



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Químicas
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Centro de Investigación Biomédica de Oriente-IMSS



Tesis presentada para obtener el título de:
Doctora en Ciencias Químicas en el
Área de Bioquímica y Biología Molecular

**Efecto de la inhibición de la autofagia en la transición epitelio
mesenquimal de líneas celulares de cáncer de mama**

Presenta

M. en C. Guadalupe Rojas Sánchez

Directoras de tesis

D.C Nidia Gary Pazos Salazar
Facultad de Ciencias Químicas-BUAP

D.C Paola Maycotte González
CIBIOR, IMSS

Puebla, Puebla

10 de diciembre de 2021



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dra. Rosana Pelayo Camacho, Dr. Joaquín Manzo Merino, Dra. Verónica Vallejo Ruíz y la Dra. Bertha Alicia León Chávez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Efecto de la inhibición de la autofagia en la transición epitelio mesenquimal de líneas celulares de cáncer de mama”**, que presenta la alumna **M.C. Guadalupe Rojas Sánchez** para obtener el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veinticinco días del mes de noviembre del año dos mil veintiuno.

ATENTAMENTE

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Dr. Joaquín Manzo Merino

Dra. Verónica Vallejo Ruíz

Dra. Bertha Alicia León Chávez

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Celular II del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social en colaboración con la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Agradezco el apoyo y becas de

CONACYT 7202827 en el periodo 2018-2021

IMSS 97222355 durante el año 2020

Este trabajo fue financiado por

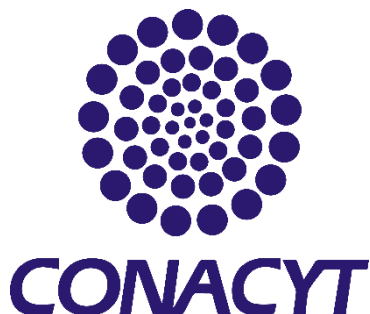
CONACYT CB 258123

CONACYT Infraestructura 2019 300379

FIS/IMSS/PRI0/15/049

También doy las gracias a la Dra. Rosana Pelayo, Dra. Dalia Ramírez y MC Rubí Romo del laboratorio de Oncoinmunología del CIBIOR, por su apoyo y las facilidades para el uso del citómetro de flujo.

Asímismo, agradezco a la Dra. Verónica Vallejo del laboratorio de Biología Molecular, por su valioso apoyo, paciencia y asesoría para los experimentos de qPCR.



Agradecimientos

A Dios

Por cuidar de mi familia, maestros, amigos y de mi persona a toda hora.

A Paola Maycotte

Gracias por abrirme las puertas en tu grupo de trabajo, por permitirme proponer y crecer, por enseñarme y corregirme. Gracias por mantener las puertas de tu oficina y de tu corazón siempre abiertas, has sido un gran impulso profesional y personal. No tengo palabras para agradecer todas tus enseñanzas a lo largo de estos años.

A la Dra Nidia Gary

Le agradezco siempre estar presente y su apoyo incondicional. Gracias por su codirección, ya siempre tuvo disposición y compromiso para con el proyecto. También le agradezco su interés hacia mi familia y mi persona. Le agradezco infinitamente el que siempre se tomase el tiempo para escucharme y aconsejarme, su apoyo ha sido invaluable.

A la Dra. Lourdes Millán, Dra Rosana Pelayo y al Dr. Joaquín Manzo

Queridos doctores, muchas gracias por sus enseñanzas, observaciones y por los gratos seminarios a lo largo de estos años. He aprendido mucho de ustedes, gracias por ser participes activos de mi formación.

A mis compañeros de laboratorio

Benito, Israel, Lili, Alin, Eduardo, gracias por su participación en este proyecto, que también es suyo. Así como por los agradables momentos compartidos.

A mi esposo y a mi hija

Por ser un bálsamo de luz, esperanza y amor. Por su amor, apoyo y paciencia todo este tiempo. Pequeña Sofia Elena, recuerda que es importante que realices todo con gusto y entusiasmo, lo que quieras estudiar y hacer es tú decisión; nosotros siempre te apoyaremos así como tú nos impulsas en cada proyecto.

A mi mamá

Por tu cariño y calidez, por amor y apoyo. Gracias por ser un gran ejemplo a seguir y por tu apoyo incondicional en cada aspecto de mi vida. Te amo mami.

A mis hermanos y sobrinos

Gracias por estar presentes en cada etapa de mi vida y por su amor.

Como resultado de este proyecto de investigación se derivaron las siguientes publicaciones

Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia
<https://doi.org/10.1007/s10911-021-09503-5>

ORIGINAL PAPER



Chloroquine Induces ROS-mediated Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion and Epithelial to Mesenchymal Transition in ER-positive Breast Cancer Cell Lines

Guadalupe Rojas-Sanchez^{1,2} · Alin García-Miranda^{1,3} · José Benito Montes-Alvarado¹ · Israel Cotzomi-Ortega^{1,2} · Fabiola Lili Sarmiento-Salinas^{1,2} · Eduardo Eleazar Jimenez-Ignacio^{1,4} · Dalia Ramírez-Ramírez¹ · Rubí Esmeralda Romo-Rodríguez¹ · Julio Reyes-Leyva¹ · Verónica Vallejo-Ruiz¹ · Nidia Gary Pazos-Salazar² · Paola Maycotte¹

Received: 11 June 2021 / Accepted: 10 November 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021


Abstract

Breast cancer (BC) is the leading cause of cancer-related death in women in the world. Since tumor cells employ autophagy as a survival pathway, it has been proposed that autophagy inhibition could be beneficial for cancer treatment. There are several ongoing clinical trials where autophagy is being inhibited (using chloroquine, CQ or hydroxychloroquine, HCQ) along with chemotherapy with promising results. However, there is also *in vitro* evidence in which autophagy inhibition can induce epithelial to mesenchymal transition (EMT) in cancer cells, indicating that, at least in some cases, this strategy could be detrimental for cancer patients. In this study, we found that the genetic inhibition of autophagy primed cells for EMT by inducing a decrease in E-cadherin protein levels, while CQ treatment decreased E-cadherin levels, induced morphological changes related to EMT, increased EMT-related transcription factor (EMT-TF) expression and migration in estrogen receptor positive (ER+) BC cell lines. Importantly, CQ treatment increased intracellular reactive oxygen species (ROS) which induced the secretion of macrophage migration inhibitory factor (MIF), a pro-inflammatory cytokine related to malignancy. Both ROS production and MIF secretion were responsible for the mesenchymal morphology and increased migratory capacity induced by CQ. Our results indicate that CQ treatment increased malignancy by inducing ROS production, MIF secretion and EMT and suggest that autophagy inhibition in ER+BC patients might have detrimental effects. Our data indicates that a careful selection of patients should be performed in order to determine who will benefit the most from autophagy inhibition with available pharmacological agents for the treatment of breast cancer.

Keywords Autophagy · Breast cancer · Macrophage migration inhibitory factor · Epithelial-mesenchymal transition · Chloroquine

Review

Autophagy and Its Relationship to Epithelial to Mesenchymal Transition: When Autophagy Inhibition for Cancer Therapy Turns Counterproductive

Guadalupe Rojas-Sanchez ^{1,2}, Israel Cotzomi-Ortega ^{1,2}, Nidia G. Pazos-Salazar ¹, Julio Reyes-Leyva ² and Paola Maycotte ^{3,*} 

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla 72570, Mexico; grs.pharm@gmail.com (G.R.-S.); israelcotzomi@gmail.com (I.C.-O.); nidianaye@hotmail.com (N.G.P.-S.)

² Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Km 4.5 Carretera Atlixco-Metepec HGZ5, Puebla 74360, Mexico; julio.reyes@imss.gob.mx

³ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)—CIBIOR, IMSS, Puebla 74360, Mexico

* Correspondence: pmaycottego@conacyt.mx

Received: 30 August 2019; Accepted: 20 September 2019; Published: 24 September 2019



Abstract: The manipulation of autophagy for cancer therapy has gained recent interest in clinical settings. Although inhibition of autophagy is currently being used in clinical trials for the treatment of several malignancies, autophagy has been shown to have diverse implications for normal cell homeostasis, cancer cell survival, and signaling to cells in the tumor microenvironment. Among these implications and of relevance for cancer therapy, the autophagic process is known to be involved in the regulation of protein secretion, in tumor cell immunogenicity, and in the regulation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a critical step in the process of cancer cell invasion. In this work, we have reviewed recent evidence linking autophagy to the regulation of EMT in cancer and normal epithelial cells, and have discussed important implications for the manipulation of autophagy during cancer therapy.

Keywords: autophagy; cancer; cancer therapy; EMT

Índice

1	Índice de figuras.....	9
2	Abreviaturas	10
3	Resumen.....	12
4	Abstract	13
5	Capítulo I: Antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos	14
5.1	Antecedentes	15
5.1.1	Cáncer de mama	15
5.1.2	La autofagia	17
5.1.3	Maquinaria molecular de la autofagia	18
5.1.4	La autofagia en cáncer	21
5.1.5	Secreción de citocinas mediada por autofagia y por su inhibición.....	23
5.1.6	Secreción mediada por autofagia en cáncer de mama.....	24
5.1.7	MIF y cáncer.....	25
5.1.8	Transición epitelio mesenquimal en cáncer.....	26
5.2	Planteamiento del problema.....	29
5.3	Hipótesis	29
5.4	Objetivos	29
5.4.1	Objetivo general	29
5.4.2	Objetivos particulares	29
6	Capítulo II: Metodología	30
6.1	Diagrama de trabajo.....	31
6.2	Reactivos.....	32
6.3	Cultivo celular.....	32
6.4	Análisis de genes	32
6.5	Transducción lentiviral con shRNAs	33
6.6	Análisis de proliferación y muerte celular	33
6.7	Western Blot	34
6.8	Análisis morfológico de las células	34
6.9	Cuantificación de citocinas proinflamatorias.....	35
6.10	Cuantificación de MIF	35

6.11	Cuantificación de ERO	36
6.11.1	Microscopía de fluorescencia	36
6.11.2	Citometría de flujo.....	36
6.12	Cierre de herida.....	37
6.13	qPCR.....	38
6.14	Análisis estadístico	39
7	Capítulo III: Resultados y discusión	40
7.1	Resultados	41
7.1.1	La inhibición de la autofagia muestra diferencias en el perfil transcripcional entre líneas celulares de CM RE+ y TN.....	41
7.1.2	La inhibición de la autofagia induce una disminución en los niveles proteicos de E-cadherina, pero sólo el tratamiento con CQ induce TEM funcional.....	44
7.1.3	El tratamiento con CQ induce TEM a través de la secreción de MIF mediada por ERO	52
8	Discusión	60
9	Conclusiones	67
10	Perspectivas	68
11	Bibliografía.....	68

1 Índice de figuras

Figura 1. Modelo esquemático del proceso de autofagia y su regulación.....	20
Figura 2. La autofagia tiene un papel dual en la progresión tumoral.....	21
Figura 3. Mecanismos de secreción proteica por la vía no clásica mediada por autofagia..	24
Figura 4. Gates utilizados para el análisis de poblaciones ERO ^{altas} y ERO ^{bajas}	37
Figura 5. La inhibición de la autofagia regula positivamente vías relacionadas a la inflamación, secreción y TEM en la línea MCF7 RE+.....	42
Figura 6. La inhibición de la autofagia regula positivamente genes relacionados a vascularización, secreción y de citoesqueleto en la línea MCF7.....	43
Figura 7. La inhibición de la autofagia disminuye la proliferación de líneas de CM.....	44
Figura 8. El tratamiento con CQ induce muerte celular en tiempos de cultivo prolongados y en la dosis más alta.....	45
Figura 9. El tratamiento con CQ bloquea el flujo autofágico en las líneas de CM.....	46
Figura 10. El tratamiento con CQ induce cambios morfológicos en las líneas RE+.....	47
Figura 11. La inhibición de la autofagia no modifica la morfología de la línea MCF7 RE+.....	48
Figura 12. El tratamiento con CQ durante 48 h tiende a disminuir los niveles de E-cadherina.....	49
Figura 13. El tratamiento con CQ durante 72 h disminuye los niveles de E-cadherina.....	50
Figura 14. El tratamiento con CQ induce TEM en la línea MCF7 RE+.....	51
Figura 15. La inhibición de la autofagia disminuye los niveles de E-cadherina pero no induce la migración de la línea MCF7 RE+.....	52
Figura 16. El cierre de herida es mediado por factores solubles inducidos por el tratamiento con CQ.....	53
Figura 17. El tratamiento con CQ durante 24 h mantiene estable un perfil de citocinas.....	54
Figura 18. El tratamiento con CQ induce la secreción de MIF mediada por ERO.....	56
Figura 19. La inhibición de la autofagia no induce la secreción de MIF en la línea MCF7 RE+.....	57
Figura 20. El tratamiento con CQ induce la fosforilación de ERK en la línea MCF7 RE+.....	58
Figura 21. El tratamiento con CQ induce TEM mediada por MIF en líneas RE+.....	59
Figura 22. Resumen gráfico del trabajo.....	68

2 Abreviaturas

AMPK	Cinasa activada por AMP
Atg	Relacionado a la autofagia
CM	Cáncer de mama
CQ	Cloroquina
DE	Desviación estándar
DHE	Dihidroetidio
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ES	Error estándar
FT	Factor de transcripción
FT-TEM	Factor de transcripción regulador de la transición epitelio mesenquimal
HCQ	Hidroxicloroquina
HER2	Receptor epidermal humano del tipo 2
IL-18	Interleucina 18
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
lncRNAs	ARNs largos no codificantes
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MAPK/ERK	MAP cinasa 1
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MMP	Metaloproteinasa de matriz
NAC	N-acetil cisteína
NF-k β	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLRP3	Dominio de pirina 3 de la familia NLR
NT	No tumorigénico
PD-1	Ligando de muerte programada
RE	Receptor de estrógeno

RER	Retículo endoplásmico
RP	Receptor de progesterona
SFB	Suero fetal bovino
SMA- α	Actina de músculo liso α
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TN	Triple negativo
UDP	Unidades de densidad óptica

3 Resumen

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en las mujeres en México y en el mundo; por lo que representa un grave problema de salud pública, haciendo imperativo su estudio para la mejora de la detección y la terapéutica. La autofagia es un proceso de mantenimiento citoplásmico basal que se encuentra activo en todas las células. En cáncer, la autofagia posee un rol complejo dependiente de la etapa de tumorigénesis. Recientemente, el proceso autofágico se ha relacionado a la secreción de citocinas proinflamatorias las cuales regulan procesos como la transición epitelio mesenquimal (TEM), que está íntimamente relacionado con la invasión, metástasis, la troncalidad y la resistencia a fármacos. Antecedentes de nuestro grupo de trabajo muestran que la inhibición de la autofagia en la línea MCF7 (RE+) incrementa la secreción de IL-6 y se activan programas génicos relacionados a la TEM, lo cual podría indicar un incremento en la agresividad tumoral. Existen estudios clínicos en los que se emplean inhibidores de autofagia (cloroquina CQ e hidroxiclороquina HCQ) como adyuvantes en la quimioterapia, para tratar a pacientes de diversos tumores sólidos incluyendo cáncer de mama RE+; por lo que fue de nuestro interés determinar si la inhibición de la autofagia podría promover un fenotipo asociado a la TEM en este subtipo de cáncer de mama. Se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama derivadas de diferentes subtipos histopatológicos, se inhibió la autofagia de forma farmacológica (cloroquina, CQ) y genética (shARNs contra *ATG7*), y se evaluaron los efectos asociados a TEM. En las líneas RE+ el tratamiento con CQ indujo características relacionadas a la TEM, como cambios en la morfología, disminución de E-cadherina (proteína relacionada al epitelio), expresión de factores de transcripción reguladores de la TEM como *SNAIL*, *SLUG* y *TWIST*, acompañados de un incremento en la migración. Estos cambios estuvieron regulados por especies reactivas de oxígeno y la secreción de MIF. MIF es una citocina proinflamatoria que induce la TEM y se encuentra relacionada al mal pronóstico en pacientes. Por otra parte, se observó que la inhibición genética de la autofagia indujo una disminución de E-cadherina, pero no se observaron cambios a nivel celular y funcional relacionados a la TEM, por lo que esta inhibición podría sensibilizar a las células para la inducción de TEM. Ya que actualmente existen estudios clínicos en los que se estudia la inhibición de la autofagia con CQ en pacientes con cáncer de mama tipo RE+, nuestros resultados sugieren que este enfoque terapéutico no será el adecuado para este tipo de cáncer de mama y que la implementación de ciertas terapias necesita de una estratificación adecuada de acuerdo con las características de los pacientes.

Palabras clave: Cáncer de mama, receptor de estrógeno, transición epitelio mesenquimal, MIF, cloroquina

4 Abstract

Breast cancer (BC) is the most frequent neoplasm in women in Mexico and worldwide, thus the improving of diagnosis and therapeutics results imperative. Autophagy is a housekeeping process that is always active in all mammalian cells. However it exhibits a complex role depending on the tumorigenic stage. Recently, the autophagic process has been correlated with pro inflammatory cytokine secretion, whose upregulation in cancer has been related with the induction of the epithelial mesenchymal transition process (EMT). EMT is a transdiferantiation process that confers multiple features to cancer cells, such as invasion, metastasis, stemness and drug resistance. Work from our research group showed that autophagy inhibition in the MCF7 (ER+) breast cancer cell line, increased IL-6 secretion accompanied by the upregulation of genetic programs related to EMT. There are clinical trials where autophagy is pharmacologically inhibited by chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ), in cancer patients including solid tumor neoplasms such as ER+ BC. The aim of this work was to determine whether the autophagy inhibition could induce TEM in certain ER+ breast cancer. Cell lines derived from the different breast cancer subtypes were used, and autophagy inhibited using two approaches: one pharmacological (using CQ) and a genetical (by employing shRNAs against ATG7 protein) approach. CQ treatment induced features related to TEM such as changes in cell morphology, downregulation of E-cadherin (protein related to the epithelium), expression of EMT-Transcription factors such as *SNAIL*, *SLUG* and *TWIST*, and increased cellular migration. It was demonstrated that those changes were orchestrated by reactive oxygen species-mediated MIF secretion. MIF is a pro inflammatory cytokine that induces EMT and is related to a poor prognosis in patients. On the other hand, genetic autophagy inhibition did not induce morphological changes, invasion features neither MIF secretion, but E-cadherin was downregulated; which could be an indicator that cells are primed for EMT. Our results suggest that treating ER+ BC patients with CQ would not be beneficial and it will be from great importance to identify the right patients according to its BC subtype.

Keywords: Breast cancer, estrogen receptor, epithelial mesenchymal transition, MIF, chloroquine

5 Capítulo I: Antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos

5.1 Antecedentes

5.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es la neoplasia más frecuente en las mujeres a nivel mundial y afecta a más de 1.5 millones de mujeres cada año [1-3], su incidencia es alta en países desarrollados y en México es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer [4]. El CM se ha relacionado al envejecimiento y estudios demográficos por el Consejo Nacional de Población (CONAPO) han pronosticado que para el año 2050 habrá un incremento significativo de la población senil; lo cual está relacionado a la disminución de la natalidad y al incremento de la esperanza de vida [5, 6]. Por lo tanto, se considera un grave problema de salud pública y es necesario continuar su estudio para determinar su origen, establecer sus marcadores moleculares y celulares, así como para proponer terapias seguras, eficaces y con los menores efectos adversos para las pacientes [2].

A pesar de que esta patología se relaciona con el envejecimiento, existen otros factores de riesgo, los cuales son de tipo hormonal, relacionados a hábitos de estilo de vida y a factores genéticos [7, 8]. Entre los factores hormonales se encuentran: presentación de una menarca temprana, menopausia tardía, el primer embarazo en edad avanzada y la exposición prolongada a estrógenos a través de terapia hormonal. Por otra parte, la obesidad presenta un factor importante en el desarrollo de esta neoplasia [9]. La obesidad involucra una compleja remodelación del tejido adiposo que deriva en el incremento de los niveles de estradiol, así como a la secreción de citocinas proinflamatorias, al incremento de estrés oxidativo y a la sobreactivación de la vía del factor de crecimiento de insulina (IGFs) [7, 9, 10]; estos cambios moleculares se encuentran directamente relacionados con un incremento en la incidencia de CM [7, 10]. Referente a los factores genéticos se ha encontrado que las pacientes con mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1/2*, *TP53*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1*, *ATM*, *PTEN*, *CDH1*, tienen una mayor probabilidad de desarrollar cáncer [8, 11].

El CM es un grupo de neoplasias heterogéneas con origen en las células epiteliales que recubren los ductos de leche o lóbulos de la mama [12]. El diagnóstico se basa en un examen físico, estudios de imagen (ultrasonido, mastografía, resonancia magnética) y en un análisis patológico [13]. En éste último, a través de una inmunohistoquímica se clasifican a las pacientes acorde al estado de expresión de receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RP), cuya prevalencia es del 60-70% entre todos los tipos de CM [14]; así como del receptor del factor de crecimiento humano epidermal de tipo 2 (HER2), cuya

prevalencia es del 15-20% de entre todos los tipos de CM [14]; mientras que a la ausencia de todos estos se le denomina triple negativo (TN), con una prevalencia del 15% [14]. Esta clasificación es muy importante ya que determina la terapia farmacológica y la respuesta clínica [13, 14].

