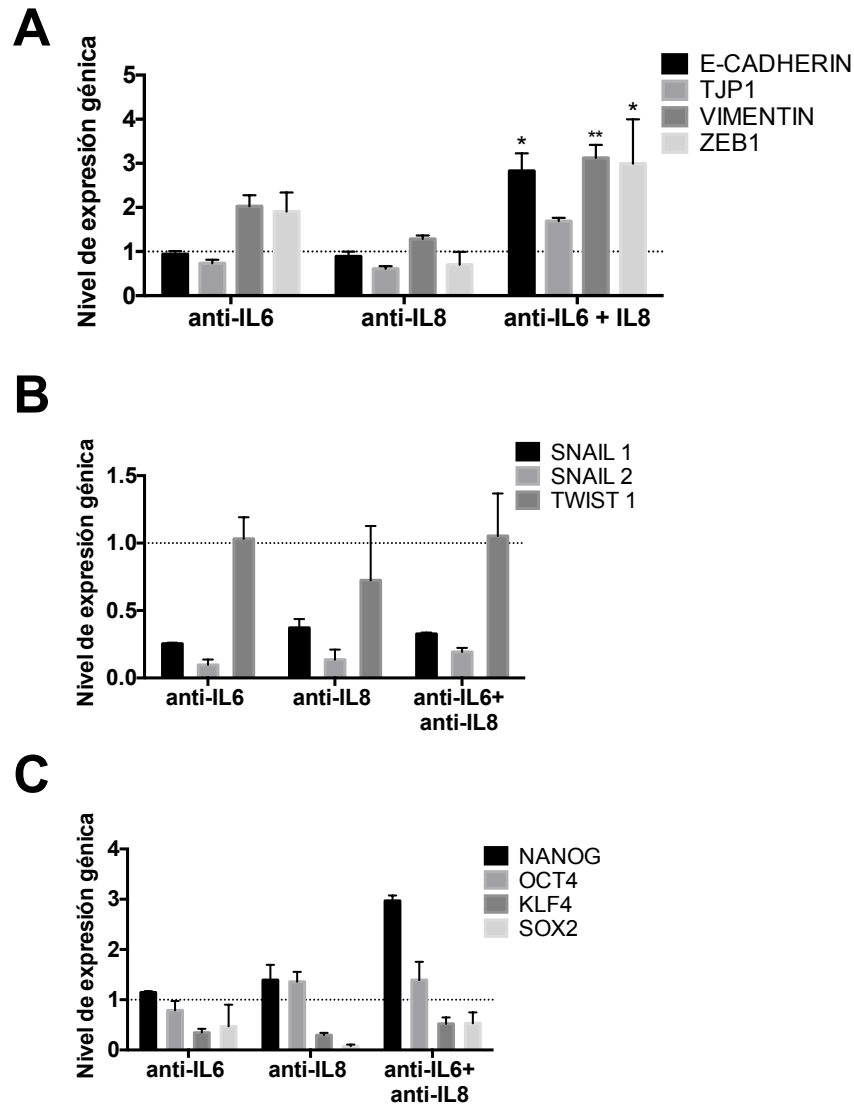


**Figura suplementaria 2. Evaluación de la proliferación celular mediante la marcación con *EDU*.** La estimulación de las células MCF-7 por 12 h no induce un aumento en la capacidad de migración. Se muestran imágenes representativas de células MCF-7 estimuladas o no (control) con citoquinas por 12 h en láminas microscópicas y marcadas con el kit *Click-iT® EdU Imaging*.

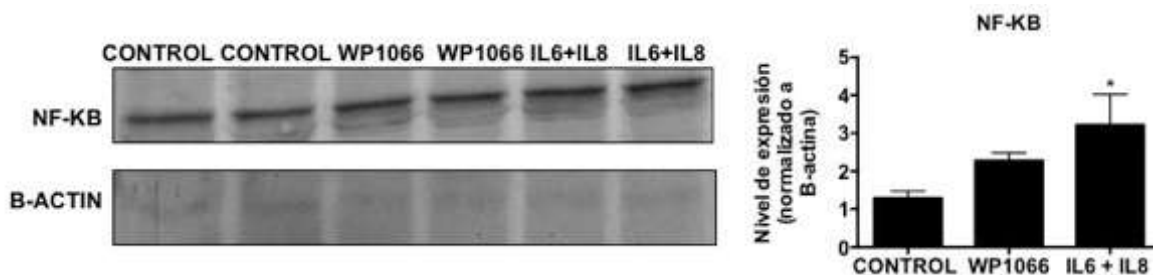


**Figura suplementaria 3. Células MCF-7 tratadas con MeCoSe presentan características asociadas a un potencial de diferenciación.** La diferenciación hacia linajes mesenquimales de células MCF-7 pre-tratadas o no (control) con MeCoSe, se indujo por la incubación con medios de inducción específicos, y se evaluó después de 10 días de inducción. La diferenciación hacia Osteocitos (Actividad de la enzima fosfatasa alcalina), Adipocitos (Aceite rojo-O) y condrocitos (Safranina-O) se determinó mediante el uso de coloraciones específicas. Se muestran imágenes representativas. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

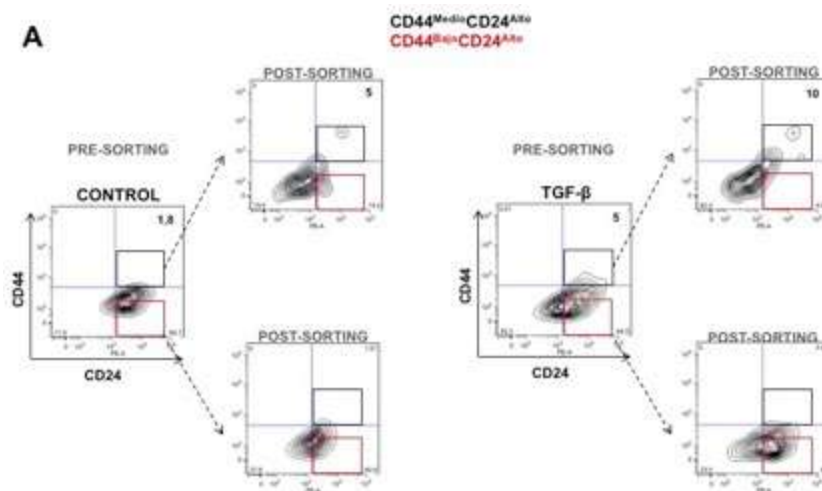


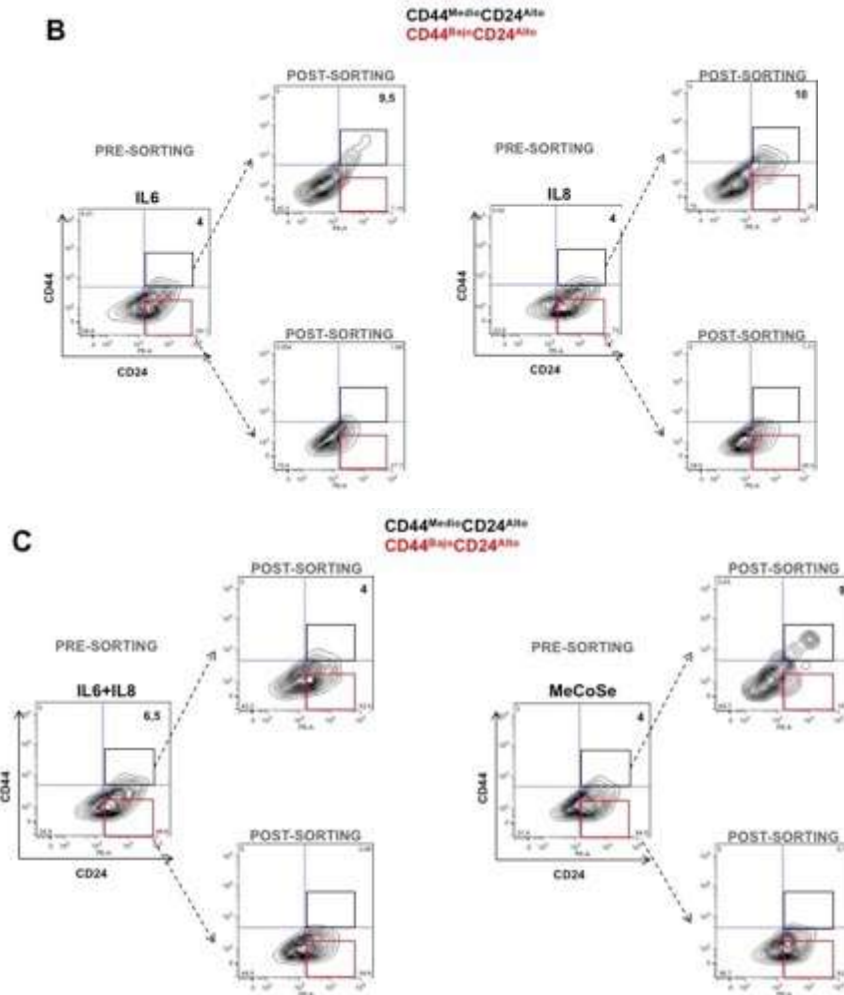


**Figura suplementaria 4.** El tratamiento con anticuerpos neutralizantes indujo cambios en la expresión de marcadores y FTs asociados a la EMT. Nivel de expresión génica de marcadores y FTs asociados a EMT (A y B) y FTs asociados a reprogramación (C) Los valores se normalizaron a GAPDH y son relativos a las células control (línea punteada). barras de error indican SEM. (\*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ) (n = 2).

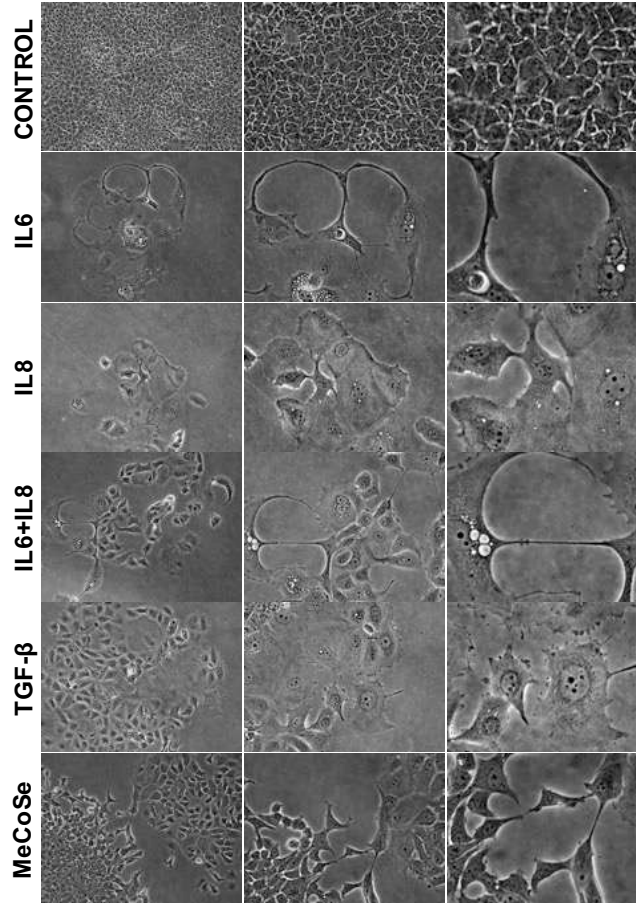


**Figura suplementaria 5. Papel de Stat3 en la activación de NF- $\kappa$ B en células MCF-7.** Nivel de expresión de NF- $\kappa$ B determinado por WB en células MCF-7 estimuladas o no con citoquinas y con WP1066. Los valores se normalizaron a beta-actina. Barra de error indica SEM. (\*<p 0,05).

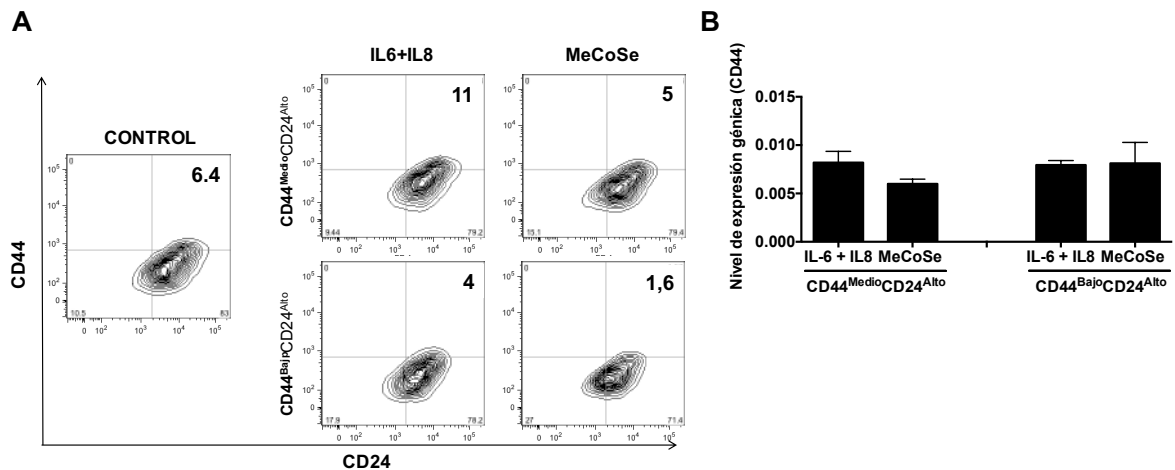




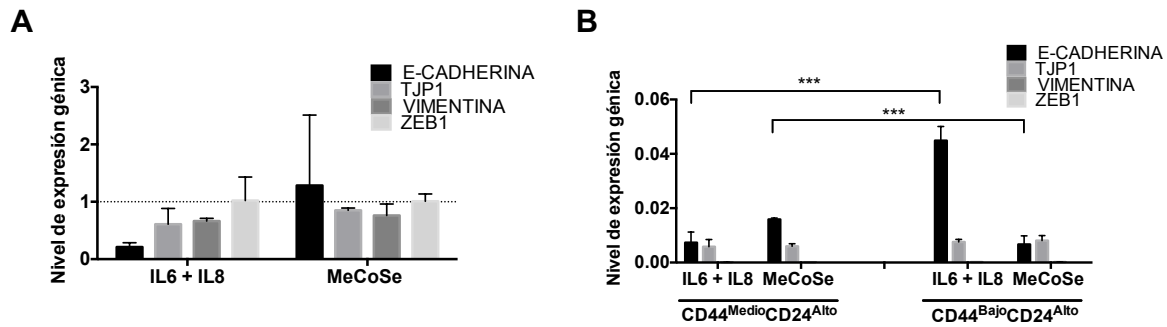
**Figura suplementaria 6. Separación de células MCF-7 por la expresión del marcador CD44.** (A) Células MCF-7 control o estimuladas con TGF-B; (B) Células MCF-7 estimuladas con IL6 o IL8 y (C) Células MCF-7 estimuladas con IL6+IL8 o MeCoSe, se marcaron con los anticuerpos CD44-FITC y CD24-PE y se seleccionaron por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células CD44<sup>Medio</sup>CD24<sup>Alto</sup> antes (Pre-sorting) y después de la separación celular (post-sorting).



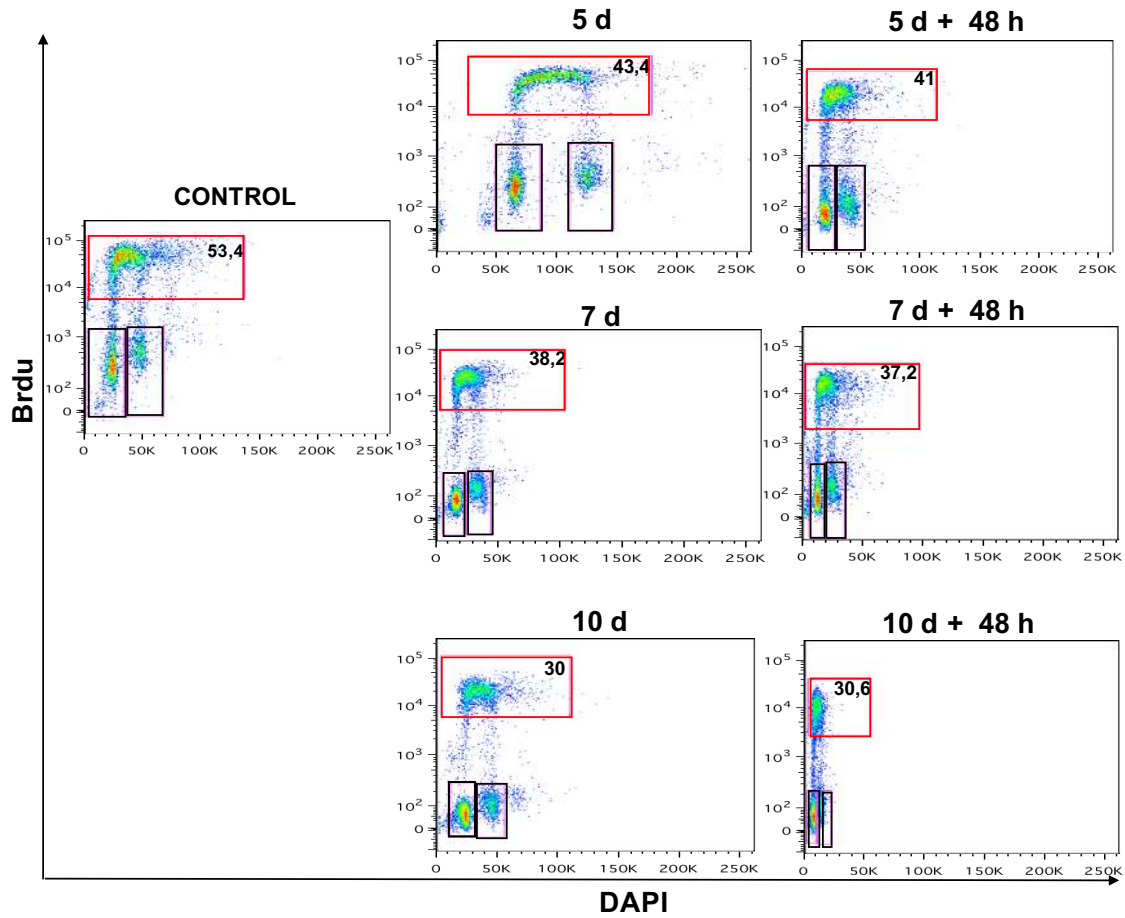
**Figura suplementaria 7. Células MCF-7  $CD44^{Medio}CD24^{Alto}$  presentan un fenotipo heterogéneo.** Imágenes representativas de células MCF-7  $CD44^{Medio}CD24^{Alto}$  seleccionadas por citometría de flujo y mantenidas en cultivo durante 11 días, hasta alcanzar una confluencia de 60-70%. Se observan células con una morfología de tipo epitelial y mesenquimal.



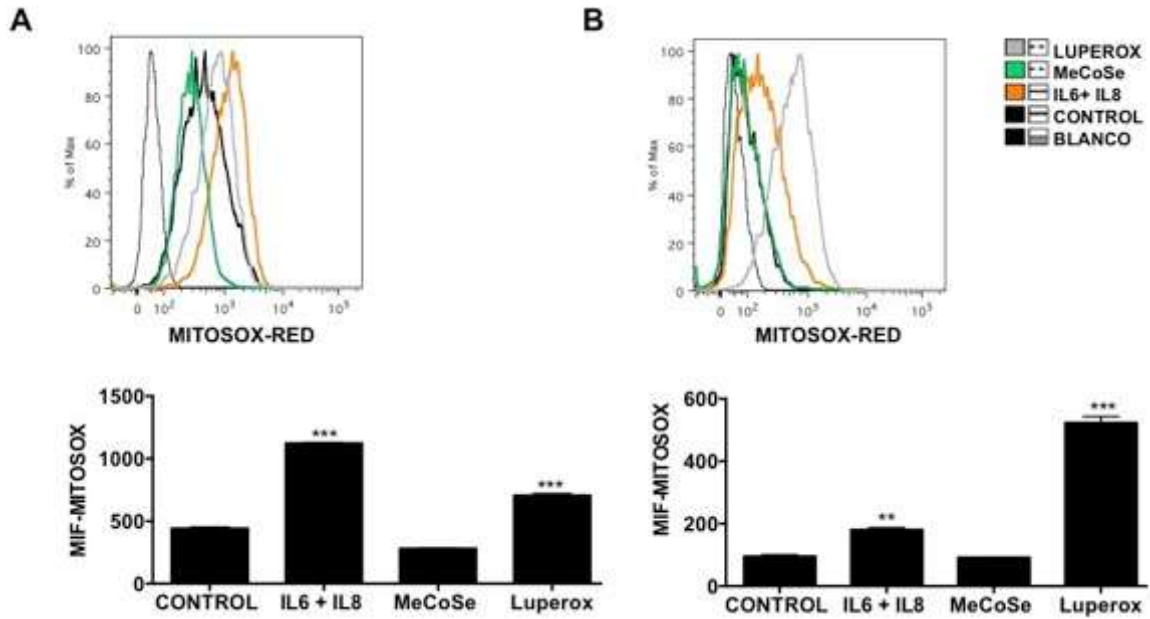
**Figura suplementaria 8. Expresión del marcador CD44 en células MCF-7 CD44Medio CD24Alto.** Análisis de la expresión del marcador CD44 por citometría de flujo (A) y por qRT-PCR (B) en células MCF-7 estimuladas con IL6+IL8 y con MeCoSe.



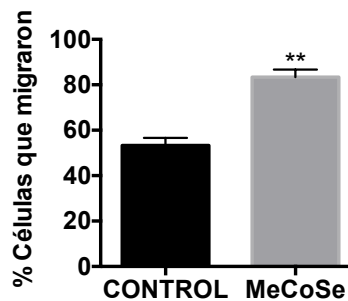
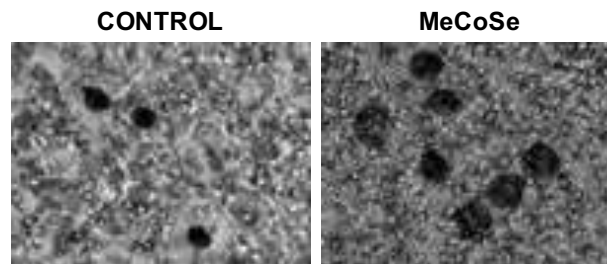
**Figura suplementaria 9. Expresión de marcadores asociados a EMT en células MCF-7 CD44<sup>Medium</sup>CD24<sup>High</sup>.** (A) Nivel de expresión génica evaluado por qRT-PCR de marcadores asociados a EMT en células MCF-7 CD44MedioCD24Alto relativo a células CD44Bajo CD24Alto (línea punteada) y normalizada a GADPH. (B) Nivel de expresión génica en células CD44MedioCD24Alto y CD44Bajo CD24Alto normalizado a GADPH. Las barras de error corresponden a SEM. (\*\*\*) $p < 0.001$ .



**Figura suplementaria 10. El MeCoSe indujo un estado de senescencia irreversible.** Incorporación de BrdU en células MCF-7 tratadas con MeCoSe durante 5, 7 o 10 y después de 48 h de contacto con medio de crecimiento (SFB 10%). El porcentaje de células en fase S del ciclo celular (recuadro rojo) no se modificó.

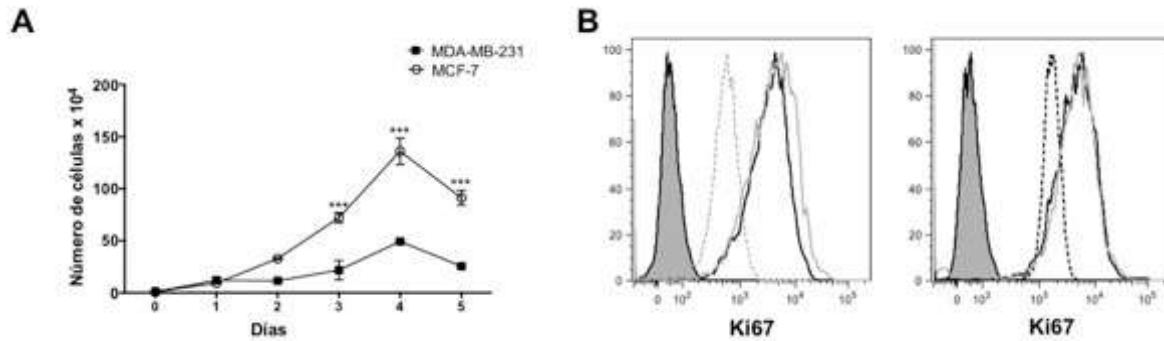


**Figura suplementaria 11.** El tratamiento con citoquinas o con MeCoSe indujo un aumento en los niveles de ROS. Los niveles de ROS mitocondrial se determinaron por citometría de flujo mediante el uso de Mitosox-red, respectivamente en células MCF-7 estimuladas o no (control) con citoquinas (línea naranja) o con MeCoSe (Línea verde) durante (A) 4 y (B) 8 días. Células sin marcar se utilizaron como blanco, y células tratadas con luperox como control positivo (Línea gris). Barra de error indica SEM. (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) (n=2).

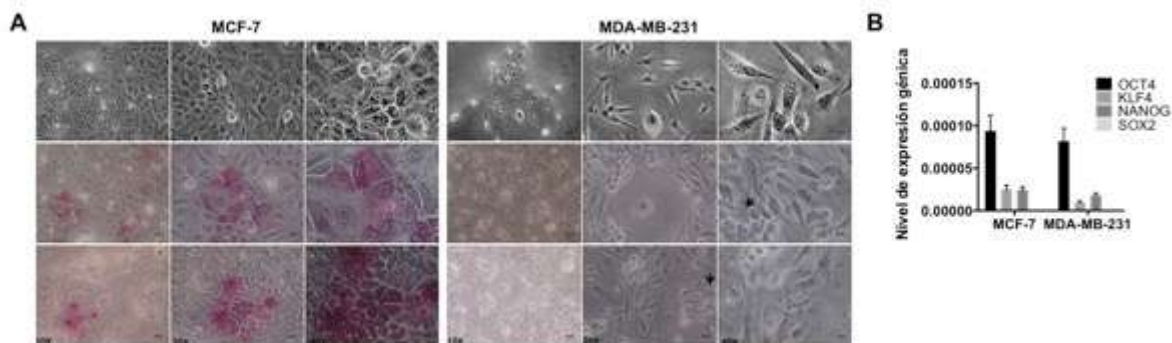


**Figura suplementaria 12.** Células MCF-7 tratadas con MeCoSe presentan mayor capacidad de migración. Ensayo de migración en Transwell realizado en células MCF-7 tratadas o no (control) con MeCoSe durante 5 días. Se utilizó 50 ng/ $\mu$ l de IL8 como quimioatrayente. Se muestra micrografías representativas (20X) de la membrana del filtro (superficie externa del filtro) teñida con cristal

violeta. La grafica de barras representa el número de células presentes en el compartimento inferior del filtro. Barras de error indican SEM. (\*\* $p < 0.01$ ).

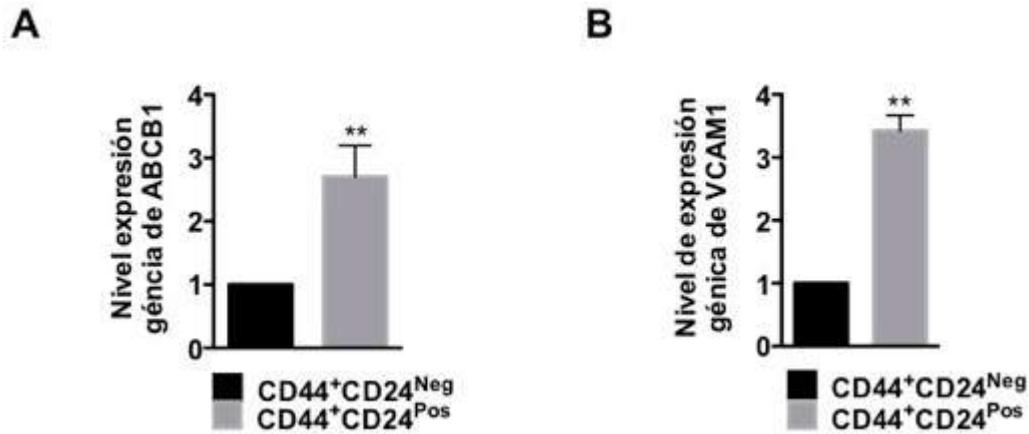


**Figura suplementaria 13. Evaluación de la capacidad de crecimiento de células MDA-MB-231.** (A). Cinética de crecimiento de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después de 5 días de cultivo. Barras de error indican SEM. (\*\* $p < 0.001$ ) ( $n=2$ ). (B). Histogramas representativos de la expresión de Ki-67 evaluada por FACS después de 3 y 5 días (histogramas izquierdo y derecho, respectivamente). Células MDA-MB-231 (línea gris), células MCF-7 (línea negra), blanco (histograma relleno) y control de isotipo (línea punteada).

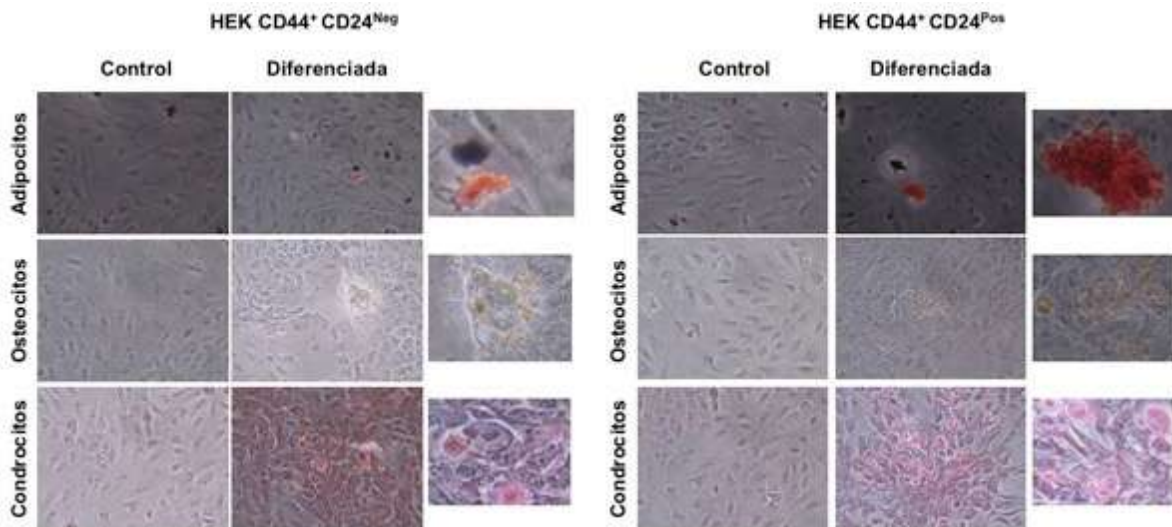


**Figura suplementaria 14. Las células MDA-MB-231 no presentaron capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico.** (A). La diferenciación hacia el linaje osteogénico se indujo con un medio de diferenciación específico y se evaluó después de 7 días de inducción mediante la marcación con un kit para determinar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Se muestran imágenes representativas (10, 20 y 40 X). Barra de escala, 10  $\mu$ m. Células sin medio de inducción se usaron como control. (B). El nivel de FTs asociados a reprogramación se determinó por qRT-PCR. Los valores se normalizaron a GAPDH. Barra de error indica SEM. ( $n=2$ )





**Figura suplementaria 15. Células CD44<sup>+</sup>CD24<sup>Pos</sup> mantienen la expresión de ABCB1 y VCAM en las condiciones de mamoesferas.** Evaluación por qRT-PCR de ABCB1 y VCAM en células obtenidas a partir de mamoesferas. Los valores se normalizaron a GAPDH. Barra de error indica SEM (\*\*p<0,01)



**Figura suplementaria 16. Evaluación temprana de la capacidad de diferenciación no revela diferencias claras entre las dos subpoblaciones.** Evaluación de la capacidad de diferenciación temprana (día 3) a adipo-condro- y osteocitos. La evaluación se realizó utilizando coloraciones específicas como se describió previamente.

## TABLAS

### Tabla suplementaria 1. Secuencias de genes utilizados

Nombre	F-Secuencia	R- Secuencia
<b>Marcadores epiteliales</b>		
E-CADHERINA	TGGACAGGGAGGATTTGAG	ACCCACCTCTAAGCCATCT
KR19	GAGCATGAAAGCTGCCTTGG	GGGCTTCAATACCGCTGATC
<b>Marcadores mesenquimales</b>		
CD44	TGCCGCTTTGCAGGTGTAT	GGCCTCCGTCCGAGAGA
VIMENTINA	CGAGGACGAGGAGAGCAGGATTTCTC	GGTATCAACCAGAGGGAGTGA
ZEB1	AAGAATTCACAGTGGAGAGAAGCCA	GGTTTCTTGCAGTTTGGGCATT
ZEB2	TATGGCCTACACCTACCCAAC	AGGCTGACATGTAGTCTGTG
TWIST 1	GGAGTCCGAGTCTTACGAG	TCTGGAGGACCTGGTAGAGG
TWIST 2	CTTATGTTTGGGGGAGGTT	TAGCCAAGCAATCACGGAGA
SNAIL 1	ACCACTATGCCGCGCTCTT	GGTCGTAGGGCTCTGGAA
SNAIL 2	TGTTGCAGTGAGGGCAAGAA	GACCTGGTTGCTTCAAGGA
<b>Marcadores de reprogramación</b>		
OCT4	AGTTTGTGCCAGGTTTTTG	CTTCACCTTCCCTCCAACC
NANOG	CCTGTGATTTGTGGGCCT	GACAGTCTCCGTGTGAGGCAT
SOX2	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG	TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC
KLF4	TATGACCACACTGCCAGAA	TGGGAACTTGACCATGATTG
LIN28	CAAAAGGAAAGAGCATGCAGAA	ATGATCTAGACCTCCAGAGTTGTAGC
<b>Marcadores asociados a diferenciación</b>		
PPAR $\gamma$	GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC	AACTCAAACCTGGGCTCCATAAAG
C/EBP-alpha	CTTGTGCCTTGAAATGCAA	GCTGTAGCCTCGGGAAGGA
Runx2	TTACCTACACCCCGCCAGTC	TGCTGGTCTGGAAGGGTCC
ALP	ATGGGATGGGTGTCTCCACA	CCACGAAGGGGAACCTTGTCT
AGGRECAN	CGAAACATCACTGAGGGTGAAG	GTGGCCTCTCCAGTCTCATTCT
SOX9	TTCCAAGACACAACATGA	AAAGTCCAGTTTCTCGTTGA
<b>Marcadores de células stem</b>		
ABCBI	TGCGACAGGAGATAGGCTG	GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT
<b>Citoquinas</b>		
IL6	GGAGACTTGCCTGGTGA AAA	GTCAGGGGTGGTTATTGCAT
IL8	TTGGCAGCCTTCTGATTTC	AACTTCTCCACAACCCTCTGCA
<b>Genes asociados a senescencia</b>		
p16 <sup>ink4</sup>	GAAGGTCCCTCAGACATCCCC	CCCTGTAGGACCTTCGGTGAC
P53	CTGCCCTCAACAAGATGTTTTG	CTATCTGAGCAGCGCTCATGG
p21	GCAGACCAGCATGACAGATT	GGATTAGGGCTTCTCTTGA
<b>Control interno</b>		
GAPDH	GACCCCTTCATTGACCTCAAC	CTTCTCCATGGTGGTGAAGA

## BIBLIOGRAFIA

Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol.* 2017; 232(8): 2008-18.

Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial- to-Mesenchymal Transition. *Trends in Cancer*. 2015; 1:44- 52.

Acosta JC, O’Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S., et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008; 133(6): 1006-18.

Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP., et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013; 15(8): 978-90.

Agiostatidou G, Hult J, Phillips GR, Hazan RB. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2007; 12(2–3): 127-33.

Agliano A, Calvo A, Box C. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2017; 44: 25-42.

Aguilera A, García-Muse T. Causes of genome instability. *Annu Rev Genet*. 2013; 47: 1-32.