Los tumores RE+ son los menos agresivos respecto a los tumores HER2+ y TN, se encuentran altamente diferenciados, las pacientes tienen un buen pronóstico y una mejor tasa de supervivencia [14]. Estos tumores sobreexpresan el RE+, que es un factor de transcripción (FT) dependiente de su ligando, el estradiol, que modula la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la migración celular a través de su unión a elementos de respuesta a estrógeno (ERE) [15]. A través de análisis de expresión génica se ha encontrado que los tumores RE+ tienen una alta expresión de queratinas luminales (KRT18, KRT19), de proteínas de uniones adherentes (E-cadherina, Claudina 7/8), así como a factores de transcripción (FOXA1, GATA3, TBX3) regulados por el receptor RE (ESR1) [16-18]. Tomando en cuenta que estos subtipos tumorales tienen una proliferación y supervivencia dependiente de la señalización del RE, en la clínica se ha empleado terapia endócrina durante 5 a 10 años, lo cual ha ayudado a prevenir metástasis y recurrencia [14, 15]. Dependiendo del estado hormonal de la paciente (con menopausia o postmenopáusica) se prescriben inhibidores del receptor de estrógeno (Tamoxifeno) o inhibidores de la enzima aromataasa (Letrozol, Anastrozol, Exemestano), respectivamente. Además, dependiendo de otros factores (como el grado tumoral) se sugiere quimioterapia [14, 19].

El subtipo histopatológico HER2+ se caracteriza por una elevada expresión de la proteína HER2, así como, por la amplificación de su respectivo gen, el cual codifica para un receptor transmembranal tirosina cinasa de la familia de EGFR [13]. Estos tumores se caracterizan por tener un índice elevado de proliferación, muestran una mayor inestabilidad genómica, poseen una expresión intermedia de genes y proteínas luminales (ESR1 y PGR1) y una baja expresión de genes basales (KRT5 y FOXC1) [20]. Anteriormente, estas pacientes tenían una mayor probabilidad de generar metástasis [20]; sin embargo, el empleo de anticuerpos monoclonales contra el receptor HER2 (Trastuzumab y Pertuzumab), así como, de inhibidores de su señalización (Lapatinib y Neratinib) en conjunto con quimioterapia, han tenido resultados favorables en las pacientes, incrementando su supervivencia así como el tiempo libre de enfermedad [13, 14].

Por otro lado, los tumores TN son los más agresivos y heterogéneos de todos los subtipos de CM, son los menos diferenciados, tienen una capacidad metastásica alta y carecen de terapia dirigida. Se ha descrito que este subtipo tumoral tiene una alta señalización de las vías Notch, Wnt- β -catenina, Hedgehog; y existen estudios *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos en los que se emplean fármacos para inhibir estas vías [21-23]. También existen estudios en los que se emplean inhibidores de mecanismos de reparación de DNA (inhibidores de PARP) [21]; así como inmunoterapias dirigidas al receptor PD-L1, que induce la evasión de la respuesta inmune [21, 24]. Además, para este subtipo de CM, se ha planteado a la inhibición de la autofagia como un enfoque terapéutico [25]. Sin embargo, su uso en la clínica actualmente es limitado donde las pacientes por lo general, sólo se benefician de quimioterapia [13, 14].

5.1.2 Autofagia

En la célula se orquestan múltiples procesos para el mantenimiento, comunicación, proliferación y muerte celular. Entre ellos, para la eliminación de proteínas existen dos vías de degradación: el sistema ubiquitin-proteasoma y la autofagia. El sistema proteosomal es un fino regulador del tiempo de vida media de proteínas con base a su secuencia señal (residuo amino terminal) [26]. Por otra parte, el proceso de autofagia no sólo elimina proteínas mal plegadas, dañadas o aglomeradas, sino también organelos (mitocondrias, retículo endoplásmico, peroxisomas), lípidos e incluso RNAs [27-29], por lo que es un proceso homeostático.

En la autofagia se eliminan componentes citoplasmáticos dañados (conocidos como cargos) que son secuestrados en una estructura de doble membrana lipídica (autofagosoma), la cual se fusiona con los lisosomas para la degradación de sus componentes y su posterior reciclaje [30]. La autofagia es un proceso altamente conservado entre eucariotas y se ejecuta por proteínas relacionadas a la autofagia (ATG), las cuales se clasifican de acuerdo con su participación jerárquica en el proceso. Se encuentra activa a nivel basal en todas las células eucariontas y puede inducirse a niveles más elevados bajo condiciones de estrés [31]. La desregulación de este proceso deriva no solo en la acumulación de autofagosomas, sino también de cargos, aunado al incremento de estrés oxidativo y se ha vinculado a enfermedades crónico degenerativas tales como cáncer, Alzheimer, la enfermedad de Crohn, atrofia muscular, miopatía, enfermedades cardíacas, pancreatitis, entre otras [31]. Asimismo,

la autofagia tiene un papel importante en el desarrollo de eucariotas superiores, ya que la deficiencia de la proteína relacionada a la autofagia 5 (ATG5) en ratones neonatos induce un fenotipo letal postnatal, que se encuentra relacionado a deficiencias del desarrollo neuronal [32, 33]. De forma importante, en ratones adultos con delección condicional a la proteína ATG7 se induce la degeneración de la morfología celular y de diferentes órganos [34]. Además, estos ratones mostraron susceptibilidad a infecciones y no sobrevivieron a la inanición por 24 horas [34]. Esta evidencia denota que la autofagia es esencial para el mantenimiento de la homeostasis sistémica de los eucariotas superiores.

5.1.3 Maquinaria molecular de la autofagia

La autofagia se efectúa en diferentes etapas: inducción y nucleación, elongación y cierre, y fusión (**Figura 1**).

Inducción y nucleación. En esta fase participa el complejo de la cinasa ULK1/2 que se encuentra conformado por las proteínas ULK1/2, FIP200, ATG101 y ATG13; el cual induce la formación del autofagosoma, así como la fosforilación del complejo de clase III fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K). Existen varios moduladores de la autofagia, sin embargo, los dos principales son AMPK y mTOR. Cuando en la célula hay bajos niveles de energía (AMP/ATP) se activa la cinasa AMPK, la cual a su vez activa al complejo ULK1/2. Por otro lado, cuando los niveles de aminoácidos son adecuados en el medio celular, el complejo mTOR inhibe a la cinasa ULK1 [35]. La nucleación del autofagosoma se lleva a cabo por el complejo PI3K, que está conformado por las proteínas Vps34, ATG14L, Beclin y p150; su función es la generación de fosoinositol 3 fosfato (PI3P), el cual es esencial para la formación del autofagosoma ya que permite el reclutamiento de otras proteínas ATG [31].

Elongación y cierre. La elongación del autofagosoma se lleva a cabo a través de dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina ATG5-ATG12 y LC3-PE. Los cuales tienen como función el procesamiento proteolítico de la proteína LC3-I y su posterior fusión al lípido fosfatidil etanolamina (PE), lo que da lugar a la forma LC3-II [31]. La forma LC3-II se ancla a ambas partes de la membrana autofagosomal, donde tiene diversas funciones: promover la elongación del autofagosoma, la fusión del autofagosoma con el lisosoma y actúa como proteína andamio de proteínas adaptadoras (p62/SQSTM1, NDP52, NBR1, OPTN, TAX1BP1, NIX, FYCO, PLEKHM); las cuales son imprescindibles para la eliminación de cargos específicos [36]. Es importante mencionar a la proteína adaptadora p62/SQSTM1, ya

que posee un papel dual en el proceso inflamatorio: en condiciones de estrés oxidativo promueve la activación de NRF2 a través de la degradación de KEAP1 (proteína inhibitoria de NRF2), con lo que se induce la expresión de proteínas antioxidantes [37]. Por otro lado, existe evidencia que la inhibición de la autofagia induce un incremento de p62, la cual activa a la vía NF- κ B, induciendo un estado proinflamatorio [38], por lo que su desregulación se ha visto implicada en la progresión tumoral [38-40].

Uno de los marcadores más utilizados para el flujo autofágico es la cuantificación de LC3-II [41], ya que correlaciona de forma directa con la cantidad de autofagosomas [41]. Existen fármacos que inhiben el proceso de elongación a través de la inhibición de la proteína ATG4 [27, 42]. Por otra parte, la inhibición genética de ciertas proteínas de los complejos tipo ubiquitina evita la formación del autofagosoma y este tipo de inhibición se denomina inhibición temprana, ya que los autofagosomas no se forman adecuadamente y los cargos permanecen en el citoplasma [37-39]. **Fusión.** Una vez formado el autofagosoma, la fusión se lleva a cabo por las proteínas SNARE y STX17. Este paso es sensible a modificaciones del pH lisosomal y hay una gran cantidad de fármacos que lo modifican, de los cuales la cloroquina (CQ) e hidroxiclороquina (HCQ) se encuentran en fase de ensayos clínicos [43]. La inhibición de esta etapa se denomina inhibición tardía, ya que el autofagosoma se encuentra formado y el paso de degradación se encuentra bloqueado.

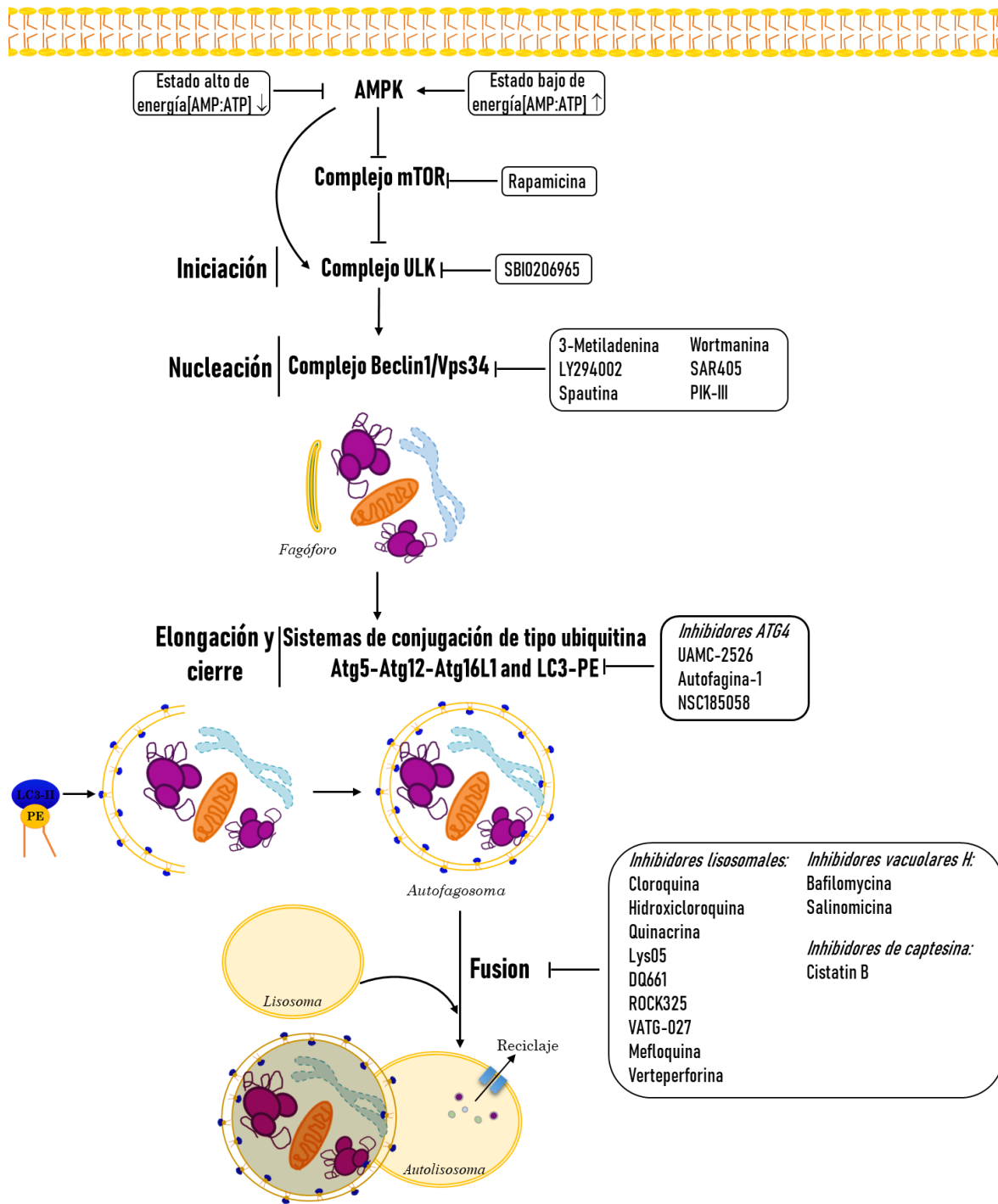


Figura 1. Modelo esquemático del proceso de autofagia y su regulación. La autofagia es un proceso catabólico mediante el cual se eliminan proteínas, organelos y lípidos (conocidos como cargos), a través de su secuestro en una doble membrana lipídica (autofagosoma), el cual se fusiona y se degrada en el lisosoma. La autofagia se regula principalmente, a través del complejo maestro regulador de rapamicina (mTORC1) y la cinasa activada por AMP (AMPK). En condiciones ricas en aminoácidos mTORC1 regula de forma negativa a la autofagia. Mientras que bajo condiciones de inanición o niveles bajos de energía, mTORC1 se inhibe y por lo tanto la autofagia se induce. La autofagia se ejecuta por múltiples proteínas relacionadas a la autofagia (ATG) y se clasifican acorde a su participación en el proceso: iniciación, nucleación, elongación y cierre. Existen inhibidores farmacológicos de las diferentes etapas del proceso. Tomado y modificado de [44].

5.1.4 La autofagia en cáncer

La autofagia en cáncer posee un rol complejo dependiente de la etapa de la tumorigénesis [45] (**Figura 2**). Se ha observado que los ratones con delección heterocigótica de *beclin1* se desarrollan normalmente; sin embargo, muestran un incremento en la incidencia de crecimiento de linfomas y carcinomas [46]. Asimismo, ratones con delección sistémica específica de las proteínas Atg5 y Atg7, mostraron desarrollo de adenomas de hígado [47]; en este modelo los hepatocitos deficientes de autofagia mostraron daño al DNA por estrés oxidativo, incremento del tamaño mitocondrial y acumulación de p62 [47]. De forma importante la delección simultánea de *p62* disminuyó la progresión tumoral. Con esta evidencia se sugiere que la autofagia es un mecanismo supresor de tumores ya que mantiene la estabilidad genómica y previene la tumorigénesis a través de la eliminación de mitocondrias, organelos, proteínas dañadas y de p62 [45].

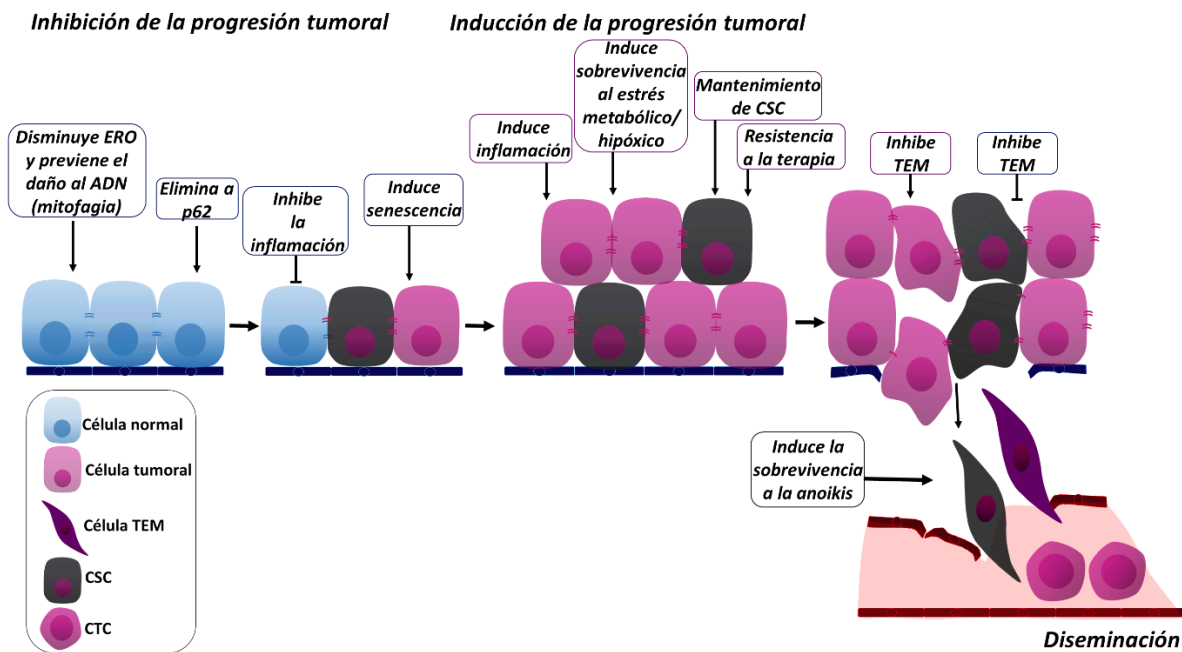


Figura 2. La autofagia tiene un papel dual en la progresión tumoral. En condiciones normales la autofagia disminuye las especies reactivas de oxígeno (ERO), organelos y proteínas dañados. La autofagia degrada a la proteína p62, la cual puede activar la señalización de NF- κ B y por lo tanto previene la inflamación. Si una célula se transforma puede inducir senescencia. Sin embargo, una vez que el tumor se encuentra establecido, la autofagia por lo general funciona como mecanismo de supervivencia, induce inflamación, resistencia a la terapia, promueve la resistencia a la anoikis. La autofagia puede inhibir o promover la transición epitelio mesenquimal, un proceso íntimamente relacionado a la cascada metastásica. Tomado y modificado de [44].

Por otra parte, en un modelo de ratón de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), la delección de *atg7* en conjunto con la activación de K-ras, indujo un incremento de benigno de oncocitomas y no se observó la formación de adenocarcinomas [48]. Además, se ha observado que las células tumorales inducen la autofagia para sobrevivir a diferentes condiciones de estrés como oxidativo [49], metabólico [50], la anoikis [51], la hipoxia [52] y en la resistencia a fármacos [53]. Esta evidencia indica que una autofagia funcional es importante para la progresión tumoral y que funciona como un mecanismo de supervivencia tumoral ante condiciones de estrés; por lo que se ha sugerido como blanco terapéutico para el tratamiento de cáncer y actualmente se desarrollan ensayos clínicos en los que se inhibe la autofagia con CQ/HCQ, ya sea como terapia única o coadyuvante [42, 54]. Adicionalmente, se ha descrito que tumores pancreáticos [55], de cerebro [56], melanoma [57], pulmón [58] y colorrectales [59] con mutaciones en la vía RAS/MAPK mantienen niveles altos de autofagia, haciéndolos sensibles a la inhibición de este proceso y en ensayos clínicos se ha observado la disminución del tamaño tumoral [55, 56, 60-63].

De forma interesante, en CM se ha observado que la inhibición genética de la autofagia tiene efectos diferenciales acorde al subtipo tumoral [25]. La línea MCF10A NT no es sensible a la inhibición de la autofagia y se observó un incremento en su capacidad proliferativa; las líneas RE+ (MCF7 y T47D) mostraron una reducción en su proliferación pero no se observó muerte celular [64], por lo que se clasificaron como no dependientes de autofagia. Por otra parte, las células TN (MDAMB231 y MDAMB468) se clasificaron como dependientes de autofagia, ya que la inhibición de este proceso disminuyó notablemente su proliferación y se acompañó de muerte celular [25, 64].

A pesar de que existe una amplia evidencia que indica que la inhibición de la autofagia es un buen enfoque terapéutico, también hay evidencia que muestra que la inhibición de la autofagia puede inducir efectos contraproducentes [44]. Por lo que se sugiere tener cautela para evidenciar qué tipos de tumores se beneficiarán de la inhibición de la autofagia y en cuáles se podrían inducir efectos no deseados.

Aunado al punto anterior, la CQ e HCQ pueden inducir efectos opuestos independientes de la autofagia, los cuales se deben principalmente a la capacidad que tienen de acumularse en compartimentos acídicos [65], induciendo un incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) [66, 67], las cuales activan a NF- κ B, induciendo la expresión de

HIF1 α , *IL-8* y *BLC2*, incrementando la migración, induciendo resistencia a la apoptosis y la resistencia a fármacos [68].

5.1.5 Secreción de citocinas mediada por autofagia

La autofagia no sólo es un proceso de mantenimiento citoplásmico basal, sino que recientemente se ha demostrado que está directamente relacionada con la secreción. La secreción proteica es un proceso por el cual proteínas solubles y cargos son liberados al espacio extracelular con la finalidad de regular el crecimiento celular, la inmunidad, la liberación hormonal, entre otros. La secreción de proteínas se puede llevar a cabo tanto por la vía clásica como por la vía no clásica [69]. En la primera, las proteínas sintetizadas *de novo* que contienen una secuencia señal son trasladadas al retículo endoplásmico (RER), se transportan al aparato de Golgi y se secretan a través del sistema vesicular [69]. Por otro lado, las proteínas secretadas por la vía no clásica carecen de una señal de traslocación al RER y no utilizan la vía convencional de secreción [70]. Recientemente se ha descrito y se ha relacionado al proceso de autofagia con la secreción proteica. Por ejemplo, en células de Paneth en un modelo de ratón con deficiencia en la proteína ATG5, se observó la disminución de la secreción de lisozima [71] (**Figura 3**).

También hay evidencia que muestra que los autofagosomas se pueden unir al cuerpo multivesicular a través de las proteínas SEC22B, RAB8A, RAB27A, posteriormente se fusionan a la membrana plasmática liberando su contenido al medio incluyendo IL-1 β , α -sinucleína, Acb1 y anexina A2 [70].

Otro mecanismo en el que la autofagia se relaciona a la secreción no clásica es a través de su inhibición, promoviendo la acumulación de mitocondrias dañadas e incrementando las ERO mitocondriales, las cuales inducen la maduración de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 a través del inflamasoma y su posterior secreción [70]. También se ha observado que la inhibición de la autofagia media la secreción del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) a través de la inducción de su transcripción mediada por FT modulados por ERO [72]. El empleo de antioxidantes generales como N-acetil-cisteína (NAC) [70, 71, 73, 74] o antioxidantes específicos mitocondriales (como MitoTEMPO) [70, 71, 73, 74] disminuyen la secreción de IL-1 β o del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) inducida por la inhibición de la autofagia.

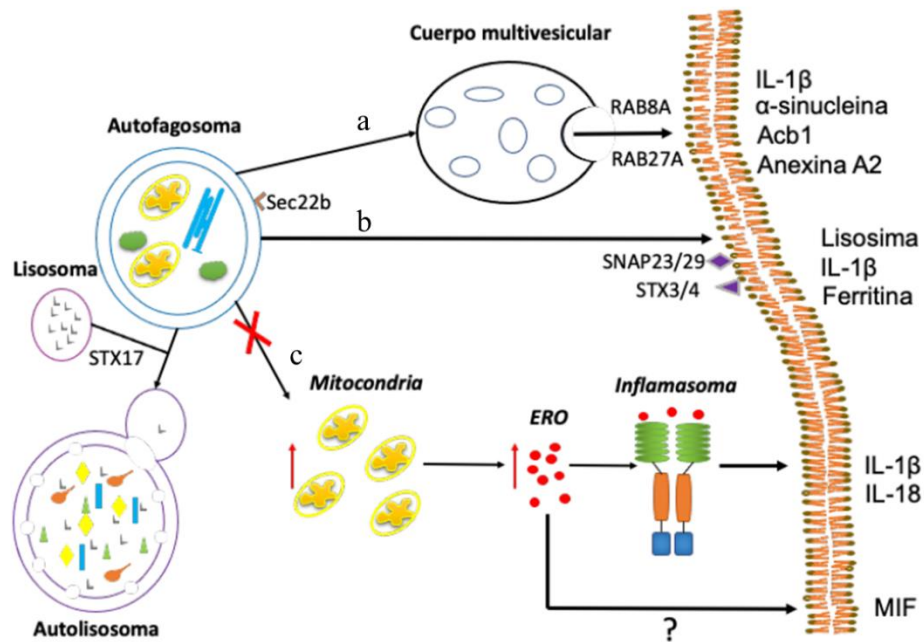


Figura 3. Mecanismos de secreción proteica por la vía no clásica mediada por autofagia. Se han descrito dos posibles mecanismos en los cuales el autofagosoma participa en la secreción no clásica de proteínas. a) Los autofagosomas se pueden unir al cuerpo multivesicular y a través de las proteínas Sec22b, Rab-8A y Rab-27A se fusionan a la membrana plasmática promoviendo la liberación de su contenido. b) El autofagosoma se puede unir directamente a la membrana plasmática, mediado por las proteínas SNAP23/29, STX3/4, liberando su contenido. c) Por otra parte, la evidencia sugiere que la inhibición de la autofagia puede inducir el incremento de mitocondrias dañadas, lo que deriva en un incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales pueden activar al inflamasoma; éste a su vez, puede inducir la maduración y secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18. Además, la evidencia también sugiere que las ERO pueden mediar la secreción del factor inhibidor de macrófagos (MIF). Tomado de [70].

5.1.6 Secreción mediada por autofagia en cáncer de mama

En células tumorales el proceso de autofagia juega un papel importante en la resistencia a estrés, pero también se ha descrito que media la secreción de proteínas a través de una vía no clásica. La secreción mediada por autofagia demostró tener un papel importante en la invasión celular en un modelo de células transformadas con RAS, donde se observó que la autofagia es indispensable para la secreción de la citocina proinflamatoria IL-6, así como de la metaloproteasa de matriz extracelular (MMP) de tipo 2 [75].

En 2015 Maycotte y cols. [64] describieron que la inhibición genética de la autofagia en la línea MCF7 RE+ induce cambios en la expresión de genes relacionados a la secreción de citocinas y de genes vinculados a la transición epitelio mesenquimal (TEM) [64]. De forma importante se encontró que la inhibición de la autofagia en la línea MCF7 (RE+) induce la secreción de la interleucina proinflamatoria IL-6 mientras que ésta disminuye en la

línea MDAMB468 (TN). Por lo tanto, el incremento de la secreción de IL-6 en la línea MCF7 (RE+) así como la disminución de la secreción en la línea MDAMB468 pone de manifiesto que los efectos de la inhibición de la autofagia son dependientes del tipo celular [64]. Cabe recalcar que tanto el tratamiento como la expresión ectópica de IL-6 en células epiteliales (RE+) incrementa la proliferación, promueve el fenotipo TEM (íntimamente relacionado con el proceso de metástasis), así como el fenotipo relacionado a células iniciadoras de tumores, la angiogénesis y la resistencia terapéutica [76-79]. Además, Cotzomi y cols. [80] describieron que la inhibición genética de la autofagia en líneas murinas TN de CM induce la secreción de la citocina proinflamatoria MIF, la cual tiene un importante efecto autócrino para la supervivencia celular. En este mismo modelo el tratamiento farmacológico con CQ indujo la secreción de MCP1 e IL-6 [80].

5.1.7 MIF y cáncer

El estudio de la citocina proinflamatoria MIF resulta de gran interés, ya que es una proteína con funciones biológicas únicas. De forma interesante, en 1960 se describió como un factor secretado abundantemente por células T y cuya función era inhibir la migración aleatoria de macrófagos [81]. Sin embargo, no fue hasta años más tarde que se describió que esta citocina es capaz de inducir la activación de macrófagos, la proliferación de células T, además de poseer una actividad proinflamatoria al actuar como un antagonista de los glucocorticoides [82]. La desregulación de esta citocina se ha relacionado con enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide [83], lupus eritematoso sistémico [84], choque séptico [85] y la enfermedad de Crohn [86]. En cáncer se ha observado que los niveles séricos elevados de MIF en suero se asocian con un mal pronóstico en pacientes de cáncer de mama [87], colorrectal [88], pulmón [89] y melanoma [90].

MIF es una proteína pleiotrópica y en cáncer se ha asociado a funciones relacionadas a la angiogénesis [91], la inflamación [82], regulación de la inmunidad [87, 92], modulador de la proliferación y de la apoptosis [92, 93], así como inducción de la TEM [93-95]. MIF es secretada por células del sistema inmune, células endoteliales y epiteliales [87], en las cuales posee una expresión constitutiva [87]. Sin embargo, se almacena en vesículas y es liberada a través de la vía secretoria no convencional, mediada por la proteína p115 asociada a Golgi [87, 96], así como por transportadores ABC [97]. En 2016 Lee y cols. [73] describieron que la inhibición de la autofagia en macrófagos tratados con lipopolisacárido induce la secreción

de MIF, la cual es dependiente de ERO. Recientemente Cotzomi y cols. [72] describieron que el promotor de MIF contiene sitios de unión a factores de transcripción (TF) como NF- κ B, HIF1 α , BACH1, Fos, Ahr, CREB y E2F1, los cuales pueden activarse por ERO.

MIF ejerce su acción proliferativa y antiapoptótica a través de su unión en forma de homotrímero con su receptor CD74, después se recluta a la proteína coactivadora CD44 y se activan las vías ERK1/2 y PI3K/AKT [98]; con lo que se induce la proliferación celular, la síntesis de citocinas proinflamatorias, la migración celular y se inhibe la apoptosis [98]. Por otro lado, MIF ejerce un papel de quimioataxis a través de los receptores CXCR2, CXCR4 y CXCR7 [99], y aunque no es su ligando canónico sí puede unirse a ellos y mediar la migración celular de fibroblastos, leucocitos y células tumorales, por lo que tiene un papel muy importante en la modulación del microambiente tumoral [98, 99]. En este tenor, se ha descrito que MIF induce la activación de NF- κ B induciendo la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1, TNF- α , IL-18 [98, 100]. En un modelo de ratón, la inhibición tumoral de MIF no sólo redujo el crecimiento tumoral, sino también los focos secundarios tumorales, acompañándose de una disminución de células mieloides supresoras circulantes y se incrementaron las células T infiltrantes [101], poniendo de manifiesto la importancia de MIF en la progresión tumoral y en la regulación de la respuesta inmune antitumoral.

5.1.8 Transición epitelio mesenquimal en cáncer

La causa más frecuente por la que el cáncer induce muerte es la metástasis [102]. La metástasis es un proceso diseminatorio en el cual las células de tumores primarios adquieren la habilidad de romper la membrana basal, extravasar, intravasarse y colonizar, promoviendo la formación de focos secundarios [103]. Esta secuencia de eventos está mediada por la activación del programa TEM. La TEM es un programa altamente conservado en eucariotas superiores y es un proceso esencial en la embriogénesis y la reparación de heridas [104]. Sin embargo, las células tumorales pueden tomar ventaja de este programa, en el cual las células epiteliales pierden características como la adhesión célula-célula (pérdida de proteínas de adhesión como E-cadherina, laminina) y polaridad, al mismo tiempo que adquieren características mesenquimales caracterizado por la expresión de proteínas mesenquimales (vimentina, N-cadherina, fibronectina), forma de huso o mesenquimal, invasividad, características troncales, resistencia a la terapia, resistencia a la anoikis y evasión del sistema inmune [105-107].

La TEM puede inducirse por varios ligandos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), proteínas morfogénicas de hueso (BMPs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la vías Wnt, Notch, así como por citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-23, IL-17 [103]; los cuales activan a FT relacionados a la TEM (FT-TEM). Existen cuatro familias principales de FT-TEM: SNAIL (SNAIL y SLUG), FT de tipo hélice-asa-hélice (TWIST1/2, E2, E47), FT de tipo dedos de zinc con unión a cajas E (ZEB1/2) y, Pit-Oct-Unc (OCT4A, OCT4B-190, OCT4b-265) [106, 108]. Estas familias de FT poseen diferentes patrones de expresión y operan de forma coordinada para dismantelar el fenotipo epitelial e inducir y mantener el fenotipo mesenquimal [106]; su expresión en conjunto se asocia con un mal pronóstico en los pacientes [106, 109-112].

La familia SNAIL se describió en *Drosophila melanogaster* (*Dm*) como un FT esencial para la formación del mesodermo [113]; después se demostró que se encuentra altamente conservado en eucariotas superiores [114]. Se ha descrito que SNAIL puede interactuar con diferentes complejos corepresores como desacetilasas de histonas (HDAC1/2), el complejo represor polycomb (PRC2) o metiltransferasas (PRMT50), regulando de forma negativa la transcripción de proteínas epiteliales tales como E-cadherina y ocludina [114]. Se ha demostrado que la línea MDAMB231 TN de CM requiere de la expresión de FT de la familia SNAIL para el establecimiento de metástasis en nódulos linfáticos [115]. También se ha observado que la expresión de la familia SNAIL (SNAIL/SLUG) promueve la resistencia a la muerte celular y al daño al DNA causado por doxorubicina y promueve el incremento de la capacidad migratoria [116]. En células de cáncer ovárico SNAIL y SLUG median la supervivencia celular e inducen la adquisición de características troncales a través de la inducción de otros FT asociados a pluripotencia y TEM como: OCT, BMI1, NANOG, HDAC1/3, GPC3, TCF4, BMI1 y NESTINA, los cuales promueven la adquisición de marcadores troncales [117]. También, la expresión aberrante de esta familia de FT se ha asociado a un mal pronóstico en pacientes y a un incremento en la incidencia de metástasis [109, 110, 112, 114, 118-122]. Cabe destacar que las modificaciones postraduccionales regulan la estabilidad de estos FT y las mismas vías de inducción pueden estabilizarlos, por ejemplo ERK2 puede inducir la transcripción de SNAIL/SLUG y una vez expresados, los fosforila, induciendo su acumulación nuclear, incrementando su tiempo de vida y disminuyendo su degradación [123].

La familia TWIST también fue descrita en *Dm* donde se encontró que era esencial para el proceso de gastrulación y la generación de las crestas neurales, su delección indujo un fenotipo letal en este organismo [113, 124]. TWIST actúa en forma de homodímeros y heterodímeros para regular la unión a cajas E sobre el DNA y de esta forma regular la transcripción. Cabe destacar que TWIST ejerce una función de inductor mesenquimal más que de represor epitelial, en contraste a SNAIL [125]. TWIST se estabiliza a través de diferentes modificaciones postraduccionales, entre ellas se fosforila por ERK2, lo que induce su estabilidad y acumulación en el núcleo [126]. Otros reguladores de la TEM también incluyen a los microRNAs, lncRNAs y bien *splicing* alternativo [106].

Adicionalmente a los inductores de TEM descritos, también se encuentran las ERO. Las ERO son moléculas reactivas de oxígeno así como radicales libres formados por la reducción parcial de oxígeno molecular [127]. Son segundos mensajeros importantes para la señalización celular [128], ya que poseen la capacidad de oxidar proteínas con grupos tioles en residuos de cisteína, lo cual puede activarlas o inactivarlas [127, 129, 130]. En cáncer se ha descrito que pueden modular la proliferación, migración, TEM [130, 131] y troncalidad [130] a través de la activación de NF- κ B, HIF1 α y TGF- β [130-132] y la posterior producción de citocinas proinflamatorias [133], además promueven la sobrevivencia celular a través de NRF2 [134].

Hasta hace unos años se consideraba que la TEM era un proceso binario, es decir que sólo habían dos estados: epitelial y mesenquimal. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de diferentes fenotipos: TEM completa o total y TEM parcial o híbrida. En modelos de ratón, se ha observado que la TEM híbrida ayuda a las células cancerígenas a diseminarse en forma grupal, mientras que las células con una transición completamente mesenquimal migran como células individuales [135, 136]. El fenotipo híbrido se ha encontrado en células circulantes de tumores (CTC) de pacientes con carcinoma escamoso de esofago [137], cáncer de mama invasivo [138], carcinoma hepatocelular [139] y se ha correlacionado con una alta invasión y una mala respuesta clínica.

5.2 Planteamiento del problema

Se ha reportado que la inhibición de la autofagia en líneas de cáncer de mama RE+ regula de forma positiva la secreción de citocinas proinflamatorias: IL-6 [64] y MIF [80]. Dichas citocinas podrían inducir cambios en la expresión génica de programas como la TEM, lo que induciría un fenotipo de malignidad [25, 64]. Además, existen estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama tipo RE+ en los que se evalúa la inhibición de la autofagia con CQ [140], por lo que este enfoque terapéutico puede no ser el adecuado para este tipo de cáncer de mama, siendo de suma importancia definir el papel de la inhibición de la autofagia en cáncer RE+ para proponer terapias efectivas y específicas basadas en la modulación de la autofagia.

5.3 Hipótesis

La inhibición de la autofagia induce la secreción de citocinas proinflamatorias en líneas celulares RE+ (MCF7 y T47D) de cáncer de mama y de forma autócrina promueve TEM.

5.4 Objetivos

5.4.1 Objetivo general

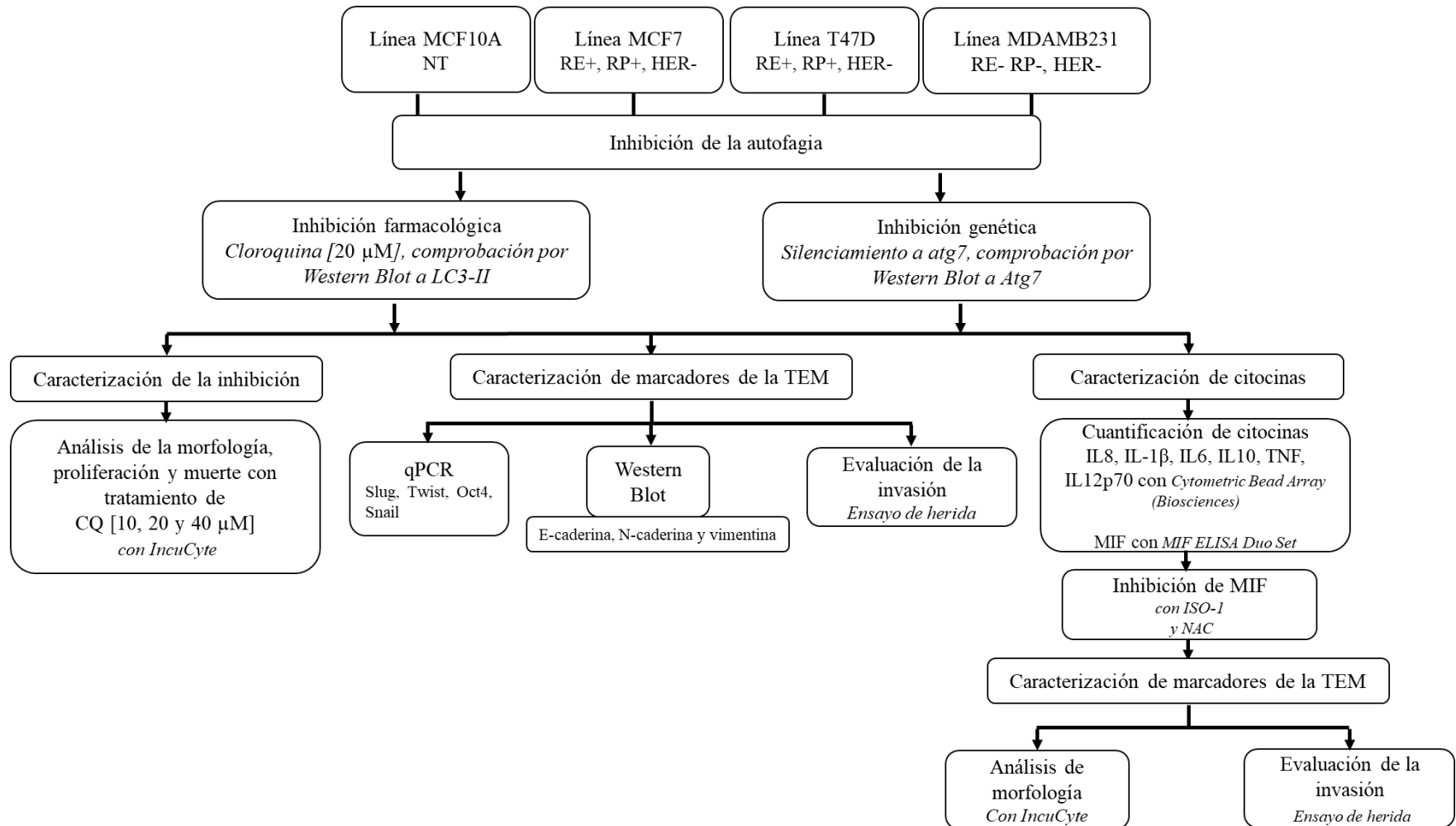
Evaluar la secreción de citocinas proinflamatorias mediada por la inhibición de la autofagia y su rol en la inducción de TEM en células RE+ de cáncer de mama

5.4.2 Objetivos particulares

- 1) Caracterizar marcadores de TEM en células de cáncer de mama con autofagia inhibida
- 2) Evaluar la secreción de citocinas mediada por la inhibición de la autofagia
- 3) Inhibir la señalización de las citocinas y analizar los marcadores de TEM

6 Capítulo II: Metodología

6.1 Diagrama de trabajo



6.2 Reactivos

Difosfato de cloroquina C6628, Sigma, MO, USA), dihidroetidio (DHE, 37291, Sigma, MO, USA), ISO-1 (4288, TOCRIS, BS, UK), N-acetilcisteína (A7250, Sigma, MO, USA), puromicina (P8833, Sigma, MO, USA)

6.3 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular MCF10A como control no tumorigénico (NT) y se cultivó en medio DMEM/F12 suplementado con suero de caballo al 5%, insulina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EGF 20 ng/mL , toxina colérica 100 ng/mL , hidrocortisona 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antibiótico (P5L01, Caisson) 1%; su uso permite el estudio de las funciones normales de las células de mama [141].

Para confirmar que el efecto observado era debido al tipo histológico RE+ y no por un artificio de una línea celular en particular se emplearon dos líneas de cáncer de mama. Se usó la línea MCF7 (RE+) (cultivada en medio MEM Eagle, 10% suero fetal bovino, insulina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antibiótico 1%) y la línea T47D (cultivada en medio RPMI, insulina 0.2 U/mL, suero fetal bovino 10%, antibiótico 1%). Las cuales poseen una morfología diferenciada de tipo epitelial, forman grupos de colonias y tienen una tendencia migratoria baja [142].