Akrup N, Andersson D, Bom E, Gregersson P, Ståhlberg A, Landberg G. Identification of Distinct Breast Cancer Stem Cell Populations Based on Single-Cell Analyses of Functionally Enriched Stem and Progenitor Pools. *Stem Cell Reports*. 2016; 6(1): 121-36.

Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, André F, De Cremoux P., et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res*. 2013; 73(8): 2418-27.

Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*. 1993; 54: 1–78.

Aleskandarany MA, Negm OH, Green AR, Ahmed MA, Nolan CC, Tighe PJ., et al. Epithelial mesenchymal transition in early invasive breast cancer: an immunohistochemical and reverse phase protein array study. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 145(2): 339-48.

Albini A, Bruno A, Gallo C, Pajardi G, Noonan DM, Dallaglio K. Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity. *Connect Tissue Res*. 2015; 56(5): 414-25.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(7): 3983-8.

Althubiti M, Lezina L, Carrera S, Jukes-Jones R, Giblett SM, Antonov A, et al., Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death Dis*. 2014. 5: p. e1528.

Antonio N, Bønnelykke-Behrndtz ML, Ward LC, Collin J, Christensen IJ, Steiniche T., et al. The wound inflammatory response exacerbates growth of pre-neoplastic cells and progression to cancer. *EMBO J.* 2015; 34(17): 2219-36.

Aponte PM, Caicedo A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 5619472.

Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1223–31.

Arik D, Can C, Dündar E, Kabukçuoğlu S, Paşaoğlu Ö. Prognostic Significance of CD24 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2017; 23(2): 409-16.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J.* 2006; 20(12): 2093-101.

Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD., et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res.* 2011; 9(8): 997-1007.

Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001; 2(1): 81-94.

Axelrod R, Axelrod DE, Pienta KJ. Evolution of cooperation among tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(36): 13474-79.

Aziz MH, Manoharan HT, Verma AK. Protein kinase C epsilon, which sensitizes skin to sun's UV radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas, associates with Stat3. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1385-94.

Azzam DJ, Zhao D, Sun J, Minn AJ, Ranganathan P, Drews-Elger K., et al. Triple negative breast cancer initiating cell subsets differ in functional and molecular characteristics and in  $\gamma$ -secretase inhibitor drug responses. *EMBO Mol Med.* 2013; 5(10):1502-22.

Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay JY. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2003; 88(11): 1721–6.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; 357(9255): 539-45.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005; 7(3): 211-7.

Barshishat M, Ariel A, Cahalon L, Chowers Y, Lider O, Schwartz B. TNFalpha and IL-8 regulate the expression and function of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2002; 19(4): 327-37.

Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N., et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006; 444(7119): 633-7.

Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Research*. 2009; 69(7): 2878-86.

Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T., et al. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 2005; 65(23): 10783-93.

Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res*. 2006; 66(2): 794-802.

Beck B, Lapouge G, Rorive S, Drogat B, Desaedelaere K, Delafaille S. Different Levels of Twist1 Regulate Skin Tumor Initiation, Stemness, and Progression. *Cell Stem Cell*. 2015; 16(1): 67-79.

Bellone S, Watts K, Cane S, Palmieri M, Cannon MJ, Burnett A, et al. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2005; 98: 92-8.

Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2000; 7: 133-8.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A., et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008; 40(5): 499-507.

Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpe S., et al. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(21): 7157-62.

Bernal GM, Wahlstrom JS, Crawley CD, Cahill KE, Pytel P, Liang H., et al. Loss of Nfkb1 leads to early onset aging. *Aging (Albany NY)*. 2014; 6(11): 931-43.

Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, Pick-Franke P, Goulet R Jr, Badve S., et al. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer*. 2010; 10: 411.

Bhatia B, Multani AS, Patrawala L, Chen X, Calhoun-Davis T, Zhou J., et al. Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: Cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *International Journal of Cancer*. 2008; 122(7): 1483-95.

Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of periodontology*. 1993; 64(5 Suppl): 456-60.

Blanpain, C., Tracing the cellular origin of cancer. *Nat Cell Biol*, 2013; 15(2): 126-34.

Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell*. 2004; 3(4): 169-76.

Blick T, Widodo E, Hugo H, Waltham M, Lenburg ME, Neve RM., et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25(6): 629-42.

Block K, Gorin Y. Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer*. 2012; 12(9): 627-37.

Boiko AD, Razorenova OV, van de Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP., et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 2010; 466(7302): 133-7.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997; 3(7): 730-7.

Bonnomet A, Syne L, Brysse A, Feyereisen E, Thompson EW, Noël A., et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene*. 2012; 31(33): 3741-53.

Borges FT, Melo SA, Özdemir BC, Kato N, Revuelta I, Miller CA., et al. TGF- $\beta$ 1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24(3): 385-92.

Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer Cell*. 2012; 22(6): 699-701.

Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res*. 2006; 66(6): 2881-4.

Bretz N, Noske A, Keller S, Erbe-Hofmann N, Schlange T, Salnikov AV., et al. CD24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in a c-Src-dependent fashion. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29(1): 27-38.

Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. *Br Med Bull*. 1995; 51(2): 368-84.

Brod SA. Unregulated inflammation shortens human functional longevity. *Inflamm Res*. 2000; 49(11): 561-70.

Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, Ang M, Ahn D, Mimuro H, Sasakawa C. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2009; 69(2): 632-39.

Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J., et al. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2011; 121(3): 1064-74.

Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, Graziano ME, Ferrando U., et al. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 2006; 169(6): 2223-35.

Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY., et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med*. 2011; 208(3): 519-33.

Bussolati B, Bruno S, Grange C, Ferrando U, Camussi G. Identification of a tumor initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J*. 2008; 22(10): 3696-705.

Bussolati B, Dekel B, Azzarone B, Camussi G. Human renal cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2013; 338(1): 141-6.

Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*. 2000; 14(1):183-88.

Campisi J. Cancer and ageing: Rival demons? *Nature Rev Canc*. 2003; 3(5):339-49.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Rev Molec Cell Biol*. 2007; 8(9): 729-40.

Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 2011; 21(6): 354-9.

Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75: 685-705.

Cahu J, Bustany S, Sola B. Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death Dis*. 2012; 3: e446.

Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C. Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1028: 1-13.

Castro-Vega LJ, Jouravleva K, Liu WY, Martinez C, Gestraud P, Hupé P., et al. Telomere crisis in kidney epithelial cells promotes the acquisition of a microRNA signature retrieved in aggressive renal cell carcinomas. *Carcinogenesis.* 2013; 34(5): 1173-80.

Castro-Vega LJ, Jouravleva K, Ortiz-Montero P, Liu WY, Galeano JL, Romero M et al. The senescent microenvironment promotes the emergence of heterogeneous cancer stem-like cells. *Carcinogenesis.* 2015; 36(10): 1180-92.

Carstens JL, Lovisa S, Kalluri R. Microenvironment-dependent cues trigger miRNA-regulated feedback loop to facilitate the EMT/MET switch. *J Clin Invest.* 2014; 124(4): 1458-60.

Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999; 10(1): 105-15.

Celià-Terrassa T, Meca-Cortés O, Mateo F, Martínez de Paz A, Rubio N, Arnal-Estapé A., et al. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest.* 2012; 122(5): 1849-68.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P., et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* 2009; 69(4): 1302-13.

Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO., et al. Normal and neoplastic non-stem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(19): 7950-5.

Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011; 331(6024): 1559-64.

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

Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35(4): 645-54.

Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(1 Suppl 1): S20-5.



Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissiere F, Laune D et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(1): R15.

Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* 2013; 34(6): 732-40.

Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn YH, Byers LA., et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun.* 2014; 5: 5241.

Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE., et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 2011; 25(20): 2125-36.

Chigurupati S, Arumugam TV, Son TG, Lathia JD, Jameel S, Mughal MR., et al. Involvement of Notch Signaling in Wound Healing. *PLoS ONE.* 2007; 2(11): e1167.

Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J et al. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov.* 2017. *Nat Rev Drug Discov.* 2017; 16(10): 718-35.

Chockley PJ, Keshamouni VG. Immunological Consequences of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *J Immunol.* 2016; 197(3): 691-8.

Choi YL, Yan HX, Lee SJ, Park SM, Kim WJ, Kim HJ, et al. Enhanced CD24 Expression in Colorectal Cancer Correlates with Prognostic Factors. *J Pathol Transl Med.* 2006; 40(2):103-11.

Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH., et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 2258-64.

Choi Y, Lee HJ, Jang MH, Gwak JM, Lee KS, Kim EJ., et al. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Hum Pathol.* 2013; 44(11): 2581-9.

Chung JK, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(11): 6508-16.

Cidado J, Wong HY, Rosen DM, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG., et al. Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget.* 2016; 7(5): 6281-93.

Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 36: 13-22.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL., et al. Cancer stem cells- perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66(19): 9339-44.

Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, Findlay J. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer.* 2009; 100(1): 134-44.

Collado, M, Serrano, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature reviews. Cancer.* 2006; 6(6): 472-76.

Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell.* 2007; 130(2): 223-33.

Collins CJ, Sedivy JM. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell.* 2003; 2(3): 145-50.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 10946-51.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009; 30(7):1073-81.

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J., et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008; 6(12): 2853–68.

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S., et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9188.

Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A and Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:99-118.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420(6917): 860-7.

Cram DS, McIntosh A, Oxbrow L, Johnston AM, DeAizpurua HJ. Differential mRNA display analysis of two related but functionally distinct rat insulinoma (RIN) cell lines: identification of CD24 and its expression in the developing pancreas. *Differentiation.* 1999; 64: 237-46.

Cui Y, Li YY, Li J, Zhang HY, Wang F, Bai X., et al. STAT3 regulates hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition in oesophageal squamous cell cancer. *Oncol Rep.* 2016; 36 (1): 108-16.

Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Journal of Signal Transduction*. 2012: 646354.

Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem*. 2005; 95: 497-505.

Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergent PA, Koulouris CR, Friel AM., et al. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer. *Stem Cells*. 2009; 27(12): 2875-83.

D'Anello L, Sansone P, Storci G, Mitrugno V, D'Uva G, Chieco P, Bonafé M. Epigenetic control of the basal-like gene expression profile via Interleukin-6 in breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2010; 9: 300.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW., et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(24): 10158-63.

Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(2): 273-83.

Davoli T, Denchi EL, de Lange T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell*. 2010; 141(1): 81-93.

Davoli T, Xu AW, Mengwasser KE, Sack LM, Yoon JC, Park PJ., et al. Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell*. 2013; 155(4): 948-62.

Darwish NS, Kim MA, Chang MS, Lee HS, Lee BL, Kim YI, et al. Prognostic significance of CD24 expression in gastric carcinoma. *Cancer Res Treat*. 2004; 36(5): 298-302.

Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(4): 275-84.

De Herreros AG, Baulida J. Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*; 2012: 1825: 223-8.

De Larco JE, Wuertz BR, Rosner KA, Erickson SA, Gamache DE, Manivel JC., et al. A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am J Pathol*. 2001; 158(2): 639-46.

Denecker G, Vandamme N, Akay O, Koludrovic D, Taminau J, Lemeire K., et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ*. 2014; 21(8): 1250-61.

Dethlefsen C, Højfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 138(3): 657-64.

Di GH, Liu Y, Lu Y, Liu J, Wu C, Duan HF. IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells. *PLoS ONE*. 2014; 9(11): e113572.

Dick JE, Lapidot T, Pflumio F. Transplantation of normal and leukemic human bone marrow into immune-deficient mice: development of animal models for human hematopoiesis. *Immunol Rev*. 1991; 124: 25-43.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ., et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003; 17(10): 1253-70.

Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005; 10(1): 75-86.

Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L., et al. Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. *Cell Mol Immunol*. 2007; 4(6): 467-72.

Drasin DJ, Guarnieri AL, Neelakantan D, Kim J, Cabrera JH, Wang CA., et al. TWIST1-Induced miR-424 Reversibly Drives Mesenchymal Programming while Inhibiting Tumor Initiation. *Cancer Res*. 2015; 75(9): 1908-21.

Duan JJ, Qiu W, Xu SL, Wang B, Ye XZ, Ping YF., et al. Strategies for isolating and enriching cancer stem cells: well begun is half done. *Stem Cells Dev*. 2013; 22(16): 2221-39.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001; 48(4): 526-35.

Emadi Baygi M, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biol Toxicol*. 2010; 26(6): 553-67.

Ernst M, Putoczki TL. Stat3: linking inflammation to (gastrointestinal) tumourigenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012; 39(8): 711-8.

Espinoza I, Pochampally R, Xing F, Watabe K, Miele L. Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets and Therapy*. 2013; 6: 1249-59.

Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Morales-Montor J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. *J Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(1): 1-16.

Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*. 2010; 7(2): 100-3.

Fan CW, Wen L, Qiang ZD, Chen T, Zhou ZG, Mo XM., et al. Prognostic significance of relevant markers of cancer stem cells in colorectal cancer: A meta analysis. *Hepatogastroenterology*. 2012; 59(117): 1421-27.

Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res*. 2011; 71(15): 5296-5306.

Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008; 10: R25.

Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L., et al. CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett*. 1999; 143(1): 87-94.

Floor S, van Staveren WC, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene*. 2011; 30(46): 4609-21.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006; 1(5): 2315-9.

Fraser DM, Sullivan FM, Thompson AM, McCowan C. Aspirin use and survival after the diagnosis of breast cancer: a population-based cohort study. *Br J Cancer*. 2014; 111(3): 623-7.

Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A., et al. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor- negative status of breast cancer cells. *Oncogene*. 2003; 22(2): 256-65.

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4): 298-306.

Friedl P, Alexander S. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell*. 2011; 147(5): 992-1009.

Frisch SM, Schaller M, Cieply B. Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 1): 21-9.

Fontanini G, Campani D, Roncella M, Cecchetti D, Calvo S, Toniolo A., et al. Expression of interleukin 6 (IL-6) correlates with oestrogen receptor in human breast carcinoma. *Br J Cancer*. 1999; 80(3-4): 579-84.

Foster SA, Wong DJ, Barrett MT, Galloway DA. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(4): 1793-801.

Fulciniti M, Hideshima T, Vermot-Desroches C, Pozzi S, Nanjappa P, Shen Z, et al. A high-affinity fully human anti-IL-6 mAb, 1339, for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 7144-52.

Gao D, Vahdat LT, Wong S, Chang JC, Mittal V. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer Res.* 2012; 72(19): 4883-9.

Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013; 14(10): 1014-22.

Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. *Histopathology.* 2005; 47: 82-9.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012; 366: 883-92.

Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, Sahai E. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 1287-96.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(5): 555-67.

Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M., et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest.* 2010; 120(2): 485-97.

Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M., et al. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med.* 2015; 21(9): 989-97.

Grosse-Wilde A, Fouquier d'Herouei A, McIntosh E, Ertaylan G, Skupin A, Kuestner RE, et al. Stemness of the hybrid epithelial/mesenchymal state in breast cancer and its association with poor survival. *PLoS One.* 2015; 10: e0126522.

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G., et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008; 10:593-601.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ., et al. IKKβ links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004; 118(3): 285-96.

Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S., et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009; 15(2): 103-13.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883-99.

Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C., et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011; 146(4): 633-44.

Gupta RG, Somer RA. Intratumor Heterogeneity: Novel Approaches for Resolving Genomic Architecture and Clonal Evolution. *Mol Cancer Res*. 2017; 15(9): 1127-37.

Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z and Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012; 38(7): 904-910.

Guo W. Concise review: breast cancer stem cells: regulatory networks, stem cell niches, and disease relevance. *Stem Cells Transl Med*. 2014; 3(8): 942-48.

Hai J, Zhu CQ, Bandarchi B, Wang YH, Navab R, Shepherd FA., et al. L1 cell adhesion molecule promotes tumorigenicity and metastatic potential in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(7): 1914-24.

Halleux C, Sottile V, Gasser JA, Seuwen K. Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001; 2(1): 71-76.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74.

Hartman ZC, Poage GM, den Hollander P, Tsimelzon A, Hill J, Panupinthu N., et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res*. 2013; 73(11): 3470-80.

Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995; 154(1): 8-20.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965; 37: 614-36.

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6- type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998; 334(Pt 2): 297-314.

Herrera-Gayol A, Jothy S. Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44. *Experimental and molecular pathology*. 1999; 66(2): 149-56.

- Herbert CA, Baker JB. Interleukin - 8: a review. *Cancer Invest.* 1993; 11: 743-50.
- Hinohara K, Gotoh N. Inflammatory signaling pathways in self-renewing breast cancer stem cells. *Current Opinion in Pharmacology.* 2010; 10(6): 650-54.
- Hirano T, Nakajima K, Hibi M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8(4): 241-52.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000; 19(21): 2548-56.
- Hiscox S, Baruha B, Smith C, Bellerby R, Goddard L, Jordan N. Overexpression of CD44 accompanies acquired tamoxifen resistance in MCF7 cells and augments their sensitivity to the stromal factors, heregulin and hyaluronan. *BMC Cancer.* 2012. 12: 458.
- Holliday DL and Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(4): 215.
- Hollier BG, Evans K, Mani SA. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: A coalition against cancer therapies. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 2009; 14(1): 29-43.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991; 253(5015): 49–53.
- Hornsby PJ. Cellular senescence and tissue aging in vivo. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2002. 57(7): B251-6.
- Huang S, Guo W, Tang Y, Ren D, Zou X, Peng X. miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 2012; 28:1831-37.
- Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. IL1- and TGF $\beta$ -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Aging (Albany NY).* 2012; 4(12): 932-51.
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell.* 2009; 139(4): 693-706.
- Iliopoulos D, Jaeger SA, Hirsch HA, Bulyk ML, Struhl K. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell.* 2010; 39(4): 493-506.
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(4): 1397–402.



Imrich, S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr.* 2012; 6(1): 30-8.

Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M., et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 139(2): 539-52.

Iwamaru A, Szymanski S, Iwado E, Aoki H, Yokoyama T, Fokt I., et al. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2007; 26(17): 2435-44.

Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. *Cancer Res.* 1999; 59(12): 2957-64.

Jee SH, Chu CY, Chiu HC, Huang YL, Tsai WL, Liao YH., et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: 1169-75.

Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev.* 2007; 128(1): 36-44.

Jia D, Tan Y, Liu H1, Ooi S, Li L, Wright K., et al. Cardamonin reduces chemotherapy-enriched breast cancer stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2016; 7(1): 771-85.

Jiang XP, Yang DC, Elliott RL, Head JF. Down-regulation of expression of interleukin-6 and its receptor results in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2011; 31(9): 2899-906.

Jolly MK, Huang B, Lu M, Mani SA, Levine H, Ben-Jacob E. Towards elucidating the connection between epithelial-mesenchymal transitions and stemness. *Journal of the Royal Society Interface.* 2014; 11(101): 20140962.

Jolly MK, Boareto M, Huang B, Jia D, Lu M, Ben-Jacob E., et al. Implications of the hybrid epithelial/ mesenchymal phenotype in metastasis. *Front Oncol.* 2015; 5: 155.

Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, Mooney SM, Celiktas M, Hanash SM., et al. Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget.* 2016; 7(19): 27067-84.

Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle.* 2011; 10(17): 2865-73.

Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2015; 7(1): 1-11.

Jung K, Gupta N, Wang P, Lewis JT, Gopal K, Wu F., et al. Triple negative breast cancers comprise a highly tumorigenic cell subpopulation detectable by its high responsiveness to a Sox2 regulatory region 2 (SRR2) reporter. *Oncotarget*. 2015; 6(12):10366-373.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119(6): 1420-28.

Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis*. 2006-2007; 26: 75-85.

Katsuno Y, Lamouille S and Derynck R. TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*. 2013; 25(1): 76-84.

Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci*. 1996; 1: d340-57.

Kiesslich T, Pichler M, Neureiter D. Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer. *Mol Clin Oncol*. 2013; 1(1): 3-11.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266(5193): 2011-5.

Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Mccarty M, Shih N, Fidler IJ. Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia*. 2001; 3(1): 33-42.

Kim NH, Kim HS, Li XY, Lee I, Choi HS, Kang SE., et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 2011; 195(3): 417-33.

Kim SY, Kang JW, Song X, Kim BK, Yoo YD, Kwon YT. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell Signal*. 2013; 25(4): 961-69.

Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med*. 2016; 22(2): 128-34.

Kim WT, Ryu CJ1. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep*. 2017; 50(6): 285-98.

Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H., et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol*. 1998; 152(1): 93-100.

Knüpfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 102(2): 129-35.

Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM, Worthen GS, Johnson GL: Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1996; 271: 2832-38.

Knall C, Worthen GS, Johnson GL: Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(7): 3052-7.

Knoepp SM, Kunju LP, Roh MH. Utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of renal cell carcinoma in diagnostic cytology. *Diagn Cytopathol.* 2012; 40(8): 667-72.

Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. 2013. *JAKSTAT.* 2013; 2(4): e25763.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1):189-195.

Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S, Sarkar FH. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One.* 2010; 5(8): e12445.

Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2011; 121(10): 3804-9.

Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S., et al. Activation of an IL6 Inflammatory Loop Mediates Trastuzumab Resistance in HER2+ Breast Cancer by Expanding the Cancer Stem Cell Population. *Molecular Cell.* 2012; 47(4): 570-84.

Korpál M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celia-Terrassa T., et al. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med.* 2011; 17(9): 1101-08.

Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H., et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol.* 2017; 19(5): 518-29.

Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am. J. Pathol.* 2002; 161 (4): 1215-21.

Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C., et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(13): 4906-13.

Kristiansen G, Schluns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 2003; 88(2): 231-6.

Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol.* 2004; 35(3): 255-62.

Kristiansen G, Machado E, Bretz N, Rupp C, Winzer KJ, Konig AK, et al. Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest.* 2010; 90 (7):1102-16.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY and Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(21):12072-77.

Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell.* 2009; 15(3): 195-206.

Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell- dependent tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(10): 3367-77.

Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ and Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008; 133(6):1019-31.

Kuilman T, Peeper DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 81-94.

Kundu JK, Surh YJ. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Rad. Biol. Med.* 2012; 52(9): 2013-37.

Kwon MJ, Han J, Seo JH, Song K, Jeong HM, Choi JS., et al. CD24 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Luminal A and Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS One,* 2015. 10(10): p. e0139112.

Lauta VM. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine.* 2001; 16: 79-86.

Landen CN Jr, Lin YG, Armaiz Pena GN, Das PD, Arevalo JM, Kamat AA. Neuroendocrine modulation of signal transducer and activator of transcription-3 in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(21): 10389-96.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(3): 178-96.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J., et al., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994; 367(6464): 645-48.

Lasry A, Ben-Neriah Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends Immunol.* 2015; 36(4): 217-28.

Lau WM, Teng E, Chong HS, Lopez KA, Tay AY, Salto-Tellez M., et al. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Res.* 2014; 74(9): 2630-41.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006; 172(7): 973-81.

Lee HJ, Kim DI, Kwak C, Ku JH, Moon KC. Expression of CD24 in clear cell renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Urology.* 2008; 72 (3): 603-07.

Lee JH, Kim SH, Lee ES, Kim YS. CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis. *Oncol Rep.* 2009; 22(5):1149-56.

Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell.* 2011; 9(1): 50-63.

Lehmann C, Jobs G, Thomas M, Burtscher H, Kubbies M. Established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int J Oncol.* 2012; 41(6): 1932-42.

Leibovich-Rivkin T, Liubomirski Y, Bernstein B, Meshel T, Ben-Baruch A. 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): 1330-46.

Levine AJ, Puzio-Kuter AM, Chan CS, Hainaut P. The Role of the p53 Protein in Stem-Cell Biology and Epigenetic Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016; 6(9). pii: a026153.

Levine AJ, Greenbaum B. The maintenance of epigenetic states by p53: the guardian of the epigenome. *Oncotarget.* 2012; 3(12): 1503-4.

Li F, Tiede B, Massague J and Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007; 17(1):3-14.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1030-7.

Li L, Gao Y, Zhang LL, DL. Concomitant activation of the JAK/STAT3 and ERK1/2 signaling is involved in leptin-mediated proliferation of renal cell carcinoma Caki-2 cells. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7(11): 1787-92.

Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H., et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2010; 7(1): 51-63.

Lin Y, Huang R, Chen L, Li S, Shi Q, Jordan C and Huang RP. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int J Cancer.* 2004; 109(4): 507-515.

Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH., et al. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med.* 2009; 15: 907-13.

Lim J, Lee KM, Shim J, Shin I. CD24 regulates stemness and the epithelial to mesenchymal transition through modulation of Notch1 mRNA stability by p38MAPK. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 558: 120-6.

Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* 2007; 67(7): 3117–26.

Liu X, Fan D. The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Curr Pharm Des.* 2015; 21(10): 1279-91.

Liu Y, Nenutil R, Appleyard MV, Murray K, Boylan M, Thompson AM., et al. Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *Br J Cancer.* 2014; 110(8): 2063-71.

Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2010; 28(25): 4006–12.

Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadrnagara K, Carstens JL., et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015; 21(9): 998-1009.

Luo F, Liu T, Wang J, Li J, Ma P, Ding H, Feng G, Lin D, Xu Y and Yang K. Bone marrow mesenchymal stem cells participate in prostate carcinogenesis and promote growth of prostate cancer by cell fusion in vivo. *Oncotarget.* 2016; 7(21): 30924-34.

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

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203): 436-44.

Manuel Iglesias J, Beloqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguiara A., et al. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS One*. 2013; 8(10): e77281.

Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem*. 2013; 59(1): 168-79.

Mason DX, Jackson TJ, Lin AW. Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene*. 2004; 23(57): 9238-46.

Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y., et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 103(6): 2332-6.

Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet*. 1992; 340(8827): 1053-8.

May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W and Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(1):202.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203): 428-35.

Mehrazma M, Z Madjd, E Kalantari, M Panahi, A Hendi and A Sharifabrizi. Expression of stem cell markers, CD133 and CD44, in pediatric solid tumors: a study using tissue microarray. *Fetal Pediatr Pathol*. 2013; 32(3): 192-204.

Mendoza-Villanueva D, Zeef L and Shore P. Metastatic breast cancer cells inhibit osteoblast differentiation through the Runx2/CBFBeta-dependent expression of the Wnt antagonist, sclerostin. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(5): R106.

Meng X, Li M, Wang X, Wang Y, Ma D. Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. 2009; 100: 1040-46.

Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(7): 1126-67.

Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016; 81(Pt A): 166-173.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S and Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008; 3(8): e2888.

- Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol.* 2004; 110(3): 252-66.
- Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009; 69(14): 5627-9.
- Mumcuoglu M, Bagislar S, Yuzugullu H, Alotaibi H, Senturk S, Telkoparan P. The ability to generate senescent progeny as a mechanism underlying breast cancer cell heterogeneity. *PLoS One.* 2010; 5(6): e11288.
- Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2002; 39(6): 527-79.
- Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol.* 2008; 18(4): 260-7.
- Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol.* 2016; 11: 47-76.
- Negrier S, Perol D, Menetrier-Caux C, Escudier B, Pallardy M, Ravaud A, et al. Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6 – from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2371–8.
- Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C and von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell.* 2012; 11(2): 345-49.
- Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2002; 3(3): 155-66.
- Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016; 166(1): 21-45.
- Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G., et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer.* 2011; 128(9): 2038–49.
- Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S., et al. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene.* 2014; 30; 33(5): 643-52.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976; 194(4260): 23-8.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(4): 274-84.



- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445(7123): 106-10.
- O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res*. 2010; 16(12): 3113-20.
- Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S., et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*. 2012; 22(6): 709-24.
- Odenthal J, Takes R, Friedl P. Plasticity of tumor cell invasion-governance by growth factors and cytokines. *Carcinogenesis*. 2016; 37(12): 1117-28.
- Ombrato L, Malanchi I. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. *Crit Rev Oncog*. 2014; 19(5): 349-61.
- Ortiz-Montero P, Londoño-Vallejo A, Vernot JP. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun Signal*. 2017; 15(1): 17.
- Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, Kawada K, Hasegawa S, Okabe H., et al. Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One*. 2014; 9(7): e101735.
- Ozcan A, de la Roza G, Ro JY, Shen SS, Truong LD. PAX2 and PAX8 expression in primary and metastatic renal tumors: a comprehensive comparison. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136(12): 1541-51.
- Park J, Schwarzbauer JE. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2014; 33(13):1649-57.
- Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 3): 485-96.
- Passalidou E, Trivella M, Singh N, Ferguson M, Hu J, Cesario A., et al. Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2002; 86: 244-49.
- Pastrana E, V Silva-Vargas and F Doetsch. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011; 8(5): 486-98.
- Philip B, Ito K, Moreno-Sánchez R, Ralph SJ. HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic. *Carcinogenesis*. 2013; 34(8): 1699-707.

Prasetyanti PR, Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer*. 2017; 16(1): 41.

Penson RT, Kronish K, Duan Z, Feller AJ, Stark P, Cook SE., et al. Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *Int J Gynecol Cancer*. 2000; 10: 33–41.

Perry VH. Innate inflammation in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(9): a009373.

Pietras A, Katz AM, Ekström EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL., et al. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3): 357-69.

Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1219-24.

Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J. Clin. Invest*. 2011; 121: 3786-88.

Pribluda A, Elyada E, Wiener Z, Hamza H, Goldstein RE, Biton M., et al. A senescence-inflammatory switch from cancer-inhibitory to cancer-promoting mechanism. *Cancer Cell*. 2013; 24(2): 242-56.

Rao SG, Jackson JG. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer*. 2016; 2(11): 676-687.

Reynolds BA, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*. 1996; 175(1): 1-13.

Rheinbay E, Suvà ML, Gillespie SM, Wakimoto H, Patel AP, Shahid M, et al. An aberrant transcription factor network essential for Wnt signaling and stem cell maintenance in glioblastoma. *Cell Reports*. 2013; 3:1567-79.

Ritschka B, Storer M, Mas A, Heinzmann F, Ortells MC, Morton JP Sansom OJ et al. The senescence associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev*. 2017; 31(2): 172-183.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C., et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007; 445(7123): 111-5.

Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR., et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009; 11(8): 973-79.

Rodríguez VM, Vernot JP. Bone marrow mesenchymal stromal cells increase and maintain CD34+CD117 myeloid progenitors from human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex-vivo expansion. *Cell Mol Biol Lett*. 2013; 18: 11-33.

Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2011; 377(9759): 31-41.

Ruscetti M, Quach B, Dadashian EL, Mulholland DJ, Hong W. Tracking and functional characterization of epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal tumor cells during prostate cancer metastasis. *Cancer Res*. 2015; 75(13): 2749-59.

Ruhland MK, Coussens LM, Stewart SA. Senescence and cancer: An evolving inflammatory paradox. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1865(1): 14-22.

Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer*. 2003; 103: 642-6.

Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 883-90.

Sanguinetti A, Santini D, Bonafe M, Taffurelli M and Avenia N. Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment. *World J Surg Oncol*. 2015; 13:129.

Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M., et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest*. 2007; 117(12): 3988-4002.

Santer FR, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta IT. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr-relat cancer*. 2010; 17: 241-53.

Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS and Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells*. 2012; 30(2): 292-303.

Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE, Hall BM. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *FASEB J*. 2007; 21(13): 3763-70.

Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2008; 9(8): 628-38.

Scheel C, Weinberg RA. Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells?. *Int J Cancer*. 2011; 129(10): 2310-4.

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

Schmidt JM, Panzilius E, Bartsch HS, Irmeler M, Beckers J, Kari V., et al. Stem-cell like properties and epithelial plasticity arise as stable traits after transient Twist1 activation. *Cell Rep*. 2015; 10(2): 131-9.

Schnabl B, Purbeck, CA, Choi, YH, Hagedorn, CH, Brenner, D. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*. 2003; 37(3): 653-64.

Schneider MR, Hoeflich A, Fischer JR, Wolf E, Sordat B, Lahm H. Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2000; 151(1): 31-38.

Schliekelman MJ, Taguchi A, Zhu J, Dai X, Rodriguez J, Celiktas M., et al. Molecular portraits of epithelial, mesenchymal and hybrid states in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer Res*. 2015; 75(9): 1789-800.

Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(24): 12160-4.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997; 88(5): 593-602.

Sethi N, Dai X, Winter CG, Kang Y. Tumor-derived Jagged1 Promotes Osteolytic Bone Metastasis of Breast Cancer by Engaging Notch Signaling in Bone Cells. *Cancer Cell*. 2011; 19(2): 192-205.

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

Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997; 33(5): 787-91.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH., et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006; 8(5): R59.

Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14(10): 611-29.

Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, et al. Humanized anti- interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(17): 5426-34.

Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F., et al. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res.* 2002; 62: 560-66.

Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T., et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008; 118(6): 2111-20.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(18): 5821-8.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T., et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432(7015): 396-401.

Singh JK, Simoes BM, Howell SJ, Farnie G, Clarke RB. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(4): 210.

Smith SC, Oxford G, Wu Z, Nitz MD, Conaway M, Frierson HF., et al. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(4): 1917-22.

Smith BN, Bhowmick NA. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J Clin Med.* 2016 Jan 27;5(2). pii: E17.

Smyth MJ. Multiple approaches to immunotherapy - the new pillar of cancer treatment. *Immunol Cell Biol.* 2017; 95(4): 323-324.

Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Molecular pathology.* 1998; 51(4):191-200.

Speirs V, Kerin MJ, Walton DS, Newton CJ, Desai SB, Atkin SL. Direct activation of oestrogen receptor-alpha by interleukin-6 in primary cultures of breast cancer epithelial cells. *Br J Cancer.* 2000; 82(7): 1312-16.

Spillane JB, Henderson MA. Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg.* 2007; 77 (6): 464-8.

Strauss R, Li Z-Y, Liu Y, Beyer I, Persson J, Sova P, et al. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One.* 2011; 6: e16186.

Streicher SA, Yu H, Lu L, Kidd MS, Risch HA. Case-control study of aspirin use and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23(7): 1254-63.

Songur N, Kuru B, Kalkan F, Ozdilekcan C, Cakmak H, Hizel N. Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumori*. 2004; 90: 196–200.

Sulaiman A, Yao Z, Wang L. Re-evaluating the role of epithelial-mesenchymal-transition in cancer progression. *The Journal of Biomedical Research*, 2017; 31(0): 1-10.

Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N., et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2009; 28(33): 2940-47.

Su YJ, Lai HM, Chang YW, Chen GY, Lee JL. Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. *EMBO J*. 2011; 30(15): 3186-99.

Swetha G, Chandra V, Phadnis S, Bhonde R. Glomerular parietal epithelial cells of adult murine kidney undergo EMT to generate cells with traits of renal progenitors. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(2): 396-413.

Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 3041-6.

Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R., et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009; 27(5): 1006-20

Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013; 19(11): 1438-49.

Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J., et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15449-54.

Terui Y, Ikeda M, Tomizuka H, Kasahara T, Ohtsuki T, Uwai M., et al. Activated endothelial cells induce apoptosis in leukemic cells by endothelial interleukin-8. *Blood*. 1998; ;92(8): 2672-80.

Terris B, Cavard C, Perret C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2010; 52 (2): 280-81.

Thapa R, Wilson GD2. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int*. 2016; 2016: 2087204.

Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridaki Z, Mavroudis D., et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2010; 288(1): 99-106.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.* 2009; 139(5): 871-90.

Tian X-J, Zhang H, Xing J. Coupled reversible and irreversible bistable switches underlying TGF $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Biophys J.* 2013; 105(4): 1079-89.

Toso A, Revandkar A, Di Mitri D, Guccini I, Proietti M, Sarti M., et al. Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep.* 2014; 9(1): 75-89.

Tran HD, Luitel K, Kim M, Zhang K, Longmore GD, Tran DD. Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Res.* 2014; 74(21): 6330-40.

Trivanović D, Jauković A, Krstić J, Nikolić S, Okić Djordjević I, Kukulj T., et al. Inflammatory cytokines prime adipose tissue mesenchymal stem cells to enhance malignancy of MCF-7 breast cancer cells via transforming growth factor- $\beta$ 1. *IUBMB Life.* 2016; 68(3): 190-200.

Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell.* 2012; 22(6): 725-36.

Turaga SM, Lathia JD. Adhering towards tumorigenicity: altered adhesion mechanisms in glioblastoma cancer stem cells. *CNS Oncol.* 2016; 5(4): 251-9.

Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23 (28): 7212-20.

Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(26): 3831-52.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 235-71.

Vincent T, Mehti N. IL-6 regulates CD44 cell surface expression on human myeloma cells. *Leukemia.* 2004; 18(5): 967-75.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer.* 2008; 8(10): 755-68.

Wahl GM, Spike BT. Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intratumoral heterogeneity. *NPJ Breast Cancer.* 2017; 3: 14.