Se usó la línea TN de cáncer de mama, MDAMB231 (cuyo medio fue DMEM F12 Ham, suero fetal bovino 10%, antibiótico 1%). Esta línea regula positivamente genes relacionados a la invasión tumorigénica y posee un fenotipo mesenquimal.

Las líneas celulares no se utilizaron por más de 6 meses después de su descongelamiento y se cultivaron a 37 °C bajo una atmósfera humificada con aire al 95% y CO₂ al 5%.

6.4 Análisis de expresión de genes

Se analizó el transcriptoma de las líneas celulares MCF7 (RE+) y MDAMB468 (TN) que tenían silenciado el gen relacionado a la autofagia 7 (*ATG7* KD), estos datos fueron obtenidos de los datos suplementarios de [64]. Se analizaron en Reactoma [143] los genes expresados diferencialmente con una tasa de cambio de ± 1.5 entre los grupos *ATG7* KD y el control no silenciante, esto con la finalidad de identificar los programas génicos con mayor probabilidad de ser afectados con la inhibición genética de la autofagia. Las gráficas muestran las 25 vías más afectadas ($p < 0.02$) para la línea MCF7 y para la línea MDAMB468 ($p < 0.01$). Para

determinar cuáles genes eran los más afectados por la inhibición genética de la autofagia, se graficaron aquellos que mostraron una tasa de cambio de ± 2.5 . Las gráficas se realizaron utilizando el programa informático R Studio Desktop.

6.5 Transducción lentiviral con shRNAs

Para la inhibición genética de la autofagia se utilizó un sistema lentiviral con vectores de tipo shRNA pLKO.1. Para la producción lentiviral se transfectaron 1.8×10^6 células de tipo LentiX-293T (NC983969, Clontech, USA). Las cuales fueron transfectadas con el reactivo de transfección TransIT-LT1 (Mirus MIR2300), se utilizaron plásmidos empaquetadores (0.2 μg del plásmido pVSV-G, 1.8 μg del plásmido pRSV y 1.8 μg del plásmido pRRE) y se adicionaron 2 μg de plásmido pLKO (ya sea que contuviera la secuencia no silenciante, NS o *ATG7* TRCN0000007587). El medio lentiviral fue recolectado a las 24 y 48 h, después se agregaron 0.8 $\mu\text{l/mL}$ de polybrene (hexadimetridine bromide, 107690, Sigma MO, USA) y se almacenó a -80°C . Antes de la transducción, se incubaron 125 000 células MCF7 (RE+) durante una hora con polybrene [0.8 $\mu\text{L/mL}$], después se agregó 1 mL del medio con virus. Un día después, para seleccionar las células trasducidas se agregó puromicina [0.5 $\mu\text{g/mL}$], luego se cambió a una concentración más baja [0.3 $\mu\text{g/mL}$] para permitir que las células proliferasen. Todos los experimentos correspondientes a los silenciamientos sólo se realizaron con células en 1 pase, debido a que con el paso del tiempo las células pierden el silenciamiento del shRNA.

6.6 Análisis de proliferación y muerte celular

Se sembraron 3000-4000 células de cada línea celular por cada condición (por triplicado) en una placa de 96 pozos. Una vez adheridas, las células se trataron con diferentes concentraciones de CQ [10, 20, 40 μM] y se monitoreó la proliferación a través de microscopía en tiempo real con el sistema IncuCyte Zoom durante 48 h. Se cuantificó la muerte celular a las 24 y 48 h de tratamiento tiñendo las células con ioduro de propidio (IP) [2.5 $\mu\text{g/mL}$]. La muerte celular se expresó como % de confluencia roja (positiva a IP)/ % de confluencia total.

6.7 Western Blot

Después de los tratamientos indicados, las células se lavaron con PBS estéril frío y luego se agregó buffer RIPA con un coctel inhibidor de proteasas (Complete 11697498001, Roche, MA, DE) y cuando se analizaron proteínas fosforiladas se agregó un coctel inhibidor de fosfatasas (Roche, 04906845001). Ya que las líneas celulares utilizadas son adherentes se rasparon y se lisaron por sonicación. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford. Para la detección de las proteínas LC3I/II, ERK fosforilada/total y Atg7, se cargaron 30 μ g de proteína por cada muestra y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12%. Para detectar las proteínas E-cadherina, vimentina y N-cadherina, se cargaron 60 μ g de proteína por cada muestra y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 8%. Se utilizó beta-actina como control de carga. Se monitoreó el peso molecular a través del uso de una escalera de proteínas pre- teñida de 10-180 kDa (26616, Thermo Fisher, IL, USA). Después se realizó una transferencia semihúmeda (15V durante 50 min) a una membrana de difluoruro de polivinilideno (0.45 μ m, IPVH00010, Merc Millipore). Las membranas se bloquearon con TBST-leche al 5% durante 1 h a temperatura ambiente, luego se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios a 4 °C en agitación durante toda la noche. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-LC3 (Novus, Biologicals, NB100-2220), anti-Atg7 (Cell Signaling, 2631), anti-ERK total (Cell Signaling, 4695), anti-ERK fosforilado (Cell Signaling, 4370), anti-E-cadherina (Cell Signaling, 14472), anti-N-cadherina (Cell Signaling, 13116), anti-Vimentina (Cell Signaling, 5741) o anti- actina (Sigma, A5441). Se emplearon anticuerpos secundarios acoplados a HRP: anti- conejo IgG (7074, 1:3000 Cell Signaling) y anti- ratón IgG (A2304, 1:20000, Sigma). Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia (WBKLS0500, Millipore) y se empleó el escáner C-Digit Blot (LICOR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Las bandas se analizaron por densitometría utilizando el software ImageJ.

6.8 Análisis morfológico de las células

Se utilizó el sistema IncuCyte Zoom (Essen Biosciences) de microscopía en tiempo real para monitorear la proliferación y la morfología. Todas las líneas celulares fueron tratadas con CQ [10, 20 y 40 μ M] durante 48 h. Se utilizaron las fotografías del tiempo final de observación (48 h) para analizar la morfología celular. Las células que expresaban los shARNs NS y *ATG7* se cultivaron durante 72 h. Se analizaron de forma individual células de

3 campos diferentes por pozo de tres experimentos independientes. Se midió el eje mayor y el eje menor de cada célula, utilizando ImageJ y después se procedió a calcular la proporción de ejes (eje mayor/eje menor).

Para analizar si la inhibición de MIF evitaba cambios en la morfología asociados a la TEM en la línea MCF7 y T47D (RE+), las células se cultivaron con CQ adicionando o no ISO-1 [50 μ M] o NAC [1mM] durante 72 h.

6.9 Cuantificación de citocinas proinflamatorias

Para determinar si la regulación del fenotipo TEM era por la secreción de factores solubles se evaluó un panel de citocinas proinflamatorias: IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF- α , IL-12p70. Para ello se utilizó el kit BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (Catálogo 551811), el cual permitió la detección simultánea de las citocinas antes mencionadas, por citometría de flujo. Se cultivaron 100 000 células de la línea MCF7 RE+ en una placa de 12 pozos, se trataron con \pm CQ [20 μ M], se recolectó el medio después de 24 h de tratamiento y se utilizó acorde a las instrucciones del fabricante. Se analizaron las muestras en un citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences).

6.10 Cuantificación de MIF

Para analizar la secreción de MIF o su modulación por CQ/ROS, se cultivaron 100 000 de cada línea celular en una placa de 12 pozos. Se trataron con \pm CQ [10, 20 y 40 μ M] o \pm NAC [1 mM]. Se recolectó el medio después de 24 h de tratamiento, se clarificó por centrifugación, se almacenó a -20 °C y sólo se descongeló una vez para el análisis de MIF. Las células se lisaron con RIPA para después cuantificar las proteínas totales por el método de Bradford. El MIF secretado en el medio de cultivo se cuantificó con el kit DuoSet ELISA Human MIF (DY289, R&D Systems, MN, USA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La secreción de MIF fue normalizada contra las proteínas totales (pg/ μ g). Para comparar la secreción de MIF en células MCF7 +/- CQ [20 μ M] y células ATG7 KD y NS, se sembraron 45 000 células (en una placa de 12 pozos y se evaluó la secreción de MIF después de 72 h en el medio de cultivo.

6.11 Cuantificación de ERO

6.11.1 Microscopía de fluorescencia

Se cuantificaron las ERO por microscopía de fluorescencia, para lo cual se sembraron 100 000 células de cada línea celular en placas de 12 pozos, una vez adheridas se trataron con CQ [20 μ M] durante 24 h, luego se incubaron 30 min, alejadas de la luz solar, con sus respectivos medios con suero y DHE [10 μ M]. Después, se hicieron 2 lavados con PBS durante 30 s cada uno, luego se procedió a fijar con formalina durante 10 min y se realizó un último lavado con PBS durante 30 s. Los núcleos se tiñeron con Hoescht [10 μ M] durante 15 min, las células se lavaron con PBS durante 30 s y se agregó 1 mL de PBS. Las muestras se protegieron de la luz, se analizaron y fotografiaron con el microscopio Zeiss Axio Vert.

6.11.2 Citometría de flujo

Se cuantificaron las ERO a través de citometría de flujo. Se sembraron 100 000 células en placas de 6 pozos y se incubaron con \pm CQ [20 μ M], \pm NAC [1 mM] o ambos tratamientos durante 24 h. Después se tiñeron con dihidroetidio (DHE) durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Las células se lavaron en tres ocasiones, se tripsinizaron y luego se resuspendieron en PBS con 3% SFB. De forma inmediata, las células se analizaron con un citómetro de flujo tipo FACS Canto II. Los resultados se expresan como el porcentaje de la población ERO^{altas}. Los gates utilizados para determinar las poblaciones altas y bajas en DHE se muestran en la **Fig 4**.

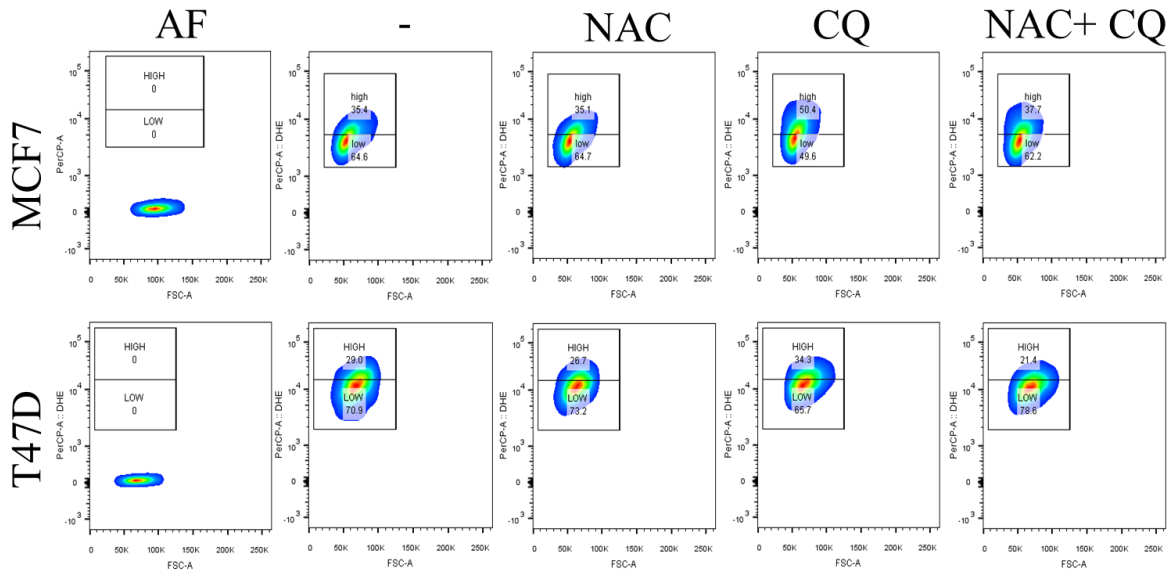


Figura 4. Gates utilizados para el análisis de poblaciones ERO^{altas} y ERO^{bajas} . Se trataron células MCF7 y T47D RE+ con CQ [20 μ M] durante 24 h, se tiñeron con DHE y se analizaron en un citómetro FACS Canto II.

6.12 Cierre de herida

Todas las heridas se realizaron con el Essen Bioscience Wound Maker. Se monitoreó la migración y se tomaron las fotografías correspondientes a las 24 h con un microscopio EVOS (Thermo Fisher Scientific). El cierre de herida se evaluó con el software ImageJ. Para determinar si la CQ inducía migración se sembraron 60 000 células MCF7 (RE+) en placas de 96 pozos, se realizaron las heridas correspondientes y se agregó medio \pm CQ [20 μ M]. De forma adicional, se pretrataron células MCF7 (RE+) durante 72 h con CQ [20 μ M] para inducir cambios morfológicos y la disminución de E-cadherina, es decir que ya tuviesen inducida la TEM. Las células se tripsinizaron y se sembraron 60 000 células en placas de 96 pozos para realizar el ensayo de herida. Se agregaron 100 μ L de medio de cultivo \pm CQ [20 μ M], estos grupos fueron denominados como pretratamiento (CQ pre 72 h).

La capacidad migratoria también se evaluó en células MCF7 (RE+) ATG7 KD y NS, después de que las células se transdujeron y alcanzaron un 80-90 % de confluencia, se tripsinizaron y sembraron 60 000 células de cada condición en placas de 96 pozos y se procedió a realizar el ensayo de herida bajo las condiciones descritas en el párrafo anterior.

Para determinar si la migración se regulaba por factores solubles se utilizó medio condicionado (MC) de células MCF7 (RE+) cultivadas con o sin CQ [20 μ M] durante 72 h. Se agregó MC y/o el MC-CQ (con CQ) a células MCF7 (RE+) con herida y se analizó su

migración durante 72 h. Para confirmar que se inducía migración en el subtipo histopatológico RE+, también se realizó un pretratamiento de 72 h con CQ [20 μ M] en la línea celular T47D.

Para analizar el papel de MIF sobre la migración en células MCF7 (RE+) tratadas con CQ, se realizaron 2 tratamientos. En uno, se agregó NAC [1 mM] en conjunto con CQ, para inhibir la secreción de MIF mediada por ROS durante 72 h y por lo tanto el MC tuviese una disminución en MIF secretado. El segundo enfoque fue agregar un inhibidor específico de MIF, ISO-1 [50 μ M], el cual se adicionó al MC después de su recolección. En ambos casos el MC se adicionó a células MCF7 con herida y se analizó la migración a las 24 h.

6.13 qPCR

Para determinar el rango dinámico de amplificación se utilizaron diferentes concentraciones de cDNA [100, 20, 4 y 0.8 ng] de la línea MDAMB231. Se eligió esta línea como control positivo ya que es una línea TN mesenquimal y expresa los FT-TEM de interés. Se extrajo el RNA total con el kit NucleoSpin RNA, Mini Kit (MACHEREY-NAGEL). Se trataron 2 μ g de RNA total con el kit DNasa I (libre de RNAsa) (Thermo Fisher). Se sintetizó DNA de cadena sencilla (DNAc) utilizando primers, oligo dT y el kit RevertAid RT Reverse Transcription (ThermoFisher). Para la detección en tiempo real se utilizó SYBR Green PCR master mix. Se usó un termociclador de 48 pozos StepOne Applied Biosystems, con las siguientes condiciones de reacción: 95 ° durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 seg, 65 °C 60 seg. Además, se realizó una curva de melting para determinar la especificidad de cada primer, encontrando un solo pico, lo cual indicó que sólo se amplificaba un producto. Con los ciclos umbral (Ct), se realizó el cálculo de las curvas estándar y la eficiencia de la reacción. Se utilizó el gen HPRT como gen de referencia y se utilizaron los primers de la **Tabla 1** para la amplificación de los transcritos de interés.

Se sembraron células MCF7 en una caja T25, se trataron con y sin CQ [20 μ M] durante 72 h. Se extrajo el ARN total, se trató con DNAsa y se sintetizó ADNc con las condiciones antes descritas. Para la amplificación y detección de los transcritos se utilizaron 20 ng de cDNA.

Tabla 1. Secuencias y características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación en qPCR.

Nombre	Secuencia	Longitud	GC %	TM (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
Snail [118]	Sentido 5' CACTATGCCGCGCTCTTC 3'	18	61.1	58.69	113
	Antisentido 5' GGTCGTAGGGCTGCTGGAA 3'	19	63.2	61.66	
Slug [118]	Sentido 5' TGGTTGCTTCAAGGACACAT 3'	20	45	57.64	66
	Antisentido 5' GTTGCAGTGAGGGCAAGAA 3'	19	52.6	58.28	
Twist [144]	Sentido 5' CCACTGAAAGGAAAGGCATC 3'	20	50	56.69	122
	Antisentido 5' CTATGGTTTTGCAGGCCAGT 3'	20	50	58.45	
Oct4 [118]	Sentido 5' AGAGGCAACCTGGAGAATTT 3'	20	45	56.72	120
	Antisentido 5' CCGGTTACAGAACCACACTC 3'	20	55	58.21	
HPRT	Sentido 5' CCTGGCGTCGTGATTAGTGATGAT 3'	24	50.0	58.8	137
	Antisentido 5' CGAGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC 3'	23	56.5	59.7	

6.14 Análisis estadístico

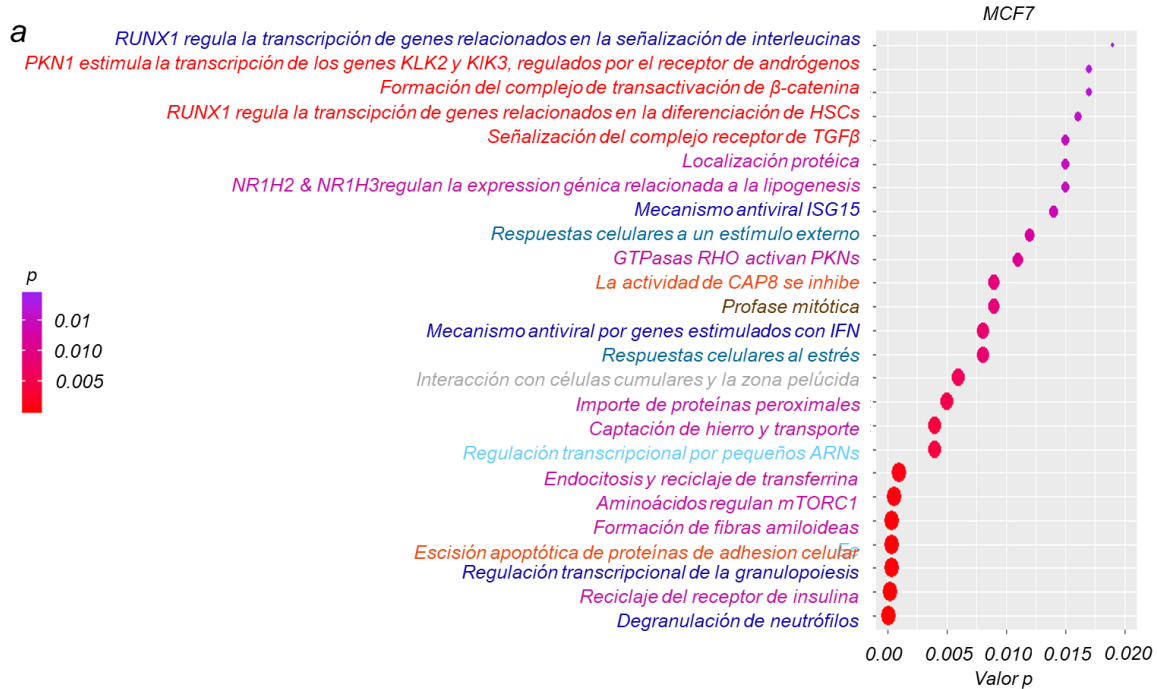
Las gráficas (a menos que se especifique lo contrario) y los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism 5. Las gráficas muestran el promedio \pm la desviación estándar (DE) de al menos tres experimentos independientes. Para comparar dos grupos, se realizó una t de Student. Para comparar 3 o más grupos, se realizó una ANOVA de una vía con un post- test Dunnett (para hacer comparar entre un grupo control) o un post- test Bonferroni (para realizar comparaciones entre grupos).