Wakahara R, Kunimoto H, Tanino K, Kojima H, Inoue A, Shintaku H., et al. Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells*. 2012; 17(2): 132-45.

Wang SJ, Wreesmann VB, Bourguignon LY. Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck*. 2007; 29(6): 550-58.

Wang PC, Weng CC, Hou YS, Jian SF, Fang KT, Hou MF., et al. Activation of VCAM-1 and its associated molecule CD44 leads to increased malignant potential of breast cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3): 3560-79.

Wang R, Lv Q, Meng W, Tan Q, Zhang S, Mo X, Yang X. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis*. 2014; 6(6): 829-37.

Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(21): 6735-6741.

Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*. 2003; 22: 1517-27.

Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A., et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*. 2009; 11(12): 1487-95.

Wendt MK, Balanis N, Carlin CR, Schiemann WP. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas. *JAKSTAT*. 2014; 3(1): e28975.

Wicha MS. Cancer stem cell heterogeneity in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008; 10(2): 105.

Wolf K, Friedl P. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol*. 2006; 154 Suppl 1:11-5.

Wu D, LaRosa GJ, Simon MI. G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science*. 1993; 261: 101-103.

Wu J, Niu J, Li X, Wang X, Guo Z, Zhang F. TGF- $\beta$ 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Developmental Biology*. 2014; 14:21.

Wu Y, Antony S, Meitzler JL, Doroshov JH. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer Lett*. 2014; 345(2): 164-73.



- Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12(4):375-391.
- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell.* 2009; 137: 647-58.
- Xu X, Chai S, Wang P, Zhang C, Yang Y, Wang K. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett.* 2015; 369(1): 50-7.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V., et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007; 445(7128): 656-60.
- Yamazaki J, Estecio MR, Lu Y, Long H, Malouf GG, Graber D, et al. The epigenome of AML stem and progenitor cells. *Epigenetics.* 2013; 8: 92-104.
- Yan W, Chen Y, Yao Y, Zhang H, Wang T. Increased invasion and tumorigenicity capacity of CD44+/CD24- breast cancer MCF7 cells in vitro and in nude mice. *Cancer Cell Int.* 2013. 13(1): 62.
- Yao C, Lin Y, Ye CS, Bi J, Zhu YF, Wang SM. Role of interleukin-8 in the progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Chin Med J (Engl).* 2007; 120(20): 1766-72.
- Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2011; 9(12): 1608-20.
- Yang Z, Schmitt JF and Lee EH. Immunohistochemical analysis of human mesenchymal stem cells differentiating into chondrogenic, osteogenic, and adipogenic lineages. *Methods Mol Biol.* 2011; 698:353-366.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C., et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004; 117(7): 927-39.
- Yang G, Quan Y, Wang W, Fu Q, Wu J, Mei T., et al. Dynamic equilibrium between cancer stem cells and non-stem cancer cells in human SW620 and MCF-7 cancer cell populations. *Br J Cancer.* 2012; 106 (9): 1512-9.
- Yang Z, Wang Z, Fan Y, Zheng Q. Expression of CD133 in SW620 colorectal cancer cells is modulated by the microenvironment. *Oncol Lett.* 2012; 4(1): 75-79.
- Yang WH, Lan HY, Huang CH, Tai SK, Tzeng CH, Kao SY., et al. RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nat Cell Biol.* 2012; 14(4): 366-74.

- Yang CH, Wang HL, Lin YS, Kumar KP, Lin HC, Chang CJ., et al. Identification of CD24 as a cancer stem cell marker in human nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*. 2014. 9(6): e99412.
- Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4(9): 1033-43.
- Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol*. 2015; 25(11): 675-86.
- Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(8): 3722-7.
- Yoneda J, Kuniyasu H, Crispens MA, Price JE, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90(6): 447-54.
- Yoon YS, Lee JH, Hwang SC, Choi KS, Yoon G: TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene*. 2005; 24(11): 1895-03.
- Yuan A, Chen JJ, Yao PL and Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*. 2005; 10:853-865.
- Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9(11): 798–809.
- Zacarias-Fluck MF, Morancho B, Vicario R, Luque Garcia A, Escorihuela M, Villanueva J, Rubio IT and Arribas J. Effect of cellular senescence on the growth of HER2-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2015; 107(5).
- Zhang C, F Guo, G Xu, J Ma, F Shao. STAT3 cooperates with Twist to mediate epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2015; 33(4): 1872-82.
- Zhi XS, Xiong J, Zi XY and Hu YP. The potential role of liver stem cells in initiation of primary liver cancer. *Hepatol Int*. 2016; 10(6): 893-901.
- Zhang C, Li C, He F, Cai Y, Yang H. Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. 2011; *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011; 137(11): 1679-86.
- Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S., et al. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell*. 2012; 148(1-2): 259-72.

Zhang Q, Ding J, Liu J, Wang W, Zhang F, Wang J, Li Y. Helicobacter pylori-infected MSCs acquire a pro-inflammatory phenotype and induce human gastric cancer migration by promoting EMT in gastric cancer cells. *Oncol Lett.* 2016; 11(1): 449-57.

**ANEXOS**

## ORIGINAL MANUSCRIPT

## The senescent microenvironment promotes the emergence of heterogeneous cancer stem-like cells

Luis Jaime Castro-Vega<sup>1,2,†</sup>, Karina Jouravleva<sup>1,2,†</sup>, Paola Ortiz-Montero<sup>3</sup>, Win-Yan Liu<sup>1,2</sup>, Jorge Luis Galeano<sup>3</sup>, Martha Romero<sup>4</sup>, Tatiana Popova<sup>5</sup>, Silvia Bacchetti<sup>6</sup>, Jean Paul Vernot<sup>3</sup> and Arturo Londoño-Vallejo<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>UMR3244, Telomeres and Cancer Laboratory, "Labellisé Ligue", Institut Curie, Paris 75248, France, <sup>2</sup>UPMC University, Paris 75005, France, <sup>3</sup>Cellular and Molecular Physiology Group, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Faculty of Medicine, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC 111311, Colombia, <sup>4</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario-Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá 110111, Colombia, <sup>5</sup>U830 Genetics and Cancer Biology, Institut Curie, Paris 75248, France and <sup>6</sup>Department of Experimental Oncology, Istituto Regina Elena, Rome 00158, Italy

To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 0 156246611; Fax: +33 0 156246674; Email: [arturo.londono@curie.fr](mailto:arturo.londono@curie.fr)

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

### Abstract

There is a well-established association between aging and the onset of metastasis. Although the mechanisms through which age impinges upon the malignant phenotype remain uncharacterized, the role of a senescent microenvironment has been emphasized. We reported previously that human epithelial cells that undergo telomere-driven chromosome instability (T-CIN) display global microRNA (miR) deregulation and develop migration and invasion capacities. Here, we show that post-crisis cells are not able to form tumors unless a senescent microenvironment is provided. The characterization of cell lines established from such tumors revealed that these cells have acquired cell autonomous tumorigenicity, giving rise to heterogeneous tumors. Further experiments demonstrate that explanted cells, while displaying differences in cell differentiation markers, are all endowed of enhanced stem cell properties including self-renewal and multilineage differentiation capacity. Treatments of T-CIN+ cells with senescence-conditioned media induce sphere formation exclusively in cells with senescence-associated tumorigenicity, a capacity that depends on miR-145 repression. These results indicate that the senescent microenvironment, while promoting further transdifferentiations in cells with genome instability, is able to propel the progression of premalignant cells towards a malignant, cell stem-like state.

### Introduction

Cancers of epithelial origin (carcinomas) are the most frequent type of malignancy in humans, with their incidence and aggressiveness increasing with age (1). This observation raises the question as to whether the aging process itself contributes to tumor progression (2). In this regard, telomere biology seems to play a pivotal role since shortening of telomeres has been associated with cellular senescence and organismal aging (2–4) as well as with cancer incidence and mortality (5,6).

In the multistep carcinogenesis model, telomere shortening has been observed together with increased chromosome

instability (CIN) in early precancerous conditions (7–9). Experimental models have also shown that a transient period of telomere instability followed by reactivation of telomerase contributes to the acquisition of the metastatic phenotype (10). Also, we have previously shown that telomere-driven chromosome instability (T-CIN) in human epithelial kidney cells (HEK cells) induces a global microRNA (miR) deregulation and the acquisition of phenotypes suggesting metastatic capability (11).

On the other hand, senescent cells display the so-called senescence-associated secretory phenotype (SASP) which comprises

Received: November 14, 2014; Revised: July 2, 2015; Accepted: July 8, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com).

**Abbreviations**

EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
GF	growth factor
GAP	genome alteration print
HEK cells	human epithelial kidney cells
hTERT	telomerase reverse transcriptase
miR	microRNA
MET	minimum essential medium
MEM $\alpha$	mesenchymal-to-epithelial transition
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
SASP	senescence-associated secretory phenotype
SCID	severe combined immunodeficiency
SCM	senescence-conditioned media
T-CIN	telomere-driven chromosome instability

the secretion of a large variety of cytokines, growth factors (GF) and enzymes that are expected to alter the surrounding microenvironment in a paracrine fashion (landmark publications on the composition and activities of SASP can be found in recent reviews (12,13)). In particular, it has been shown that senescent fibroblasts can promote tumor progression and tumorigenesis by pre-malignant cells (14). SASP can also impact the differentiation status of tumor cells (15) and induce an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (16). On the other hand, cancer-associated fibroblasts, which may comprise senescent fibroblasts, promote the tumorigenesis of premalignant cells (17,18). Nevertheless, the contribution of senescence to the progression of premalignant epithelial cells is still largely uncharacterized. Interestingly, it has been suggested that a genotoxic-induced SASP could contribute to the emergence of cancer stem-like cells within a population of irradiated (or doxorubicin-treated) multiple myeloma cells (19), thus providing a potential explanation for the high frequency of MM relapse after anticancer therapy (19). Whether a senescent microenvironment would promote the emergence of cancer stem-like cells in epithelial tissues remains unexplored.

In the present study, we examined the impact of a telomere-driven senescent microenvironment on the tumorigenic potential of immortal epithelial cells having undergone T-CIN. Our data demonstrate the prominent role of senescence as a permissive microenvironment for the full transformation of T-CIN cells. Notably, this progression in tumor capacity is associated with the manifestation of enhanced stem-like properties. We also show that SASP influences the plasticity of the T-CIN cells, but not that of CIN cells. Our results support the notion that telomere-driven senescence in stromal cells stimulates the progression of T-CIN premalignant cells towards the acquisition of a stemness-like, highly tumorigenic state, thus providing a mechanistically plausible explanation for the increased incidence of deadly carcinomas with advancing age.

**Methods****Cell lines and transfections**

Human embryonic epithelial kidney cells (HEK cells) were obtained and transformed with a plasmid carrying ER-SV40 and a neo resistant cassette immediately after isolation, as described (20). Cells were directly sent to the Londoño lab 12 years ago for a collaborative work (21). Immortalized HEK cells derived from clone HA1 (Early and post-crisis cells) and HA5 (Early and Late) were cultured as described previously (11). 'Explanted' cell lines were established by putting in culture tissue slices obtained from the tumors formed by PC1 and PC2 in immunocompromised mice. Explanted cells were maintained in complemented minimum essential medium (MEM $\alpha$ ),

as the other HEK cells. For this work, the identity of all HEK derivatives was established by STR analysis as described below. Primary and hTERT (human telomerase reverse transcriptase) immortalized foreskin fibroblasts HCA2 (isolated in, and directly obtained from, Dr Olivia Pereira Smith laboratory) were maintained in Iscove's modified Dulbecco's media + glutamax culture media (Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. To obtain fully tumorigenic HEK cells, HA1 cells immortalized with hTERT were transfected with pBabe-Puro RasG12V (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, mutated G12V) (as described in 22). A clone with the highest level of expression of the protein (not shown) was used for the experiments described here. To restore miR-145 expression, cells were transfected with 50nM hsa-miR-145 mimic (ID MC11480) or negative control #1 pre-miR (ID AM17110) (Life Technologies) using Lipofectamine 2000 as transfection reagent (Invitrogen). To deplete miR-145, cells were transfected with 50nM anti-miR-145 miRNA Inhibitors (ID MH11480) or negative control #1 (ID AM17010) (Life Technologies).

**Immunoblotting**

Subconfluent cells were harvested by trypsinization, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer with protease inhibitors (Roche). Protein quantifications were performed using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo scientific), and 20–40  $\mu$ g protein were analyzed in 4–12% Bis-Tris gels (Invitrogen). Transfer was performed for 2 h at 25V and blocking with 5% milk or bovine serum albumin for 1–2 h. Primary antibodies were incubated at 4°C overnight. Detection was performed using the ECL plus kit (Amersham). For quantification, the intensity of the specific band was normalized by the intensity of the band revealed with antibodies against  $\beta$ -actin.

**Tumorigenicity assays**

HEK cell lines were expanded and then harvested by trypsinization for 5–10 min at 37°C in an incubator. Cells were washed with PBS 1 $\times$ , centrifuged for 5 min at 800g, resuspended in culture medium without serum and kept on ice until use. A volume of 0.2 ml of the cell suspension containing from 10<sup>3</sup> to 5 $\times$ 10<sup>6</sup> (as indicated) was used for subcutaneous injections in the flanks of severe combined immunodeficiency (SCID) mice (6- to 8-week-old). For coinjection experiments, a suspension containing 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup> of both HEK cells and either presenescent, senescent or hTERT-immortalized HCA2 fibroblasts was used. Animals were kept under specific pathogen-free environment conditions and inspected for tumor growth at least two times a week for at least 3 months. Tumor masses were measured in two axes using a precision caliper (HERMANN Medizintechnik, ref H102-31710). The tumor volume was calculated using the formula: tumor volume [mm<sup>3</sup>] = (length [mm])  $\times$  (width [mm])<sup>2</sup>  $\times$  0.52. Animals were killed at the end of the observation period or when tumors reached a volume of 1200 mm<sup>3</sup>. Institutional and National guidelines for the care and use of animals were followed. The institutional ethics committee board (CEEA-IC) approved all the protocols.

**Soft agar colony formation assay**

A solution of autoclaved sterile agar 3.3% (Sigma) was melted in a microwave and cooled to 40°C in a water bath. This solution is then enriched with Dulbecco's modified Eagle's medium 2 $\times$  (Gibco) and 20% FBS also warmed to the same temperature and 1.5 ml were poured in MW6 plates (Nalge Nunc International). This bottom layer is incubated at room temperature under the hood until solidified. A second agar solution of 1.3%, also containing Dulbecco's modified Eagle's medium 2 $\times$  with 10% FBS, was prepared in a similar way. Each cell line (3 $\times$ 10<sup>5</sup> cells per plate) was resuspended in this top solution layer and 1.5 ml were carefully seeded per well. Colonies (400  $\mu$ m) were scored under microscopy visualization after 20 days. Assays were done at least twice independently.

**Immunofluorescence**

For F-actin staining, 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells per well were seeded on microscope slides (Thermo scientific). The next day, cells were washed with PBS 1 $\times$  and fixed in 3% formaldehyde and 2% sucrose for 15 min. Then, cells were washed twice and permeabilized for 10 min. Stock solutions of phalloidin-tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) conjugates (Sigma) have been made in dimethyl sulfoxide at 0.5 mg/ml and were used at a concentration of 1:400 in PBS for 40 min at room temperature. Cells were

washed several times to remove the conjugate and stained with 0.5 mg/ml 4',6'-diamidino-2-phenylindole.

### Migration/invasion assays

Wound healing assays were performed in cells at 75% confluence. At least 10 images at each time point in two independent experiments were captured at 0, 6 and 12 h. For transwell migration assays, filters (8.0 µm pore size) and multiwell-6 format plates (BD Biosciences) were used. A total of  $2 \times 10^5$  non-starved cells are seeded the day before. Chambers are rinsed with media without serum 2–4 h before the initiation of the assay. Chemotaxis was induced using medium with FBS 10% on the bottom side of the chambers. Cells were allowed to migrate for a period of 12 h after which they were fixed with methanol 15 min and then stained with crystal violet 0.2% in water for 1 h. Cells were removed from the upper side of the chamber with cotton swabs. A total of 10 images from two independent experiments were taken for quantifications using an inverted microscope. For invasion assays, a coat of growth factor reduced matrigel (BD Biosciences) diluted one-third in media without serum was applied in the upper side of the chambers and incubated for 1 h. For this assay,  $2 \times 10^5$  cells were seeded in multiwell 24 format plates (BD Biosciences) and allowed to traverse the matrigel for a period of 72 h. Fixation, staining and analyses were performed in a similar way as in the migration assay.

### Flow cytometry

A total of  $1 \times 10^6$  cells were harvested after trypsinization, washed twice and resuspended in 500 µl PBS 1× containing albumin 0.5%. Cells were stained with 5 µl of CD44-APC (BD Biosciences) and 5 µl of CD24-FITC (BD Biosciences) for 20 min and washed again to remove the excess of antibodies. A mesenchymal stem cell line was used as positive control for the expression of CD44 and negative control for CD24. Conversely, the epithelial cell line MCF7 was used as positive control for CD24 and negative for CD44. The cytometric analysis was carried out using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Aria-II flow cytometer. Data were collected from 10000 to 20000 events for each sample. The analysis was performed using the software FACS Diva. Signal amplification was decreased to normalize the dot plot for analysis, and compensation was used to exclude overlap between the two signals.

### Analysis of miR expression

For pre-miRs, a total of 178 precursors were analyzed using the MiRmaid miRNA Precursors RT-qPCR primer set (Eurogentec) as described previously (11). The analyses were performed using R software with Bioconductor packages and custom functions defined at the Institut Curie Bioinformatics group (<http://bioinfo.curie.fr/projects/ema>), as described (11). Specific miRs were analyzed by polymerase chain reaction (PCR), as described in the following paragraph.

### RT-qPCR

One microgram of total RNA, isolated with miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions, was treated with DNase I (Invitrogen) and used for the reverse transcription with oligo-dT priming and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). The resulting cDNA was diluted 1:4 and assessed by qPCR using SybrGreen GoTaq mastermix (Promega). Measurements were done in a Roche instrument LC480. RT minus control was included to ensure against contaminating transcript. For each sample, qPCR reactions were done in triplicate, and the entire analysis was done twice independently. The fold change was calculated as the relative expression of the gene of interest to the expression of β2-microglobulin (housekeeping) using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (23).

Pre-miRs were measured using a RT-qPCR based platform as described (11). Briefly, the expression of 178 precursors was examined using the MiRmaid miRNA Precursors RT-qPCR primer set (Eurogentec) following the manufacture's protocol recommendations. Universal RT reactions from 1 µg of RNA starting material were purified and then amplified using specific pre-miR primers using the ABI Prism 7500 thermal cycler (Applied Biosystems). The geometric mean of three control genes (5S, TBP, HBMS) was used for normalization. Unsupervised classification was performed using a set of 87 pre-miRs that showed the most variable expression.

The expression analysis of the miR-200 family, miR-143 and miR-145 (mature strands) was performed using the RT-quantitative PCR (RT-qPCR)

miRCURY system from (EXIQON). Briefly, 250 ng of DNase-treated RNA was used to prepare complementary DNAs in three independent RT reactions, and qPCR reactions were carried out using miR-specific locked nucleic acid primers in a 7500 Real Time PCR system. The mean expression of members of the hsa-Let7 family was used as endogenous control for normalization. Relative quantifications were calculated with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

### Sphere formation assay

Cells were in the exponential phase of growing the day of the assay and harvested by trypsinization. A total of  $2 \times 10^4$  cells per well were seeded in triplicates in low cell binding multiwell plates (MW6) (Nalge Nunc International), containing a solution of medium without serum, supplemented with recombinant human GF epidermal growth factor (Gibco; Ref. PHG0315) and fibroblast growth factor (FGF) basic (Gibco; Ref. PHG0266) at a final concentration of 20 ng/ml, and supplemented with B-27 (Gibco; Ref. 17504) and methylcellulose 0.8% (R&D Systems). Cells were incubated in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C during 7–10 days after which the spheres (>100 µm) were counted and reported as the mean number of spheres after seeding  $2 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> surface area.

### Differentiation assays

For adipogenic differentiation,  $2 \times 10^4$  cells were seeded in a 24-well format plate and cultured in complete culture medium until they reached 100% confluence. Positive controls included bone marrow mesenchymal stem cells isolated from normal volunteer donors. After third passage, mesenchymal stem cells were plated at  $2 \times 10^4$  cells/1.5 cm<sup>2</sup> and cultured to reach 90% confluence in Iscove's modified Dulbecco's media culture medium to induce osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation as described previously. The medium was replaced with adipogenic induction medium containing incomplete culture medium MEMα (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, 1 mM dexamethasone (Sigma), 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma), 200 µM indomethacin (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich). After 3 days, maintenance medium containing MEMα, 10% FBS and 10 µg/ml insulin, was added to the cells. Three cycles of induction and maintenance were completed. After 10 days, cells were washed twice with PBS 1×, followed by fixation with formalin for 30 min (Sigma-Aldrich) and stained with 0.35% oil red O solution for 1 h (Sigma-Aldrich). Plates were washed three times with PBS 1× and dried, and the number of oil red-O positive colonies were observed with an inverted microscope (24,25). Osteogenic differentiation was induced by culturing the cells in osteogenic induction medium containing incomplete culture medium MEMα (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, 100 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.2 mM ascorbic-2-phosphate (Sigma-Aldrich) and 10 mM β-glycerophosphate (Sigma-Aldrich). Medium was changed every 3–4 days. After 10 days, cells were assessed for alkaline phosphatase activity using an alkaline phosphatase staining kit (Chemicon International). The cells were washed twice with PBS 1×, followed by fixation with formalin for 2 min (Sigma-Aldrich) and washed again three times with PBS 1× and 0.05% Tween-20. About 0.5 ml of alkaline phosphatase reagent was added to the cells and they were incubated at room temperature for 15 min. Finally, cells were examined with an inverted microscope (26). For chondrogenic differentiation,  $5 \times 10^4$  cells were plated in a 24-well plate and cultured in complete chondrogenic medium, containing MEMα and 10 ng/ml TGFβ-1 (Sigma-Aldrich). The medium was changed three times a week. After 10 days, the cells were washed twice with PBS 1×, followed by fixation with formalin for 5 min (Sigma-Aldrich) and stained with 0.1% Safranin O for 3 min (Sigma-Aldrich). Plates were washed three times with PBS 1× and the cells were observed with an inverted microscope (27). Differentiation states were also evaluated by measuring expression level of genes associated with adipogenic (PPARγ, C/EBP-α), osteogenic (Runx2, APL) and chondrogenic (AGGREGAN; SOX9) differentiation by RT-qPCR 10 days after induction.

### Beta-galactosidase assay

Cells seeded in MW6 plates were washed once with PBS 1×, then fixed for 3–5 min at room temperature in a solution containing 0.2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in PBS 1×. Next, cells were washed again twice with PBS 1× and incubated at 37°C with the β-gal substrate in an acidic buffer (pH 6.0). The development of a perinuclear blue color, which is indicative of senescent cells, was followed using a standard light microscope and photographs were taken 24 h after.

### Single nucleotide polymorphism whole genome array (CytoScan)

Affymetrix CytoScan HD arrays were hybridized with labeled DNA from PC1, PC2 and the four explanted cell lines. Analyses were performed using the genome alteration print (GAP) utility (28). Briefly, the GAP method detects absolute segmental copy numbers and genotype status in complex cancer genome profiles measured by single nucleotide polymorphism arrays. The method is based on pattern recognition of alteration profiles represented by the GAP patterns. The GAP pattern for each tumor genome is a two-dimensional table of alteration segments characterized by copy number variation and allelic imbalance values. Copy number interpretation of the GAP pattern is based on the closest model pattern, which is the model of copy number alterations for a given ploidy ([http://bioinfo-out.curie.fr/projects/snp\\_gap/](http://bioinfo-out.curie.fr/projects/snp_gap/)).

### Short tandem repeats analysis

Short tandem repeats analysis was carried out to ascertain the identity of cell lines obtained after CIN and out of xenografts. A geneprint10 kit from Promega (B9510) was used following the manufacturer's instructions. Samples were run in an Applied Biosystems Genetic Analyzers 3100 and analyzed in Genemapper 5 (Life Technologies). The list of markers used and the corresponding alleles are shown in [Supplementary Table 1](#), available at [Carcinogenesis Online](#).

### Antibodies

The following antibodies with their respective specifications were used: mouse monoclonal 419 (LT-SV40; provided by Dr Silvia Bacchetti) dilution 1:1000; mouse monoclonal Beta-actin (Santa Cruz Biotechnology; Ref. sc-47778) dilution 1:30000; mouse monoclonal RAS (BD transduction laboratories; Ref. 610001) dilution 1:500; rabbit polyclonal Nanog (Abcam; Ref. ab21624) dilution 1:500; rabbit polyclonal Sox2 (Millipore; Ref. AB5603) dilution 1:500; mouse monoclonal Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology; Ref. sc-5279) dilution 1:500.

### PCR primers

The following primers were used: OCT4 Forward: AGTTTGTGCCAGGGTTTGTG; OCT4 Reverse: ACTTCACCTTCCCTCCAACC; NANOG Forward: CCTGTGATTTGTGGCCCT; NANOG Reverse: GACAGTCTCCGTGTGAGGCAT; SOX2 Forward: GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG; SOX2 Reverse: TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC; KLF4 Forward: TATGACCCACACTGCCAGAA; KLF4 Reverse: TGGAACTTGACCATGATTG; E-cadherin Forward: TGGACAGGAGGATTTTGAG; E-cadherin Reverse: ACCACACTCTAAGGCATCT; ZEB1 Forward: AAGAATTCACAGTGGAGAG AAGCA; ZEB1 Reverse: GGTTTCTTGCACTTTGGGCATT; ZEB2 Forward: TGTAGATGGTCCAGAAAGAAATG; ZEB2 Reverse: CCATGTGTAATTGCGG TCT; MYC Forward: CGGAACTCTTGTGCGTAAGG; MYC Reverse: CTCAGCCAAGGTTGTGAGGT; VIM Forward: CGAGGACGAGGAGAGCAGGAT TTCTC; VIM Reverse: GGTATCAACCAGAGGGAGTGA; ZO1 Forward: ACAAAGGAGAGGTGTTCCGTGTT; ZO1 Reverse: CGTTCTACCTCCTTAT GATTTTTAGCA; CD44 Forward: GCATTGCAAGTCAACAGTCGAA; CD44 Reverse: CGTTGAGTCCACTTGGCTTTC; B2MG Forward: TGCTGTCTCCATG TTTGATGATCT; B2MG Reverse: TCTCTGCTCCCACTCTAAGT; PPAR $\gamma$  Forward: GGCTTCATGACAAGGGAGTTTC; PPAR $\gamma$  Reverse: AACTCAAACCTTG GGCTCCATAAG; C/EBP- $\alpha$  Forward: CTTGTGCCCTGGAAATGCAA; C/EBP- $\alpha$  Reverse: GCTGTAGCCTCGGGAAGGA; RUNX2 Forward: TTACTACACCC CGCCAGTC; RUNX2 Reverse: TGCTGGTCTGGAAGGGTCC; ALP Forward: ATGGGATGGGTGTCTCCACA; ALP Reverse: CCACGAAGGGGAACCTGTGC; AGGRECAN Forward: CGAAACATCACTGAGGGTGAAG; AGGRECAN Reverse: GTGGCCTCCAGTCTCAITCT; SOX9 Forward: TTTCCAAGACACAAACATGA; SOX9 Reverse: AAAAGTCCAGTTTCTCGTTGA.

### Statistical analysis

Paired-wise comparisons for gene expression levels, sphere formation, colony formation and migration and invasion capacities were carried out using a two-tailed t test.

## Results

### The senescent microenvironment uncovers the tumorigenic potential of post-crisis HEK cells

T-CIN post-crisis HEK cells derived from the ER-SV40 clone HA1 were obtained after spontaneous reactivation of telomerase in

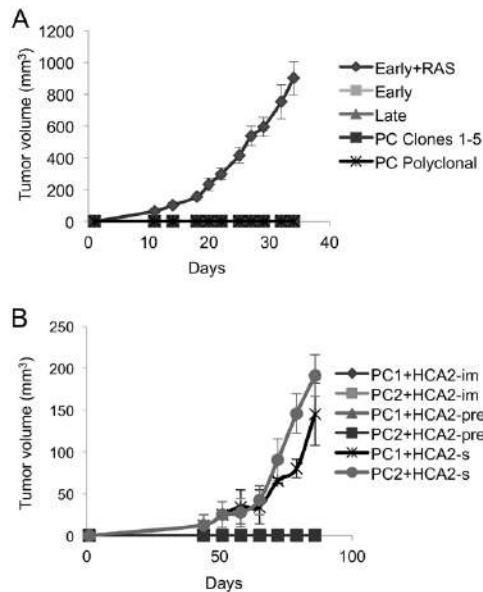
several independent experiments and have been previously characterized regarding genome instability, gene expression including microRNAs and phenotypical traits (11) ([Supplementary Figure 1A and B](#), available at [Carcinogenesis Online](#)). Since post-crisis HEK cells display several attributes generally associated with tumorigenesis such as immortality, altered differentiation program and enhanced migration/invasive capacity (11), we tested whether these cells had any tumorigenic potential by injecting them subcutaneously into immunocompromised mice. We also tested post-crisis HEK cells derived from ER-SV40 polyclonal populations that were immortalized by the exogenous expression of telomerase, introduced before (Early, CIN-) or after (Late, CIN+) the initiation of telomere instability. Unless otherwise indicated, 'Early' and 'Late' were derived from the ER-SV40 HA5 clone. As a positive control of tumorigenicity, Early cells were transfected with a construct driving the expression of an oncogenic form of RAS ([Supplementary Figure 1C](#), available at [Carcinogenesis Online](#)), as described (22). While RAS-transformed cells rapidly formed tumors when  $5 \times 10^6$  cells were injected subcutaneously in nude or SCID mice, we did not observe any tumor formation with any of the other tested HEK cells even when monitored for a period of 12 months ([Figure 1A](#)). In agreement with this apparent lack of tumorigenicity, all cell lines, with the exception of the RAS-transformed positive control, also failed to form colonies in semisolid media ([Supplementary Figure 1D](#), available at [Carcinogenesis Online](#)).

Taking into account the published evidence on the impact of the senescent microenvironment on tumorigenicity (14,15,18), we coinjected post-crisis EMT+ HEK cells subcutaneously with an equivalent number of senescent fibroblasts (HCA2-s, [Supplementary Figure 2A and B](#), available at [Carcinogenesis Online](#)) into SCID mice. In two independent experiments, the same two (out of five) post-crisis HEK cell lines formed tumors after a latency period of over 3 months ([Supplementary Figure 2C and D](#), available at [Carcinogenesis Online](#)), indicating that these two particular post-crisis cell lines, PC1 and PC2, had tumorigenic potential, albeit only manifested in the presence of a senescent microenvironment. To ascertain that the senescent state on HCA2 cells was crucial in the induction of tumorigenicity, we carried out experiments where PC1 and PC2 were coinjected with pre-senescent (PD40) HCA2 fibroblasts as well as with HCA2 fibroblasts that had been immortalized with hTERT. As shown in [Figure 1B](#), only the presence of senescent fibroblasts allowed the formation of tumors by PC1 and PC2. Thus, a senescent microenvironment promotes the tumorigenicity of post-crisis HEK cells. Of note, the same post-crisis cells did not form tumors when injected (alone) subcutaneously into irradiated mice carrying very short telomeres (*terc*<sup>-/-</sup>, G3) (data not shown), suggesting the existence of key differences between human and mouse senescent microenvironments.

### Cells explanted from tumors have undergone transdifferentiation

We have previously shown that PC1 and PC2 cells have undergone a miR-200-dependent EMT as a consequence of T-CIN (11). In order to examine the characteristics of cells that formed tumors, we established four cell lines, two from PC1-derived tumors (PC1-expl1 and -expl2) and two from PC2-derived tumors (PC2-expl1 and -expl2) ([Supplementary Figure 3A](#), available at [Carcinogenesis Online](#)). Of note, the PC2-expl2 cell line was lost in the course of the first passages and therefore material from this cell line was only available for some of the following analyses. To ascertain the origin of explanted cell lines, we compared their short tandem repeat allelic profile to the one in the





**Figure 1.** The senescent microenvironment promotes the tumorigenicity of post-crisis HEK cells. (A) Tumorigenicity assays of HEK cells. The indicated HEK cell lines were injected ( $5 \times 10^6$  cells per injection) in two flanks of SCID mice. As a positive control, Early + RAS ( $1 \times 10^6$  cells) were injected in one flank of SCID mice. No tumor growth was detected for any of the HEK cell lines in 120 days, while the positive control formed visible tumors in 10 days. Error bars indicate mean  $\pm$  SD of six injections. (B) Tumorigenicity assays of HEK cells in the presence of senescent fibroblasts. HEK cell lines PC1 and PC2 were injected alone ( $5 \times 10^6$ ) or in the presence of an equal number ( $2.5 \times 10^6$ ) of HCA2 senescent fibroblasts (HCA2-s) in one flank of five SCID mice. Other controls included coinjections of PC cells with either pre-senescent (PD40) HCA2 cells (HCA2-pre) or hTERT-immortalized HCA2 cells (HCA2-im). PC1 and PC2 cells formed tumors (3/5 and 5/5, respectively) exclusively in the presence of senescent HCA2 cells. Error bars indicate mean  $\pm$  SD.

parental cells. As shown in [Supplementary Table 1](#), available at [Carcinogenesis Online](#), all profiles were identical, thus confirming that the tumors formed by the post-crisis cells in the presence of senescent fibroblasts are bonafide HEK cells. We next examined the genome instability profile in explanted cells through single nucleotide polymorphism array hybridization. As described (11), post-crisis HEK cells display both common and cell line-specific chromosome region gains and losses ([Supplementary Figure 3B and E](#), available at [Carcinogenesis Online](#)). Explanted cells conserved some of the corresponding parental gains and losses while acquiring further rearrangements, although to different extents depending on the explanted cell line ([Supplementary Figure 3C and D, F and G](#), available at [Carcinogenesis Online](#)). These additional rearrangements in the explanted cells may indicate either further evolution of CIN during *in vivo* growth or the selection of preexistent subclones that bore additional CIN features. Although we cannot exclude that some of these additional rearrangements contributed to the tumorigenicity observed in the presence of senescent fibroblasts, no apparent recurrent events were detected in all explanted cell lines.

Finally, we examined the pre-miR expression profile of explanted cells and compared them to that of parental cells. Remarkably, the overall pre-miR expression profile of explanted cells was quite different ([Supplementary Figure 4](#), available at [Carcinogenesis Online](#)), suggesting important modifications in the genetic program of explanted cells. Indeed, microscope examination of explanted HEK cells revealed that these cells

had experienced morphological changes and appeared to be more epithelial-like than the parental cells ([Supplementary Figure 5A](#), available at [Carcinogenesis Online](#)). These changes were associated with changes in the level of expression of members of the miR-200 family ([Figure 2A](#)), some of which appeared to be re-expressed at high levels, thus suggesting that explanted cells may have reversed their EMT. FACS analysis of CD44/CD24 surface markers showed conspicuous modifications in their expression in explanted cells, although only in the case of PC1-expl2 CD24 expression was in agreement with a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) ([Supplementary Figure 5B](#), available at [Carcinogenesis Online](#)). Also concordant with a loss of EMT-related phenotypes was the fact that explanted cells showed decreased migration and invasion capacities as compared to their parental counterparts ([Figure 2B and C](#)). However, the levels of expression of epithelial markers such as E-cadherin and tight junction protein 1 (TPJ1, also known as ZO-1), as well as those of mesenchymal markers, such as ZEB1/ZEB2 and vimentin, although they were altered in explanted cells when compared to their parental cells ([Figure 5C](#)), were not, with the exception of PC1-expl2, fully consistent with an MET.

From this initial characterization, we conclude that explanted cells had undergone changes in their genetic program (as indicated by the miR expression profile) but that had either followed different paths or stopped at different stages in their transition, thus reflecting their phenotypic heterogeneity. Whatever the case, these differentiation states do not seem to correspond



to actively evolving steps since all phenotypes described above have been maintained in the long term (not shown).

### Explanted cells have become fully tumorigenic

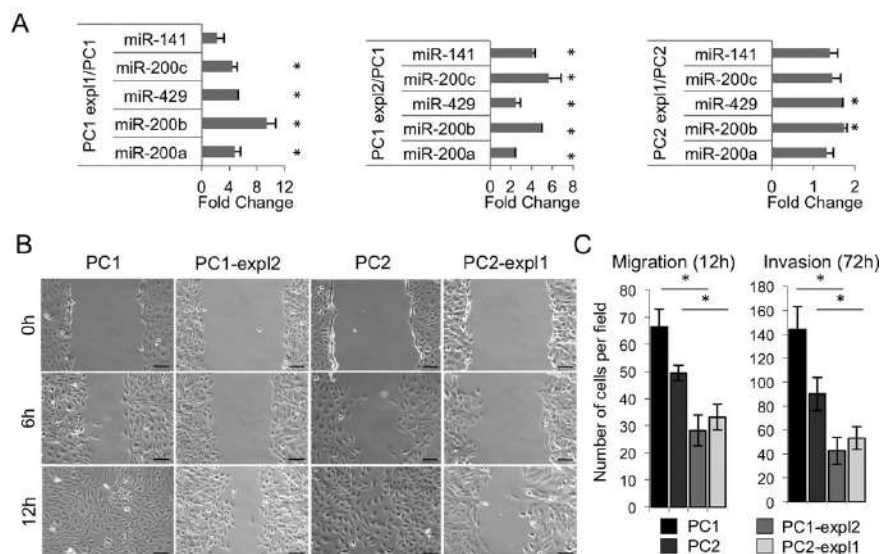
We next tested, using both anchorage-independent growth and xenograft experiments, whether explanted cells had developed any cell autonomous tumorigenic capacity. In these experiments, we directly compared PC1-expl2 and PC2-expl1, which displayed the most divergent cell phenotypes, as described previously. Both explanted cell lines behaved identically in both setups, efficiently forming colonies in semi-solid media (Figure 3A) and subcutaneous tumors in mice in the absence of senescent fibroblasts (Figure 3B and C). Moreover, the tumor initiation capacity of both explanted cell lines was identical, and in fact very similar to the RAS-transformed Early HEK cells (Figure 3C). Similar results were obtained with PC1-expl1, which formed tumors in mice in the absence of senescent fibroblasts (data not shown). Altogether, these observations indicate that explanted HEK cells have acquired cell-autonomous tumorigenicity.

Strikingly, the histological characteristics of tumors derived from explanted cells strongly differed from those observed in RAS-driven tumors. While RAS-positive tumors displayed homogeneous epithelioid, rather undifferentiated, cell morphology, tumors formed by explanted HEK cells were highly heterogeneous, bearing dissimilar proportions of two different cell populations (epithelioid and fibroblastoid) (Figure 3D). Such tumor heterogeneity suggested that explanted HEK cells were endowed with differentiation potential.

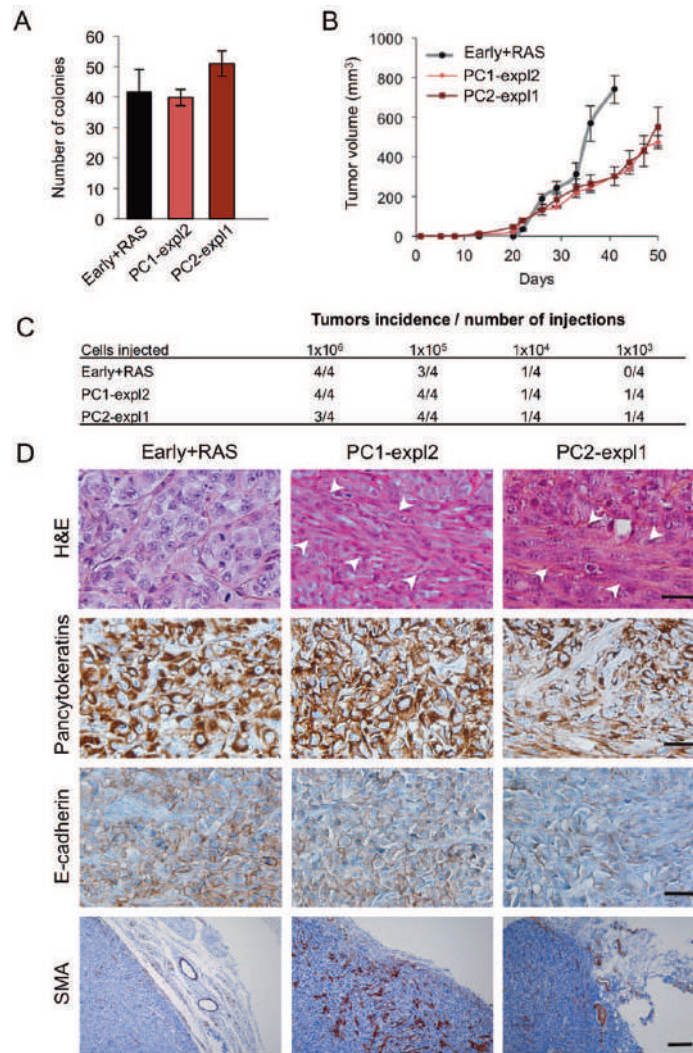
### Explanted HEK cells display enhanced stem cell properties

Since explanted cells were able to give rise to heterogeneous tumors, we explored the possibility that these cells displayed stem-like properties. Stem cells are capable of self-renewal and of differentiating into different cell lineages. Cells with self-renewal capacity are able to form spheres when cultured in media conditioned with GF. As shown in Figure 4A, explanted cells efficiently formed spheres in GF-conditioned media. Interestingly, parental cells were also endowed of sphere formation capacity albeit at a lower level. On the other hand, other immortal CIN+ (EMT+) HEK cells remained as unresponsive as control cells (immortalized CIN- HEK cells) to the GF-conditioned media, suggesting that EMT per se is not sufficient to endow HEK cells with self-renewal capacity.

We next tested the differentiation potential of explanted cells *in vitro*. Remarkably, explanted cells were able to give rise to chondrocytes, adipocytes and osteocytes, usually derived from mesenchymal stem cells (Figure 4B and Supplementary Figure 6, available at Carcinogenesis Online). PC1 and PC2—but not CIN- HEK cells—were also endowed of differentiation capacity, albeit the efficiency in differentiation was much lower than that of explanted cells. The enhanced capacity of explanted cells with regard to parental cells to form spheres and to differentiate into different cell lineages was not explained by an increased expression of reprogramming factors in the former (Figure 4C and Supplementary Figure 5D, available at Carcinogenesis Online). Instead, we noticed that the relative expression of miR-143/145,



**Figure 2.** Explanted cells have undergone transdifferentiation. (A) Levels of expression of the miR-200 family, as detected by RT-qPCR and relative to two housekeeping miRs hsa-Let7 and hsa-miR-365, in explanted cell lines with regard to the parental counterparts. Represented are the ratios of expression for each miR relative to the level of that of the parental HEK cells. Error bars indicate mean  $\pm$  SEM from three independent RT reactions. Asterisks indicate a statistically significant ( $P < 0.05$ ) difference. (B) Wound healing assays performed in post-crisis and explanted cells. Representative bright field micrographs ( $10\times$ ) of two independent experiments taken at 0, 6 and 12h show a diminished migration capacity of explanted cells. (C) Quantification of transwell migration assays (left) and matrigel invasion assays (right) in post-crisis and explanted cells. Number of cells per field from at least 10 images is shown for each assay. Explanted cells exhibit a significant decrease in both migration and invasion at 12 and 72h, respectively, ( $P < 0.01$ ). Error bars indicate SD and asterisks indicate statistically significant differences between parental and their corresponding explanted cells.



**Figure 3.** Explanted cells are highly tumorigenic. (A) Agar colony formation assay showing high colony formation capacity of explanted cells PC1-expl1 and PC2-expl1 similar to the positive control Early + RAS. Error bars indicate SD ( $n = 6$ ). (B) Tumorigenicity assays of same cell lines as in A. Curves represent tumor growth in SCID mice following the injection of  $1 \times 10^6$  cells into one mouse flank. Error bars indicate mean  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). (C) Tumorigenicity assay as in B using decreasing number of cells for injections. The tumor initiation capacity was even higher in explanted cells when  $1 \times 10^3$  cells were injected ( $n = 4$ ). (D) Histopathology analyses of tumors formed by Early + RAS and explanted cells. Hematoxylin and eosin stain (H&E) shows the morphological aspect. Immunostaining for the epithelial markers pancytokeratins and E-cadherin as well as the mesenchymal marker alpha smooth muscle actin (SMA), were performed using specific antibodies to detect the human proteins. White arrows point to the fibroblastoid cells. Scale bars, 200  $\mu$ m for SMA, 20  $\mu$ m for all other stainings.

which targets these reprogramming factors and has been proposed to control the stem cell properties in some types of cancer cells (29,30), was highly repressed in post-crisis and explanted

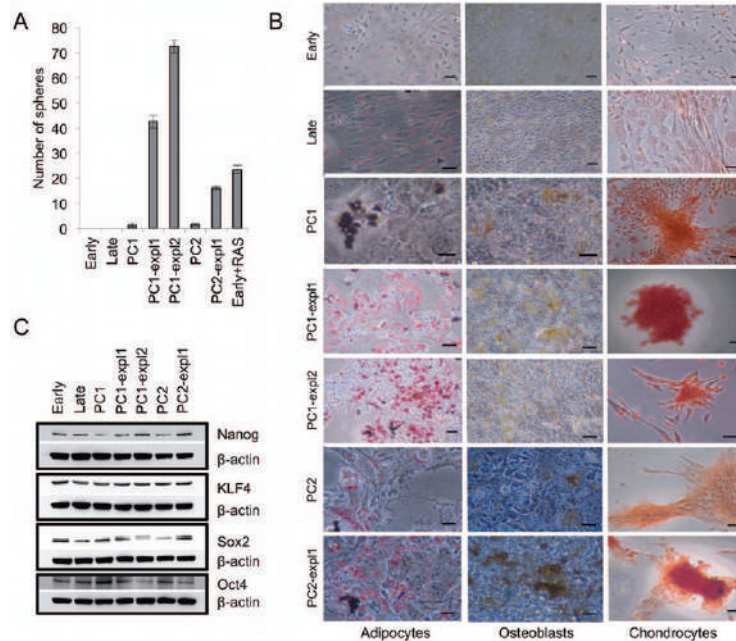
cells when compared with EMT+, CIN+ HEK cells, which were unable to form spheres and to differentiate (Figure 5A). This observation suggested a connection between the capacity of

explanted cells to both differentiate into mesenchymal lineages and form spheres, with the downregulation of miR-143/145. To directly test this, we measured sphere formation in explanted HEK cells in response to GF after re-establishing miR-145 expression and found that this re-expression was sufficient to induce a reduction in the number of spheres (Figure 5B and Supplementary Figure 7A, available at Carcinogenesis Online). Next, we wondered whether suppressing the expression of miR-145 would be sufficient to induce sphere formation in either CIN+ HEK cells or in the karyotypically stable Early HEK cells in response to GF media. Suppression of miR-145 expression was sufficient to promote sphere formation in PC1 (although not in a statistically significant way for PC2) and in Late cells, but not at all in Early cells (Figure 5C and D and Supplementary Figure 7B and C, available at Carcinogenesis Online), thus suggesting that the EMT status associated with telomere-driven CIN is a prerequisite for the induction of the stem-like phenotype by miR-145 down-regulation.

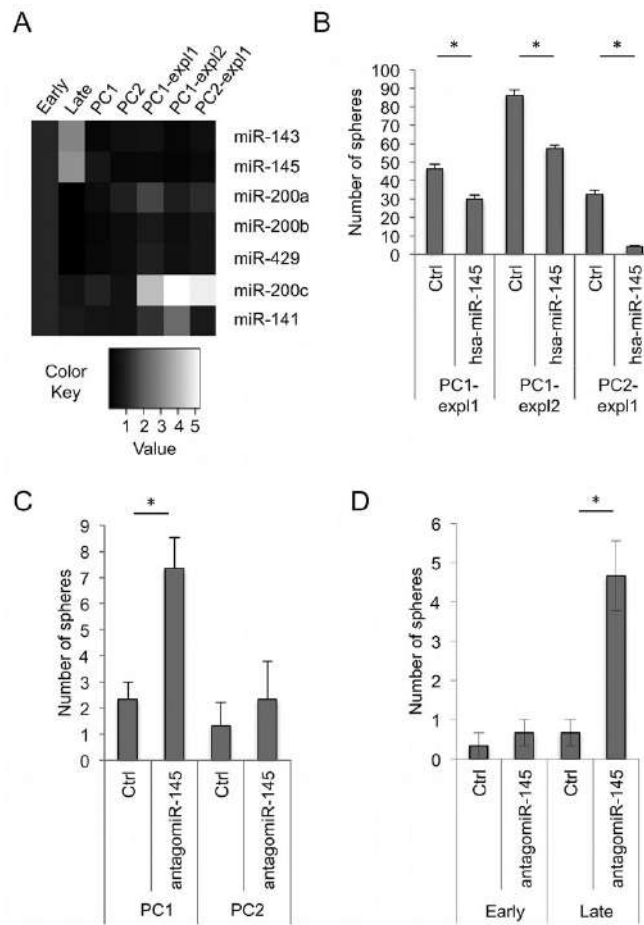
#### The SASP influences the metastable differentiation of pre- and fully tumorigenic cells

Different types of heterotypical interactions (paracrine, endocrine, etc) have been described to take place in the tumor stroma

(31). Because explanted cells emerged after coinjection with senescent fibroblasts *in vivo*, we wondered whether soluble factors, rather than cell-cell contacts, were the major contribution to MET and to the reinforcement of stemness in post-crisis EMT+ HEK cells. To test this possibility, we cultured karyotypically stable Early (epithelial) as well as CIN+ (either EMT+ or explanted) HEK cells in the presence of senescence- or pre-senescence- conditioned media (SCM and pre-SCM) (Supplementary Figure 8A and B, available at Carcinogenesis Online). We measured the impact of these media on cell growth. Short treatments with SCM induced a dramatic increase in growth kinetics in both post-crisis and explanted cells, in agreement with previous reports (14,18) (Supplementary Figure 8C, available at Carcinogenesis Online). As we aimed at recapitulating the *in vivo* situation, we setup long-term treatments by changing these conditioned media every 3 days for a period of 15 days after which we examined cell morphology, expression of EMT markers, reprogramming factors and sphere formation capacity. For these experiments, we also performed treatments with GF FGF1 and epidermal growth factor. We found that karyotypically stable Early cells undergo an EMT upon treatments with GFs, as described for other epithelial systems, whereas CIN+ Late and post-crisis cells retained their mesenchymal phenotype after this treatment (Figure 6A).



**Figure 4.** Stem-like status of post-crisis and explanted cells. (A) Sphere formation assay (in the presence of growth factors epidermal growth factor and FGF1 and 0.8% methylcellulose) of post-crisis PC1 and PC2 and their explanted derivatives. Included are CIN- control cells (Early), CIN+ non-tumorigenic cells (Late) as well as the fully tumorigenic (Early + RAS) HEK cells. Error bars indicate SD ( $n = 3$ ). (B) Differentiation assays of CIN- control cells, CIN+ non-tumorigenic cells (Late), post-crisis PC1 and PC2 along with their explanted derivatives. Differentiation was promoted towards the mesenchymal cell lineages osteoblasts (stained for alkaline phosphatase activity), adipocytes (stained with oil red-O) and chondrocytes (stained with Safranin O). Differentiation was evaluated after 13 days of induction. Representative images are shown. See Supplementary Figure 6, available at Carcinogenesis Online for enlarged images and supplementary results regarding positive controls and expression of differentiation markers. Scale bar, 10  $\mu$ m. (C) Western blot analysis of reprogramming factors in the above cells. Only Nanog appears to be consistently over-expressed in explanted cells (see quantification in Supplementary Figure 5D, available at Carcinogenesis Online).



**Figure 5.** The miR-145 repression participates in the induction of stem cell properties in HEK cells. (A) miR expression profile of miR-143/145 and 200 families in Early, Late, post-crisis and explanted cells. Levels of expression were set to 1 for Early. While miR-200 levels evolve as expected with regard to differentiation transitions, miR-143/145 levels are strongly repressed in post-crisis and explanted cells. (B) Sphere formation assays in explanted cells in response to growth factors after re-establishing miR-145 expression. Spheres > 100  $\mu$ m were counted 6 days after transfection with pre-miR-145 or a negative control. Representative microscopic field images are presented in [Supplementary Figure 7A](#), available at [Carcinogenesis Online](#). Error bars indicate mean  $\pm$  SEM (n = 3). Asterisks indicate a statistically significant difference ( $P < 0.01$ ). (C) Sphere formation assays in PC1 and PC2 cells in response to growth factors after knocking down miR-145 expression. Spheres > 100  $\mu$ m were counted 10 days after transfection with miR-145 antagomir or a negative control. Representative microscopic field images are presented in [Supplementary Figure 7B](#), available at [Carcinogenesis Online](#). Error bars indicate mean  $\pm$  SEM (n = 3). Asterisks indicate a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). (D) Similar sphere formation evaluation in Early and Late cells after knocking down miR-145 expression. Spheres > 100  $\mu$ m were counted 10 days after transfection with miR-145 antagomir or a negative control. Representative microscopic field images are presented in [Supplementary Figure 7C](#), available at [Carcinogenesis Online](#). Error bars indicate mean  $\pm$  SEM (n = 3). Asterisks indicate a statistically significant difference ( $P < 0.01$ ).

In contrast, treatment with SCM (but not with control pre-SCM) was associated with the induction of epithelial cell morphology in CIN+ HEK cells, as shown by a redistribution of F-actin fibers ([Figure 6A](#)), re-expression of epithelial markers such as ZO-1 and repression of mesenchymal markers such as vimentin ([Figure 6B](#)). Interestingly, the expression of some reprogramming factors was also stimulated by the SCM with regard to pre-SCM ([Figure 6B](#)). Furthermore, the SCM, but not pre-SCM (not shown), was able to induce robust sphere formation by cancer cell lines,

explanted HEK cells as well as by PC1 and PC2, but not by the other post-crisis HEK cells that were unable to form tumors in the presence of senescent fibroblasts or other non-tumorigenic HEK cells ([Figure 6C](#)). We tested the tumorigenic capacity of PC1- and PC2-derived spheres by injecting 1 million cells into immunosuppressed mice but did not observe tumor formation, even after three months (data not shown). This failure may reflect a difference between stem-like status and tumor initiation capacity as well as the need of a more permanent contact with the



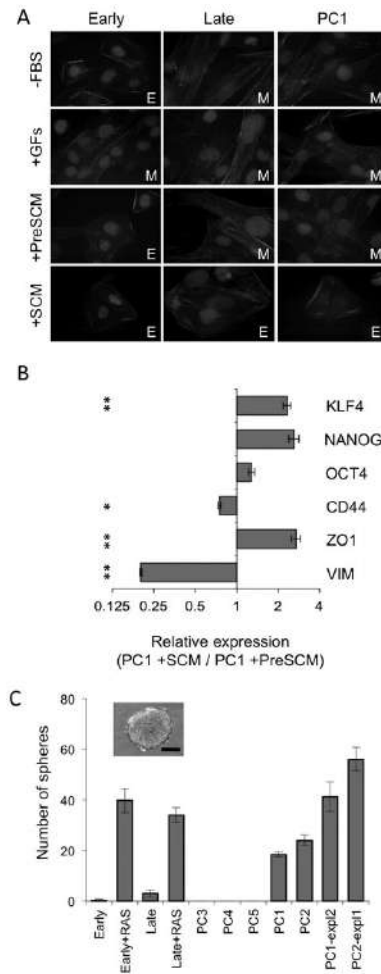
senescent microenvironment in order to become tumorigenic. Alternatively, cell-cell contacts between CIN+ cells and senescent cells may be required to achieve full transformation.

In an attempt to determine how the contact with a senescent microenvironment impacts the tumorigenic post-crisis cells EMT program, we monitored the expression changes of epithelial and mesenchymal markers, reprogramming factors as well as the miR-200 family after three passages in SCM (Supplementary Figure 9, available at Carcinogenesis Online). We detected significant decreases in mesenchymal markers such as Vimentin and ZEB2 in both PC1 and PC2 (Supplementary Figure 9, available at Carcinogenesis Online). We also detected a significant increase in the expression of CDH1 and Nanog (but not for MYC or KLF4) for PC1, but not for PC2 (Supplementary Figure 9, available at Carcinogenesis Online). Intriguingly, miR-200 expression was also affected but not always in the same direction: for PC1, we detected significant changes in miR-200b and miR-429 while for PC2 we detected significant changes for all miR-200 family members. Strikingly, in both PC1 and PC2, the contact with an SMC led to a significant decrease of the expression of miR-145. Together, while the responses to SCM at the level of gene expression were heterogeneous, the experiments indicate that SASP modulates the differentiation states of pre- and fully tumorigenic cells. It also favors the emergence of stem-like properties, likely through the downregulation of miR-145.

## Discussion

It is increasingly recognized that the emergence of full-blown, aggressive carcinomas in elderly individuals is the result of complex interactions between intrinsic alterations of epithelial cells and the extrinsic influence of the senescent stroma. Previous studies have shown that senescent fibroblasts are able to promote proliferation and tumorigenesis of various types of pre-malignant epithelial cells (14,18). The characterization of those tumors suggested that a senescent microenvironment could induce EMT, and this was later demonstrated to be a paracrine effect of a SASP (15). On the other hand, it has been shown that highly aggressive tumors show preferential overexpression of genes normally enriched in embryonic stem cells (32). Indeed, stem cell fundamental properties such as self-renewal, multilineage differentiation capacity and anchorage-independent growth are associated with a more aggressive cancer phenotype (33). These properties, together with tumor initiation capacity, constitute the operational definition of cancer stem cells (34).

In this work, we sought to describe the contribution of a telomere-driven senescent microenvironment to the transformation of CIN+ epithelial cells. Our results demonstrate that post-crisis HEK cells, which display EMT and tumor-related phenotypes (11), have the potential to become fully tumorigenic exclusively in the presence of a senescent microenvironment. Strikingly, cells recovered from senescence-promoted tumors exhibited high cell-autonomous tumorigenicity and enhanced stem-like cell properties, including self-renewal, anchor-independent growth and multilineage differentiation capacity. Surprisingly, while such characteristics allow us to consider these cells as cancer stem-like cells, these cells display wide ranging heterogeneity in cell differentiation status, gene expression as well as in the way they respond to environmental cues, including SASP. Nevertheless, our observations are in line with studies showing that when the stem-like status is reinforced, the migration and invasion capacity potential is decreased (35,36). Our experiments also revealed that SASP is able to impinge on the differentiation status of EMT+ pre-tumor



**Figure 6.** Senescence-associated secreted factors promote epithelial transitions and stemness (A) Phalloidin-Tritc staining of Early, Late and PC1 cells cultured for 15 days in media without fetal bovine serum (-FBS) or supplemented with growth factors (+GFs), or using pre-senescent conditioned (+PreSCM) or senescent-conditioned media (+SCM). Only SCM induced an MET in post-crisis cells. See Supplementary Figure 5, available at Carcinogenesis Online for the preparation of conditioned media, treatment schedule and effects on cell growth. (B) Expression of EMT genes and stemness factors in PC1 treated with SCM determined by RT-qPCR, normalized to  $\beta$ 2-microglobulin and relative to treatment with PreSCM. While the epithelial marker (ZO-1) and stemness factors (in particular KLF4) tend to increase, mesenchymal factors decrease (Vimentin and CD44). Error bars indicate mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.001$ ). (C) Sphere formation assay in the presence of SCM in the panel of HEK cell lines. The total number of spheres per well larger than 100  $\mu$ m was counted at day 10. Only cell lines with cell autonomous (RAS-transformed and explanted) or non-cell autonomous (PC1 and PC2) tumorigenic potential are able to form spheres in SCM. Error bars indicate mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). A representative sphere is shown. Scale bar 100  $\mu$ m.

or cancer cells. Moreover, SASP treatments uncovered stem-like properties only in CIN+ HEK cells with tumorigenic potential and not in CIN+ HEK cells unable to form tumors even in the presence of a senescent microenvironment. However, it remains to be shown whether SASP is sufficient to promote tumorigenicity since SCM-induced spheres from CIN+ HEK cells did not form tumors (not shown), suggesting that cell-cell contacts may also be required in this particular context.

The transformation model of HEK cells that combines, step-by-step, p53/Rb inactivation, telomere-driven CIN, spontaneous immortalization and the senescent microenvironment, allowed us to produce cells bearing all the characteristics that define cancer stem cells (Supplementary Figure 10, available at Carcinogenesis Online). At least two hypotheses explaining the emergence of cancer stem cells have been proposed. The first one states that normal stem cells are the targets of transforming changes (mutations or epigenetic modifications) that produce tumor-initiating cells. The second, perhaps less accepted, suggests that when somatic terminally differentiated cells become tumorigenic, they are somehow dedifferentiated and endowed of a more restrictive multipotentiality (34,37). During this process, differentiation state transitions are proposed to fuel the acquisition of malignant and stem-like characteristics by transformed cells (38,39), through mechanisms that are comparable to those intervening in the generation of induced pluripotent stem cells (iPS cells), in particular the over-expression of the miR-200 family (more specifically miR-200c) (40–42), an event also present during the conversion of EMT+ HEK cells into stem-like cells.

On the other hand, and up to now, the relative contributions of the transforming events mentioned above in the making of cancer stem cells have remained elusive. We and others have shown that telomere dysfunction leads to a major perturbation in the cell differentiation program (11,43,44). We now show that although telomere-driven CIN is sufficient to induce EMT through perturbations in miR-200 expression (11), exposure to a senescent microenvironment is required for these cells to form tumors and to further engage in the process that leads to the acquisition of stem cell characteristics. Our data suggest that in this process, the progressive suppression of miR-145, which is initiated in response to CIN (11) and reinforced by the exposure to the senescent microenvironment (this article), plays an important role in the road to stemness of cancer cells. Interestingly, the low expression of miR-145 is associated with poor prognosis in several types of epithelial cancers (45–47) and has been suggested to control the emergence of cancer stem-like cells in prostate and lung cancers (30,48). That suppression of miR-145 was not enough to induce sphere formation capacity in CIN-HEK cells indicates that other phenomena associated with CIN, such as EMT, are critical in the process. The stochasticity of genetic and epigenetic processes associated with CIN, independently of the immortalization process itself, is underlined by both the fact that only two out of five post-crisis HEK cells were able to consistently form tumors in a senescent microenvironment but also by the wide heterogeneity of explanted cells. These processes do confer some degree of metastability to premalignant cells, as demonstrated by the limited but ascertained capacity of the post-crisis cells to form spheres in senescence-conditioned media and to differentiate into mesenchymal lineages. Thus, it is tempting to speculate that during the process of *in vivo* carcinogenesis, CIN+/EMT+ cells bearing stem-like characteristics will be favored when in the presence of the senescent microenvironment and that this process is more likely to occur with increasing age.

Thus, our observations may help to explain the long-standing link between aging and the incidence of aggressive carcinomas. Taking into consideration that the metastatic capacity is most likely determined at earlier stages of tumorigenesis (49,50), our results may be relevant to the situation *in vivo* since the transformation model of HEK cells fits the parallel progression model of primary tumors (51). Following this model, the telomere-driven crisis in early pre-malignant lesions would lead to the activation of the EMT program, producing cells that, in the absence of external cues, do not survive or potentially stay into a dormant state in tissues or eventually reach the circulation, as suggested by the fact that circulating tumor cells display this EMT-like phenotype (52). With aging, the senescent microenvironment promotes either reactivation of dormant premalignant cells at the site of tumor initiation or the progression into the stemness state of newly produced EMT+ cells, thus favoring tumor growth with extension to neighboring tissues or the dissemination of cells to distant sites where colonization (MET) may occur with production of macroscopic metastases (53). Further interconversions may be expected to occur in locally advanced tumors and overt metastases, as illustrated by the capacity of SASP to modulate these phenotypes in fully malignant cells. It has been proposed that this phenotypic plasticity is a prominent characteristic of metastatic cells and that adaptation rather than mutation/selection is at play in a continuously evolving process (54,55).

In conclusion, our results give further support to the idea that failure of telomere maintenance mechanisms in premalignant epithelial cells (56), on one hand, and telomere-driven senescence in the associated stromal cells, on the other (57), both contribute to the high incidence of aggressive carcinomas with advancing age. These observations may help to explain the delay between the emergence of primary tumors and advanced disease as well as the absence of new driving mutations in metastases (58,59). They also illustrate the way a high degree of genetic and non-genetic (phenotypic) heterogeneity, which characterizes most human epithelial tumors, may have a common origin (60,61). Further investigations will be required to dissect the underlying mechanisms that directly command these complex processes.

### Supplementary material

Supplementary Tables 1 and 2 and Figures 1–10 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

### Funding

L.J.C.V. was the recipient of ALBAN (E06D103001CO) and FRM (FDT20090916974) PhD fellowships. K.J. is a recipient of a French Ministry of Research PhD fellowship. Work in the 'Telomere and Cancer' laboratory was supported by the INCa PAIR-Prostate program, the Ligue National Contra le Cancer (programme Labellisation), L'Association contre la recherche contre le Cancer (ARC) and the ECOS-Nord program of the French Foreign Affairs Ministry (Action ECOS n°: C12S01). Work in the Cellular and Molecular Physiology Group of Universidad Nacional was supported by the Patrimonio Autonomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnologia y la Innovacion, Francisco José de Caldas (contract RC-692-2013).

### Acknowledgements

L.J.C.V., J.P.V. and A.L.V. conceived and designed the study. L.J.C.V., P.O.M., K.J., W.Y.L. and J.L.G. carried out the experiments.

M.R. performed the histopathological analysis. T.P. carried out the GAP analyses. S.B. contributed with reagents and materials. J.P.V. and A.L.V. supervised the study. All the authors analyzed and interpreted the results. L.J.C.V., J.P.V. and A.L.V. wrote the article. Conflict of Interest Statement: None declared.

## References

- Armitage, P. et al. (1954) The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer*, 8, 1–12.
- Campisi, J. (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.*, 75, 685–705.
- Harley, C.B. et al. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458–460.
- Frenck, R.W. et al. (1998) The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 5607–5610.
- DePinho, R.A. (2000) The age of cancer. *Nature*, 408, 248–254.
- Willeit, P. et al. (2010) Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA*, 304, 69–75.
- Chin, K. et al. (2004) In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat. Genet.*, 36, 984–988.
- Meeker, A.K. et al. (2002) Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.*, 62, 6405–6409.
- van Heek, N.T. et al. (2002) Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 161, 1541–1547.
- Ding, Z. et al. (2012) Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. *Cell*, 148, 896–907.
- Castro-Vega, L.J. et al. (2013) Telomere crisis in kidney epithelial cells promotes the acquisition of a microRNA signature retrieved in aggressive renal cell carcinomas. *Carcinogenesis*, 34, 1173–1180.
- Velarde, M.C. et al. (2013) Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy. *Interdiscip. Top Gerontol.*, 38, 17–27.
- Coppe, J.P. et al. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.*, 5, 99–118.
- Krtolica, A. et al. (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12072–12077.
- Parrinello, S. et al. (2005) Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.*, 118, 485–496.
- Coppe, J.P. et al. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.*, 6, 2853–2868.
- Olumi, A.F. et al. (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.*, 59, 5002–5011.
- Bavik, C. et al. (2006) The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.*, 66, 794–802.
- Cahu, J. et al. (2012) Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death Dis.*, 3, e446.
- Stewart, N. et al. (1991) Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells. *Virology*, 180, 49–57.
- der-Sarkissian, H. et al. (2004) The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene*, 23, 1221–1228.
- Hahn, W.C. et al. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400, 464–468.
- Schmittgen, T.D. et al. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.*, 3, 1101–1108.
- Farmer, S.R. (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.*, 4, 263–273.
- Rosen, E.D. (2005) The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73, 31–34.
- Phillips, J.E. et al. (2006) Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J. Cell Sci.*, 119, 581–591.
- Chen, W.H. et al. (2009) In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis Rheum.*, 60, 450–459.
- Popova, T. et al. (2009) Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol.*, 10, R128.
- Xu, N. et al. (2009) MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 137, 647–658.
- Huang, S. et al. (2012) miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells. *Oncol Rep.*, 28, 1831–1837.
- Tlsty, T.D. et al. (2006) Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu. Rev. Pathol.*, 1, 119–150.
- Ben-Porath, I. et al. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.*, 40, 499–507.
- Chaffer, C.L. et al. (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331, 1559–1564.
- Gupta, P.B. et al. (2009) Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat. Med.*, 15, 1010–1012.
- Tsuji, T. et al. (2008) Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res.*, 68, 10377–10386.
- Celia-Terrassa, T. et al. (2012) Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J. Clin. Invest.*, 122, 1849–1868.
- Friedmann-Morvinski, D. et al. (2014) Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Rep.*, 15, 244–253.
- Mani, S.A. et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704–715.
- Polyak, K. et al. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer*, 9, 265–273.
- Li, R. et al. (2010) A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7, 51–63.
- Samavarchi-Tehrani, P. et al. (2010) Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 7, 64–77.
- Wang, G. et al. (2013) Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 2858–2863.
- Pucci, F. et al. (2013) Short telomeres in ESCs lead to unstable differentiation. *Cell Stem Cell*, 12, 479–486.
- Hirashima, K. et al. (2013) Telomere length influences cancer cell differentiation in vivo. *Mol. Cell Biol.*, 33, 2988–2995.
- Larne, O. et al. (2013) miQ-a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 132, 2867–2875.
- Campayo, M. et al. (2013) Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer. *Eur. Respir. J.*, 41, 1172–1178.
- Karakatsanis, A. et al. (2013) Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol. Carcinog.*, 52, 297–303.
- Yu, M. et al. (2013) Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 339, 580–584.
- Husemann, Y. et al. (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*, 13, 58–68.
- Rhim, A.D. et al. (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148, 349–361.
- Klein, C.A. (2009) Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer*, 9, 302–312.
- Hu, J. et al. (2014) MiR-145 regulates cancer stem-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma-initiating cells. *Tumour Biol.*, 35, 8953–8961.
- Giancotti, F.G. (2013) Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*, 155, 750–764.
- Scheel, C. et al. (2007) Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res.*, 67, 11476–11479.

55. Chaffer, C.L. et al. (2015) How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov.*, 5, 22–24.
56. Meeker, A.K. et al. (2004) Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 10, 3317–3326.
57. Heaphy, C.M. et al. (2013) Prostate cancer cell telomere length variability and stromal cell telomere length as prognostic markers for metastasis and death. *Cancer Discov.*, 3, 1130–1141.
58. Bernards, R. et al. (2002) A progression puzzle. *Nature*, 418, 823.
59. Jones, S. et al. (2008) Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 4283–4288.
60. Kreso, A. et al. (2014) Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 14, 275–291.
61. Burrell, R.A. et al. (2013) The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501, 338–345.



## The senescent microenvironment promotes the emergence of heterogeneous cancer stem-like cells.

Castro-Vega et al.

### Legends to the supplementary figures

#### Figure S1. Post-crisis HEK cells are not tumorigenic.

(A) Model of telomere instability and immortalization. Post-crisis HEK cells were obtained from clone ER-SV40 HA1 after spontaneous immortalization by reactivation of telomerase. Early cells were obtained from clones ER-SV40 HA5 and HA1 by introduction of hTERT before the initiation of telomere instability (<PD50). Late cells were obtained from clone ER-SV40 HA5 by introduction of hTERT after the initiation of telomere instability (>PD50). Unless otherwise stated, “Early” refers to the HA5-derived cells. (B) Analysis of HEK cell lines Early, Late, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, and PC-Polycloidal for the expression of LT-SV40 by Western blot. (C) Western blot to analyze the expression of RAS in HEK cell lines Early, Early+RAS, Late, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5 and PC-Polycloidal. (D) Agar colony formation assay of HEK cell lines as in B. Error bars indicate mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Only Early+RAS (positive control), was capable of forming colonies in soft agar.