7 Capítulo III: Resultados y discusión

7.1 Resultados

7.1.1 La inhibición de la autofagia muestra diferencias en el perfil transcripcional entre líneas celulares de CM RE+ y TN

Considerando que las líneas celulares RE+ y TN tienen una dependencia a la autofagia diferencial [25], se analizó el efecto de la inhibición genética de la autofagia con el transcriptoma de las líneas MCF7 RE+ y MDAMB468 TN [64]. En la **figura 5a** se muestran 25 vías biológicas reguladas positivamente por la inhibición de la autofagia de la línea celular MCF7 RE+; de las cuales 6 se relacionan a la secreción e inflamación (azul oscuro), 8 se asocian al metabolismo (rosa) y 4 se relacionan a la TEM (rojo). También se identificaron los genes con una tasa de cambio de ± 2.5 (**Figura 6**). Los genes regulados positivamente son *OPG*, que media la vascularización y cuya expresión se relaciona a una mayor agresividad tumoral [145]; *SI00A8*, que media la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL8 [146]; y *KRTAP3-1* que es una proteína de filamentos intermedios relacionada al mal pronóstico en pacientes [147]. Por otro lado, entre los genes regulados negativamente se encuentra el gen *U6* que regula el proceso de *splicing*, genes relacionados a la señalización de proteínas G (*GNGI3*) e inhibidores de metaloproteasas (*TIMP3*). Estos resultados sugieren que el patrón de expresión de genes de la línea MCF7 *ATG7* KD se relaciona con una posible activación de la TEM. Para el caso de la línea celular MDAMB468 TN (**Figura 5b**), de las 25 vías biológicas reguladas a la alza, 14 de ellas se relacionan a la regulación transcripcional.



Regulación transcripcional	Diferenciación celular	Ubiquitinación y degradación proteosomal
Reparación del ADN	Metabolismo	Otros
Señalización de estrés: MAPK, HIF, detoxificación de ROS, senescencia celular, respuesta de HSP90	Muerte celular	
Secreción e inflamación	Transición epitelio mesenquimal	
	Proliferación	

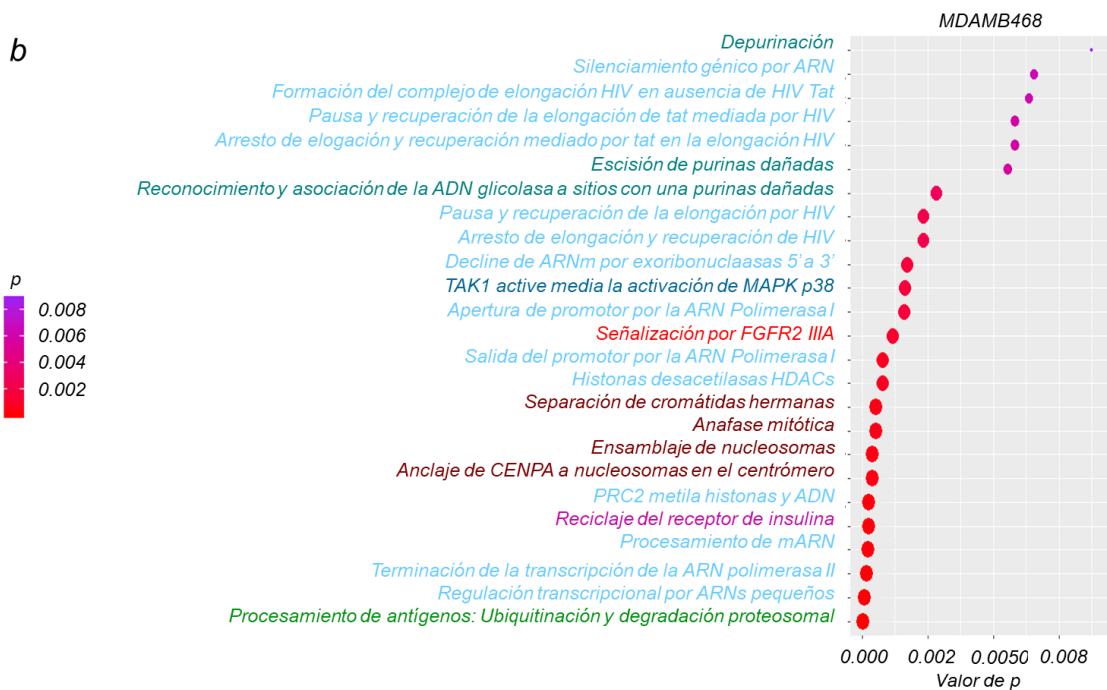


Figura 5. La inhibición de la autofagia regula positivamente vías relacionadas a la inflamación, secreción y TEM en la línea MCF7 RE+. a) Se analizaron genes diferencialmente expresados [64] en la línea MCF7 RE+ y b) MDAMB468 TN con inhibición genética de la autofagia, los cuales fueron analizados en Reactoma [143] y se graficaron en R.

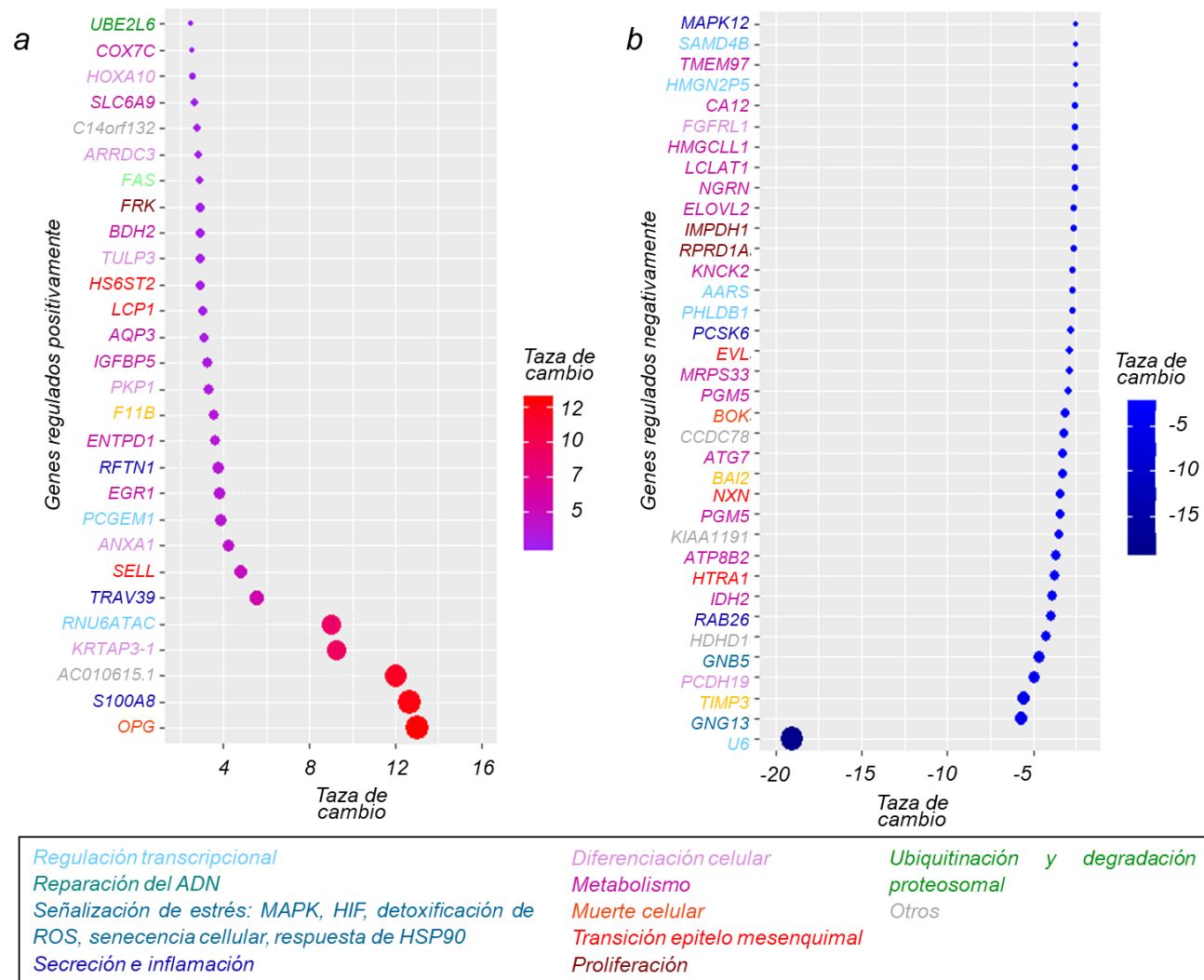


Figura 6. La inhibición de la autofagia regula positivamente genes relacionados a vascularización, secreción y de citoesqueleto en la línea MCF7. a) Genes con una tasa de cambio mayor a 2.5 y b) menor a 2.5 de la línea MCF7 RE+ A7. Gráfica realizada en R.

7.1.2 La inhibición de la autofagia induce una disminución en los niveles proteicos de E-cadherina, pero sólo el tratamiento con CQ induce un fenotipo TEM funcional

Los únicos fármacos clínicamente aprobados para la modulación de la autofagia son la CQ e HCQ, por lo cual fue importante dilucidar si el tratamiento con CQ tenía un impacto en líneas celulares de CM a través del tiempo. Utilizando microscopía en tiempo real se analizó la proliferación celular durante 48 h (**Figura 7a-d**), encontrándose que el tratamiento con CQ disminuyó la proliferación celular en todas las concentraciones y que no indujo muerte celular a excepción del tratamiento con la dosis más alta (40 μ M) y al tiempo más largo (48 h) (**Figura 8a, b**).

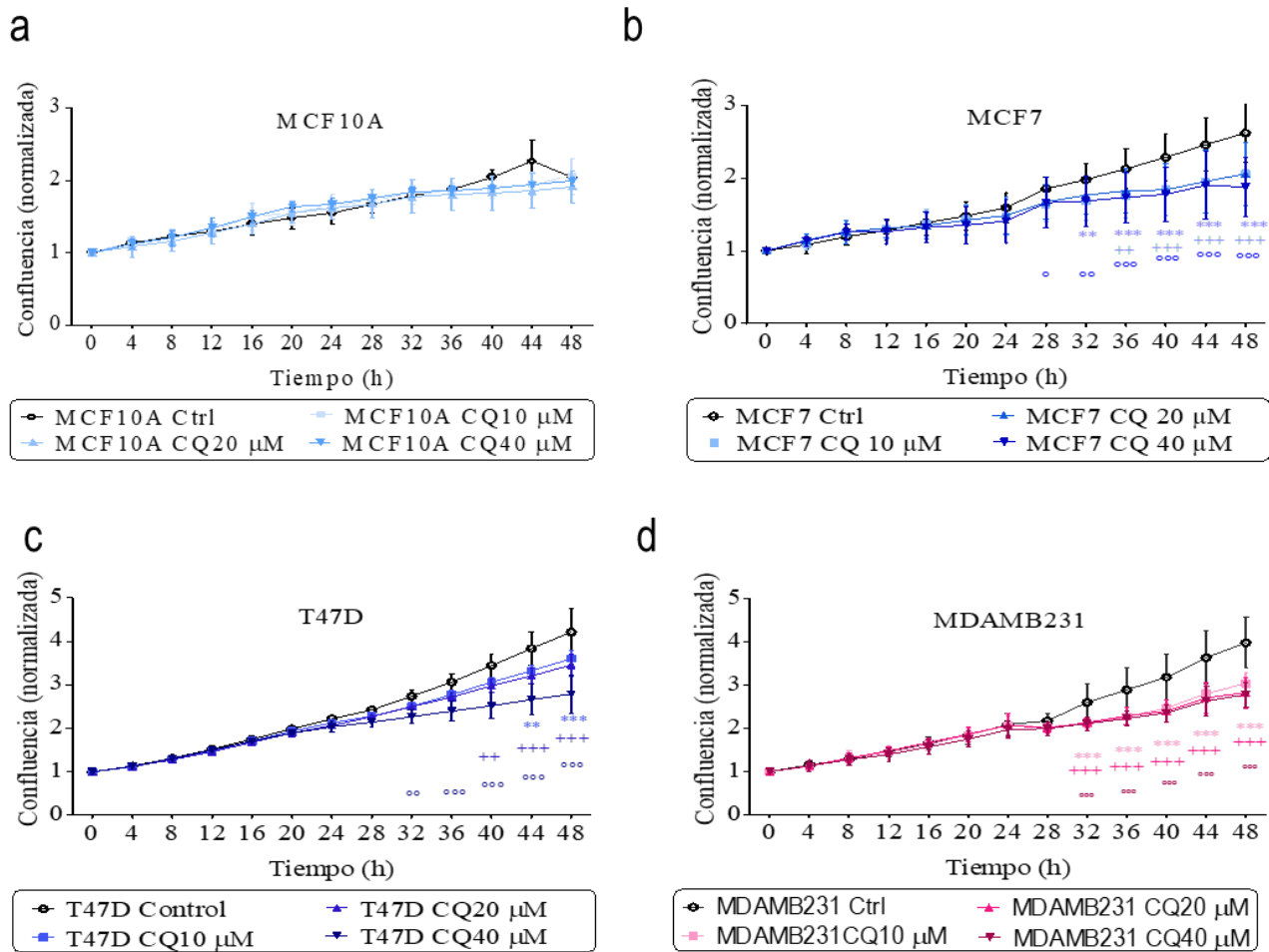


Figura 7. La inhibición de la autofagia disminuye la proliferación de líneas de CM. Se trataron células a) MCF10A NT, b) MCF7 RE+, c) T47D RE+ y d) MDAMB231 TN con CQ [10, 20 y 40 μ M], se monitoreó la morfología celular en tiempo real durante 48 h, utilizando microscopía en tiempo real con el sistema IncuCyte. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de dos vías, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

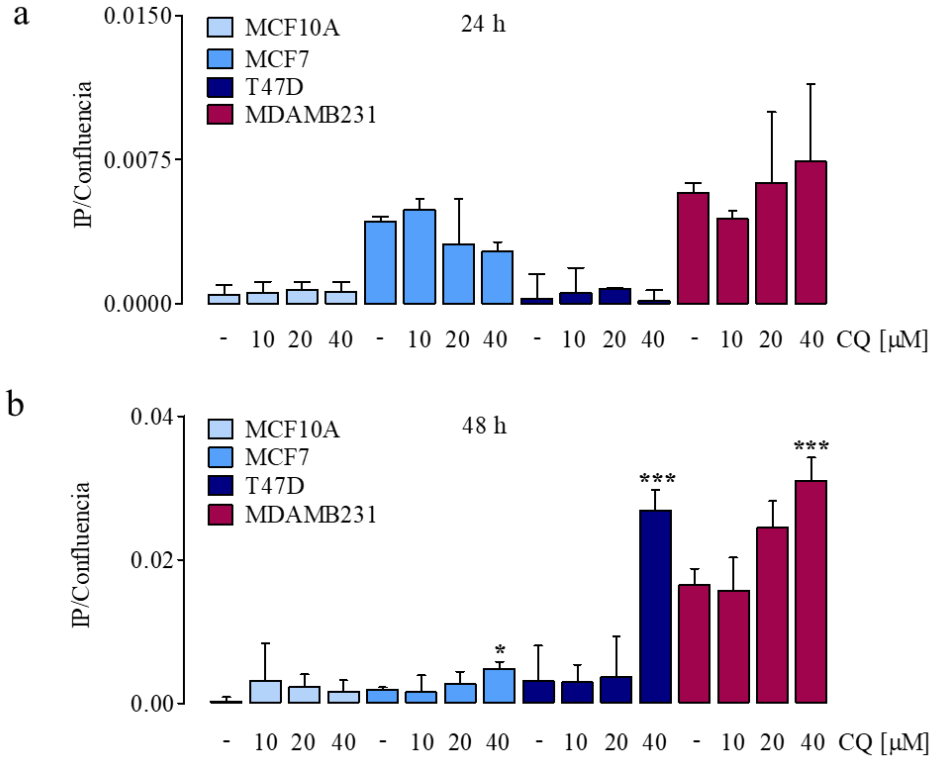


Figura 8. El tratamiento con CQ induce muerte celular en tiempos de cultivo prolongados y en la dosis más alta. a) Se trataron células MCF10A NT, MCF7 RE+, T47D RE+ y MDAMB231 TN con CQ [10, 20 y 40 μM] durante 24 y b) 48 h . Se cuantificó la muerte celular con una tinción de yoduro de propidio, la muerte celular se expresó como % de rojo (positivo a IP)/ % de confluencia. Las gráficas muestran el promedio ± DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía con un post test Tukey, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

Cabe destacar que las concentraciones de 20 y 40 μM de CQ, fueron eficaces para inhibir la autofagia, esto se determinó a través de la acumulación de LC3II (**Figura 9**). Con las observaciones anteriores se utilizó la concentración de 20 μM de CQ para tratamientos largos de 48, ya que inhibe la autofagia pero no induce muerte celular. Este último punto resulta importante, ya que en caso de inducir muerte celular se liberaría el contenido citoplasmático al medio de cultivo y al cuantificar la secreción de citocinas el resultado no estaría relacionado a la secreción sino al proceso de muerte celular, resultando en un falso positivo.

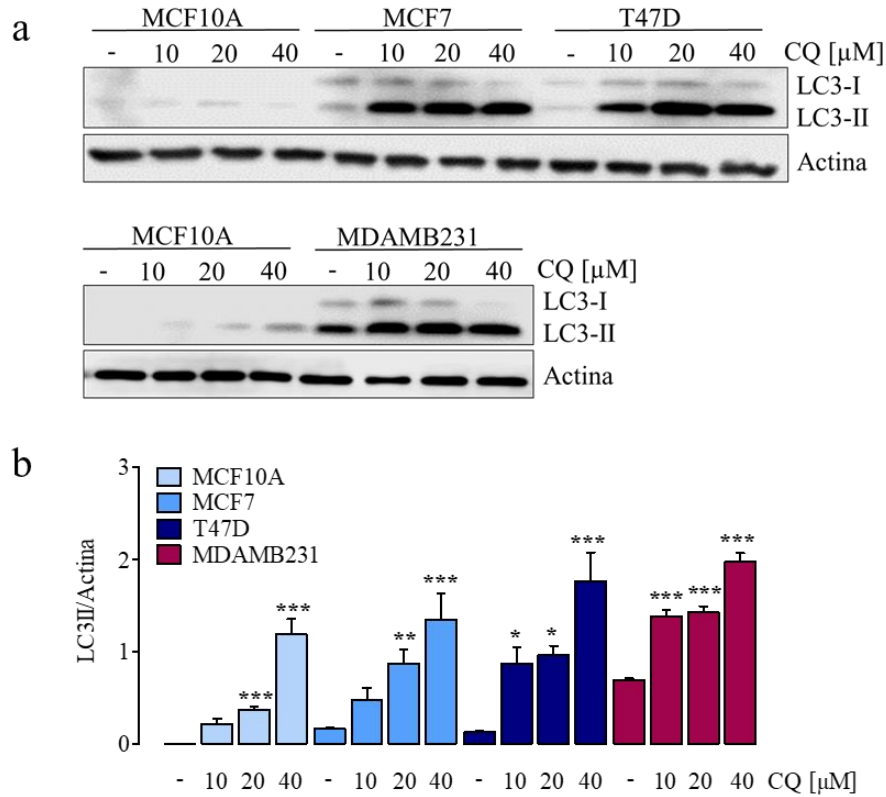


Figura 9. El tratamiento con CQ bloquea el flujo autofágico en las líneas de CM. a) Las líneas MCF10A (NT), MCF7 (RE+), T47D (RE+) y MDAMB231 (TN), se trataron con CQ [10, 20 y 40 μ M] durante 4 h, después se realizó un western blot contra la proteína LC3I/II. b) Utilizando Image J se cuantificó la intensidad relativa de las bandas (unidades de densidad óptica, UDP) Se observó que las líneas tumorales tenían un mayor flujo autofágico en comparación a la línea NT. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía con un post test Tukey, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

Con el fin de evaluar si el tratamiento con CQ inducía EMT, se analizó la morfología celular a las 48 h de tratamiento y se observó que las líneas MCF10A (NT) y MDAMB231 (TN) mantenían su morfología fibroblastoide característica (**Figura 10a**). Por otro lado, las líneas MCF7 y T47D (RE+) las cuales poseen una forma piramidal y tienen la capacidad de formar colonias, exhibieron forma de huso o mesenquimales a las 48 h de tratamiento, además de que se observó una menor cantidad de colonias. Se confirmó esta observación a través de un análisis cuantitativo, a través del cálculo de la relación de aspecto (eje mayor/ eje menor), el cual está directamente relacionado a la forma celular; es decir, indica si la célula es redonda, de tipo piramidal o mesenquimal (**Figura 10b**).