#### Figure S2. Characterization of senescence in human fibroblasts HCA2.

(A) Growth curves of primary human fibroblasts HCA2 and isogenic cells immortalized with hTERT (HCA2+hTERT) showing the entry in senescence at PD60. (B) Images (10X) of cells as in A stained for  $\beta$ -galactosidase showing a positive staining in senescent fibroblasts only. Scale bars, 100  $\mu$ m. (C) Tumorigenicity assays of HEK cells in the presence of senescent fibroblasts. Post-crisis HEK cell lines PC1 and PC2 as well as Early (CIN-) cells were injected alone ( $2.5 \times 10^6$ ) or in the presence of an equal number of HCA2 senescent fibroblasts (HCA2-s) in one flank of six SCID mice. Only PC1 and PC2 cells formed tumors (3/5 and 5/5, respectively) exclusively when injected in the presence of senescent HCA2 cells. Error bars indicate mean  $\pm$  SD. (D) Duplication of the above experiment. Once again, only post-crisis cells PC1 and PC2 co-injected with HCA2-s formed tumors. Error bars indicate mean  $\pm$  SD.

#### Figure S3. Characterization of genome instability in explanted cells.

(A) Schematic representation of the experimental setup to establish explanted HEK cells from tumors. (B-G) SNP array hybridization profiles of parental post-crisis (PC1

and PC2, panels B and E) and explanted cells (panels C-D and F-G). Characteristic genomic rearrangements acquired by post-crisis cells are observed in the corresponding explanted cells, whereas additional rearrangements were identified in the latter.

**Figure S4. Patterns of expression of microRNAs have drastically changed in explanted cells.**

Pre-miR expression profiles of HEK cells that did not undergo CIN, including primary, non immortalized ER-SV40-transformed cells at early passages (clones HA1 and HA5 at PD33) or immortalized by exogenous expression of hTERT (clones HA1 and HA5 called “Early”) determined by RT–qPCR. The normalized expression of each precursor against the mean of three housekeeping genes ( $\Delta$ CT) was used to generate the heatmap, where blue indicates high expression and yellow indicates low expression. The color bar indicates the magnitude of expression in log<sub>2</sub> scale. Clustering was performed only for pre-miRs using Euclidean distance metric.

**Figure S5. HEK explanted cells are heterogeneous.**

(A) Analyses by contrast phase microscopy (upper panel, 10X, scale bar=100 $\mu$ m) and phalloidin–TRITC staining (bottom panel, 20X) of parental post-crisis PC1 and PC2 and corresponding explanted cells revealed cell heterogeneity. Only PC1–expl2 displays an overt epithelial-like distribution of actin fibers, in agreement with the FACS analysis and E-cadherin expression (see below). The other explanted cell lines rather display mixed morphology patterns and stainings. (B) Flow cytometry analysis of surface markers CD24–FITC (epithelial) and CD44–APC (mesenchymal) in post-crisis and the corresponding explanted cells. Expression of CD44 marker remained approximately the same with regard to the parental cell lines. On the other hand, levels of expression of CD24 varied amongst explanted cells, giving intermediate, high or low levels of expression in PC1expl1, PC1expl2 and PC2expl1, respectively. (C) Levels of expression of mRNAs corresponding to epithelial and mesenchymal markers in explanted cells as compared to the parental post-crisis cells. Represented is the ratio between explanted and parental cells. Error bars indicate SEM from three independent RT reactions. Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0.01$ ). (D) Levels of expression as detected by western blot (presented in Figure 4C) of reprogramming factors in explanted cells as compared to the parental post-crisis cells. Represented is the ratio between explanted and parental cells.

**Figure S6. Differentiation assays**

(A) Mesenchymal stem cells (MSCs) were treated with factors in order to induce their differentiation into osteoblasts (stained for alkaline phosphatase activity), adipocytes

(stained with oil red-O) and chondrocytes (stained with Safranin O). Enlargements of positive staining cells are shown on the right. Scale bar 10 $\mu$ M. **(B)** Relative expression levels of genes deemed to reflect differentiation of MSCs into mesenchymal cell lines: adipocytes (PPAR $\gamma$ ; C/EBP-alpha), osteoblasts (Runx2; APL) and chondrocytes (AGGRECAN; SOX9) by RT-PCR ten days after induction. **(C)** Image enlargements from the experiment shown in Figure 4B. **(D)** Relative expression levels of chosen genes deemed to reflect differentiation of CIN+ HEK cells into mesenchymal cell lines. Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure S7. Sphere formation assays after introduction or depletion of miR-145.**

**(A)** Levels of miR-145 as detected by RT-qPCR, relative to miR family hsa-Let-7 in explanted cells 48h after transfection either with pre-miR-145 or a negative control and represented as ratios to the expression level in the latter. Error bars indicate SEM (n=2). Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0.01$ ). On the right, representative microscopic field images (scale bar is 100  $\mu$ m) for each experimental condition.

**(B)** miR-145 levels measured by RT-qPCR, relative to miR family hsa-Let-7 in post-crisis cells 48h after transfection either with a miR-145 antagomir or a negative control and represented as ratios to the expression level in the latter. Error bars indicate SEM (n=2). Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0.01$ ). On the right, representative microscopic field images (scale bar is 100  $\mu$ m) for each experimental condition.

**(C)** miR-145 levels measured by RT-qPCR, relative to miR family hsa-Let-7 in Early and Late cells 48h after transfection either with a miR-145 antagomir or a negative control and represented as ratios to the expression level in the latter. Error bars indicate SEM (n=2). Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0.01$ ). On the right, representative microscopic field images (scale bar is 100  $\mu$ m) for each experimental condition.

**Figure S8. Preparation of senescence-conditioned medium and growth kinetics of postcrisis and explanted cells upon treatments with this medium.**

**(A)** HCA2 fibroblasts, pre-senescent (PD35) and senescent (PD65) were starved for 48h in medium without serum. Conditioned media were collected, filtered and concentrations normalized to the number of cells used for their production. **(B)** Treatment schedule. **(C)** Equal numbers of cells were seeded in triplicate and treated with either normal or conditioned media (CM) from pre-senescent (Pre-SCM) or senescent (SCM) fibroblasts. Cells were counted at the indicated time points. Error bars represent SEM (n=3).

**Figure S9. Impact of SASP on the expression of EMT markers, stemness-related factors and miRs in post-crisis HEK cells.**

PC1 and PC2 were cultured in SCM and spheres were serially passaged for three generations, always in SCM. Control cells (monolayer) were kept in media without serum for 5 days. Expression of EMT markers (VIM, ZEB1, ZEB2 and CDH1), reprogramming factors (MYC, KLF4 and NANOG) as well as microRNAs (miR-200 family and miR-145) were measured by RT-PCR. Shown is the expression found in spheres relative to cells grown in control media (monolayer). Error bars represent SEM (n=2). Asterisks indicate a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure S10. Stepwise transformation model of HEK cells.**

Primary cells transfected with ER-SV40 are allowed to escape premature senescence by disruption of the p53/Rb signaling pathways. Telomere-driven chromosome instability leads cells to crisis where a few of them reactivate spontaneously telomerase. Post-crisis cells display a miR-200-dependent EMT and are considered premalignant since they exhibit tumor-related traits such as invasion and migration capacities and slight increase in the expression of reprogramming factors. In agreement with a stem-like status, EMT+ cells have both sphere formation and differentiation capacities, potentially explained by down-regulation in the expression of miR-145. Nevertheless, EMT+ post-crisis cells lack of tumorigenic capacity and only a fraction of these cells are capable of forming tumors when co-injected with senescent fibroblasts into immunodeficient mice. Cells explanted from tumors formed by post-crisis cells are highly heterogeneous and exhibit a more robust stem-like phenotype, while the expression of miR-145 is kept down-regulated. These stem-like cells are highly tumorigenic in the absence of senescent fibroblasts and give rise to heterogeneous tumors composed by both epithelioid and fibroblastoid components. Fully transformed stem-like cells are metastable, undergoing EMT-MET inter-conversions when in contact with a senescent microenvironment.

Figure S1

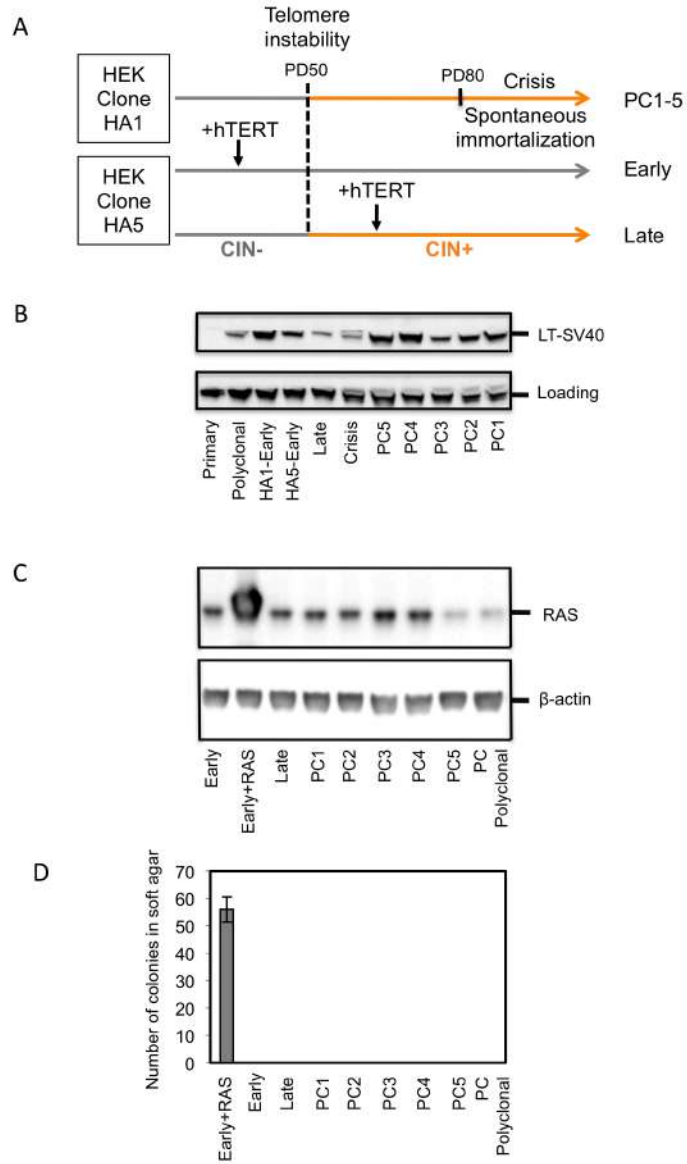


Figure S2

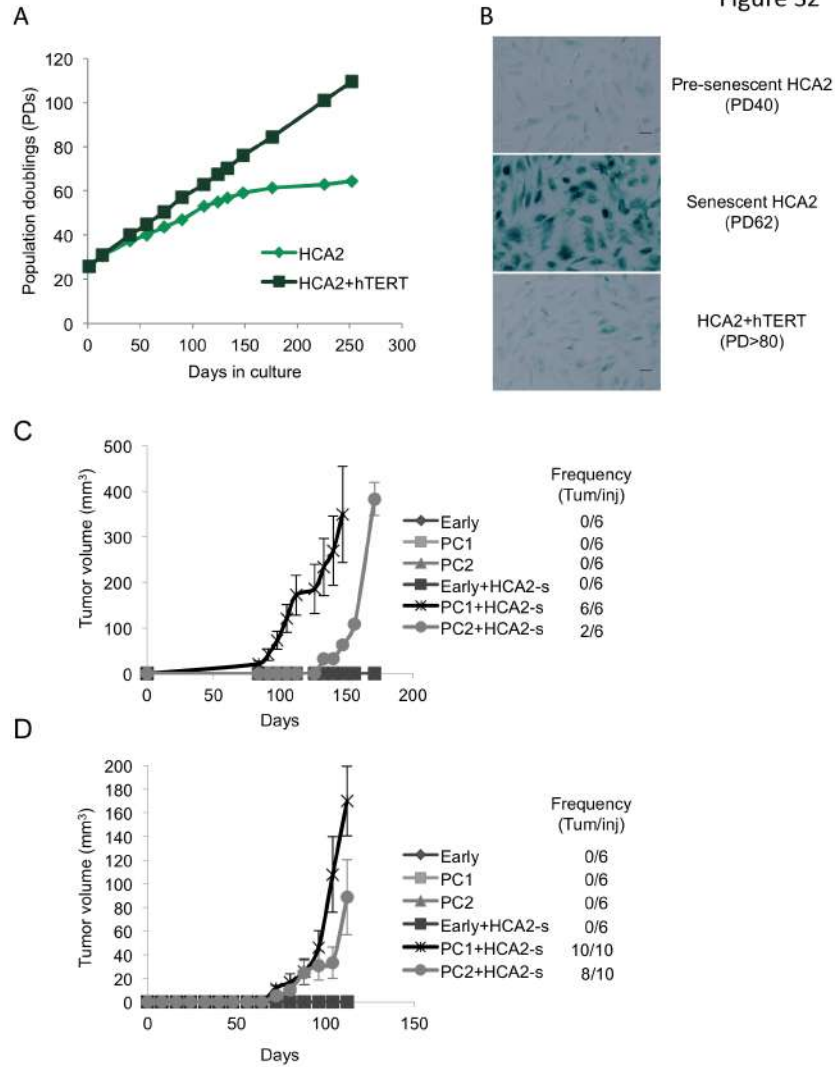


Figure S3

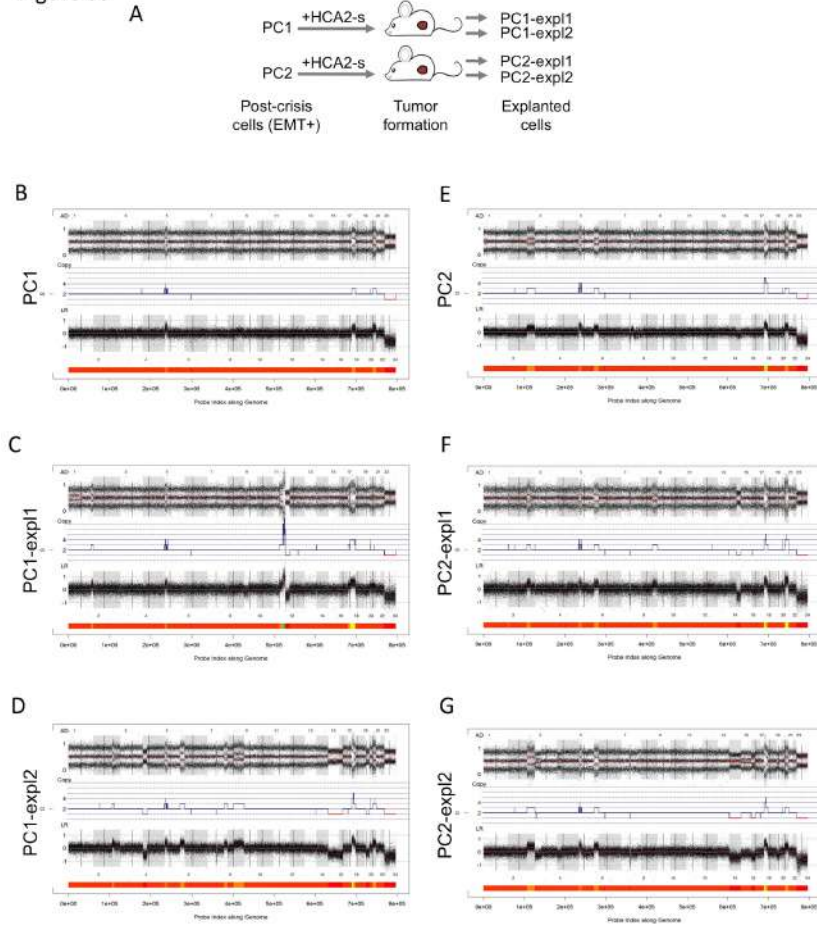


Figure S4

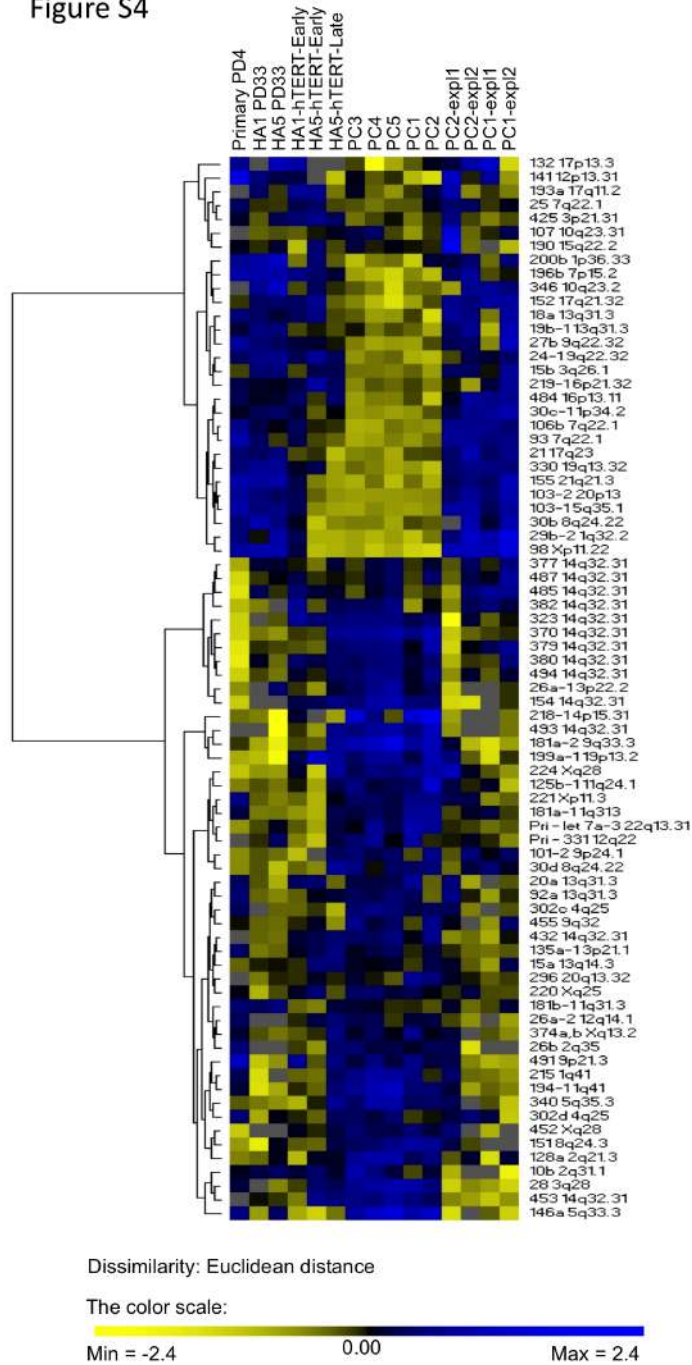
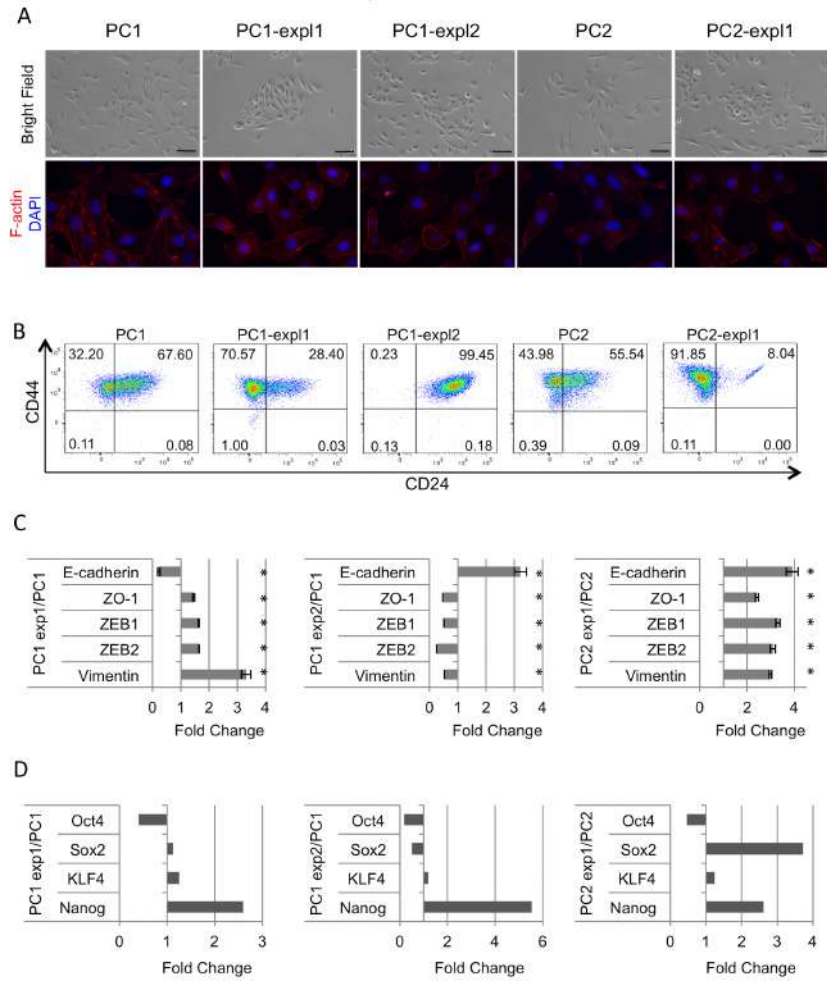
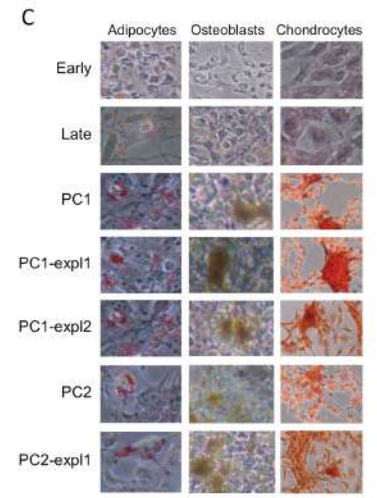
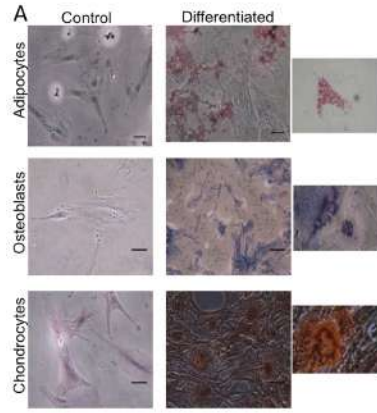




Figure S5





**B** Figure S6

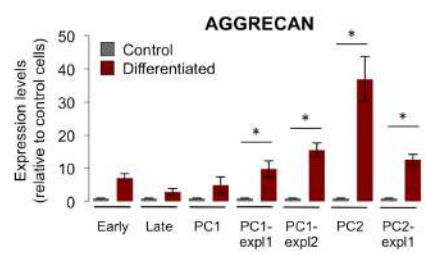
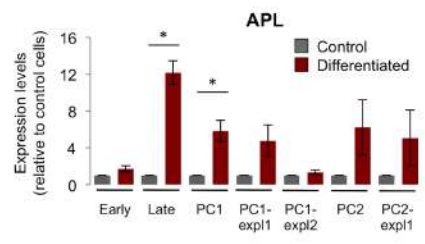
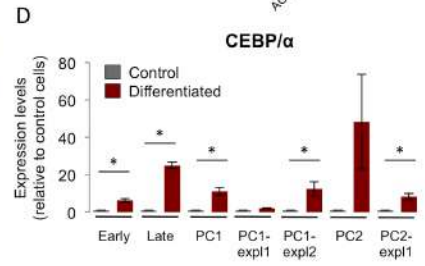
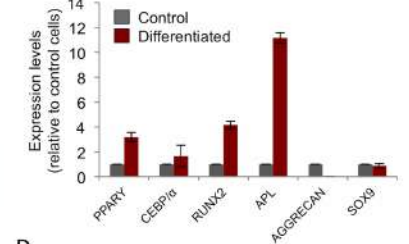


Figure S7

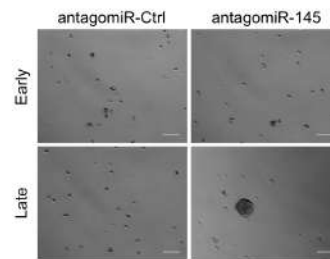
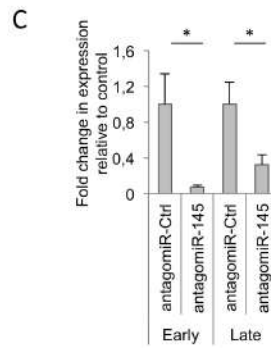
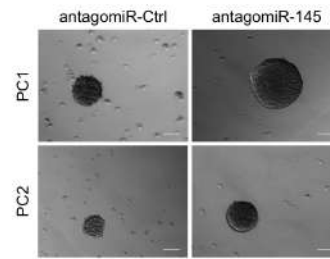
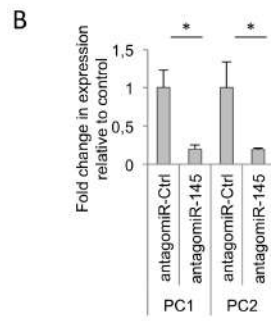
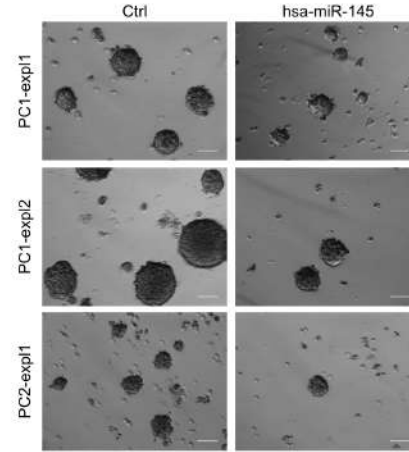
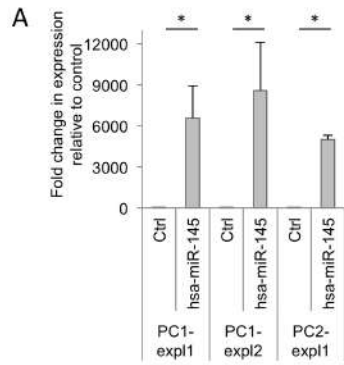
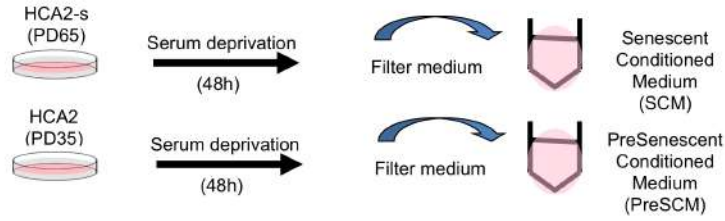


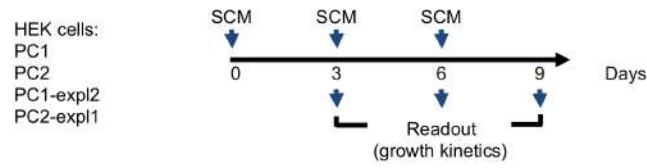
Figure S8

A



B

Treatment schedule



C

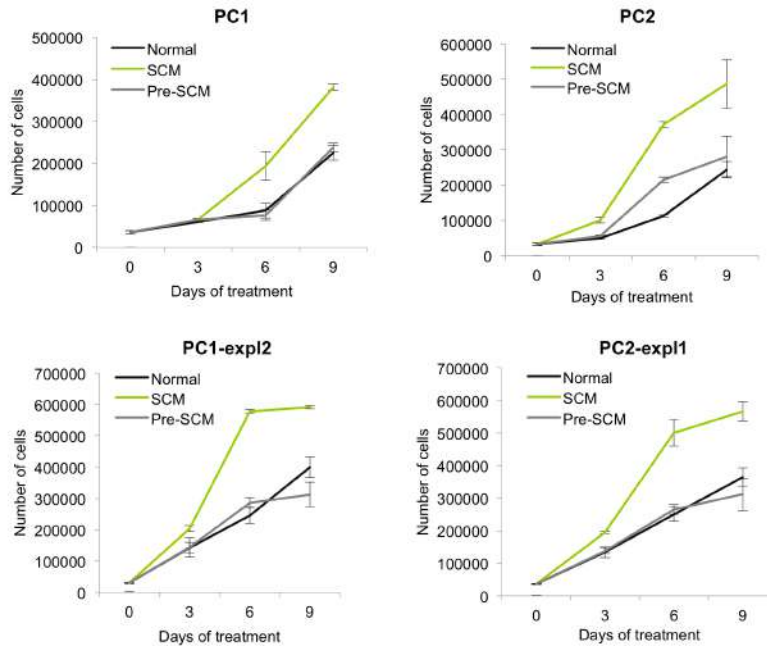


Figure S9

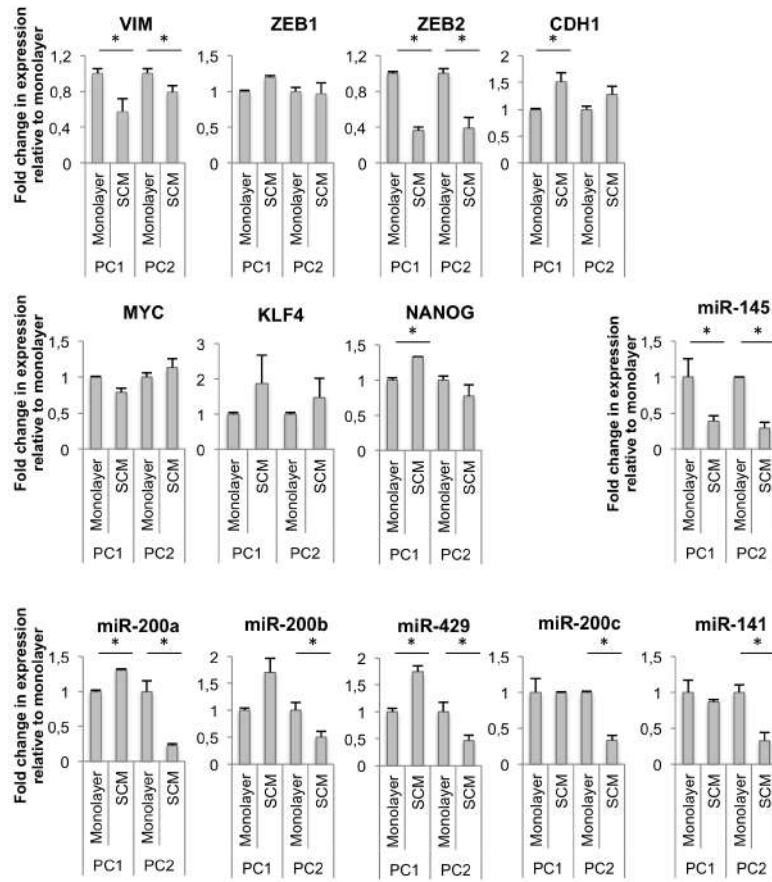
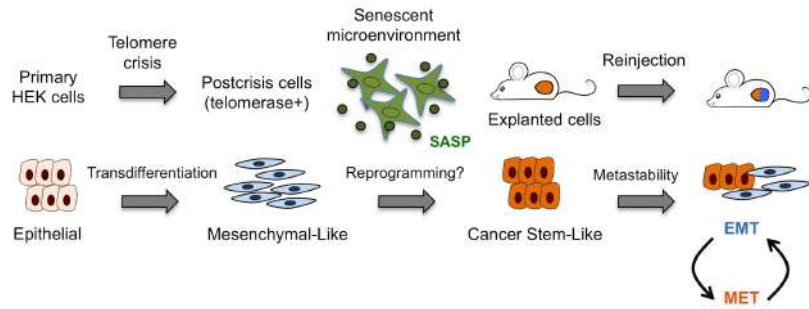


Figure S10



RESEARCH

Open Access



# Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line

Paola Ortiz-Montero<sup>1</sup>, Arturo Londoño-Vallejo<sup>2,3</sup> and Jean-Paul Vernot<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** There is compelling evidence associating senescent cells with the malignant progression of tumours. Of all senescence-related mechanisms, the so-called senescence-associated secretory phenotype (SASP) has attracted much attention. Since the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 are consistently present in the SASP, and secreted by highly aggressive breast cancer cell lines, we aimed at elucidating their role on the less aggressive breast cancer cell line MCF-7, which does not secrete these cytokines.

**Methods:** The MCF-7 cell line was treated with either senescence-conditioned medium (SCM), IL-6 or IL-8 and then evaluated for phenotypic (CD44 and CD24 by FACS) and functional changes associated with an EMT program (migration/invasion) and for the acquisition of stem cell properties: mammosphere-forming capacity, expression of reprogramming factors (by qRT-PCR) and multilineage differentiation potential. We also evaluated the role of IL6 and IL8 in the cytokine-secreting, highly tumorigenic cell line MDA-MB-231.

**Results:** Our results show that treatment of MCF-7 cells with IL6 and IL8, alone or together, induced the appearance of cells with fibroblastoid morphology, increased CD44 expression and migration, self-renewal and multilineage differentiation capacity, all characteristics compatible with an EMT program and stemness. These changes closely resembled those induced by a SCM. Interestingly, SCM treatments further increased IL6 and IL8 secretion by MCF-7 cells, thus suggesting the participation of an autocrine loop. Indeed, neutralizing antibodies against IL6 and IL8 reversed the effects of SCM on MCF-7, pinpointing these cytokines as major mediators of EMT and stemness-related effects associated with the senescent microenvironment. Additionally, prolonged exposure of MCF cells to IL6 or IL8 induced the appearance of senescent cells, suggesting a mechanism by which senescence and inflammation are reinforced favouring the acquisition of EMT and stem-like features at the population level, thus increasing tumour aggressiveness. Strikingly, our results also show that both IL6 and IL8 are important to maintain aggressive traits in MDA-MB-231 cells, a highly tumorigenic cell line, which appears to be devoid of stemness-related features.

(Continued on next page)

\* Correspondence: [jpvernnot@unal.edu.co](mailto:jpvernnot@unal.edu.co)

<sup>1</sup>Cellular and Molecular Physiology Group, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. 111311, Colombia

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

**Conclusions:** This study demonstrates that, similar to what is observed with a senescent microenvironment, purified IL6 and IL8 induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu responsible for the emergence of epithelial plasticity and stemness features, thus conferring more aggressive phenotypes to a luminal breast cancer cell line. On the other hand, the basal-like MDA-MB-231 cells, whose aggressiveness-related features depend on IL6 and IL8 secretion, almost completely lack mammosphere formation and differentiation capacities, suggesting that tumour aggressiveness is not always related to stemness.

**Keywords:** Senescence, IL6, IL8, Stemness, Breast cancer, Inflammation

## Background

Cellular senescence has been considered as a powerful tumour suppressive mechanism [1, 2]. Nevertheless, early work has shown that cancer cells evade this mechanism in different ways [3–7]. Furthermore, senescent cells when co-transplanted with fully malignant cancer cells clearly increase cell growth and rate of tumour formation in xenotransplantation models [8–11]. There is also compelling evidence on the impact of senescent cells on the evolution of premalignant stages of tumour development [12, 13] and various types of premalignant cells are induced to proliferate and to form tumours in the presence of senescent fibroblasts [10, 14, 15]. The accumulated evidence indicate that a tumour-permissive microenvironment is induced by senescence-dependent mechanisms, either directly through cell-cell contacts or the secretion of tumour growth factors, or indirectly by modifying the environment in which tumour cells evolve.

Of all senescence-related mechanisms, the so-called senescence-associated secretory phenotype (SASP) has attracted much attention. Indeed, senescent cells secrete a wide assortment of soluble molecules [16], including inflammatory cytokines, chemokines, growth factors, and proteases believed to facilitate tumour growth. In vivo, SASP effects are thought to be much more complex because of its impact on immune, inflammatory and other stromal cells. SASP composition varies depending on cell and tissue of origin and the triggers involved [17]. Nevertheless, the inflammatory cytokines IL6 and IL8 are consistently present and known to be responsible for the maintenance and propagation of the SASP response in the microenvironment [16, 18]. Elevated serum levels of both cytokines have been used independently as prognostic markers for breast cancer [19–22]. Their effect has been principally and individually studied in basal/mesenchymal subtypes of breast cancer, since these cells secrete constitutively high amount of both cytokines [23–25]. In these models, IL6 has been shown to play a central role in the dynamic equilibrium between cancer stem cells (CSC) and non-CSC, and in the maintenance and enrichment of normal and malignant mammospheres [26–29]. Interestingly, it has been recently shown, in models of advanced breast cancers HER2+, that IL6 was expressed mainly by senescent cells [30]. On the other hand, IL8 has

been studied not only for its role as a chemokine in cancer invasion and metastasis [31, 32] but also for its ability to induce CSC activity in HER2+ breast cancer cells [33] and mammosphere formation in several cell lines of different origins [34]. Both cytokines are also essential for cell growth and anchorage-independent growth and colony formation in tumour cells from the so-called triple negative breast cancers (TNBC) [35]. Additionally, both cytokines play an essential role in mediating oncogenic-induced senescence acting in an autocrine and cell-autonomous fashion [36, 37].