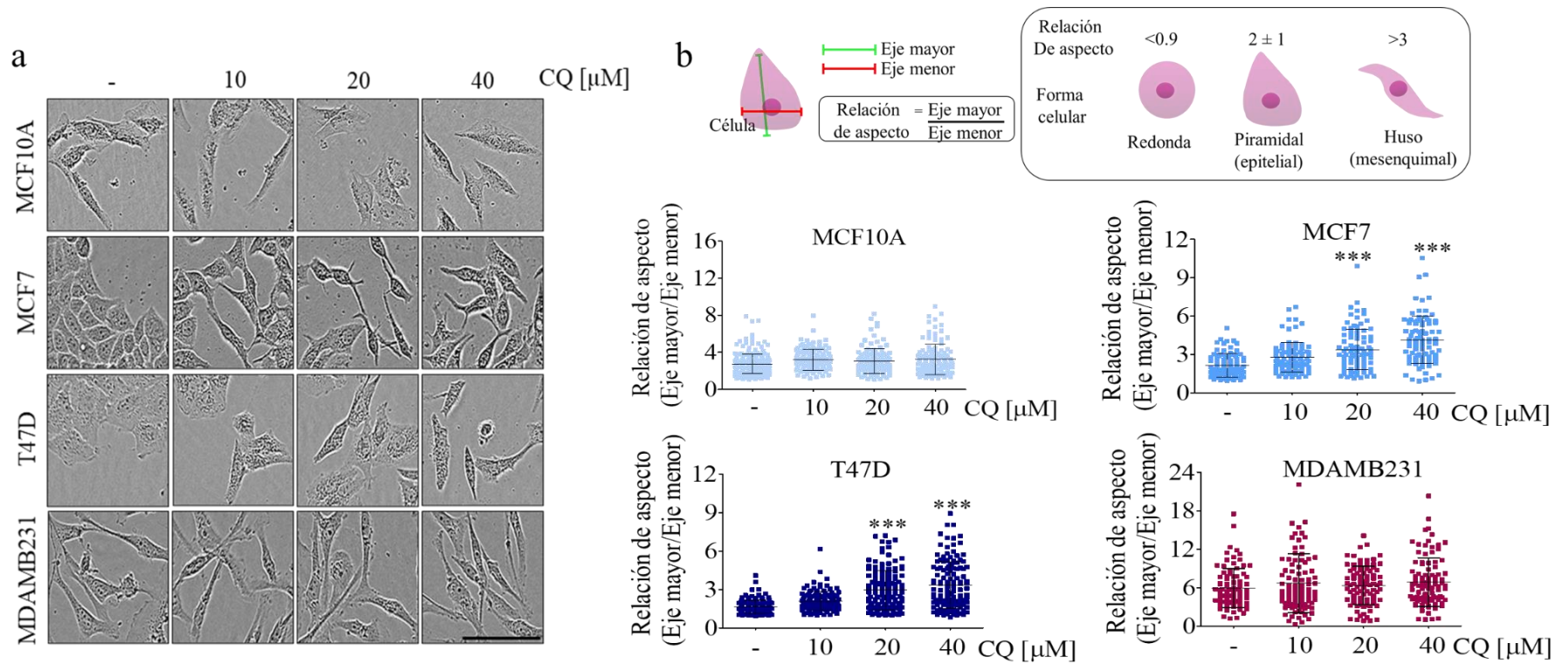


Figura 10. El tratamiento con CQ induce cambios morfológicos en las líneas RE+. a) Todas las líneas celulares se trataron con diferentes concentraciones de CQ [10, 20 y 40 μ M] durante 48 h, a través del sistema InCuCyte se evaluó la morfología celular. b) Utilizando ImageJ se cuantificó el eje mayor y el eje menor celular, se analizaron todas las células de 3 campos diferentes, se cuantificó la relación de aspecto y se graficó. Se observó que el tratamiento con CQ modifica la morfología de epitelial a mesenquimal de las líneas MCF7 y T47D, ambas RE+. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía con un post test Tukey, * = diferente al control, *** < 0.001, *p < 0.01.

Diversos reportes han descrito que la CQ puede ejercer diferentes efectos independientes de autofagia [148-150], por lo cual fue imprescindible determinar si el cambio de morfología se debía a la inhibición de la autofagia o era consecuencia del tratamiento con CQ. Realizar esta diferenciación es de suma importancia, ya que la CQ e HCQ son los únicos tratamientos en fase clínica y al implementar una nueva terapéutica es imprescindible que no induzcan efectos adversos como la TEM [27]. Con este objetivo, se inhibió genéticamente la autofagia en la línea MCF7 (RE+) a través de un silenciamiento con un shARN contra el gen *ATG7* (A7), se utilizó un shARN no silenciante (NS) como control y se confirmó la eficiencia de la inhibición mediante western blot (**Figura 11a**). Se monitoreó si la inhibición genética inducía cambios morfológicos (**Figura 11b**), encontrando que las células silenciadas tenían una población pequeña de células fibroblastoides, sin embargo la mayoría continuó con la morfología clásica y al realizar el análisis cuantitativo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ausencia de la expresión de *ATG7*.

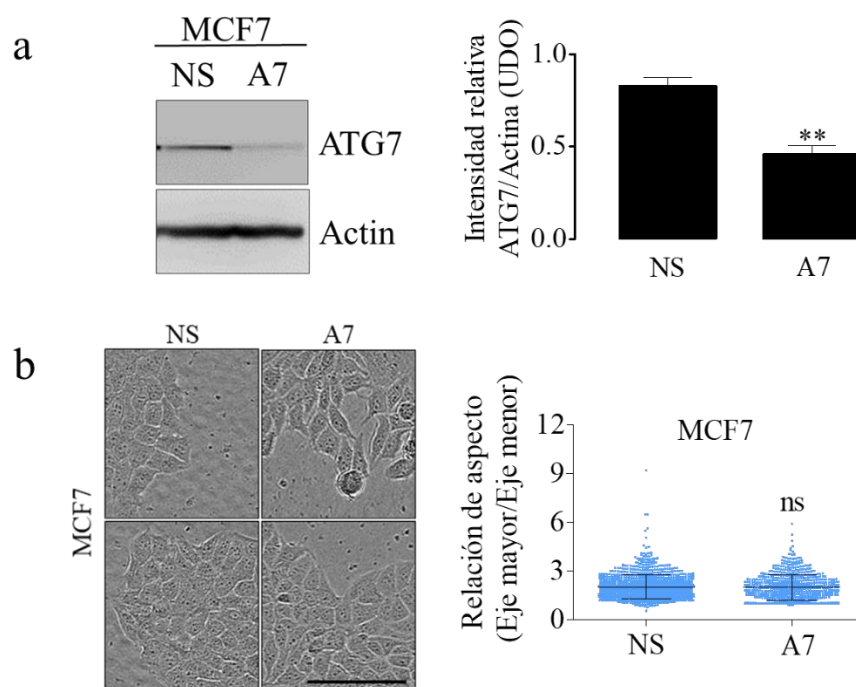


Figura 11. La inhibición de la autofagia no modifica la morfología de la línea MCF7 RE+. a) Se inhibió genéticamente la autofagia en la línea MCF7 y se evaluó la eficiencia de inhibición a través de un western blot, utilizando Image J se cuantificó la intensidad relativa de las bandas (unidades de densidad óptica, UDO). b) Se monitoreó la morfología de células MCF7 con *ATG7* (A7) KD y se cuantificó la relación de aspecto como se describió previamente. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una *t* de student, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

Por otra parte, se evaluó si el tratamiento con CQ modificaba los niveles de proteínas que funcionan como marcadores epiteliales (E-cadherina) o mesenquimales (N-cadherina y vimentina) (**Figura 12**), se observó que ambas permanecieron sin cambios en las líneas NT y TN. En las líneas RE+ tratadas con CQ, se observó una disminución de E-cadherina que no fue significativa y tampoco se encontró la inducción de marcadores mesenquimales.

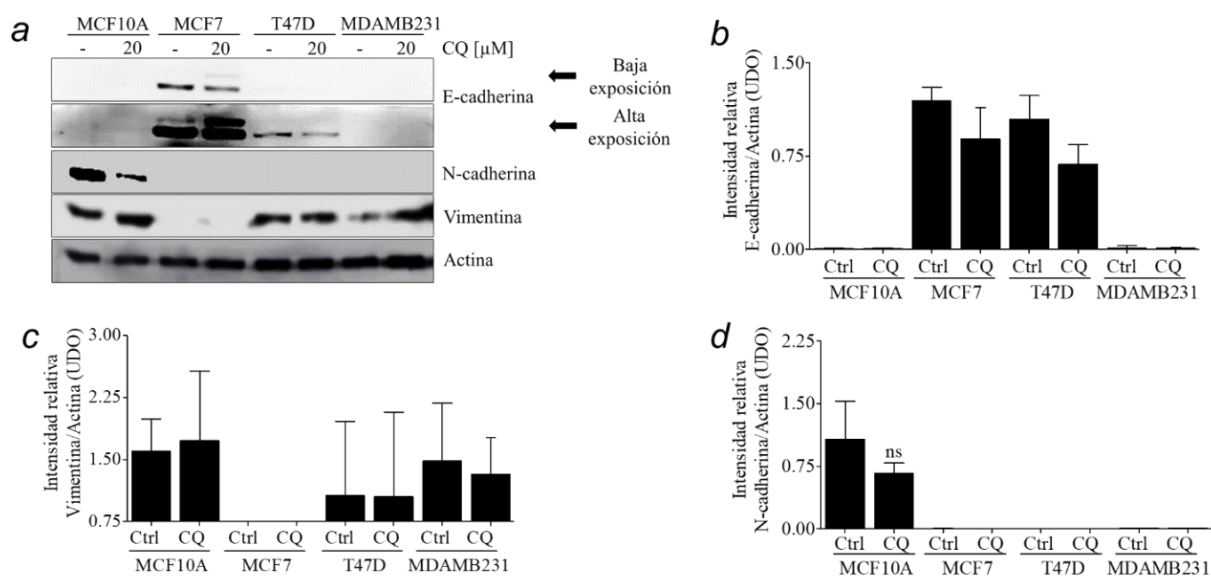


Figura 12. El tratamiento con CQ durante 48 h tiende a disminuir los niveles de E-cadherina. a) Las líneas MCF10A, MCF7, T47D y MDAMB231 se trataron con CQ [20 μM] durante 48 h, se analizaron las proteínas E-cadherina, N-cadherina y vimentina mediante western blot, usando actina como control de carga. Se usó Image J para cuantificar la intensidad relativa de las bandas (unidades de densidad óptica, UDP) b-d). Se cuantificó la intensidad relativa de las bandas (unidades de densidad óptica, UDP). Las gráficas muestran el promedio ± DE de tres experimentos independientes. Se realizó una *t* de student, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

Teniendo en cuenta que la inducción de la TEM es un proceso dependiente del estímulo y del tiempo, las células RE+ se trataron por 72 h con CQ, donde se observó una mayor inducción de la morfología mesenquimal (**Figura 13a**), la cual se acompañó de una disminución estadísticamente significativa de E-cadherina, pero no se encontró la expresión de proteínas mesenquimales (**Figura 13b-e**). De forma importante el tratamiento durante 72 h no indujo muerte celular en las células RE+ (**Figura 13f**), lo que se sugiere que los cambios mencionados son un proceso activo relacionado a la TEM y no un artefacto relacionado a con la muerte celular.

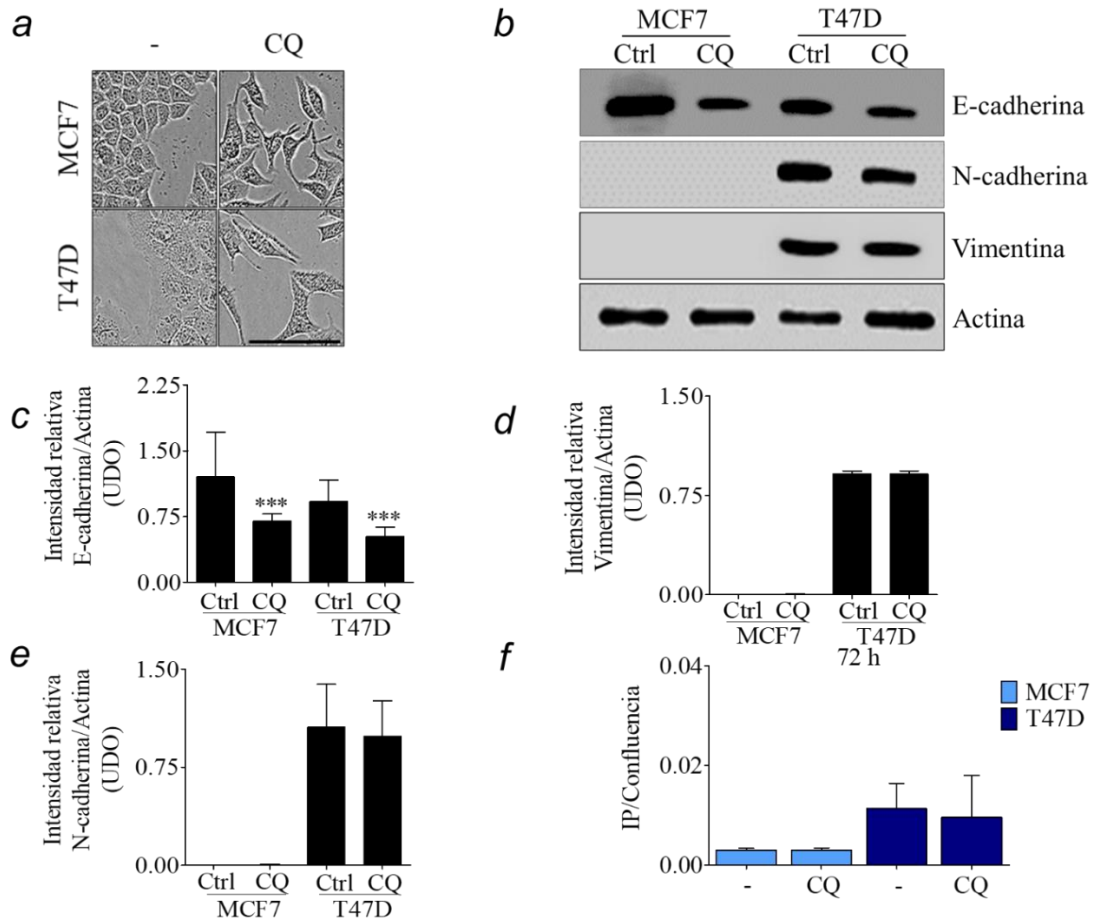


Figura 13. El tratamiento con CQ durante 72 h disminuye los niveles de E-cadherina. a) Las líneas MCF7, T47D RE+ se trataron con CQ [20 μ M] durante 72 h y se analizó la morfología. b) Se analizaron las proteínas E-cadherina, N-cadherina y vimentina mediante western blot, se utilizó actina como control de carga. c-e) Se cuantificó la intensidad relativa de las bandas (unidades de densidad óptica, UDP). f) Las líneas MCF7 y T47D se trataron con CQ [20 μ M] durante 72 h y se cuantificó la muerte celular con una tinción de yoduro de propidio, la muerte celular se expresó como % de rojo (positivo a IP)/ % de confluencia. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una *t* de student, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

Los cambios morfológicos de las líneas RE+ con el tratamiento de CQ sugieren la inducción de la TEM. No obstante, no debe considerarse que el proceso de TEM se ha inducido únicamente con la evaluación de cambios en la morfología celular, ya que ésta no siempre se correlaciona con cambios funcionales relacionados a la TEM, por lo que fue fundamental determinar cambios moleculares y funcionales [151]. Por lo tanto, se evaluó si el tratamiento con CQ podría inducir migración en un modelo de cierre de herida en la línea MCF7 RE+ (**Figura 14a y b**) sin que se evidenciara efecto alguno. Teniendo en cuenta que

la disminución de E-cadherina se encontró a las 72 h de tratamiento, se consideró que las células debían activar el programa TEM para migrar. Por ello, se realizó un pretratamiento con CQ durante 72 h (pre 72 h) antes de realizar el ensayo de cierre de herida (**Figura 14a y b**), donde se encontró un incremento en la migración y que la adición de CQ en esta condición no incrementó la capacidad migratoria. Para confirmar a un nivel molecular la activación de la TEM, se analizaron los niveles de expresión de FT-TEM: *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST* y *OCT4* (**Figura 14c**), de los cuales mostraron una razón de cambio de 1.5, 35, 1.9 y 0.66 respecto a su control. Los resultados anteriores sugieren que el tratamiento con CQ induce una TEM funcional.

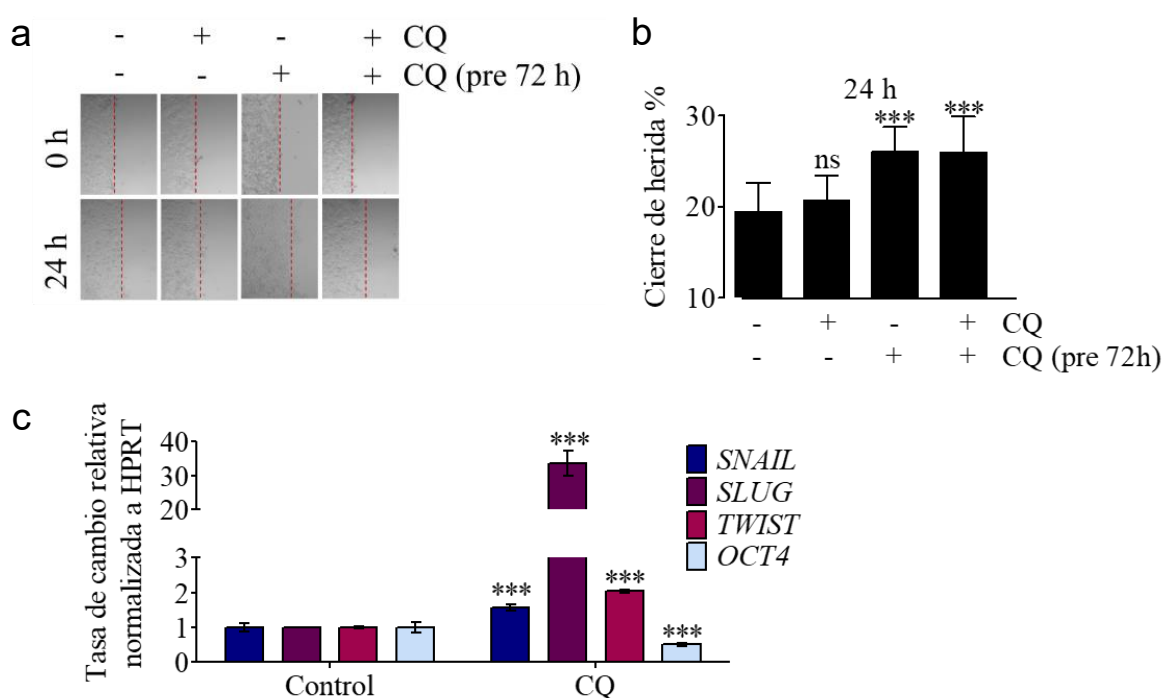


Figura 14. El tratamiento con CQ induce TEM en la línea MCF7 RE+. a) Se realizó una herida a células MCF7 y se trataron \pm CQ [20 μ M], adicionalmente a se pre trataron células MCF7 (RE+) durante 72 h con CQ [20 μ M] las cuales se tripsinizaron y se sembraron para realizar el ensayo de herida, se trataron \pm CQ [20 μ M]. b) Se cuantificó el % de cierre en 24 h. c) Se evaluó la expresión de FT-TEM por qPCR en la línea MCF7 tratada con CQ [20 μ M] durante 72 h, se utilizó HPRT como gen endógeno. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía, * = diferente al control, *** < 0.001, *p < 0.01.

Así mismo, se analizó si la inhibición genética de la autofagia podría tener efecto sobre el fenotipo epitelial de la línea MCF7 RE+, ya que a pesar de no encontrar diferencias morfológicas, el análisis transcriptómico sugería que la TEM podría inducirse. Se encontró

que la inhibición de la autofagia en las células MCF7 A7 indujo una disminución significativa de la proteína E-cadherina (**Figura 15a y b**). Sin embargo, no se encontró un incremento en la migración, sino una disminución en dicho evento respecto a las células NS (**Figura 15c y d**). Esta evidencia sugiere que a pesar de que el tratamiento con CQ y la inhibición genética de la autofagia inducen una disminución de E-cadherina, existen diferencias mecánicas y funcionales entre ambos.

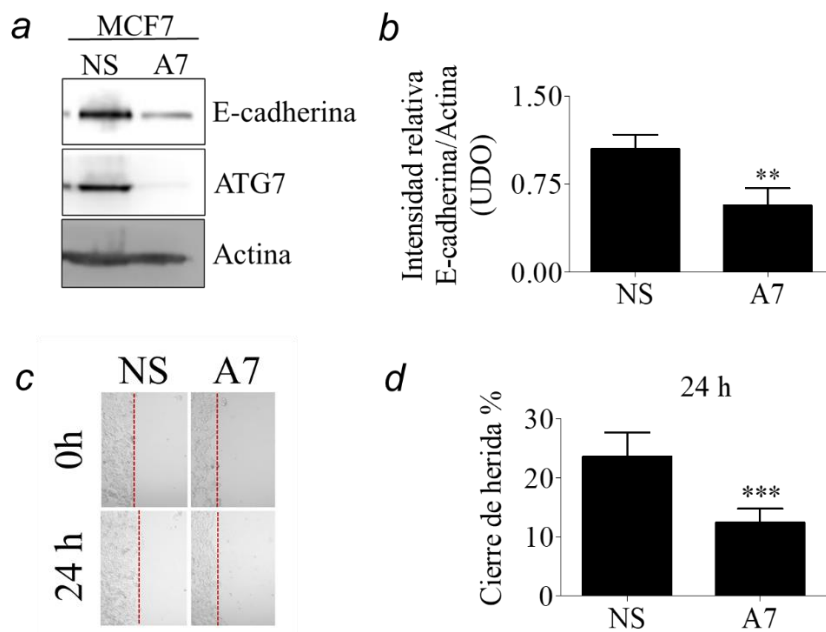


Figura 15. La inhibición de la autofagia disminuye los niveles de E-cadherina pero no induce la migración de la línea MCF7 RE+. a) Se midieron los niveles de E-cadherina por western blot en las células NS y ATG7 KD (A7) de la línea celular MCF7 RE+. b) Se realizó un análisis densitométrico, utilizando actina como control de carga. c) Se realizó un ensayo de cierre de herida en las células MCF7 NS y A7 y se cuantificó el cierre de herida (d) después de 24 h. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una *t* de Student, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

7.1.3 El tratamiento con CQ induce TEM a través de la secreción de MIF mediada por ERO

Teniendo en consideración que la inhibición de la autofagia se ha asociado a la secreción de citocinas proinflamatorias [64, 70, 80] que pueden inducir la TEM y que el tratamiento prolongado con CQ inducía TEM, se realizó un ensayo de medio condicionado (MC) (**Figura 16a**) en las líneas MCF7 (**Figura 16b**) y T47D (**Figura 16c**), ambas RE+. Se encontró que el MC-CQ inducía migración celular en ambas líneas celulares. Lo que sugirió

que el tratamiento con CQ inducía la secreción de componentes solubles que mediaban la migración.