These findings and others have revealed a close relationship between senescence and inflammation [17], and the relevance of the chronicity of both phenomena in tumour progression. For instance, prolonged SASP exposure can enhance tumour progression [10, 14] and chronic inflammation can increase cancer risk and act as a tumour-promoting stimulus [38]. Additionally, the decreased recurrence and mortality observed not only in colorectal cancer [39] but also in breast and pancreas cancer after surgical removal of the primary tumour and the use of the NSAIDs, suggest a possible common mechanism of action of the inflammatory mediators in tumour development [40, 41].

Recently, we have shown that post-crisis, pre-malignant HEK cells have the potential to become fully tumorigenic exclusively in the presence of a senescent microenvironment [15], and by doing so they acquire enhanced stem-like cell properties, autonomous tumorigenic potential and epithelial plasticity. Additionally, conditioned media from senescent fibroblasts (SCM), highly enriched in IL6 and IL8, strongly influenced the cell plasticity of pre- and fully malignant cells [15]. Nevertheless, SCM-induced spheres from CIN+ HEK cells did not form tumours, suggesting, that in this particular setting, the prolonged exposure to SASP is necessary for maintaining the senescence/inflammatory responses that confers tumorigenic properties.

Since luminal A breast cancer cell lines do not express IL6 or IL8 [25, 42, 43], the relevance of these cytokines in CSC function has been poorly studied. Nevertheless, they could play a role in luminal A breast cancer development and progression. The understanding of the contribution of these specific cytokines in maintaining a



tumour prone milieu capable of inducing specific properties of tumour cells would be extremely relevant for novel therapeutic interventions. In the present work, we have studied the specific contribution of the pro-inflammatory cytokines IL6 and IL8 in the acquisition of a tumorigenic phenotype using the well-characterized luminal breast cancer cell line MCF-7, which does not express IL6 or IL8 constitutively [25, 42, 43]. This cell line has been classified as senescent-cell progenitor subtype with abilities to differentiate into luminal and myoepithelial cell types, and showing lower and heterogeneous expression of the senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ Gal). This is in clear contrast with other cell lines, including the MDA-MB-231 basal breast cancer subtype, which expresses high IL6 and IL8 levels and are categorized as immortalized-cell progenitor subtype with limited differentiation potential and negative for SA- $\beta$ Gal [44].

## Methods

### Breast cancer cell lines and culture conditions

MCF-7 and MDA-MB-231 cells were obtained from the ATCC and were maintained under standard culture conditions in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C. MCF-7 cells were grown in minimum essential medium, MEM $\alpha$  (Invitrogen) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), nonessential amino acids and sodium pyruvate. MDA-MB-231 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% heat inactivated FBS.

### MCF-7 treatment with senescent-conditioned medium (SCM)

SCM was prepared by culturing senescent (PD65) foreskin fibroblasts HCA2 to 80% confluence, then washed twice with PBS 1 $\times$  and serum starved for 48 h in Iscove's modified Dulbecco's media + glutamax culture media (Invitrogen) without FBS. SCM was collected, centrifuged, filtered and its concentration normalized to the number of cells used. MCF-7 cells were treated with either normal or SCM for 5 days with refeeding every two days.

### Senescence-associated $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ GAL) assay

Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ GAL) activity was evaluated in senescent- and young fibroblasts after 2 days of culture by using the cellular senescence assay kit (KAA002, Millipore). SA- $\beta$ GAL activity was also determined in MCF-7 cells treated for 5 or 10 days with high (50 ng/ml) or low (0,5 ng/ml) cytokine concentration or SCM. Briefly, cells were seeded in triplicates in 24-well plates, washed twice with PBS 1 $\times$ , and then fixed with formalin for 5 min at room temperature. Next, cells were washed twice with PBS 1 $\times$  and incubated overnight at 37 °C with  $\beta$ -gal substrate in an acidic

buffer (pH 6.0) and examined with an inverted microscope and photographed (NIKON TS100). The development of a perinuclear blue color was indicative of senescent cells.

### MCF-7 treatment with human recombinant cytokines or neutralizing antibodies

Adherent MCF-7 cells were grown to 20% confluence in complete medium, washed twice in PBS 1 $\times$  before the addition of 50 ng/ml of human recombinant IL8 (PHC0084, Invitrogen), IL6 (PHC0065, Invitrogen) or the mixture (IL6 + IL8) in 0,5% FBS MEM $\alpha$  medium. For neutralization experiments, MCF-7 cells were incubated with SCM containing 1  $\mu$ g/ml of human CXCL8/IL-8 antibody (AF-208-NA, R&D SYSTEMS), IL6 antibody (MAM206, R&D SYSTEMS) or the mixture (anti-IL6 + anti IL8). Cells cultured in MEM $\alpha$  supplemented with 0,5% FBS or SCM were used as a control. Cells were cultured for 5 days and cytokines or antibodies were added every two days.

### Cell proliferation determination

SCM-or cytokine-treated MCF-7 cells or control were seeded in triplicates into 16-mm-diameter wells at a density of 5000 cells per well in 0,5% FBS MEM $\alpha$  medium and allowed to attach for 24 h. At daily intervals and for 5 consecutive days, cells were harvested from the monolayer after trypsinization and counted using a Neubauer chamber.

### Cell migration and invasion assays

SCM-or cytokine-treated MCF-7 cells or control were grown to 80–90% confluence then serum starved overnight before setting up the experiment. Cells were washed twice with PBS 1 $\times$ , harvested after trypsinization and collected and suspended in starvation medium. For “wound healing” assay, cells were seeded in triplicates, grown to confluence and scratched with a p10 pipette tip making a straight scratch, simulating a wound. Images were captured at 0, 6 and 12 h. At least 10 images at each time point were used for analysis and the percentage of invaded area was estimated by using Image J program. For transwell migration assays, filters (8.0  $\mu$ m pore size) and 24-well transwell chambers (BD Biosciences) were used. Chambers were rinsed with culture medium without serum 1 h before the assay. The cells were plated in triplicates in the upper wells at a density of  $1 \times 10^5$  per well in 0,1 ml; the lower chambers were set in the following conditions: complete medium + 50 ng/mL hrIL8 or complete medium (20% FBS). Cells were allowed to migrate for a period of 48 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, after which the experiment was stopped by wiping the cells from the well with a cotton swab and fixed with methanol 15 min and then stained with 0,5% Crystal violet in water for 15 min. A total of 10 images were taken for quantification using an

inverted microscope. The invasion assay was identical to the above migration assay except that filters were coated with 100  $\mu$ L of matrigel (BD Bioscience), diluted one-third in media without serum. The experiment was stopped after 48 h as described above.

#### Cell adhesion assay

Fibronectin at 20  $\mu$ g/ml (Invitrogen) or Collagen at 40  $\mu$ g/ml (Sigma) was added to 96-well plates and incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere; then the solution was removed and the wells were washed with PBS 1 $\times$  and incubated during 1 h with the blocking solution (0,5% of BSA in medium).  $4 \times 10^3$  cells were added to each well in triplicates. Plates were then cultured for 40 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, after which the medium was removed. The non-adherent cells were washed twice with PBS 1 $\times$  and the remaining cells were stained with Crystal violet as described above. The adherent cells were counted using an inverted microscope.

#### Flow cytometry analysis

Cells ( $10^6$ ) were harvested after trypsinization, washed twice (for cell surface markers expression) or fixed with ethanol (for Ki-67 staining) and suspended in 500  $\mu$ l PBS 1X containing 0,5% bovine serum albumin. Cells were stained with FITC-conjugated mouse anti-human CD44 and R-Phycoerythrin-conjugated mouse anti-human CD24 (both from Invitrogen). Cells incubated without antibody were used as a blank. For Ki-67 determination an allophycocyanin-conjugated mouse anti-human Ki-67 (Biolegend) and its respective isotype control APC Mouse IgG1,  $\kappa$  isotype Ctrl (FC) were used. The different antibodies were incubated for 30 min and washed to remove the excess of antibodies. The cytometric analysis was carried out using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Aria-II flow cytometer (BD Bioscience). The Flow Jo software was used for data acquisition and analysis, respectively, using measurements from 10,000 cells in each experiment.

#### Human inflammatory cytokine assay

The amount of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12-p70, IL-6, IL-8, IL-10) present in cell supernatants from senescent and young fibroblasts or SCM-treated or untreated MCF-7 was determined using a human inflammatory cytokine kit (BD™ Cytometric Bead Array (CBA) following instructions of the manufacturer. A FACScan flow cytometer (BD) was used to analyse samples.

#### Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Cells were collected by centrifugation, and RNA was extracted using the Trizol/chloroform method (Invitrogen)

according to manufacturer's instructions. The concentration of total RNA was measured by a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer and one microgram of RNA was treated with DNase I (Invitrogen) and used for the reverse transcription using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). The resulting cDNA was diluted 1:4 and assessed by qRT-PCR using Power Syber Green Master Mix (Applied Biosystems). The volume of each reaction was 25  $\mu$ L. Measurements were done in a 7500 Real Time PCR system. For each sample, qRT-PCR reactions were done in triplicate, and the entire analysis was done twice independently. Ct-values for each sample and the data were exported to Microsoft Excel for further analysis. The average Ct-value for the endogenous control (GADPH) was calculated for each sample. To calculate the relative expression of the gene of interest the delta-delta Ct-method was used [45]. The sequence of the primers used is provided in the Additional file 1: Table S1.

#### Mammosphere-forming assay

For the mammosphere-forming assay, cultured MCF-7 and MDA-MB-231 cells at a density of  $5 \times 10^3$  cells/mL per well were suspended and seeded in triplicates into ultralow attachment plates (MW6) (Nalge Nunc International), in serum free DMEM/F12 (1:1) medium supplemented with 20 ng/mL basic-fibroblast growth factor (b-FGF, Gibco; Ref. PHG0266), 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF, Gibco; Ref. PHG0315), ITS (insulin + transferrin + selenium, Sigma), B27 supplement (GIBCO) and 1% methylcellulose. Fresh medium was added to each well every two days (without removing the old medium). Cells were grown in these conditions as non-adherent spherical clusters of cells during 3–9 days after which the spheres (>100  $\mu$ m) were counted. Media without growth factors was used as a control (without induction). Second and third-generation mammosphere were formed by collecting mammosphere every five days by gentle centrifugation and dissociated to single cell suspensions by incubation in a 0,25% trypsin-EDTA solution for about 5–10 min at 37 °C and by mechanical dissociation by pipetting up and down 10–20 times. The single cells suspensions were washed, counted and plated at the initial density in the defined media describe above.

#### Differentiation assays to mesenchymal lineages

For adipogenic and osteogenic differentiation assays,  $2 \times 10^4$  cells were seeded in triplicates in a 24-well format plate and cultured in complete medium. 24 h later, the medium was replaced with the respective induction medium. For adipogenic differentiation we used incomplete medium MEM $\alpha$  (Sigma–Aldrich) supplemented with 10% FBS, 1 mM dexamethasone (Sigma), 0,5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma), 200  $\mu$ M indomethacin (Sigma–Aldrich) and 10  $\mu$ g/ml insulin (Sigma–Aldrich).

After 3 days, maintenance medium containing MEM $\alpha$ , 10% FBS and 10  $\mu$ g/ml insulin, was added to the cells. Three cycles of induction and maintenance were completed. After 10 days, cells were washed twice with PBS 1 $\times$ , followed by fixation with formalin for 30 min (Sigma–Aldrich) and stained with Oil Red–O solution for 1 h (Sigma–Aldrich). The number of Oil Red–O positive cells was determined with an inverted microscope [46, 47]. Osteogenic differentiation was induced with incomplete medium MEM $\alpha$ , supplemented with 10% FBS, 100 nM dexamethasone, 0,2 mM ascorbic-2-phosphate (Sigma–Aldrich) and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma–Aldrich). Medium was changed every 3–4 days. After 10 days, cells were assessed for alkaline phosphatase activity (APL activity) using an APL staining kit (Chemicon International, SCR004) following the manufacturer's instructions; cells were examined with an inverted microscope [48]. For chondrogenic differentiation,  $5 \times 10^4$  cells were plated in a 24-well plate and cultured in chondrogenic induction medium, containing MEM $\alpha$  and 10 ng/ml TGF $\beta$ -1 (Sigma–Aldrich). The medium was changed three times a week. After 10 days, the cells were washed twice with PBS 1 $\times$ , followed by fixation with formalin for 5 min and stained with 0,1% Safranin O for 3 min (Sigma–Aldrich). Cells were observed with an inverted microscope [49].

#### BrdU proliferation assay

MCF-7 cells at 30–50% confluence were cultured overnight in 25 cm<sup>2</sup> flasks. After 24 h of serum starvation, cells were treated with cytokines for 12 h or with SCM during 5, 7 and 10 days. After treatment, cells were labelled with 30  $\mu$ M BrdU (Eurobio) for 25 min, washed and permeabilized with 100% ethanol. After treatment with pepsin and HCl 2 N to denature the DNA, samples were incubated with primary anti-BrdU and secondary anti-BrdU-FITC antibodies (Invitrogen). Samples were analyzed by flow cytometry.

#### Transfection of MDA-MB-231

MDA-MB-231 cells were transfected with pSuperRetroPuro-IL-6 shRNA 1 plasmid (Addgene) or endoribonuclease-prepared small interfering (esi)RNAs (Sigma EHU 048321) using an Amaxa Nucleofection system (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD) or Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturers' instructions. PSuperRetroPuro empty plasmid and esiFLUC (Firefly luciferase) were used as a control.

#### Statistical analysis

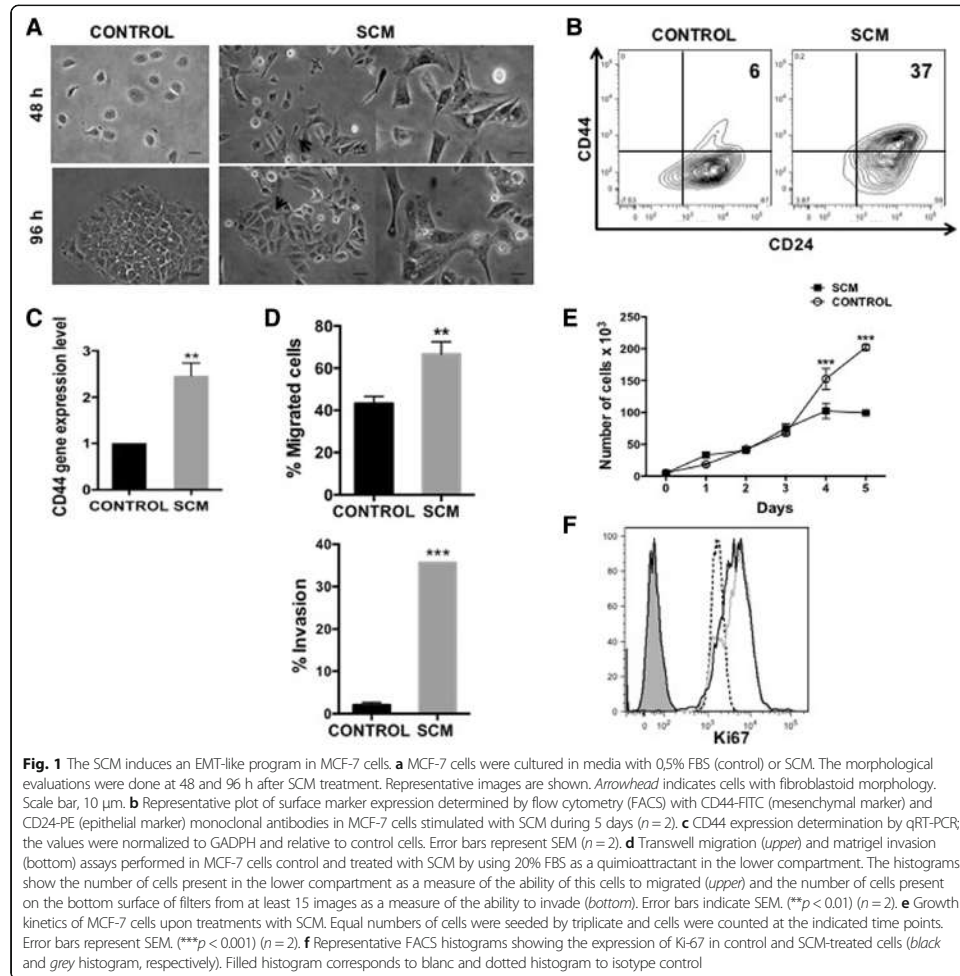
Comparisons for gene expression levels, cell growth, sphere-forming, adhesion, migration and invasion capacities were analyzed with GraphPad Prims v5 software using non-parametric two-tailed *t* test (Mann–Whitney) and

two way ANOVA with Bonferroni post-test. Significant *p* value was considered as \* <0.05, \*\* <0.01 or \*\*\* <0.001.

## Results

### SCM induces an EMT-like program in MCF-7 cells

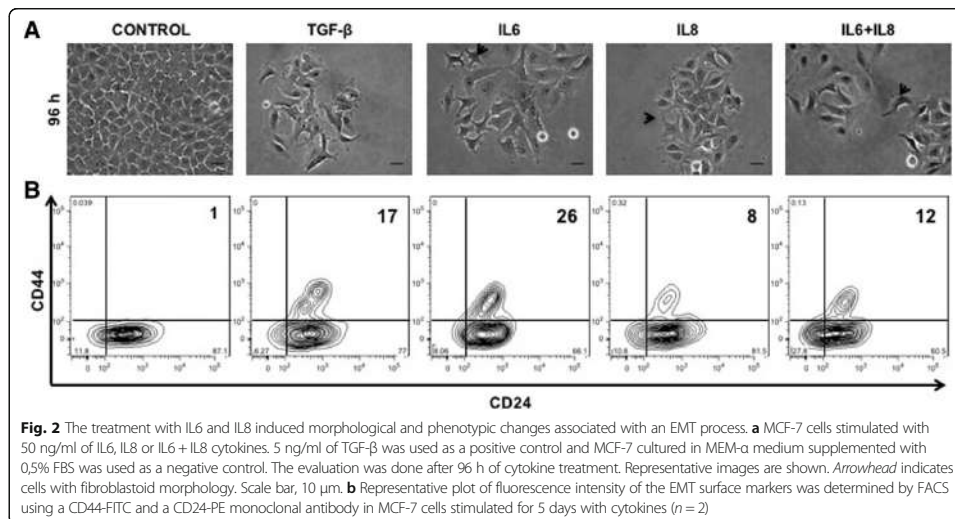
Determining the particular role of specific components of the SASP responsible for conferring special competencies to pre- or fully tumorigenic cells is of great relevance in tumour biology and therapeutics. In this regard, it is interesting to point out that a senescent microenvironment is able both to uncover the tumorigenic potential of pre-malignant cells and to influence the metastable differentiation of pre- and fully tumorigenic cells [15]. Although the SASP composition may vary the pro-inflammatory cytokines IL6 and IL8 are consistently expressed by senescent cells [18]. We sought to investigate if a senescence-associated inflammatory milieu could also influence the tumorigenic and differentiation potential in a luminal A breast cancer cell model. We therefore studied the MCF-7 human cell line, characterized as an estrogen and progesterone receptor positive (ER+/PR+) and Her-2/neu negative (Her2-) cell line, exhibiting low tumorigenic capacity, and importantly, expressing low or no detectable levels of endogenous IL6 or IL8 [25, 42, 43]. Exposure of MCF-7 cells to SCM from HCA2 senescent fibroblast (Additional file 2: Figure S1A) induced a well-defined morphological change with the loss of cobblestone-like appearance and the presence of cells that adopted an elongated, spindle-like shape more typical of fibroblastoid cells (Fig. 1a). Interestingly, SCM-treated MCF-7 cells showed increased expression of the mesenchymal and stem cell-associated marker CD44 [50, 51], as evaluated by FACS (Fig. 1b) and qRT-PCR (Fig. 1c), in contrast to control MCF-7 cells, which exhibited an epithelial-like morphology (Fig. 1a) and displayed a very low proportion of CD44+ cells (Fig. 1b). These changes were accompanied by an increase in the directed migration towards FBS and matrigel invasion capacity of MCF-7 (Fig. 1d, upper and lower panel, respectively). On the other hand, the SCM did not induce cell growth in MCF-7 cells in the first three days of culture (Fig. 1e). After 4–5 days of incubation with SCM, MCF-7 cells showed less cell numbers than control cells. Nevertheless, Ki-67 expression was determined at day 5<sup>th</sup> of treatment and showed no difference between control and SCM-treated cells (Fig. 1f). Additionally, epithelial and mesenchymal markers were measured after SCM addition. MCF-7 cells showed increased expression of vimentin, ZEB-1, SNAIL-1 and SNAIL-2/Slug (without losing E-cadherin or TJP-1 expression) (Additional file 2: Figure S1C), and of the cell reprogramming factors OCT-4 and KLF-4 (Additional file 2: Figure S1D). These results give suggestive evidence that MCF-7 cells undertake an epithelial-mesenchymal transition (EMT) program when in contact with an SCM.



**IL6 and IL8 treatments reproduce the morphological, phenotypic and functional changes induced by the SCM**  
 Cellular senescence is accompanied by a striking increase in the secreted levels of more than 40 soluble factors, the SASP [52]. We were particularly interested in exploring the contribution of senescence-associated pro-inflammatory cytokines in the observed changes after SCM treatment. Therefore we quantified the amount of some pro-inflammatory cytokines (IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL12-p70, IL6, IL8, IL10) by CBA and found that the SCM was highly enriched in IL6 and IL8 (Additional file 2: Figure S1B), two pleiotropic pro-inflammatory

cytokines that have been implicated in cancer progression [32, 43]. Conditioned media from young fibroblasts do not produce these or other of the pro-inflammatory cytokines here tested (Additional file 2: Figure S1B).

We therefore studied the effects of human recombinant IL6 and IL8 individually or together on the MCF-7 cell line. As a positive control of the EMT program, we used the well-known EMT-inducer TGF- $\beta$  [53–55]. After 5 days of exposure to IL6 or IL8 or both, MCF-7 cells adopted a more fibroblastoid morphology with a concomitant increase in CD44 expression (Fig. 2a-b), similar to TGF- $\beta$  and to the above-described effects of the SCM. The



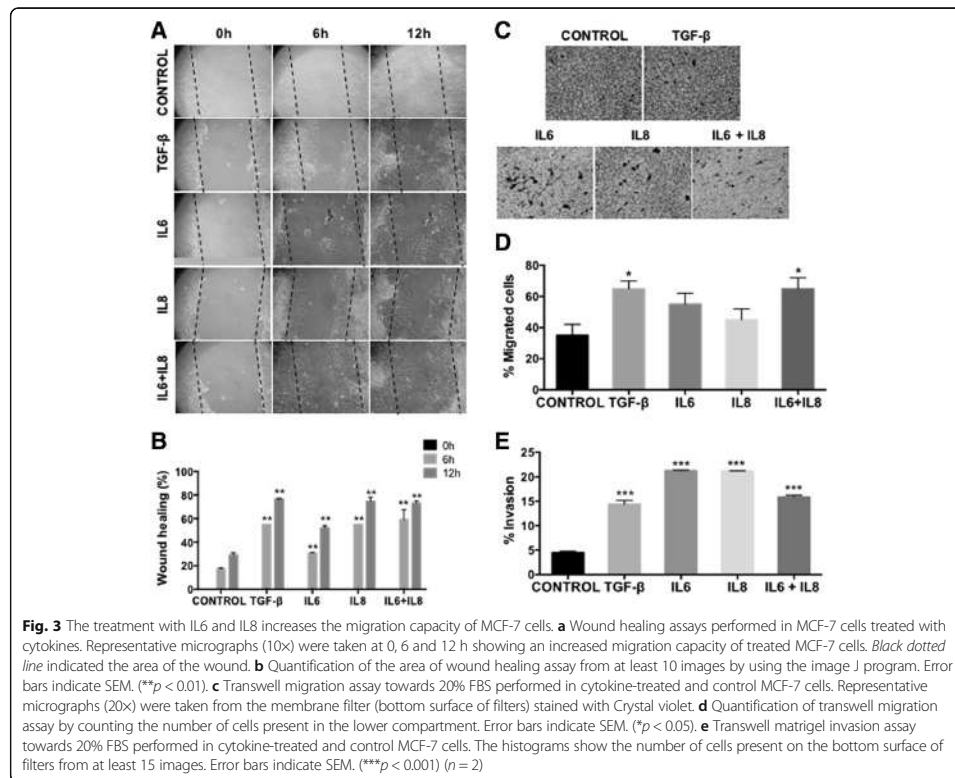
stimulation on CD44 expression was visible either by FACS (Fig. 2b) or by qRT-PCR (Additional file 3: Figure S2A), and it was neither additive nor synergistic when both cytokines were used (Fig. 2b and Additional file 3: Figure S2A). As observed with the SCM, cytokine-treated MCF-7 cells were more motile, with cells spontaneously migrating more than control cells or having higher migration towards FBS, as assessed by the “wound-healing” (Fig. 3a-b) or the transwell migration assays (Fig. 3c-d). BrdU labelling of DNA showed that cytokine-induced “wound healing” was not due to MCF-7 cell proliferation; no changes in the cell populations in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M phases of the cell cycle were observed (Additional file 3: Figure S2B). An important increase in Matrigel invasion capacity was also evident after cytokine treatments (Fig. 3e). Although there were statistically significant differences in migration and invasion capacity between the control and the different cytokine treatments, differences between treatments were minimal. Here again, there were no major differences in cell proliferation rates in MCF-7 cells treated with cytokines and control, similar to what we observed with SCM-treated MCF-7 cells (Additional file 4: Figure S3A). Despite slight variations, it appears that the different cytokine treatments (IL6, IL8 or both) induced morphological, molecular and functional changes compatible with an EMT process and that they closely resemble those observed with the SCM.

To further characterize this response, we proceeded to evaluate other EMT markers, including E-cadherin, cyto-keratin 18, the tight junction protein 1 (TJP-1) and vimentin. There was not a well-defined pattern of changes in relation with these markers (Additional file 4: Figure S3B),

as it was the case for SCM. Nevertheless, analyses by qRT-PCR of the EMT-associated transcription factors (TFs), ZEB1, TWIST-1 and TWIST-2 consistently showed a gene expression pattern totally consistent with an EMT (Fig. 4a). While the levels of ZEB1, TWIST-1 and TWIST-2 augmented in a similar way (about three times) in response to IL6, the mixture of IL6 and IL8, and TGF- $\beta$ , they reached very high levels upon IL8 treatment (between 10 and 15 times). The upstream regulators SNAIL-1 and SNAIL-2/Slug were also evaluated and only SNAIL-1 consistently showed increased gene expression (Fig. 4b). In addition, cytokine-treated MCF-7 cells showed more ability to adhere to fibronectin, a process that has been associated with an EMT event [56] (Fig. 4c). Altogether, these results are clearly indicative of an EMT program induced by the cytokines IL6 and IL8, quite similar although not identical to the one induced by the SCM.

#### Cytokines-treated MCF-7 cells exhibit stem-like cell properties

It has been previously shown that the EMT program is frequently accompanied by the emergence of cells with stem-like properties [50, 57–59]. Therefore, we studied the SCM effect on MCF-7’s stemness potential by first evaluating the sphere-forming capacity [60]. MCF-7 cells in defined medium displayed limited capacity to form mammospheres (<100  $\mu$ m). However, when MCF-7 cells were pre-treated with SCM, their capacity to form spheres increased (by >50% compared to control) (Fig. 5a-b). Interestingly, spheres formed in the latter condition were, in some cases, bigger than 500  $\mu$ m. Next, we evaluated the sphere-forming

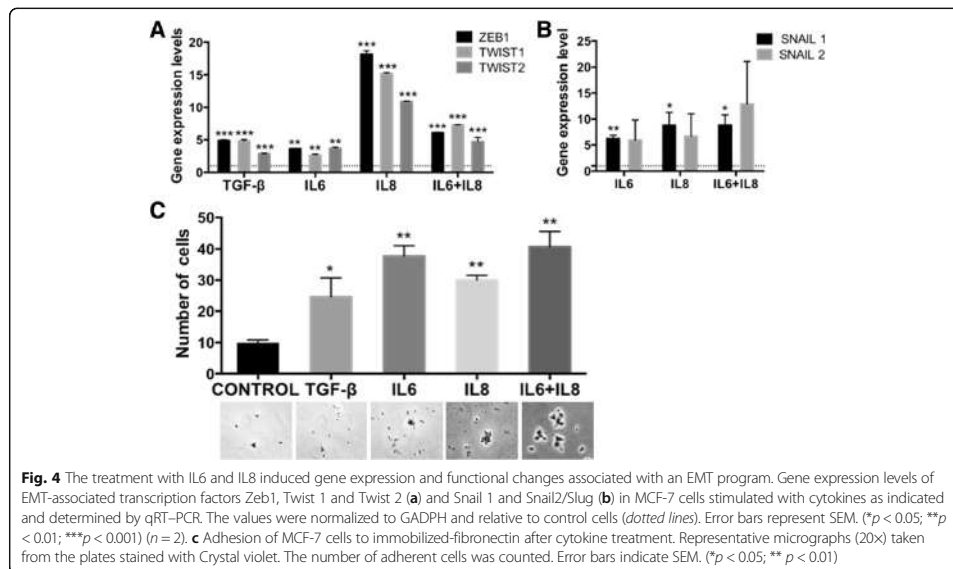


capacity after incubation with either IL6, IL8 or both. These pre-treatments, which by themselves did not efficiently induce sphere formation, increased the number (by almost 50%) and the size (by at least 5 times) of mammospheres when compared to control cells in defined medium alone, or to the TGF- $\beta$ -treated cells (Fig. 5c-d). This increase in sphere size, seen with SCM and most particularly with IL6 and IL8, suggested some degree of mammosphere fusion. In order to assess more precisely the effect of cytokine pre-treatment on sphere formation potential we performed early and daily evaluations. As illustrated in Additional file 5: Figure S4A, both IL6 and IL8 treatments induced 10 times more spheres at day 3 and 15 times more spheres at day 4 than the control (no pre-treatment), respectively. Although some fusion events were detected at early time points (Additional file 5: Figure S4B), the data support the idea that IL6 and IL8 are able to very efficiently induce mammosphere formation. Self-renewal capacity was confirmed in experiments where serial passages allowed sphere formation for at least three generations (Additional file 5: Figure S4C).

To further explore the impact of cytokines on the emergence of stemness properties of tumor cells, we determined the multilineage differentiation capacity of MCF-7 cells. We found that after treatment with either IL6, IL8 or both differentiation induction into mesenchymal lineages occurred remarkably fast (10 days compared to the 2–3 weeks needed for the differentiation of bone-marrow mesenchymal stem cells [61, 62]), and very efficiently (as judged by the intense and more homogenous staining in the culture dish) (Fig. 6a). Cytokine-untreated MCF-7 cells also exhibit a slight differentiation capacity (Fig. 6a, control), suggesting a pre-existing condition that could be strengthened by a senescence-associated pro-inflammatory microenvironment. A similar observation can be made regarding the assays described above in which cytokine pre-treatments potentiate the formation of spheres (Fig. 5c).

Given that poorly differentiated tumours tend to have more stem properties with preferential overexpression of reprogramming TFs [63], we evaluated their gene expression level in response to cytokine treatments. Interestingly,





**Fig. 4** The treatment with IL6 and IL8 induced gene expression and functional changes associated with an EMT program. Gene expression levels of EMT-associated transcription factors Zeb1, Twist 1 and Twist 2 (a) and Snail 1 and Snail2/Slug (b) in MCF-7 cells stimulated with cytokines as indicated and determined by qRT-PCR. The values were normalized to GADPH and relative to control cells (dotted lines). Error bars represent SEM. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) ( $n = 2$ ). c Adhesion of MCF-7 cells to immobilized-fibronectin after cytokine treatment. Representative micrographs (20 $\times$ ) taken from the plates stained with Crystal violet. The number of adherent cells was counted. Error bars indicate SEM. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )

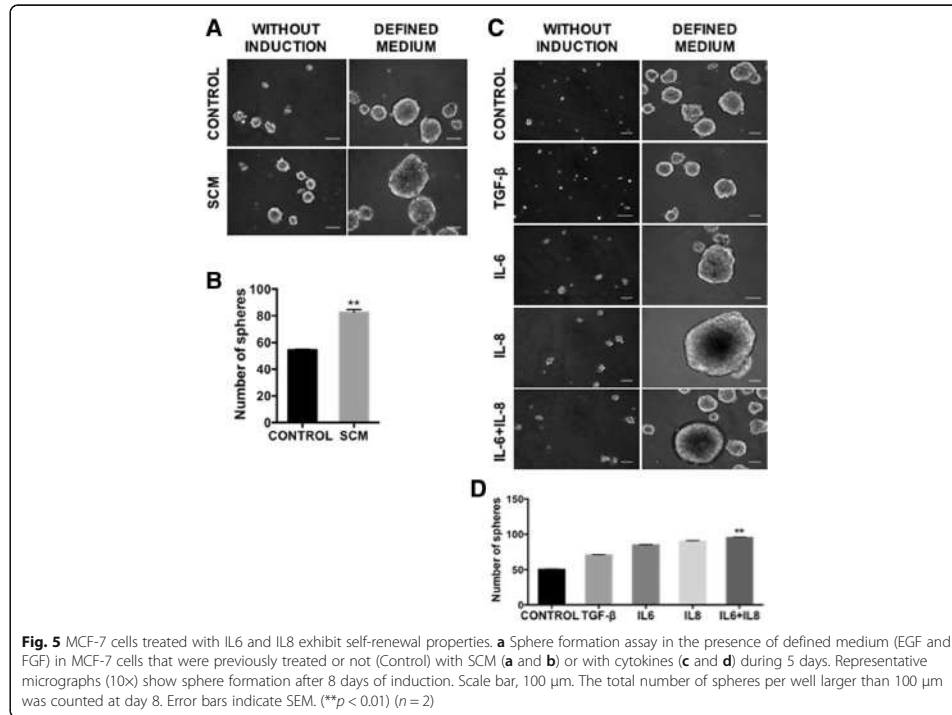
IL8 treatment enhanced the expression of NANOG, KLF-4 and SOX2, whereas IL6 enhanced only the expression of KLF-4, similar to the TGF- $\beta$ . Treatment with both IL6 and IL8 produced a slight increase in these TFs (Fig. 6b). OCT4 expression was not modified by cytokine treatment. As with EMT-TFs, IL8 gives a strong reprogramming TF response, especially NANOG.

The relevance of IL6 and IL8 in the acquisition of these important functional properties was further evaluated by incubation of SCM with neutralizing monoclonal antibodies against these cytokines (Additional file 6: Figure S5A). Inhibition of IL6 and IL8 by specific antibodies was around 50 to 65% as it was for MCF-7 cell migration, as evaluated by the wound-healing assay (Fig. 7a). Mammosphere formation capacity was also importantly reduced (60%) in the first generation and even more in subsequent generations (Fig. 7b and c). SNAIL-1, SNAIL-2/Slug and KLF4 expression was consistently reduced by antibodies treatment (Additional file 6: Figure S5B and C).

Overall, our results show that MCF-7 breast cancer cells in a senescence-associated pro-inflammatory milieu can acquire characteristics of more aggressive cells, i.e.: a mesenchymal morphology with higher mobility and CD44 expression, thus resembling an EMT program, as well as acquisition of stem-like cell properties such as self-renewal and multi-differentiation potential. Importantly, IL-6 and IL-8, present in the SCM, play a major role in the acquisition of these properties.

#### Senescence and inflammation are self- and cross-reinforcing

In the course of these experiments, we noticed that the MCF-7 cells looked slightly flattened after SCM treatment (Fig. 1a). We therefore proceeded to evaluate the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ Gal) activity, which was negative after 5 days of exposure to SCM (Additional file 7: Figure S6A). Yet, incubation of MCF-7 cells with SCM induced a further increase in the expression of IL6 and IL8 (six times for IL8 and at least two times for IL6) (Additional file 7: Figure S6B, to be compared to Additional file 2: Figure S1B). This observation suggested the involvement of an autocrine mechanism that could reinforce the effect of the SCM. Remarkably, a prolonged (10 days) exposure to SCM induced the appearance of senescent cells as evaluated by SA- $\beta$ Gal activity (Fig. 8a) or p16 and p21 expression (Fig. 8b). A similar result was obtained by stimulating MCF-7 cells with either IL6 or IL8, but not with TGF- $\beta$  or a combination of IL6 and IL8 (Fig. 8c). Incubation of SCM with anti-IL6 and anti-IL8 antibodies suppressed SA- $\beta$ Gal activity (Fig. 8d). IL6 and IL8 also induced a significant increase of p16 and p21 (Fig. 8e) that was abrogated by incubation with anti-IL6 or/and IL8 antibodies (Fig. 8f). These observations confirm that a senescence process is induced by the IL6 and IL8 present in the SCM. Also, exposure to lower (100 times less) IL6 or IL8 concentrations for 10 days induced positive SA- $\beta$ Gal activity in MCF-7 cells (Additional file 7: Figure S6C) as did a prolonged exposure to high TGF- $\beta$  concentration. In the case of IL6 and IL8, it appears that prolonged exposure to lower cytokine concentrations is more effective



in senescence induction than shorter stimulation with a high cytokine concentration. Furthermore, we observed that the proportion of senescence cells induced by SCM did not change after 48 h of contact with serum containing medium suggesting that the senescence state was irreversible (Additional file 7: Figure S6D).

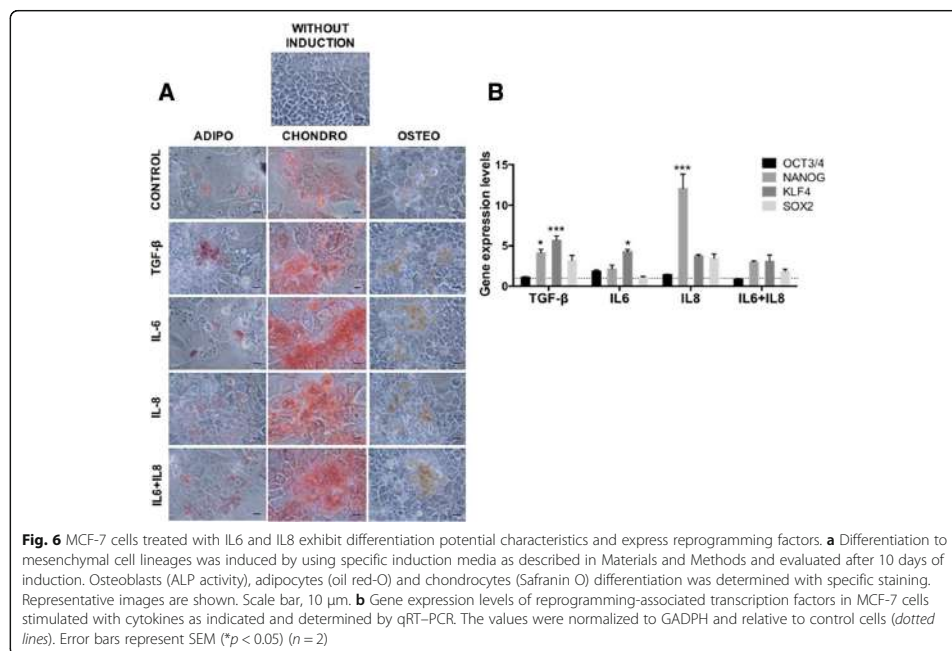
These results suggest that a senescence-induced pro-inflammatory microenvironment triggers a cellular mechanism by which both senescence and inflammation are reinforced at the cell population level. This, in turn, should favour the appearance of cells bearing stem cell attributes (EMT-like program, enhanced cell migration, self-renewal and differentiation capacity) allowing them to migrate to new senescence/inflammatory niches. Indeed, we observed that MCF-7 cells incubated with SCM migrate more efficiently towards IL8 (Additional file 7: Figure S6E).

#### IL6- and IL8-secreting MDA-MB-231 cells displayed an EMT-like phenotype but exhibit partial/incomplete stem-like cell capabilities

Taken together, these observations suggest that a senescence-induced inflammatory microenvironment could

make a cancer cell adopt a more aggressive tumorigenic potential. Indeed, basal/mesenchymal breast cancers that constitutively express IL6 and IL8 have been shown to be more aggressive than luminal cancers [64–66]. To further evaluate the relationship between the expression of these cytokines and stem-like cell properties, we used the MDA-MB-231 cell line, a basal-type breast cancer cell line, and confirmed that these cells constitutively express IL6 and IL8 (Additional file 8: Figure S7A). These cells exhibit a spindle-like appearance and express high levels of CD44 in the absence of CD24 (Additional file 8: Figure S7B and C). As expected for a mesenchymal-type cell line MDA-MB-231 also expresses high levels of vimentin, ZEB1 and SNAIL-1, and low levels of E-cadherin, as evaluated by qRT-PCR (Additional file 8: Figure S7D). MDA-MB-231 cells showed less proliferation potential than MCF-7 cells (Additional file 8: Figure S7E), although Ki67 expression was slightly higher in the MDA-MB-231 cell line when evaluated during the exponential growth phase (3<sup>rd</sup> day) (Additional file 8: Figure S7E, left panel), and not very different at day 5<sup>th</sup> when cell growth slowed down (Additional file 8: Figure S7E, right panel). MDA-MB-231

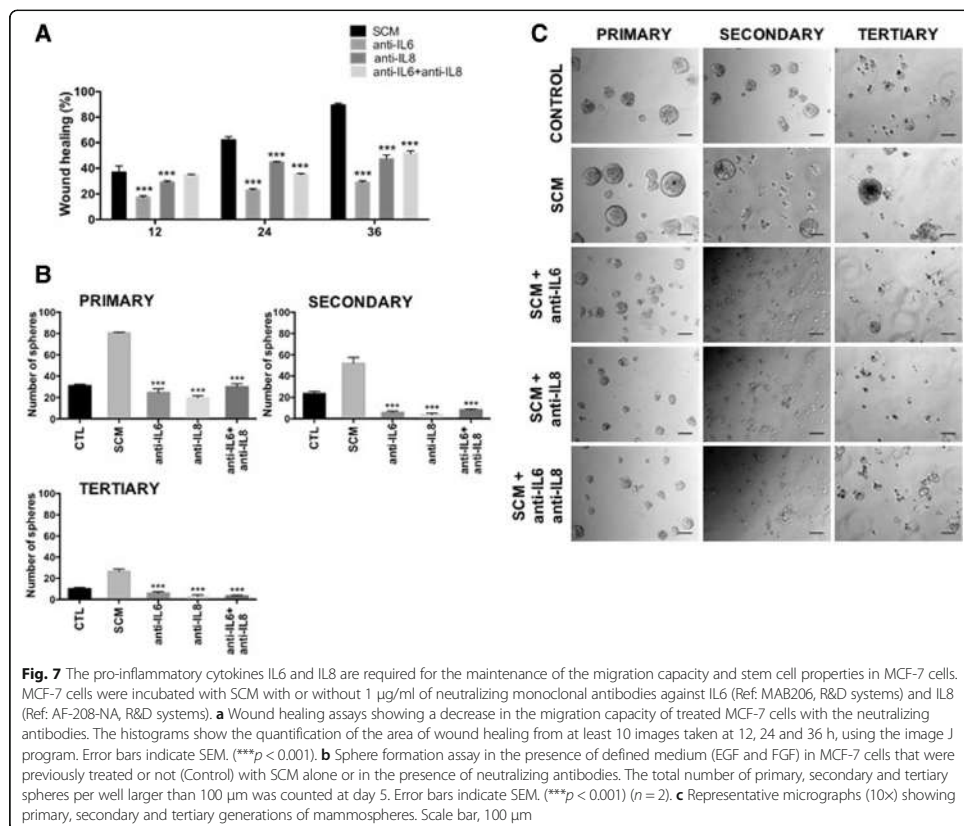




cells spontaneously migrated more than the MCF-7 cells (Additional file 9: Figure S8A) and also showed higher directed migration towards FBS or IL8 (Additional file 9: Figure S8B). Accordingly, MDA-MB-231 cells presented higher invasion to matrigel-coated filters (Additional file 9: Figure S8C) and adherence to fibronectin (Additional file 9: Figure S8D) when compared to MCF-7 cells. Thus, MDA-MB-231 cells have an EMT phenotype and resemble MCF-7 cells that have been treated with cytokines or SCM. Interestingly, treatments with SCM did not impact morphology nor migration capacity of MDA-MB-231 cells, leaving open the question about the role of cytokines in the maintenance of these properties (Additional file 10: Figure S9A and B). We therefore sought to confirm the relevance of IL6 and IL8 in MDA-MB-231 properties, by either incubating these cells with neutralizing antibodies (Additional file 10: Figure S9) or by knocking down their expression (Additional file 11: Figure S10A). Inhibition of IL6 and IL8 by antibodies induced a morphological change in MDA-MB-231 cells (Additional file 10: Figure S9A) and a decrease in the migration capacity (Additional file 10: Figure S9B). The knockdown of IL6 or IL8 was associated with increased expression of the epithelial markers E-cadherin and TJP-1 (Additional file 11: Figure S10D). Also, the knockdown of IL6 and IL8 led to a decrease in the collagen adhesion

capacity of MDA-MB-231 cells (Additional file 11: Figure S10B and S10C). These results support the idea that IL6 and IL8 play an important role and suggest that senescence/inflammation could be more relevant for the biology of cell lines that do not express these pro-inflammatory cytokines.

Next, we explored the concurrence of stem-like cell properties with the EMT process in the MDA-MB-231 cell line, as we have observed in cytokine-treated MCF-7, and as it has been reported in other cancer models [67–72]. Unexpectedly, cytokine pre-treated MDA-MB-231 cells do not form mammospheres, but instead cell aggregates, that were very irregular, translucent and of different size (Fig. 9a). This was in clear contrast to the high mammosphere-forming capacity of cytokine pre-treated MCF-7 cells, described above (Figs. 5a, c and 9a). In addition, although differentiation to chondro- and adipocytes was normal (Fig. 9b, upper and lower panels), MDA-MB-231 cells were surprisingly unable to differentiate into osteocytes (Fig. 9b, middle panel and Additional file 12: Figure S11A). MDA-MB-231 cells did not express APL upon osteocyte differentiation induction, in contrast to MCF-7 cells, (Fig. 9c). Intriguingly, MDA-MB-231 cells express high levels of RUNX2 (Fig. 9c), which can be an inhibitor of osteogenic differentiation. In relation to the expression of reprogramming TFs, there were no



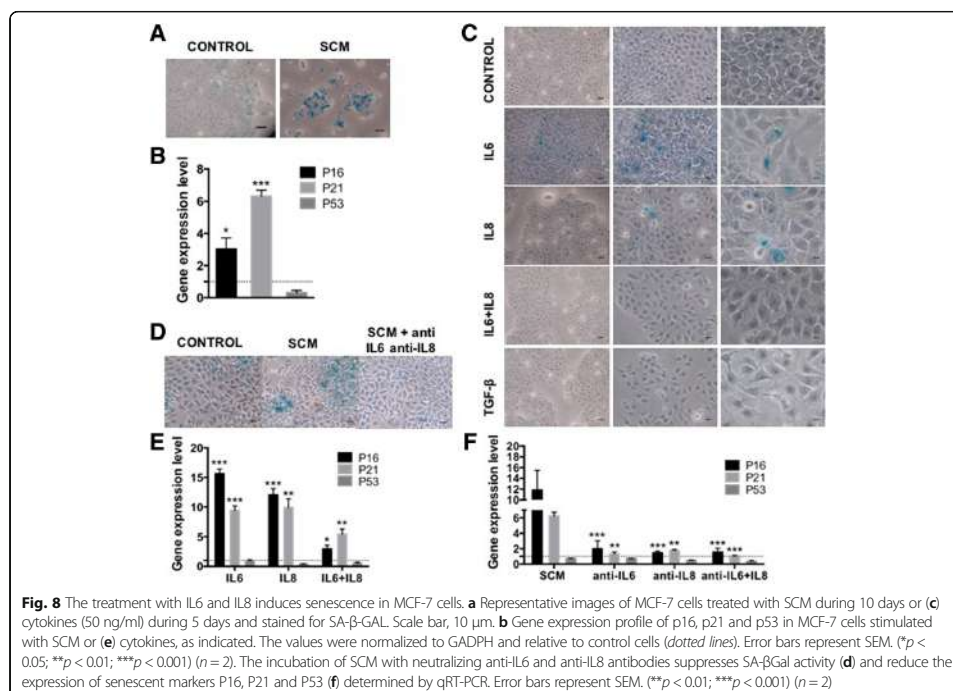
differences between MCF-7 and MDA-MB-231 (Additional file 12: Figure S11B).

In all, treatments of luminal A MCF-7 cell line with SCM, IL6 and IL8 were able to reveal an EMT phenotype, which is proper to basal/mesenchymal cell lines like MDA-MB-231, as well as CSC-like properties. However, it appears that both cell lines differ in important ways regarding their stem-like cell capabilities suggesting that EMT and CSC properties are not always acquired together.

### Discussion

Previous work has shown that fibroblast-derived SASP induced a classic EMT in two human non-aggressive luminal breast cancer cell lines T47D and ZR75.1 and that this effect was principally exerted through IL6 and IL8 secretion [18]. These inflammatory cytokines are consistently present in SASP [16, 18] suggesting the existence of a common inflammatory effect associated

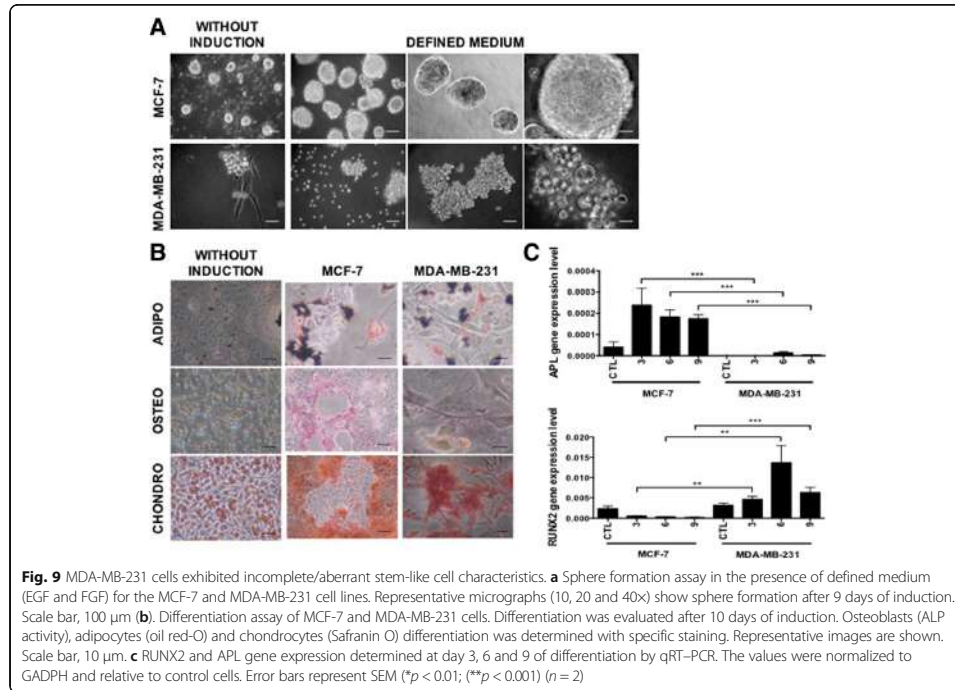
with senescence in pre-malignant and malignant cells. We have previously shown that SCM from senescent HCA2 fibroblasts is partially responsible for unveiling epithelial plasticity and CSC-like properties in pre-malignant cells [15]. We have shown here that fibroblast SCM is highly enriched in IL6 and IL8 and that these cytokines were capable of inducing an EMT-like program in MCF-7, another luminal breast cancer cell line. Nevertheless, this EMT program was only partial with CD44 expression increasing in a fraction of the cell population and with other EMT-associated markers showing variable responses with the different treatments. This suggests the existence of differentiation plasticity in MCF-7 cells, as previously observed in the HEK model [15]. In spite of differences in gene expression, MCF-7 cells consistently adopted a mesenchymal cell morphology associated with higher migration potential towards FBS or IL8, higher EMT-associated TFs expression and increased



adherence to fibronectin. We argue, by analogy to the HEK model, that SCM-treated MCF-7 cells adopt a metastable state that help reveal particular/specific cell competencies.

Indeed, the cytokine-induced EMT program was accompanied by a concomitant appearance of cells with stem-like cell properties as reported by other authors using different inducers [50, 51]. We have shown here, that both inflammatory cytokines IL6 and IL8 have the capability to induce typical stem-like cell properties (self-renewal and differentiation capabilities) associated with malignancy in otherwise low aggressive breast cancer cells. The importance of this observation is underlined by the widely accepted view that a tumorigenic phenotype may be initiated and preserved in a subpopulation of cells that shows stem-like cell properties ([73–75]. Remarkably, luminal A MCF-7 breast cancer cells, in spite of its lower tumorigenic potential, are intrinsically capable of displaying stem-like cell properties (low basal sphere-forming capacity and some differentiation potential) but these properties are substantially strengthened by a senescence-associated inflammatory microenvironment. It is important to note that the development of stem-like cell properties was highly consistent in response to the cytokine treatments, as opposed to the induction of a full-blown EMT program.

The role of IL6 or IL8 has been independently studied in breast cancer lines due to their different roles in tumour biology, the different cellular origins from which they can be obtained and their cancer-related inflammatory roles [76–79]. For instance IL6 effect has been studied in the dynamic conversion between CSC and non-CSC [10, 26, 27] or its effect on the maintenance and enrichment of the CSC population using the in vitro mammosphere-forming assay [29]. On the other hand and due to its chemokine role, IL8 has been studied in the context of migration and invasion in breast cancer [80] and more recently, it has also been associated with CSC and metastasis [34]. As mentioned above, we observed differences between the treatments with IL6 or IL8, in special in the induction of the EMT program. Interestingly, IL8 seems to better simulate the observed effect with the SCM and consistently induced characteristics associated with CSC. Unexpectedly, this effect was not enhanced by the addition of IL6, in spite of the fact that IL6 has similar effects to IL8; rather, it seems that IL6 can paradoxically inhibit, at least in some instances, the IL8 effect (for example, EMT-TFs (Fig. 4a), the reprogramming TF Nanog (Fig. 6b), SA-β-Gal induction (Fig. 8c) and p21 expression (Fig. 8e). The significance of



this is unknown to us but it would be interesting to ascertain if there is any connection between these different observed effects in the context of inflammatory cytokines. Whether it is the same cell subpopulation that responds to IL6 or to IL8 remains to be determined.

We have shown that SCM can induce the secretion of IL6 and IL8 by MCF-7 cells, suggesting that a reinforcing inflammatory loop can be established. This has also been described for IL8 in other models [18]. Interestingly, exposure to IL6 or IL8 induced SA- $\beta$ -GAL activity in MCF-7 cells creating a second loop that could contribute to reinforce and spread the effect of the senescence/inflammatory microenvironment. This paracrine-induced senescence has also been shown recently for TGF- $\beta$ , VEGF and CCL2 suggesting that this is a general mechanism for senescence propagation involving not only tumour cells but also surrounding stromal cells [81]. Of note, the simultaneous addition of IL6 and IL8 or TGF- $\beta$  at higher concentration to MCF-7 cells did not induce senescence after 5 days of exposure. On the contrary, addition of a hundred times lower concentration of both IL6 and IL8 cytokines for a prolonged period of time (10 days) induced the appearance of SA- $\beta$ -GAL positive MCF-7 cells. Clearly, a self- and cross-

reinforced senescence/inflammatory microenvironment where cells are chronically exposed to such soluble factors has potential physiological relevance.

For instance, the presence of a low proportion of senescent-cell progenitors in the MCF-7 cell line [44] may create the basal condition that initiates the production of reinforcing stimuli leading to the formation of foci of senescent cells surrounded by tumour and inflammatory cells [82]. Accordingly, it has been shown that cytokines might reinforce a senescence arrest only when cells are moderately damaged or near senescent [83]. In this senescent/inflammatory self-reinforcing condition, luminal breast cancer cells showing low aggressiveness could turn into highly tumorigenic cells.

The situation seems to be different for the MDA-MB-231 basal/mesenchymal breast cancer cell line. First, this cell line has been classified as immortalized-cell progenitor subtype, without a senescent component. The absence of senescent-cell progenitors would compromise the establishment of the senescence reinforcing loops. Second, MDA-MB-231 cell line, which secretes high amounts of IL6 and IL8, is already pre-set to a basal/mesenchymal program, and expresses constitutively malignant features associated with higher tumorigenicity. These features include high

migration and invasion capacities and, presumably, the presence of stem-like cell properties, such as self-renewal and differentiation potential. Our work showed that IL6 and IL8 production are indeed important in the maintenance of EMT-like features. However, to our surprise, we found that MDA-MB-231 had no sphere-forming capacity and this inability was not modified by the addition of either cytokines or neutralizing antibodies to these cytokines (not shown). The reasons for this observation are unknown and warrant a better evaluation. On the other hand, MDA-MB-231 cells showed reduced osteogenic differentiation potential, when compared to MCF-7 cells. Further evaluation showed that the aberrant capacity to differentiate of the MDA-MB-231 cells was associated to a lower expression of APL compared to MCF-7 cells. On the other hand, MCF-7 showed a similar APL expression kinetics to mesenchymal stem cells [84]. Additionally, MDA-MB-231 showed an increase of RUNX2, a known transcription factor required for osteoblast lineage definition in pre-osteoblast, but an inhibitor of the osteoblastic maturation and mature bone formation [85, 86]. Although the significance of this abnormal osteogenic differentiation remains unclear, it is believed that aberrant differentiation contributes to breast cancer heterogeneity [87]. One could envisage that part of the aggressiveness of basal/mesenchymal breast cancer cells is more related to this abnormal differentiation-induced cell heterogeneity than to the stem-like cell capabilities they may have. Consequently with this, MCF-7 breast cancer cells have basal stem-like cell capabilities (self-renewal and differentiation potential), though have a less aggressive tumorigenic potential.

We have shown here that a senescence-induced inflammatory microenvironment, enriched in the cytokines IL6 and IL8, is responsible for a prevailing inflammatory-senescence response that persists for longer periods because of their self and cross reinforcing characteristics. This continuous stimulation potentiates epithelial plasticity with acquisition of stem-like cells properties that could transform non-aggressive breast cancer cells (MCF-7) in cells having a more tumorigenic potential. It would be interesting to decipher the real contribution of cell heterogeneity and stem-like cell capabilities to cancer aggressiveness, and the role that the tumour microenvironment may have in these cell properties.

## Conclusions

Our findings show that the IL-6 and IL-8 present in the SCM are responsible for the induction of epithelial plasticity and stemness in the malignant MCF-7 cells. Endogenous IL-6 and IL-8 production is also responsible for the EMT-like behaviour of the more aggressive MDA-MB-231 cell line. However, these cells showed abnormal differentiation and incomplete stemness, suggesting that in this case aggressiveness is more related to EMT

properties than to stem-like cell properties. All in all, our results underscore that stemness, although necessary for tumorigenicity, is varied, differentially influenced by the senescent/inflammatory microenvironment and contributes distinctly to the aggressiveness of tumour cells.

## Additional files

**Additional file 1: Table S1.** Primer sequence. (DOCX 29 kb)

**Additional file 2: Figure S1.** The SCM is rich in the pro-inflammatory cytokines IL6 and IL8. (A) Representative images (10x and 40x) of cells stained for SA- $\beta$ -GAL. Scale bar 10  $\mu$ m. (B) Pro-inflammatory cytokines, IL6 and IL8 were measured by using a Becton Dickinson Cytometric Bead Array (CBA) flow cytometric assay, using free serum conditioned medium from young and senescent fibroblast. Bar graph shows the amount of cytokine in pg/ml. (C) Gene expression levels of EMT markers and EMT TFs and (D) reprogramming TFs, determined by qRT-PCR. The values were normalized to GAPDH and relative to control cells (dotted lines). Error bars represent SEM. (\*\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) ( $n = 2$ ). (DOCX 632 kb)

**Additional file 3: Figure S2.** The treatment with IL6 and IL8 induces an increase in CD44 expression. (A) CD44 gene expression in MCF-7 cells stimulated with cytokines as indicated. The values were normalized to GAPDH and relative to control cells (dotted lines). Error bars represent SEM. (\*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 2$ ). (B) BrdU incorporation of MCF-7 cells treated or not with cytokines during the migration assay (12 h time point). Cells were incubated with 5-bromo-2-deoxyuridine (30  $\mu$ M) for 25 min and stained with DAPI and analysed by FACS. The percentage of cells in the different cell-cycle phases is shown. (DOCX 857 kb)

**Additional file 4: Figure S3.** The treatment with IL6 and IL8 induces slight changes in the proliferation of MCF-7 cells and in the expression of EMT markers. (A) Growth kinetics of MCF-7 cells upon treatment with cytokines. Equal numbers of cells were seeded in triplicate and treated with either control normal or cytokines-supplemented medium. Cells were counted at the indicated time points. Error bars represent SEM. \*\*\* $p < 0.001$  indicate statistically significant differences between control cells and cytokine treatments. ( $n = 2$ ). (B) Gene expression profile of EMT-associated transcription factors in MCF-7 cells stimulated with cytokines as indicated and determined by qRT-PCR. The values were normalized to GAPDH and relative to control cells (dotted lines). Error bars represent SEM. (\*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 2$ ). ECADH = E-cadherin, KR18 = cytokeratin 18, VIM = vimentin  $\gamma$  TJP1 = tight junction protein 1. (DOCX 236 kb)

**Additional file 5: Figure S4.** MCF-7 cells treated with IL6 and IL8 exhibit self-renewal properties. (A) Sphere formation assay in the presence of defined medium (EGF and FGF) in MCF-7 cells that were previously treated or not (Control, CTL) with cytokines. The total number of spheres per well larger than 100  $\mu$ m was counted after the treatment with IL-6 and IL-8 during 3 or 4 days, as indicated. Error bars indicate SEM. (\*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 3$ ). (B) Representative micrographs (10x) showing sphere fusion after 4 days of induction, scale bar, 100  $\mu$ m. (C) The total number of primary, secondary and tertiary spheres per well larger than 100  $\mu$ m was counted at day 5. Error bars indicate SEM. (\*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ) ( $n = 2$ ). (DOCX 587 kb)

**Additional file 6: Figure S5.** The pro-inflammatory cytokines IL6 and IL8 are important players in the EMT process. (A) Neutralization of IL6 and IL8 with 1  $\mu$ g/ml of monoclonal antibodies against IL6 (Ref. MAB206, R&D systems) or IL8 (Ref. AF-208-NA, R&D systems). The levels of IL6 and IL8 were measured by using a Becton Dickinson Cytometric Bead Array (CBA) flow cytometric assay, using free serum conditioned medium from MCF-7 that were treated with SCM or with SCM plus neutralizing antibodies specific for each cytokine. Bar graph shows the amount of cytokine in pg/ml before and after treatment. (B) Gene expression levels of EMT TFs (B) and reprogramming TFs (C). The values were normalized to GAPDH and relative to control cells (dotted lines). Error bars represent SEM. (DOCX 623 kb)

**Additional file 7: Figure S6.** The SCM increases the expression of IL6 and IL8 in MCF-7 cells that was accompanied by an irreversible senescence state. (A) Representative images (40x) of MCF-7 cells treated with SCM during 5 days or (C) with cytokines at low concentrations (0.5 ng/ml)



during 10 days and stained for SA- $\beta$ -GAL. Scale bar, 10  $\mu$ m. (B) IL6 and IL8 were measured by CBA flow cytometric assay using free serum conditioned medium from MCF-7 treated as indicated above. (D) BrdU incorporation detected in MCF-7 cells treated with SCM during 5, 7 or 10 days to induce senescence and after additional incubation with growth medium (RPMI-1640 and 10% FBS) for 48 h. The histogram shows the ratio between S and G1 phases of cell cycle (left). Error bars indicate SEM. Representative images (10x) of MCF-7 cells stained for SA- $\beta$ -GAL (Right). (E) Transwell migration assay towards 50 ng/ $\mu$ l of IL-8 performed in MCF-7 cells treated or not (control) with SCM during 5 days. Representative micrographs (20x) taken from the membrane filter (bottom surface of filters) stained with Crystal violet. Cells present in the lower compartment were counted. Error bars indicate SEM. (\*\* $p$  < 0.01). (DOCX 237 kb)

**Additional file 8: Figure S7.** MDA-MB-231 cells are rich in pro-inflammatory cytokines and display an EMT-like phenotype. (A) Pro-inflammatory cytokines, IL6 and IL8 were measured by CBA flow cytometric assay, using free serum conditioned medium from MCF-7 and MDA-MB-231 cells. (B) Morphological evaluations by phase contrast microscopy (20 x). Arrowhead indicates cells with fibroblastoid morphology. Scale bar, 10  $\mu$ m. (C) Surface markers expression of CD44 and CD24 was determined by FACS as above or by qRT-PCR. (D) Gene expression of EMT-associated markers was evaluated by qRT-PCR. The histogram shows the expression of these markers relative to GAPDH. Error bars indicate SEM. (\*\*\* $p$  < 0.001). E-cadherin and TJP1 (epithelial markers) and Vimentin, Zeb1, Twist1, Snail1 and Snail2/Slug (mesenchymal markers). (E) Growth kinetics of MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. Error bars represent SEM. (\*\*\* $p$  < 0.001) ( $n$  = 2). (F) Representative FACS histograms showing the Ki-67 analysis done at day 3 and 5 (Left and right histograms, respectively). MDA-MB-231 cells (gray line), MCF-7 cells (black line), blanc (filled histogram) and isotype control (dotted line). (DOCX 556 kb)

**Additional file 9: Figure S8.** MDA-MB-231 exhibits high migration capacity. (A) Wound healing assays were performed in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Representative micrographs (10x) were taken at 0, 16, and 24 h and showed an increased migration capacity of MDA-MB-231 cells (left). Black dotted line indicated the area of the wound. Quantification of wound healing assay from at least 10 images (right) by using the image J program. Error bars indicate SEM. (\*\*\* $p$  < 0.001) ( $n$  = 2). (B) Transwell migration assay performed in MCF-7 and MDA-MB-231 cells by using SFB (20%) or IL8 (50 ng/ $\mu$ l) as chemoattractants in the lower compartment. Error bars indicate SEM. (\*\*\* $p$  < 0.001). (C) Matrigel invasion assay; cells were allowed to invade during 48 h at 37 °C. Representative micrographs (20x) were taken from the upper panel (bottom surface of filters) and from the lower compartment (LC) and stained with violet Crystal. The histograms show the number of cells in the lower compartment. Error bars indicate SEM. (\*\* $p$  < 0.01) ( $n$  = 2). (D) Adhesion of MDA-MB-231 and MCF-7 cells to 96 multiwell plates coated with fibronectin. Representative micrographs (20x) were taken from the plates and stained with violet Crystal (left). The number of adherent cells was counted. Error bars indicate SEM. (\* $p$  < 0.05) ( $n$  = 3). (DOCX 646 kb)

**Additional file 10: Figure S9.** IL6 and IL8 are relevant in the acquisition of functional properties of the EMT process in MDA-MB-231. MDA-MB-231 cells were treated or not (Control) with SCM or with 1  $\mu$ g/ml of neutralizing monoclonal antibodies or IgG isotype control in RPMI medium without serum. (A) The morphological evaluation was done at 72 h after treatment. Representative images (10 and 20 x) are shown. Scale bar, 10  $\mu$ m. (B) Wound healing assays were performed in MDA-MB-231 cells. Representative micrographs (10x) were taken at 0, 4, 8 and 12 h and showed a decrease in migration capacity of MDA-MB-231 cells (upper). Black dotted line indicated the area of the wound. Quantification of wound healing assay from at least 10 images (bottom) by using the image J program. Error bars indicate SEM. (\*\*\* $p$  < 0.001) ( $n$  = 2). (DOCX 268 kb)

**Additional file 11: Figure S10.** IL6 and IL8 are important players in the acquisition of characteristics associated to EMT in MDA-MB-231. The knock-down of the pro-inflammatory cytokines was carried out by using esiRNA for IL8 and shRNA for IL6. The esiRNA-FLUC and shRNA Puro vector were used as control, respectively. (A) The decrease in the expression of these

cytokines and (D) EMT markers was confirmed by qRT-PCR. The values were normalized to GAPDH and relative to control cells (dotted lines). Error bars represent SEM. (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001). Adhesion of normal or IL6 and IL8 knockdown MDA-MB-231 to 96 multiwell plates coated collagen. Representative micrographs (10x) were taken from the plates and stained with Crystal violet (B). The number of adherent cells was counted. Error bars indicate SEM. (\*\*\* $p$  < 0.001). (DOCX 578 kb)

**Additional file 12: Figure S11.** MDA-MB-231 cannot differentiate to osteogenic lineage and are similar to MCF-7 in the expression of reprogramming factors. (A) Differentiation was promoted towards the osteogenic lineage by using specific induction medium. Differentiation was evaluated after 10 days with specific staining (APL activity). Representative images are shown (10, 20 and 40 x). Scale bar, 10  $\mu$ m. Cells without induction medium were used as a control. (B) Gene expression levels of reprogramming-associated transcription factors were evaluated by qRT-PCR. The values were normalized to GAPDH. Error bars represent SEM. (DOCX 1247 kb)

#### Abbreviations

APL: Alkaline phosphatase; CBA: BD™ cytometric bead array; CSC: Cancer stem cells; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; ER+/PR+: Estrogen and progesterone receptor positive; FACS: Fluorescence-activated cell sorting; FBS: Fetal bovine serum; FC:  $\kappa$  isotype Ctrl; Her2-: Her-2/neu negative; SA- $\beta$ -Gal: Senescence-associated beta-galactosidase; SASP: Senescence-associated secretory phenotype; SCM: senescence-conditioned medium; TFs: Transcription factors

#### Acknowledgments

We would like to thank to Molecular and Cell Physiology staff members for helpful discussions

#### Funding

This work was supported by the Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, Colciencias (Contract No RC-692-2013), and DIEB and Faculty of Medicine, Universidad Nacional de Colombia to JPV. Work in Arturo Londono-Vallejo laboratory was supported by INCa and ARC grants and the Labellisation program of the Ligue contre le Cancer.

#### Availability of data and materials

The authors declare that data supporting the findings of this study are available within the article and its Additional information files.

#### Authors' contributions

J-PV and AL-V conceived and designed the study. POM carried out the experiments. J-PV, AL-V and POM analysed data, interpreted the results and wrote the article. All authors read and approved the manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Author details

<sup>1</sup>Cellular and Molecular Physiology Group, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. 111311, Colombia. <sup>2</sup>Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR3244, Telomeres & Cancer lab, 75005 Paris, France. <sup>3</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR3244, 75005 Paris, France.