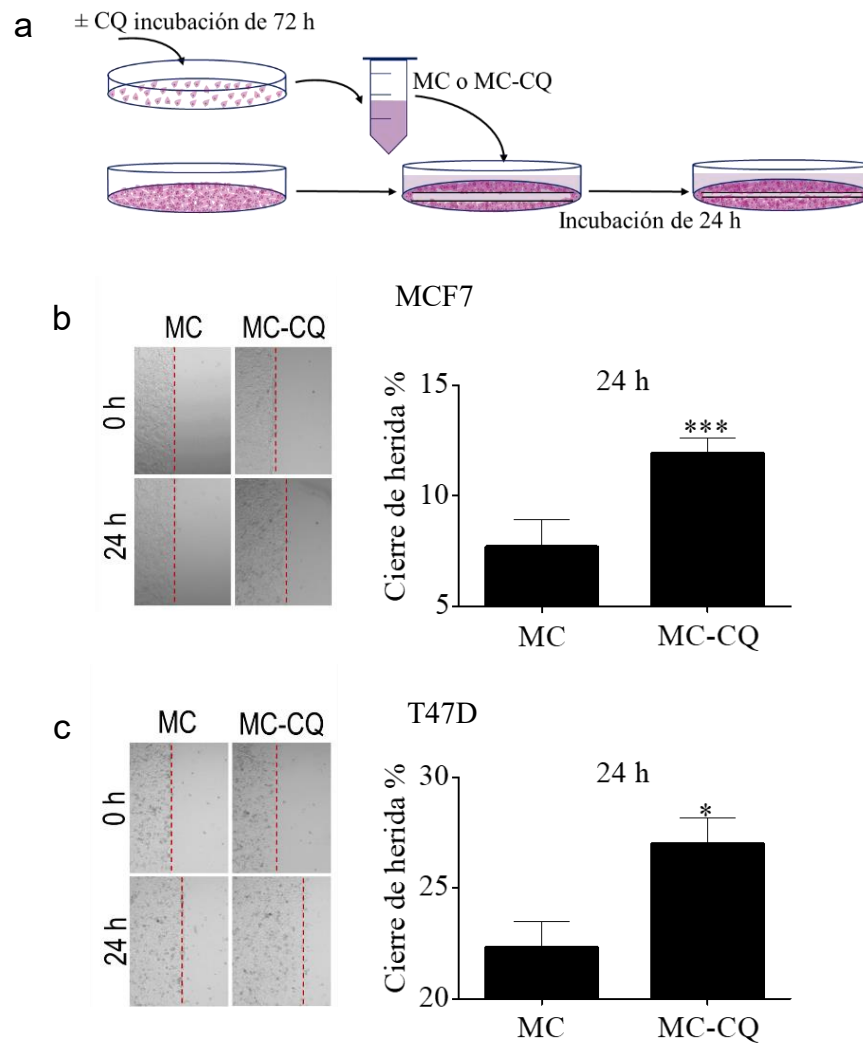


Figura 16. El cierre de herida es mediado por factores solubles inducidos por el tratamiento con CQ. a) Diagrama del experimento, se incubaron células RE+ con ± CQ [20 µM] durante 72 h, el medio de cultivo se recolectó y denominó como medio condicionado (MC) y medio condicionado con CQ (MC-CQ), respectivamente. Los medios condicionados se adicionaron a células RE+ sin tratamiento previo y con una herida, se incubaron durante 24 y se cuantificó el % de cierre de herida. Se utilizaron dos líneas celulares RE+ b) MCF7 y c) T47D. Las gráficas muestran el promedio ± DE de tres experimentos independientes. Se realizó una *t* de Student, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01.

Para determinar qué citocinas podrían secretarse y mediar la TEM por el tratamiento de CQ, se evaluó un perfil de citocinas: IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12p70. Para lo cual, se analizó el medio de cultivo de células MCF7 tratadas con CQ durante 24 h; cabe

destacar que se utilizó este tiempo porque a través del análisis de microscopía en tiempo real se observó que las células mostraron cambios en su morfología, donde comenzaban a elongarse para formar husos y se observaba el inicio de la separación de sus colonias. Por lo que, razonamos que en este momento, la TEM ya había sido activada y que la citocina que encontrásemos mayormente secretada podría orquestrar la TEM. Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia entre el tratamiento con CQ y el control (**Figura 17**).

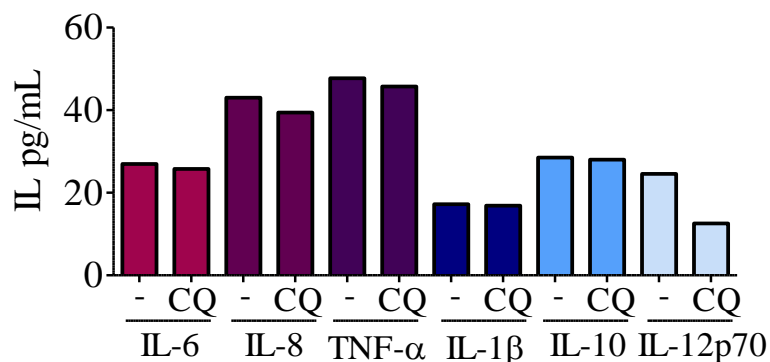


Figura 17. El tratamiento con CQ durante 24 h mantiene estable un perfil de citocinas. Se realizó un perfil de citocinas del medio de cultivo de células MCF7 tratadas con CQ [20 μ M] durante 24 h. Se utilizó el kit BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit. $n=1$.

Ya que nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el tratamiento con CQ y la inhibición de la autofagia pueden inducir la secreción de MIF en líneas celulares TN [80] y teniendo en cuenta que MIF se encuentra río arriba de otras citocinas proinflamatorias [98], decidimos analizar su secreción. De forma inicial, se analizó la secreción basal de MIF en todas las líneas celulares de estudio (**Figura 18a**), observándose que las líneas MCF7, T47D y MDAMB231 tienen una secreción basal mayor que la línea MCF10A NT. Todas las líneas se trataron con diferentes concentraciones de CQ [10, 20 y 40 μ M] (**Figura 18b**) durante 24 h observando que las dosis de 20 y 40 μ M indujeron la secreción de MIF en las líneas MCF7 y T47D. A pesar de que se utilizaron las dosis más altas de CQ a este tiempo no se observó muerte celular (**Figura 8**), por lo que se concluye que se está cuantificando la secreción activa y no es un falso positivo. Por otro lado, las líneas MCF10A NT y MDAMB231 TN, mantuvieron niveles constantes de MIF secretado (**Figura 18b**).

Estudios realizados por Lee y cols. [73] y por Cotzomi y cols. [72] pusieron de manifiesto, que la secreción de MIF se encuentra mediada por ERO. Por tal motivo, para

continuar dilucidando el mecanismo de secreción, se analizó por microscopía de fluorescencia el nivel de oxidación celular de las líneas MCF7 y T47D RE+. Se observó que el tratamiento con CQ a 24 h incrementó de forma considerable la oxidación respecto a su control (**Figura 18c**). Para determinar si los niveles de ERO podían modularse y con ello modular la secreción de MIF, se trataron a células MCF7 y T47D con un inhibidor de ERO, NAC [1 mM] en conjunto con CQ (**Figura 18d y e**). El NAC es un profármaco de cisteína [152], que permite incrementar los niveles de glutatión, el cual permite la reducción de las ERO [153]. El cotratamiento de NAC con CQ disminuyó el porcentaje de células oxidadas (**Figura 18d y e**) y se vio acompañado de una disminución de la secreción de MIF en las células MCF7 (**Figura 18f**). Estos resultados indican que el tratamiento con CQ induce la secreción de MIF mediada por ERO.

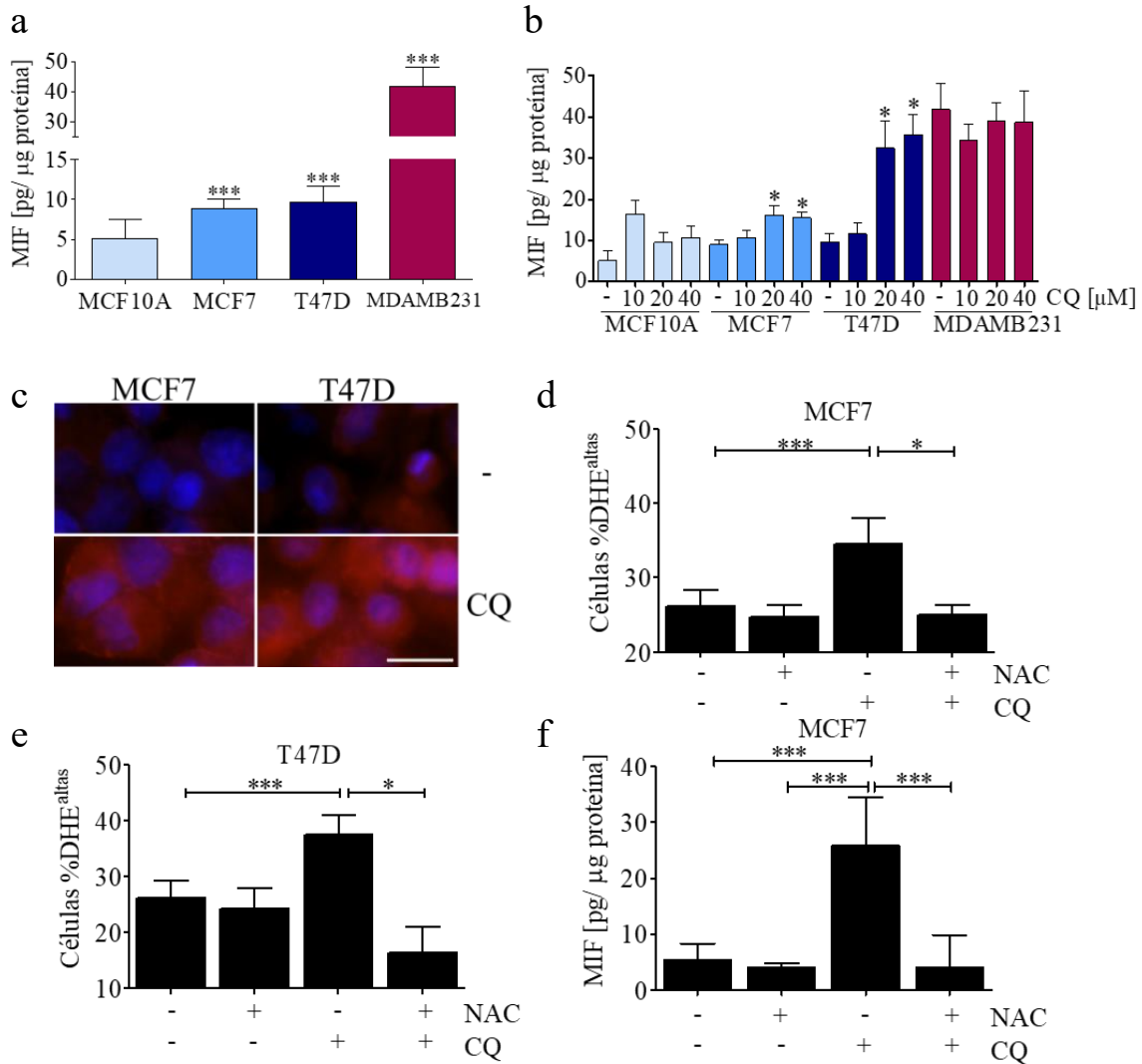


Figura 18. El tratamiento con CQ induce la secreción de MIF mediada por ERO. a) Secreción basal de MIF en las líneas MCF10A NT, MCF7 RE+, T47D RE+, MDAMB231 TN. b) Secreción inducida de MIF a las 24 h de tratamiento con CQ [10, 20 y 40 μM] de 24 h. c) Determinación de ERO totales por microscopía de fluorescencia con DHE en las líneas MCF7 y T47D RE+ con tratamiento de CQ [20 μM] durante 24 h. d) Se cuantificaron las ERO totales con DHE, se trataron células MCF7 y T47D con NAC [1 mM] en conjunto con CQ [20 μM]. e) El tratamiento con NAC disminuye la secreción de MIF inducida por el tratamiento con CQ en la línea celular MCF7 RE+. Las gráficas muestran el promedio ± DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01

Para dilucidar las diferencias entre la inhibición genética de la autofagia y el tratamiento con CQ, se cuantificó el porcentaje de células oxidadas en células MCF7 A7, NS y se comparó con el tratamiento de CQ (**Figura 19**), donde no se encontraron diferencias entre las células silenciadas y no silenciadas. Además, al evaluar la secreción de MIF, tampoco se encontró un incremento del mismo en el medio de cultivo (**Figura 19c**). Por lo tanto, la inhibición de la autofagia no incrementa los niveles de ERO y por consecuencia no

se induce la secreción de MIF; lo que podría ser la razón de las diferencias en la inducción de la TEM entre el tratamiento con CQ y la inhibición genética de la autofagia.

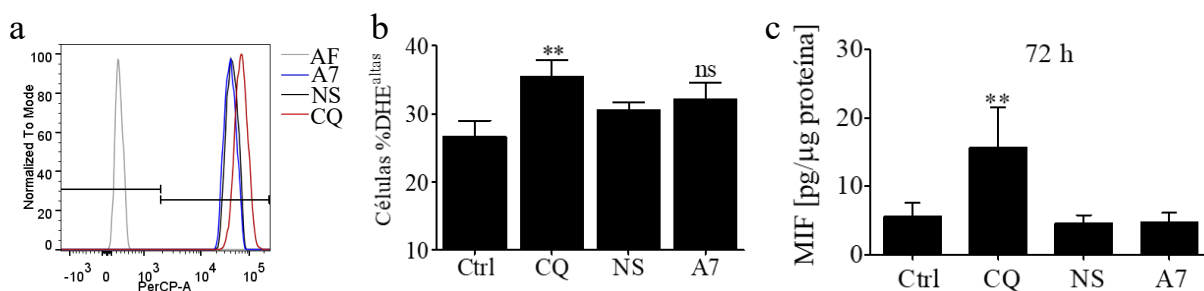


Figura 19. La inhibición de la autofagia no induce la secreción de MIF en la línea MCF7 RE+. a y b) La inhibición genética de la autofagia en células MCF7 A7 y NS se cuantificó con DHE. c) Se analizó la secreción de MIF. Las gráficas muestran el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía, *= diferente al control, ***<0.001, *p<0.01

La señalización de MIF es a través de su receptor CD74/CD44 y la posterior activación de la vía ERK1/2 [98], mediante la cual ejerce sus funciones. Para confirmar que el MIF secretado es capaz de activar la señalización de ERK1/2, se evaluó la fosforilación de estas proteínas (**Figura 20a**), encontrando un incremento en la línea celular MCF7 RE+. Para confirmar que la activación de ERK se daba por MIF y no por algún otro factor, se inhibió su señalización a través de dos enfoques: en el primero se inhibió con NAC, que es un antioxidante que disminuye las ERO y la posterior secreción de MIF (**Figura 18f**). En el segundo, se inhibió con un inhibidor específico, ISO-1. Con ambos tratamientos se disminuyó la fosforilación de ERK1/2 (**Figura 20b**). Los resultados anteriores confirman que el tratamiento con CQ induce la secreción de MIF y que este señala a través de la vía ERK1/2.

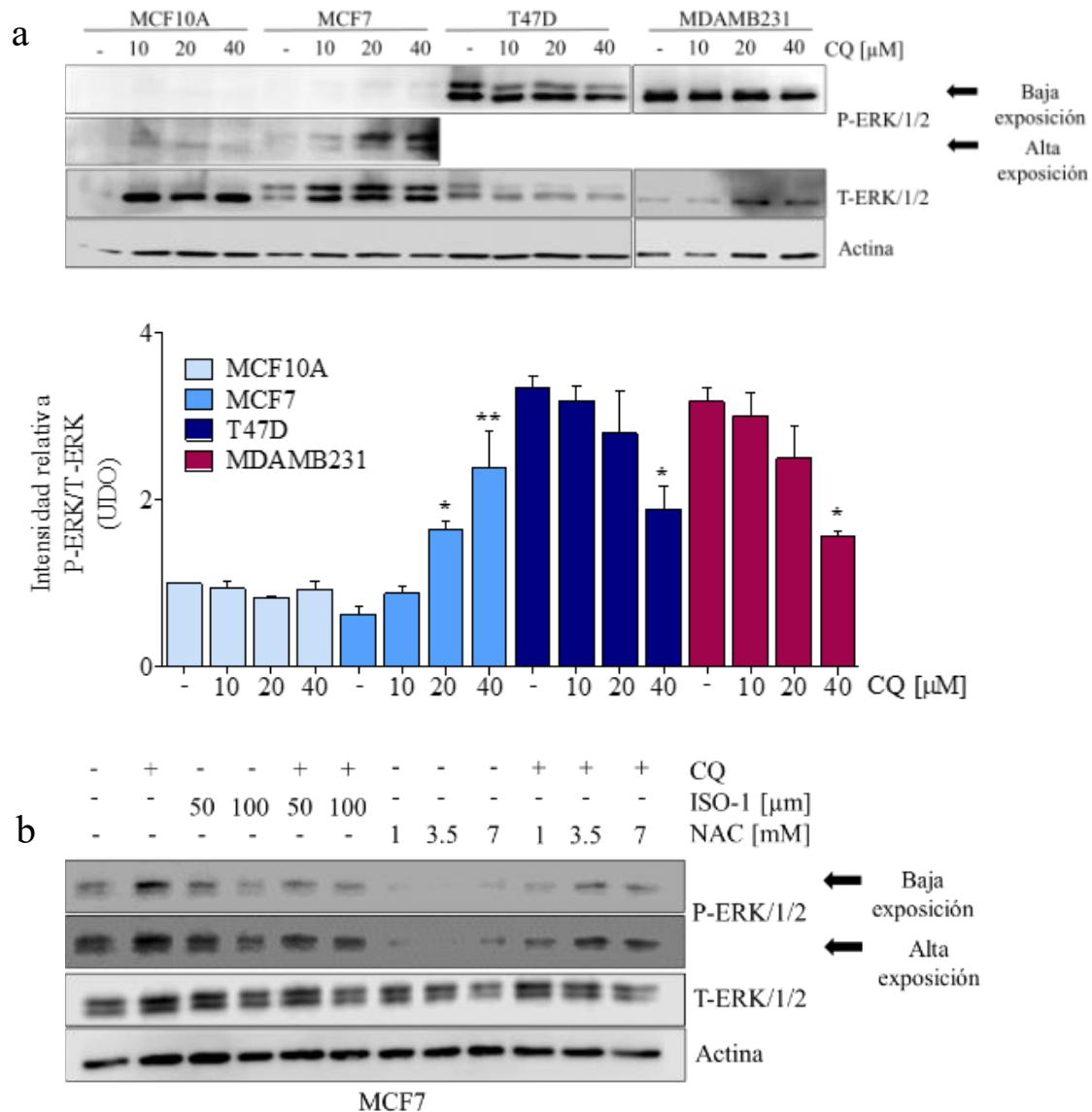


Figura 20. El tratamiento con CQ induce la fosforilación de ERK en la línea MCF7 RE+. a) Se trataron células MCF10A, MCF7, T47D y MDAMB231 con CQ [10, 20 y 40 μM], se analizó la fosforilación de ERK1/2 por western blot. Se analizó mediante comparación con ERK1/2 total, utilizando actina como control de carga. b) Se trataron células MCF7 con CQ [20 μM] en conjunto con NAC [1, 3.5 y 7 mM] (inhibidor de ERO) o con ISO-1 [50, 100 μM] (inhibidor de MIF). La gráfica muestra el promedio ± DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía, *= diferente al control, **p<0.01, *p<0.05.

Para confirmar que la inducción de TEM se estimulaba por MIF, la secreción de este se inhibió con NAC [73, 80] y su señalización con ISO-1, en conjunto con CQ durante 72 h. Ambos enfoques farmacológicos previnieron de forma parcial el cambio morfológico de las líneas RE+ (**Figura 21a**), donde se puede apreciar que las células aún poseen una forma mesenquimal, pero mantienen la capacidad de formar colonias. Para determinar si la

inhibición de MIF podía tener efectos en la migración celular, se realizó un ensayo de medio condicionado y se encontró que el tratamiento tanto con NAC+CQ como con ISO-1+CQ disminuye notablemente la migración de células MCF7. Estos resultados indican que MIF se encuentra orquestando los cambios morfológicos y de migración en las líneas RE+.