Received: 2 November 2016 Accepted: 27 April 2017

Published online: 01 May 2017

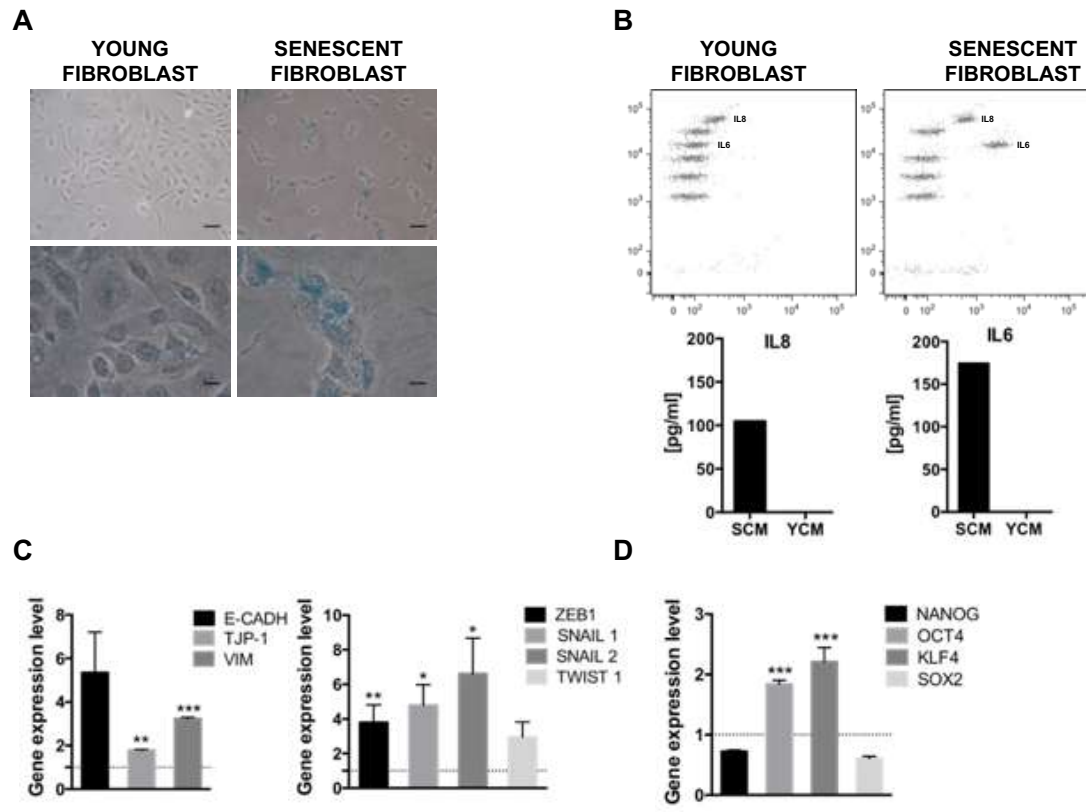
## References

- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpouris VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444(7119):633–7.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickens RA, Hernandez E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007;445(7128):656–60.
- Foster SA, Wong DJ, Barrett MT, Galloway DA. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(4):1793–801.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253(5015):49–53.
- Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H, Nassif N, Meisner L, Newton MA, Waldman FM, Reznikoff CA. p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 1999;59(12):2957–64.
- Kim NW, Platzek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011–5.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33(5):787–91.
- Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Res*. 2009;69(7):2878–86.
- Bhatia B, Multani AS, Patrawala L, Chen X, Calhoun-Davis T, Zhou J, Schroeder L, Schneider-Broussard R, Shen J, Pathak S, Chang S, Tang DG. Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *Int J Cancer*. 2008;122(7):1483–95.
- Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12072–7.
- Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*. 2007; 67(7):3117–26.
- Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 2011;21(6):354–9.
- Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130(2):223–33.
- Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res*. 2006; 66(2):794–802.
- Castro-Vega LJ, Jouravleva K, Ortiz-Montero P, Liu WY, Galeano JL, Romero M, Popova T, Bacchetti S, Vernot JP, Londono-Vallejo A. The senescent microenvironment promotes the emergence of heterogeneous cancer stem-like cells. *Carcinogenesis*. 2015;36(10):1180–92.
- Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99–118.
- Lasry A, Ben-Neriah Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends Immunol*. 2015;36(4):217–28.
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008;6(12):2853–68.
- Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay JY. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1721–6.
- Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpe S, Vermeulen PB, Dirix LY. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*. 2004;10(21):7157–62.
- Knupfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat*. 2007;102(2):129–35.
- Yao C, Lin Y, Ye CS, Bi J, Zhu YF, Wang SM. Role of interleukin-8 in the progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(20):1766–72.
- Blick T, Wlododo E, Hugo H, Waltham M, Lenburg ME, Neve RM, Thompson EW. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(6):629–42.
- Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW. Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ*. 1991;2(8):365–72.
- Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinckon S, Boissiere F, Laune D, Roques S, Lazennec G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R15.
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1397–402.
- Kim SY, Kang JW, Song X, Kim BK, Yoo YD, Kwon YT, Lee YJ. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell Signal*. 2013;25(4):961–9.
- Korkaya H, Kim GJ, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, Quraishi AA, Tawakkol N, D'Angelo R, Paulson AK, Chung S, Luther T, Paholuk HJ, Liu S, Hassan KA, Zen Q, et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell*. 2012;47(4):570–84.
- Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Paterini P, Marcu KB, Chieco P, Bonafe M. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3988–4002.
- Zacarias-Fluck MF, Moranco B, Vicario R, Luque Garcia A, Escorihuela M, Villanueva J, Rubio IT and Arbas J. Effect of cellular senescence on the growth of HER2-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(5). doi:10.1093/jnci/djv020.
- Lin Y, Huang R, Chen L, Li S, Shi Q, Jordan C, Huang RP. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *Int J Cancer*. 2004;109(4):507–15.
- Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6735–41.
- Singh JK, Simoes BM, Howell SJ, Farnie D, Clarke RB. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res*. 2013;15(4):210.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xeri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*. 2009;69(4):1302–13.
- Hartman ZC, Poage GM, den Hollander P, Tsimelzon A, Hill J, Panupinuthu N, Zhang Y, Mazumdar A, Hilsenbeck SG, Mills GB, Brown PH. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res*. 2013;73(11):3470–80.
- Acosta JC, O'Loughlin A, Banito A, Gujjarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagnagna F, Bernard D, Hernandez E, Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008;133(6):1006–18.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peepers DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008;133(6):1019–31.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005;7(3):211–7.
- Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2011;377(9759):31–41.
- Fraser DM, Sullivan FM, Thompson AM, McCowan C. Aspirin use and survival after the diagnosis of breast cancer: a population-based cohort study. *Br J Cancer*. 2014;111(3):623–7.
- Streicher SA, Yu H, Lu L, Kidd MS, Risch HA. Case-control study of aspirin use and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(7):1254–63.
- Jiang XP, Yang DC, Elliott RL, Head JF. Reduction in serum IL-6 after vaccination of breast cancer patients with tumour-associated antigens is related to estrogen receptor status. *Cytokine*. 2000;12(5):458–65.

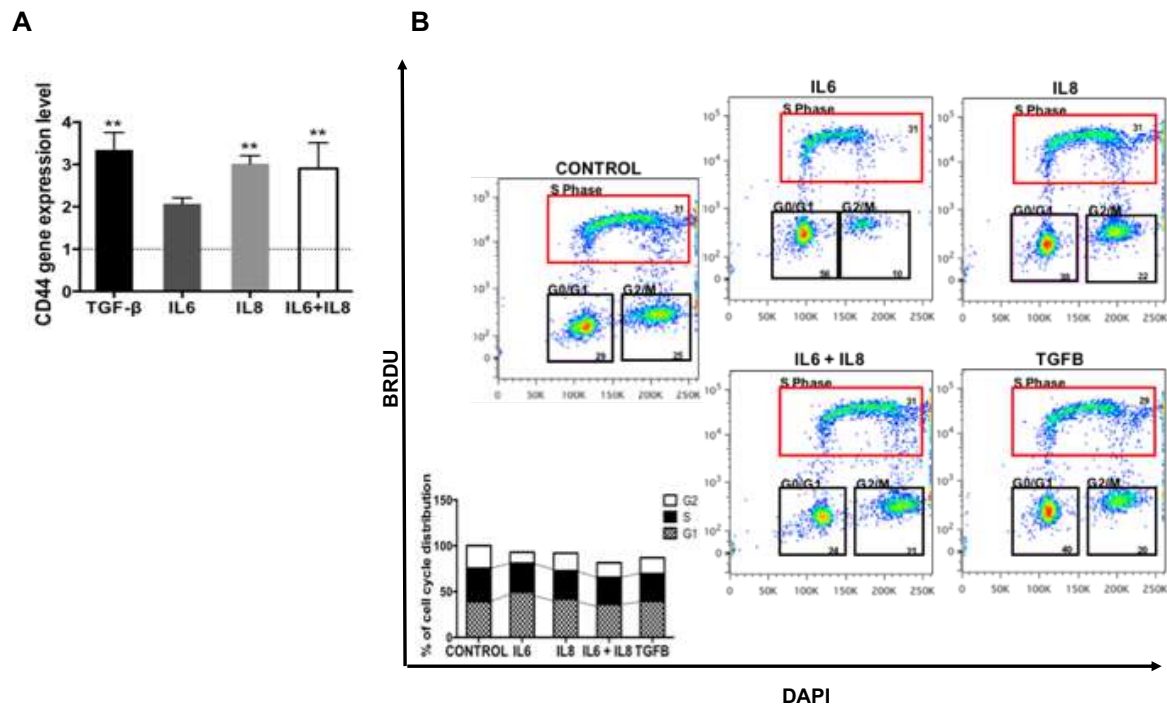
43. Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE, Hall BM. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer. *FASEB J*. 2007;21(13):3763–70.
44. Mumcuoglu M, Bagislar S, Yuzugullu H, Alotaibi H, Senturk S, Telkoparan P, Gur-Deoglu B, Cingoz B, Bozkurt B, Tazebay UH, Yulug IG, Akcali KC, Ozturk M. The ability to generate senescent progeny as a mechanism underlying breast cancer cell heterogeneity. *PLoS One*. 2010;5(6):e11288.
45. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
46. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263–73.
47. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(1):31–4.
48. Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz AM, Garcia AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 3):581–91.
49. Chen WH, Lai MT, Wu AT, Wu CC, Gelovani JG, Lin CT, Hung SC, Chiu WT, Deng WP. In vitro stage-specific chondrogenesis of mesenchymal stem cells committed to chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009;60(2):450–9.
50. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704–15.
51. Morel AP, Lieve M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008;3(8):e2888.
52. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):273–83.
53. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(1):76–84.
54. Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(8):314–23.
55. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156–72.
56. Park J, Schwarzbauer JE. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2014;33(13):1649–57.
57. Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, Devouassoux-Shisheboran M, Treilleux I, Tissier A, Gras B, Pourchet J, Puisieux I, Browne GJ, Spicer DB, Lachuer J, Ansieau S, et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet*. 2012;8(5):e1002723.
58. Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS, Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells*. 2012;30(2):292–303.
59. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011;13(1):202.
60. Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(1):75–86.
61. Halleux C, Sottile V, Gasser JA, Seuwen K. Multi-lineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;2(1):71–6.
62. Yang Z, Schmitt JF, Lee EH. Immunohistochemical analysis of human mesenchymal stem cells differentiating into chondrogenic, osteogenic, and adipogenic lineages. *Methods Mol Biol*. 2011;698:353–66.
63. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008;40(5):499–507.
64. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):215.
65. Sheridan C, Kshimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet Jr R, Badve S, Nakshatri H. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006;8(5):R59.
66. Jung K, Gupta N, Wang P, Lewis JT, Gopal K, Wu F, Ye X, Alshareef A, Abdulkarim BS, Douglas DN, Kneteman NM, Lai R. Triple negative breast cancers comprise a highly tumorigenic cell subpopulation detectable by its high responsiveness to a Sox2 regulatory region 2 (SRR2) reporter. *Oncotarget*. 2015;6(12):10366–73.
67. Hwang WL, Yang MH, Tsai ML, Lan HY, Su SH, Chang SC, Teng HW, Yang SH, Lan YT, Chiou SH, Wang HW. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology*. 2011;141(1):279–91. 291 e271–275.
68. Liu H, Ren G, Wang T, Chen Y, Gong C, Bai Y, Wang B, Qi H, Shen J, Zhu L, Qian C, Lai M, Shao J. Aberrantly expressed Fra-1 by IL-6/STAT3 transactivation promotes colorectal cancer aggressiveness through epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis*. 2015;36(4):459–68.
69. Miao JW, Liu LJ, Huang J. Interleukin-6-induced epithelial-mesenchymal transition through signal transducer and activator of transcription 3 in human cervical carcinoma. *Int J Oncol*. 2014;45(1):165–76.
70. Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos TN, Kumar P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol Cancer Res*. 2011;19(12):1658–67.
71. Zhang B, Shi L, Lu S, Sun X, Liu Y, Li H, Wang X, Zhao C, Zhang H, Wang Y. Autocrine IL-8 promotes F-actin polymerization and mediate mesenchymal transition via ELMO1-NF-kappaB-Snail signaling in glioma. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(6):898–911.
72. Zhang RL, Peng LX, Yang JP, Zheng LS, Xie P, Wang MY, Huang BJ, Zhao HR, Bao YX, Qian CN. IL-8 suppresses E-cadherin expression in nasopharyngeal carcinoma cells by enhancing E-cadherin promoter DNA methylation. *Int J Oncol*. 2016;48(1):207–14.
73. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*. 2007;17(1):3–14.
74. Luo F, Liu T, Wang J, Li J, Ma P, Ding H, Feng G, Lin D, Xu Y and Yang K. Bone marrow mesenchymal stem cells participate in prostate carcinogenesis and promote growth of prostate cancer by cell fusion in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(21):30924–34.
75. Zhi XS, Xiong J, Zi XY and Hu YP. The potential role of liver stem cells in initiation of primary liver cancer. *Hepatal Int*. 2016;10(6):893–901.
76. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(7):904–10.
77. Sanguinetti A, Santini D, Bonafe M, Taffurelli M, Avenia N. Interleukin-6 and pro inflammatory status in the breast tumor microenvironment. *World J Surg Oncol*. 2015;13:129.
78. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(4):375–91.
79. Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*. 2005;10:853–65.
80. Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, Vignon F, Lazennec G. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene*. 2003;22(2):256–65.
81. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrusis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):978–90.
82. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell*. 2012;11(2):345–9.
83. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009;11(8):973–9.
84. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001;2(1):81–94.
85. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):189–95.
86. Mendoza-Villanueva D, Zeef L, Shore P. Metastatic breast cancer cells inhibit osteoblast differentiation through the Runx2/CBFbeta-dependent expression of the Wnt antagonist, sclerostin. *Breast Cancer Res*. 2011;13(5):R106.
87. Wicha MS. Cancer stem cell heterogeneity in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):105.

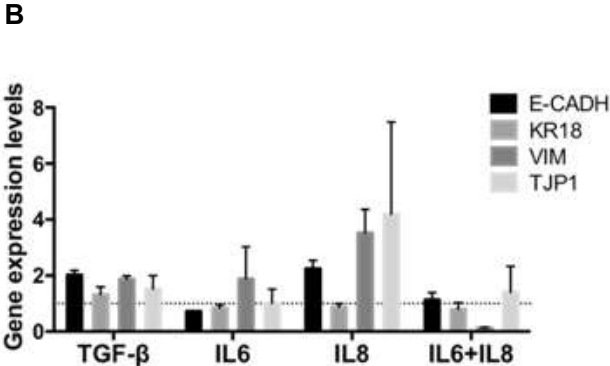
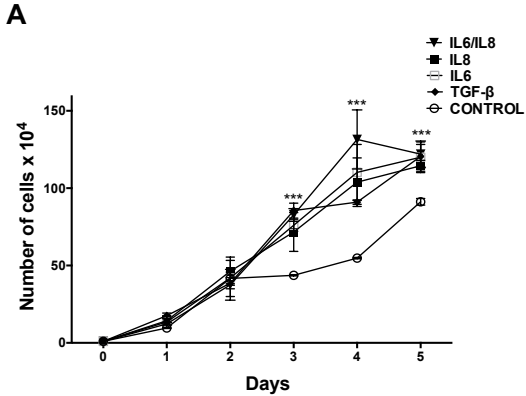


Additional file 1: Figure S1

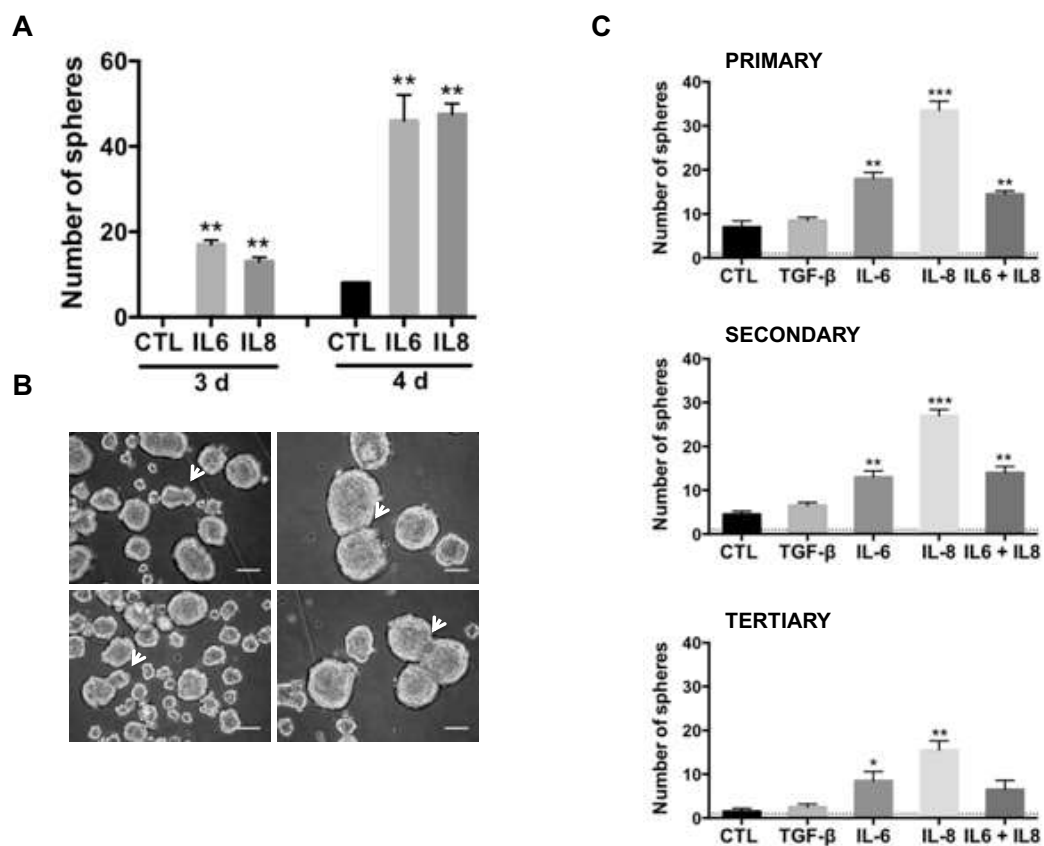


Additional file 2: Figure S2

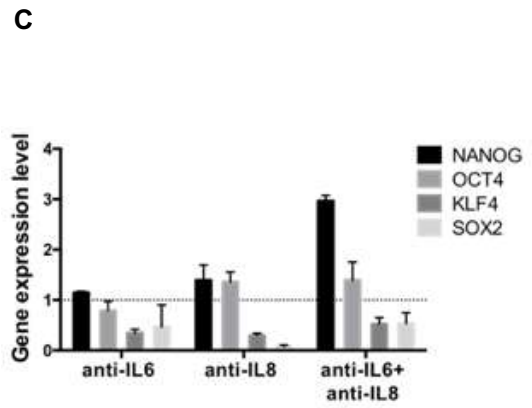
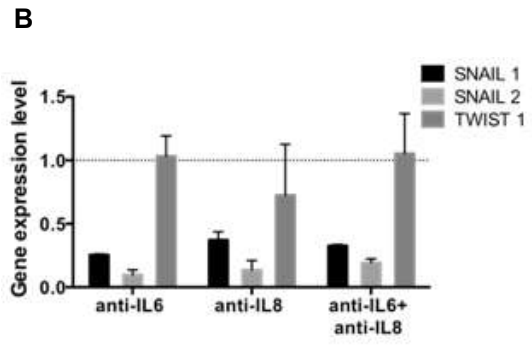
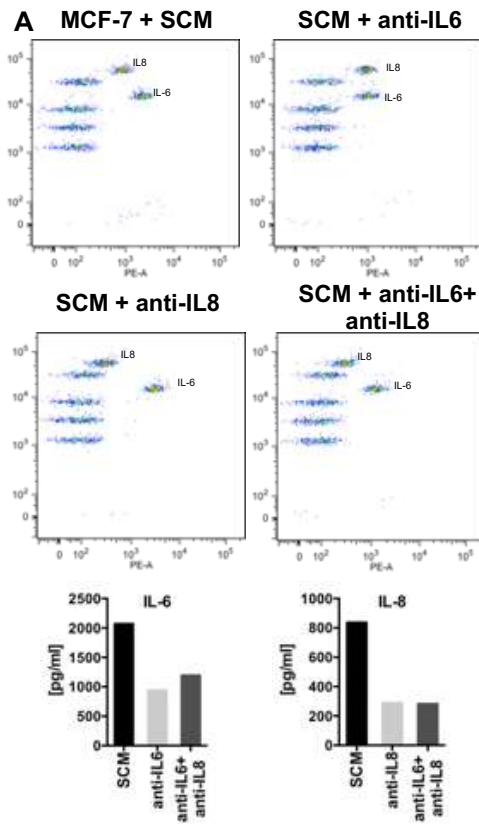




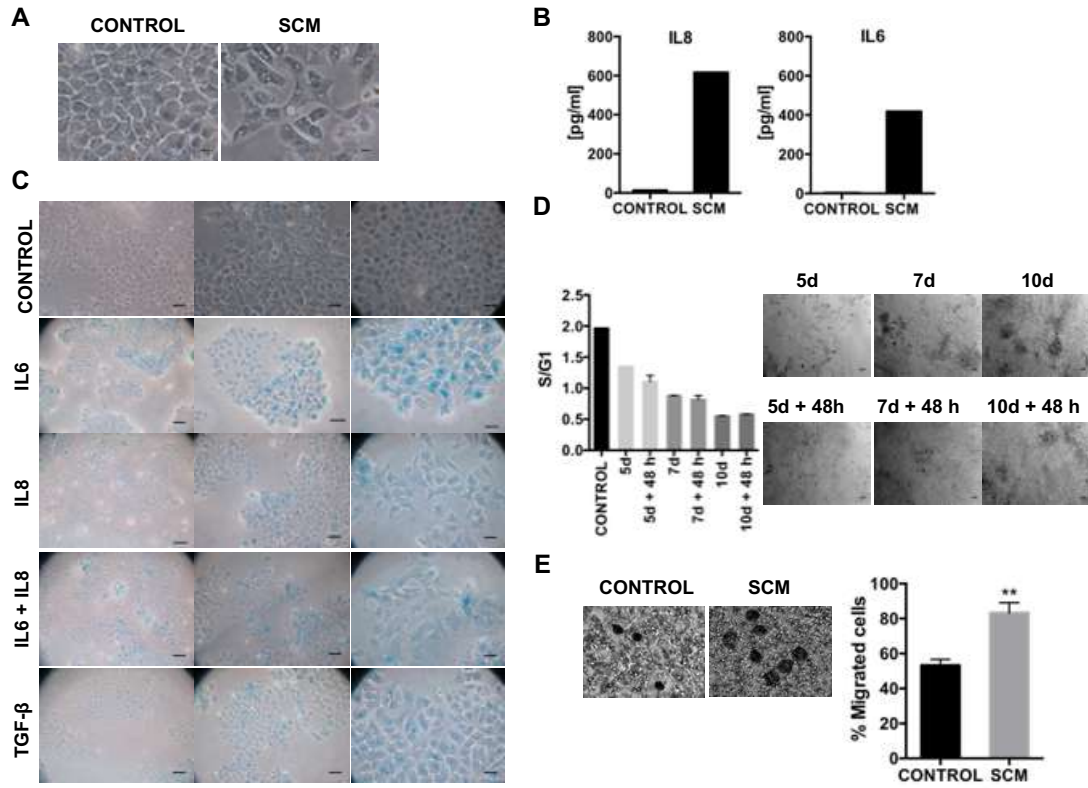
Additional file 4: Figure S4



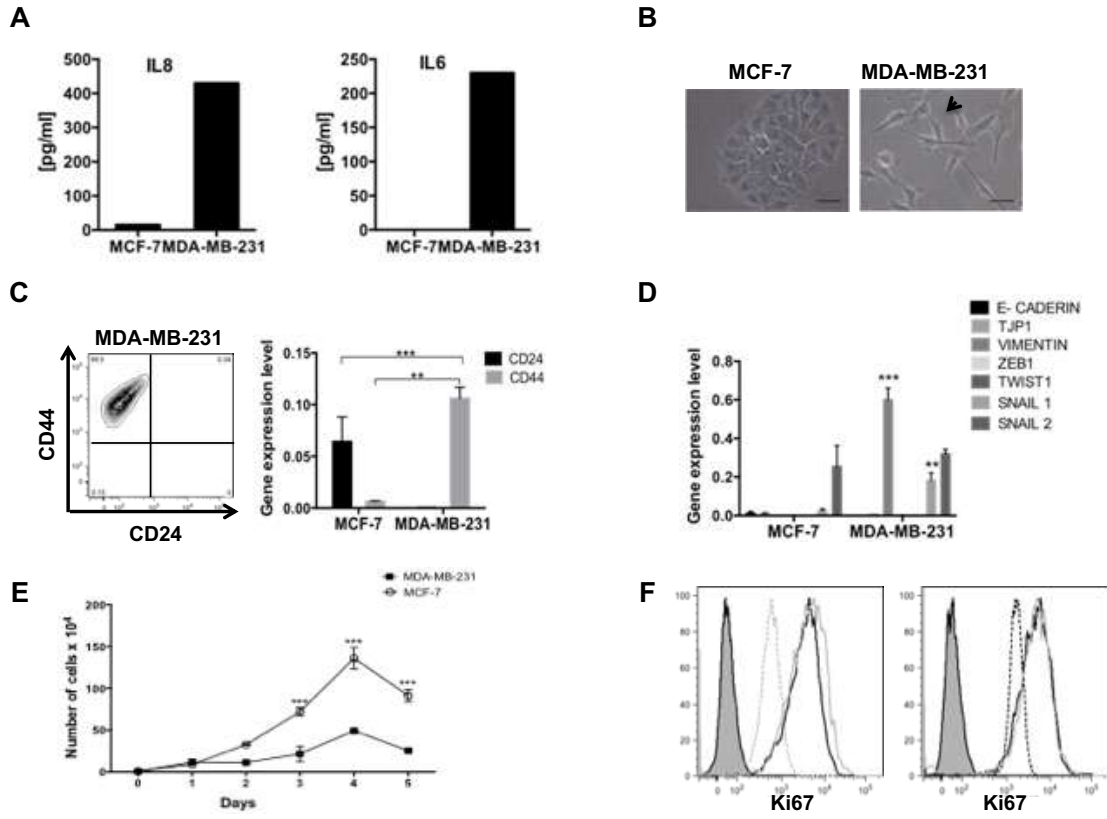
Additional file 5: Figure S5



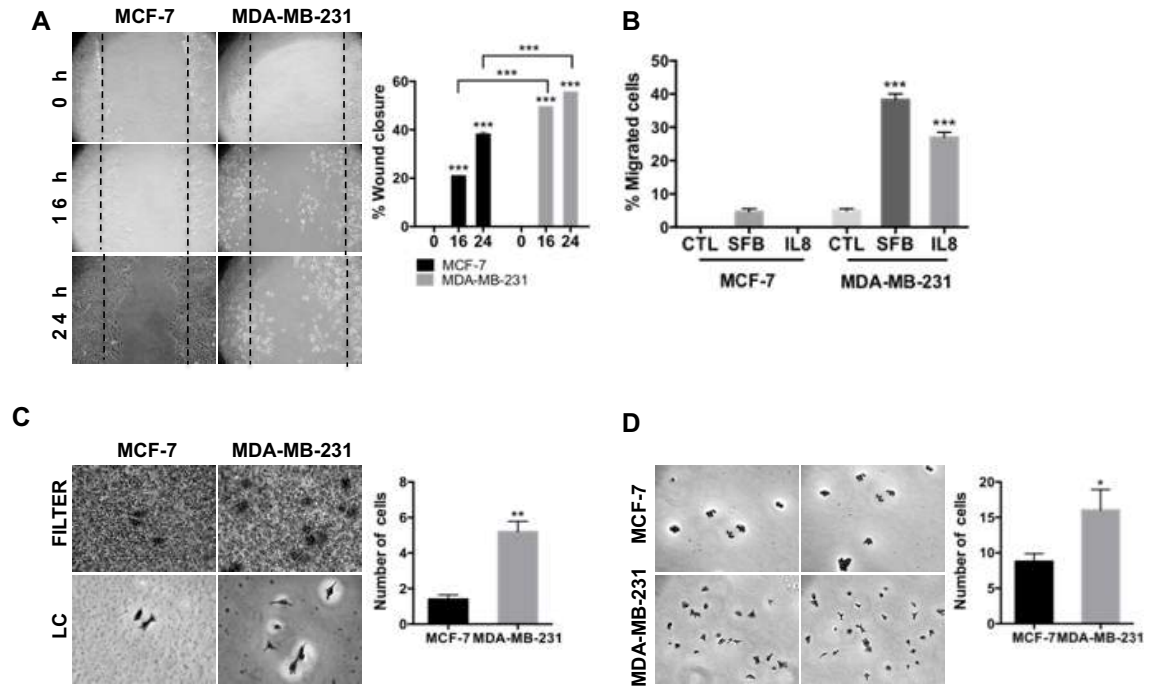
Additional file 6: Figure S6



Additional file 7: Figure S7



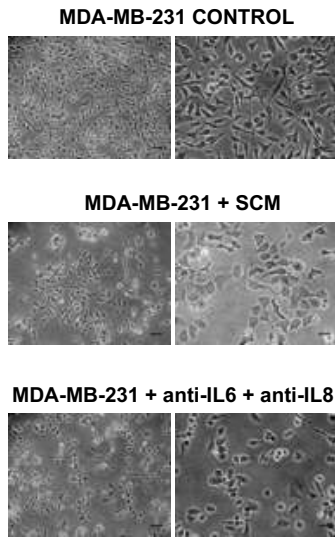
Additional file 8: Figure S8



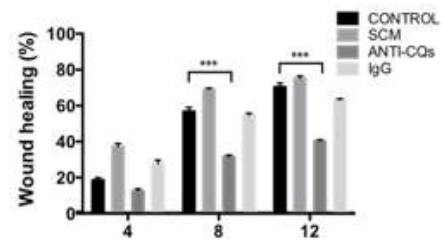
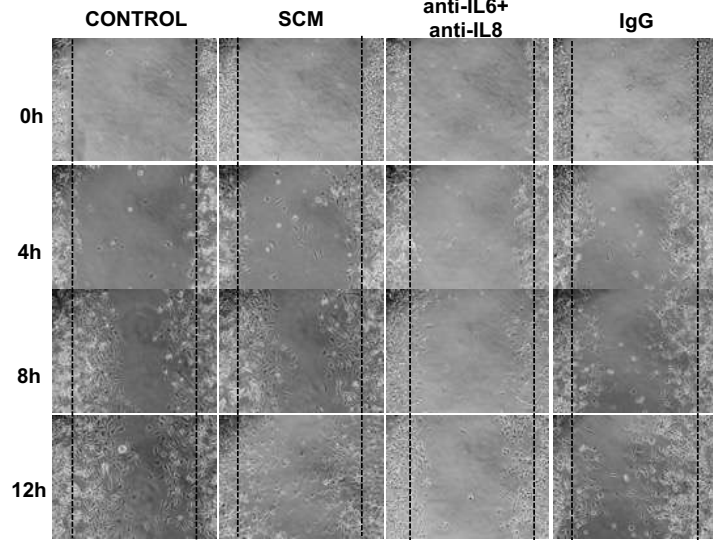


Additional file 9: Figure S9

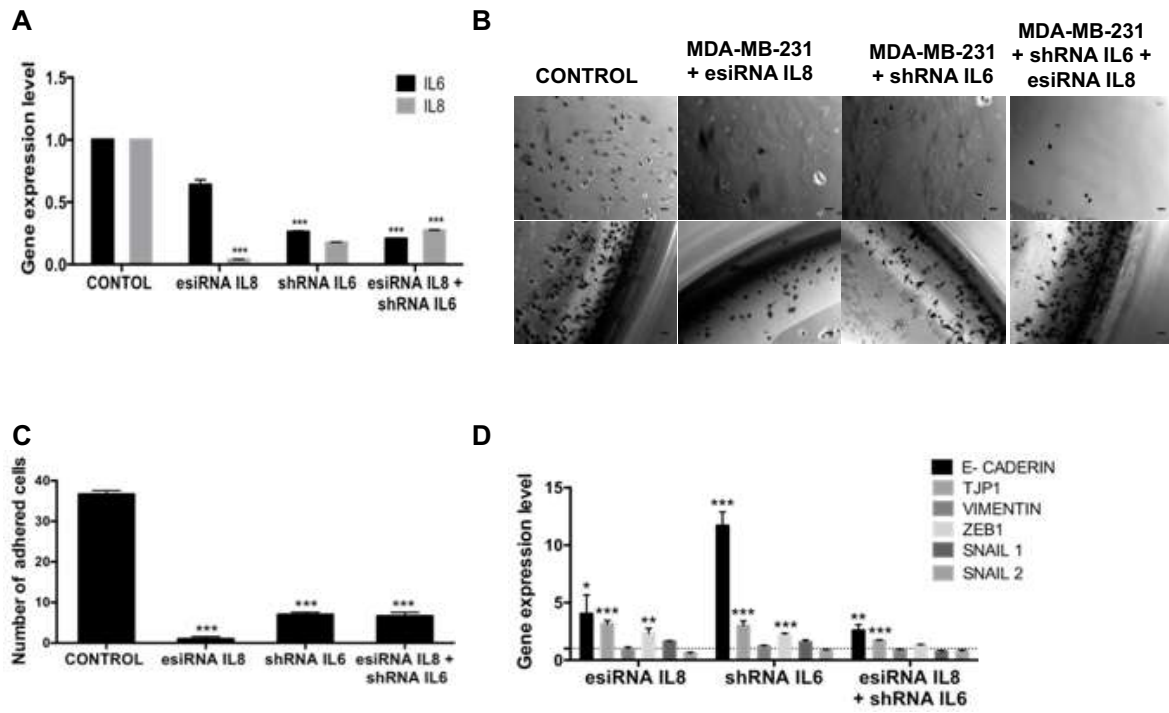
**A**



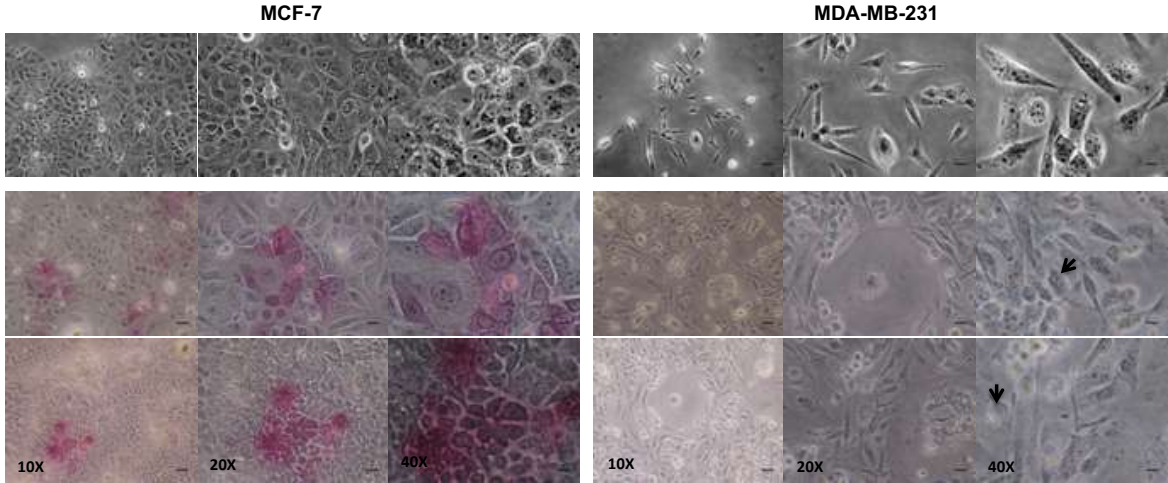
**B**



Additional file 10: Figure S10



A



B