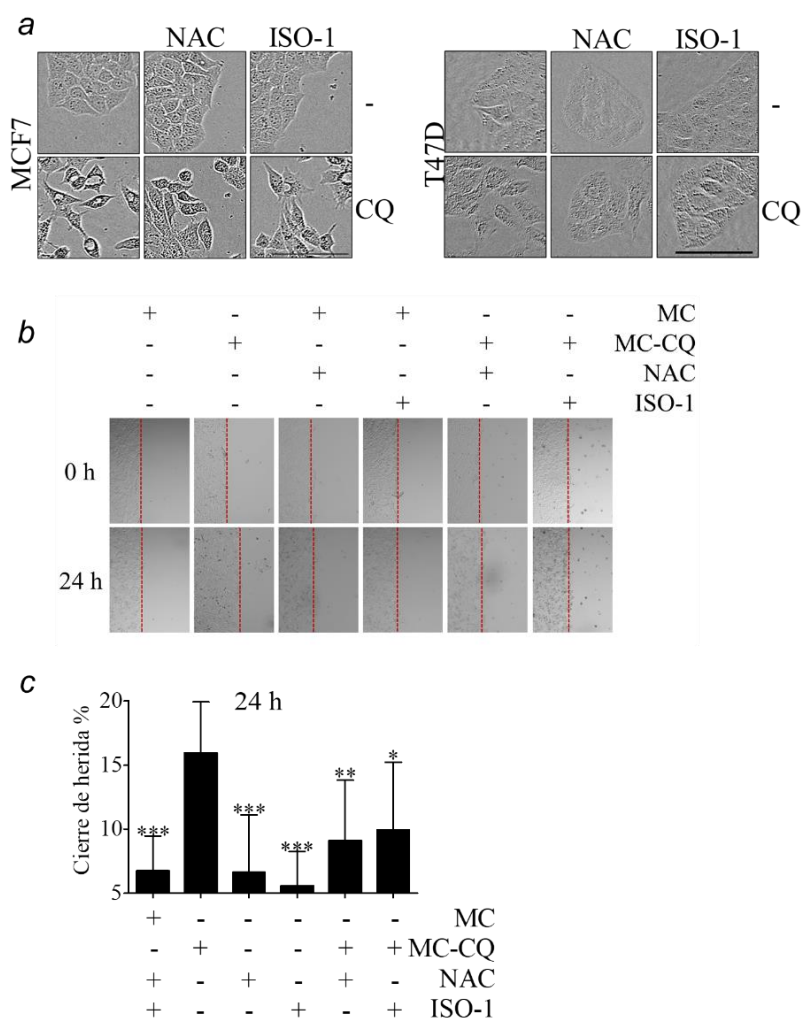


Figura 21. El tratamiento con CQ induce TEM mediada por MIF en líneas RE+. a) Se analizó el impacto de la inhibición de ERO con NAC [1 mM] y de la inhibición de MIF con ISO-1 [50 mM] en la morfología celular de las líneas MCF7 y T47D tratadas con CQ [20 μM]. b y c) Se utilizó el medio de cultivo de células MCF7 RE+ tratadas con ± CQ [20 μM], ±NAC [1 mM]/ ± ISO-1 [50 mM] durante 72 h, denominado medio condicionado. Los MC se adicionaron a células MCF7 RE+ sin tratamiento previo y con una herida, se incubaron durante 24 y se cuantificó el % de cierre de herida. La gráfica muestran el promedio ± DE de tres experimentos independientes. Se realizó una ANOVA de una vía, *= diferente al control, ***<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

8 Discusión

El proceso evolutivo ha permitido que los eucariotas superiores tengan una fina regulación en su desarrollo, maduración y mantenimiento celular; incluso una vez que las células tienen un daño exacerbado, son eliminadas para evitar procesos tumorigénicos. Sin embargo, las células tumorales toman ventaja de diferentes procesos de supervivencia e incluso de programas primitivos no sólo para el establecimiento tumoral, sino para resistir al estrés, migrar y establecer focos secundarios o activar características troncales, por mencionar algunos ejemplos. Uno de los procesos que las células tumorales emplean para sobrevivir es la autofagia.

La autofagia es un proceso de mantenimiento citoplásmico basal que se encuentra activo en todas las células, puede inducirse a través de la disminución de aminoácidos, factores de crecimiento, hipoxia, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial o estrés del retículo endoplásmico; eliminando proteínas dañadas, agregadas, pero también otros cargos como mitocondrias, peroxisomas, el retículo endoplásmico y RNAs [27-29]. La degradación de cargos permite su posterior reciclaje, brindando una fuente de bioelementos necesarios para ser utilizados como fuente bioenergética y compensar las deficiencias energéticas. Cabe destacar que la autofagia no sólo juega un papel importante en la eliminación de cargos, sino también en la secreción de proteínas por una ruta no convencional, tal es el caso de las citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, MIF e IL-8 [70, 154]. Todo esto pone de manifiesto que la autofagia opera como un proceso homeostático, citoprotector e inmunomodulador, por lo que su modulación es un blanco terapéutico de interés [155, 156].

Existe extensa evidencia que pone de manifiesto la dependencia de la autofagia de diversos tipos tumorales como aquellos del sistema nervioso central, pancreáticos, carcinomas de células no pequeñas de pulmón, tiroideos y melanoma, los cuales muestran mutaciones en la vía EGFR/RAS/BRAF [60, 62, 157]. Para este tipo de tumores la inhibición de la autofagia sola o en conjunto con terapias neoadyuvantes ha mostrado una disminución del tamaño tumoral debido a la disminución de la proliferación y la inducción de muerte celular [60, 62, 157], mostrando resultados prometedores en modelos *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, también hay evidencia en modelos *in vivo* e *in vitro* [44] en los que la inhibición de la autofagia puede inducir efectos contraproducentes como inducción de la proliferación celular, TEM, la activación de características troncales y la inmunoección [44].

En nuestro grupo de trabajo se ha descrito que las líneas TN de CM son sensibles a la inhibición de la autofagia [25], las cuales disminuyen su proliferación, en conjunto con la disminución de la secreción de la IL-6 [64], además se induce muerte celular [64]. Este subtipo de CM carece de terapia dirigida y la inhibición de la autofagia representa una excelente opción terapéutica. En contraste, las líneas RE+ no tienen dependencia a la autofagia [25], a pesar de que disminuye su proliferación celular [25] no hay un incremento de muerte celular [64]. De forma interesante, se induce la secreción de la citocina proinflamatoria IL-6 [64]. Teniendo en cuenta que la IL-6 es una citocina que regula la TEM (proceso íntimamente relacionado a la metástasis), la troncalidad, sobrevivencia y resistencia a fármacos [158], fue importante determinar si la inhibición de la autofagia en este subtipo celular RE+ podría inducir la TEM.

Actualmente, existen varios estudios clínicos en los que se inhibe la autofagia de forma farmacológica con CQ/HCQ (únicos fármacos aprobados), como monoterapia o en conjunto con terapia neoadyuvante en varios tipos de tumores [27]. Estos fármacos pueden administrarse crónicamente teniendo un mínimo de toxicidad, la cual puede ser reversible y por lo tanto son clasificados como seguros y bien tolerados [159]. Asimismo tienen efectos independientes de autofagia, que pueden tanto ayudar a sensibilizar a las células tumorales [160], pero también pueden producir efectos contrarios como la activación de NF- κ B y la secreción de citocinas proinflamatorias [68, 80, 148]. Dado que hay varios ensayos clínicos en los que se analiza la inhibición de la autofagia, utilizando CQ/HCQ como agentes farmacológicos, en una amplia variedad de tumores sólidos sin estratificar. Fue importante determinar si el tratamiento estos fármacos en las líneas RE+ podría inducir algún efecto contraproducente, propio de la inhibición de la autofagia o *per sé* del mismo.

Para conocer a detalle el impacto de la inhibición de la autofagia en la línea celular MCF7 A7, se analizó su transcriptoma y se detectaron cambios opuestos en comparación a la línea celular MDAMB468 A7. Las células MCF7 A7 mostraron la inducción de vías relacionadas a la TEM, al metabolismo, a la inflamación y secreción, mientras que en la TN se observaron vías relacionadas a la regulación transcripcional. Esto sugiere que la inhibición de la autofagia puede tener efectos diferenciales en cáncer de mama y que pueden depender del subtipo histopatológico. Para determinar si la inhibición de la autofagia podía activar la

TEM en líneas de CM, se utilizaron dos enfoques de inhibición: uno farmacológico (con CQ), como el utilizado en la terapéutica en los ensayos clínicos, y uno genético (*ATG7* KD), esto para confirmar si el efecto observado se debía a la inhibición de la autofagia o a efectos independientes de la autofagia. Se encontró que el tratamiento con CQ induce TEM en las líneas RE+, encontrando cambios morfológicos de tipo mesenquimal, acompañados por la disminución de E-cadherina, en conjunto con la expresión de FT-TEM, *SNAIL*, *SLUG* y *TWIST1*, así como un incremento en la capacidad de migración. Sin embargo, no se encontró la inducción de proteínas mesenquimales (N-cadherina y vimentina). En contraste, las células MCF7 *ATG7* KD mantuvieron su morfología epitelial, la cual se acompañó de una disminución de E-cadherina. Sin embargo, la inhibición genética de la autofagia no indujo un fenotipo funcional migratorio. Tanto el tratamiento con CQ como la inhibición genética de la autofagia, disminuyeron los niveles de E-cadherina. Al respecto, se ha reportado que *SNAIL*, que es un represor de E-cadherina [161], se degrada por el proceso de autofagia [162]. Por lo que al inhibir la degradación de cargos en ambos contextos, los niveles de *SNAIL* podrían mediar la disminución de la proteína epitelial. Nuestros resultados sugieren que las líneas RE+ son propensas para la inducción de TEM, ya que tanto la inhibición genética de la autofagia como el tratamiento con CQ disminuyeron los niveles de E-cadherina. Hasta el momento no es claro si la pérdida de E-cadherina es causa o consecuencia de la TEM; pero en pacientes, la disminución de E-cadherina se correlaciona con un mal pronóstico y se asocia a un incremento en la incidencia de metástasis [163, 164].

Se han propuesto cinco tipos de estímulos inductores de la TEM: hipoxia y pH bajo, estrés mecánico, alteraciones en la matrix extracelular, quimioterapéuticos y el microambiente tumoral [165]; si bien en nuestro trabajo la inhibición de la autofagia no indujo un fenotipo funcional, no debe descartarse la posibilidad de que estas células estén sensibilizadas para transicionar y que estímulos adicionales, puedan inducir un fenotipo funcional. Otros trabajos han encontrado que la inhibición de la autofagia sensibiliza a las células para la inducción de TEM aunque ésta no ocurre sino después de que se aplica un estímulo adicional. Así, en un modelo de células de carcinoma colorrectal, la inhibición genética de la autofagia indujo cambios transcripcionales relacionados a la inducción de la TEM [166], pero no encontraron un incremento en la capacidad migratoria. Al inyectar ortópicamente las células CRC A7 KD, se observó un incremento en el tamaño del tumor

[166]. En este trabajo se sugirió que las diferencias en el modelo *in vivo* podrían deberse a un efecto prolongado del silenciamiento, pero también a la interacción del microambiente tumoral [166]. A pesar de que un incremento en la proliferación no es indicativo de inducción de TEM, sí se evidenció la importancia de evaluar en un modelo complejo con la interacción del microambiente. Por otro lado, Towers y cols. [167] mostraron que la inhibición genética de la autofagia en líneas de CM dependientes de autofagia, después de un tiempo prolongado de cultivo se adaptaron y proliferaron. Por lo que tampoco puede descartarse la posibilidad de que se necesite un tiempo de cultivo mayor para determinar si la inhibición genética de la autofagia en líneas RE+ puede inducir un fenotipo de migración y de cambios moleculares relacionados a TEM, ya que su perfil transcriptómico indicó la inducción de TGF- β (vía canónica TEM) acompañada de genes reguladores de citocinas proinflamatorias, de filamentos intermedios, así como de inhibidores de metaloproteasas.

De forma importante, por mucho tiempo se consideró que la TEM era un proceso binario en el cual las células debían perder su fenotipo epitelial y adquirir características celulares y moleculares del linaje mesenquimal acompañadas de un incremento en la migración [104]. Sin embargo, la evidencia sugiere que las células que experimentan la TEM también pueden exhibir, pero no necesariamente al mismo tiempo, diversas características como características de troncalidad [168-170], de resistencia a fármacos [168, 171, 172], metabólicas [173] y de inmunoección [174]. Esta reprogramación puede acompañarse de cambios morfológicos y moleculares totales, parciales o nulos y estos estados son reconocidos como estados híbridos o parciales de TEM [136, 173, 175]. Además, la duración, intensidad y el tipo de señal inductora de TEM, así como el fenotipo de cáncer y el microambiente, modulan el fenotipo de TEM. Así, en líneas de cáncer ovárico humanas, el tratamiento con TGF- β indujo migración de forma dosis dependiente, pero los niveles de E-cadherina en conjunto con la expresión de *SNAIL* no se modificaron [119].

Por otro lado, se ha descrito que el tratamiento con CQ se correlaciona con la activación de NF- κ B [68, 148]. La actividad de NF- κ B es esencial para la inducción y mantenimiento de la TEM, ya que regula la expresión de citocinas proinflamatorias (que pueden tener efectos autócrinos y parácrinos en el microambiente tumoral), así como de proteínas mesenquimales, quimiocinas y proteasas remodeladoras de la matriz extracelular

[176]. Se ha descrito que los FT-TEM como SNAIL, SLUG y TWIST1, poseen sitios de unión a NF- κ B en su promotor y a través de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, se han descrito como sitios funcionales [177]. En este trabajo encontramos el incremento de la expresión de *SNAIL*, *SLUG* y *TWIST1*, que son FT-TEM, los cuales reprimen la transcripción de moduladores de la morfología epitelial de la mama e incrementan la expresión de proteínas relacionadas a la migración, resistencia a fármacos y troncalidad [178]. Se ha encontrado que la disminución de E-cadherina en conjunto con elevados niveles de las proteínas SNAIL, SLUG y/o TWIST, se correlacionan con el grado tumoral y mal pronóstico de pacientes de cáncer de mama [112, 179], cervical [110], próstata [120], esofágico [109] y hepatocarcinoma [180]. La falta de detección de proteínas mesenquimales (vimentina y N-cadherina) como consecuencia del tratamiento con CQ sugiere que las células RE+ activan una TEM parcial o híbrida, lo cual necesitaría confirmarse a través del análisis de otras proteínas mesenquimales como fibronectina o actina de músculo liso α (SMA- α) (por mencionar algunos ejemplos).

El tratamiento con CQ no sólo activa NF- κ B, sino que induce la posterior secreción de citocinas proinflamatorias como IL-8 o IL-6 [68, 148]. Se ha descrito que el tratamiento con citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β , IL-6 y MIF en células RE+ de CM promueven cambios morfológicos y funcionales como incremento en la proliferación, migración y resistencia a fármacos relacionados a la TEM [103, 181]. En un modelo de células de melanoma, el tratamiento con CQ activa la vía de NF- κ B y la secreción de la citocina IL-8, promoviendo resistencia a fármacos [149]. Por esta razón se utilizó un ensayo de medio condicionado (MC) proveniente de células RE+ tratadas con CQ (MC-CQ) para determinar si estas secretaban factores solubles que pudiesen mediar la migración. Se encontró que el MC-CQ de ambas líneas RE+ inducía la migración de células RE+ sin tratamiento. Se cuantificó la secreción de MIF y se encontró que el tratamiento con CQ indujo su secreción de forma dosis dependiente en células MCF7 y T47D RE+; en conjunto se detectó la fosforilación de ERK1/2, la cual es activada por MIF. De forma importante, el tratamiento corto con CQ (24 h) no indujo la secreción de otras citocinas, lo que sugiere que MIF tiene un papel importante en la regulación de la TEM. Estudios por Lee y cols. [73] y Cotzomi y cols. [72, 80] muestran que la inhibición de la autofagia y el tratamiento con CQ incrementan los niveles de ERO, que a su vez modulan la secreción de MIF [73, 80]; en este

trabajo se encontró que los niveles de ERO incrementaban como respuesta al tratamiento con CQ y éstos disminuyeron con un tratamiento antioxidante como NAC; derivando en la disminución de la secreción de MIF, así como de la fosforilación de ERK1/2. También, se confirmó que MIF modula la TEM, ya que la inhibición de su secreción, así como de su actividad disminuyeron su señalización e inhibieron parcialmente los cambios morfológicos asociados a la TEM, aunado a una disminución de la capacidad migratoria mediada por CQ. Por otro lado, la inhibición genética de la autofagia no indujo incremento en ERO. Se cuantificó el nivel de oxidación y la secreción de MIF de células MCF7 A7, los cuales fueron similares en las células MCF7 NS.

Probablemente las diferencias entre los niveles de ERO entre las células MCF7 A7 y las tratadas con CQ son la principal causa de las diferencias mecánicas y funcionales encontradas. Cabe destacar que la principal fuente de ERO celular es la mitocondria, donde la inhibición de la autofagia induce la acumulación de estos organelos y por ende un incremento en ERO e inflamación [47, 50]. En este trabajo, no se observó un incremento de los niveles de oxidación en la línea MCF7 A7. En este sentido Sarmiento y cols. [182] demostraron que las líneas RE+ tienen ERO basales y mitocondriales más bajos en comparación a las líneas TN, por lo que se propone que se necesitaría un tiempo de inhibición genética más prolongado para poder alcanzar niveles de ERO mayores.

Por otro lado, en un modelo de colangiocarcinoma humano el tratamiento con CQ induce un súbito incremento de ERO mitocondriales, que sensibilizaron a las células para inducir muerte celular [66]. Adicionalmente, se ha descrito que la CQ puede inhibir las funciones mitocondriales e inducir el incremento de ERO mitocondriales [66]. En los trabajos anteriormente descritos se utilizaron concentraciones altas de CQ [50 μ M]. En este trabajo, el tratamiento con CQ a las dosis y tiempos utilizados no indujo muerte celular, sólo una disminución en la proliferación celular, lo que sugiere que los niveles de ERO inducidos por CQ no son letales para las células, sino que son oncogénicos. Al respecto, se ha observado que el tratamiento con un agente oxidante, como el peróxido de hidrógeno, en líneas MCF7 RE+ induce la expresión de *SNAIL*. Este aumento se ve acompañado de un incremento en la migración celular y cambios en el metabolismo [131]. Esta evidencia sugiere que el tratamiento con CQ puede inducir un incremento en ERO, que pudiera inducir la TEM.

La CQ e HCQ son 4-aminoquilonas que han sido utilizadas ampliamente para el tratamiento de la malaria y de la artritis reumatoide [65]. Al ser bases débiles anfifílicas tienen la capacidad de cruzar la membrana celular y bioacumularse en espacios ácidos, como lisosomas, endolisosomas, el aparato de Golgi y el RER modificando su pH y alterando su función [65], así como de alterar funciones mitocondriales, alterando su composición lipídica y sus funciones [183]. La CQ/HCQ han sido utilizadas como inhibidores de fases tardías de la autofagia al inhibir la fusión de los autofagosomas con los lisosomas [184], a través de la desorganización del sistema endosomal y el aparato de Golgi. Además, se ha sugerido que al incrementar el pH de los lisosomas se inhibe la fusión [185], lo que induce la acumulación de autofagosomas en el citoplasma.

Como se mencionó, la CQ puede desorganizar el sistema endosomal y en conjunto con la generación de ERO, inducir estrés del RER y la activación del sistema de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Las funciones del RER son proveer las condiciones para la síntesis y el plegamiento de proteínas [186], mantener la homeostasis de calcio, monitorear y responder a diferentes tipos de estrés celular como disminución de nutrientes, estrés oxidativo y la acumulación de proteínas mal plegadas a través del sistema UPR [186, 187]. El RER posee un ambiente oxidante y en él se pueden generar hasta el 25% de las ERO de la célula [188]. Teniendo en cuenta esta evidencia, el tratamiento con CQ podría desorganizar al RER y generar ERO. Al respecto, en un modelo de células de colongiocarcinoma tratadas con una dosis alta de CQ se observó la activación del estrés del RER derivando en muerte celular [189]. De forma paralela, el estrés del RER induce la liberación de calcio al citoplasma, el cual puede ingresar a la mitocondria derivando en una producción constante de ERO [190], amplificando y manteniendo una señalización oncogénica e inflamatoria [187]. De manera alterna, recientemente se ha descrito que el incremento de calcio intracelular puede inducir una TEM híbrida a través de la internalización de E-cadherina, así como incrementar la migración e invasión [191].

En este trabajo encontramos que la inhibición de la autofagia y el tratamiento con CQ en líneas celulares RE+ de CM, disminuyen los niveles de E-cadherina, proteína epitelial. Sin embargo, el tratamiento prolongado con CQ indujo cambios morfológicos, la expresión de FT-TEM como *SNAIL*, *SLUG* y *TWIST1*, la secreción de MIF y la migración celular. La

inhibición de la autofagia no indujo un fenotipo morfológico y funcional asociado a la TEM. Si bien existen otros fármacos que inhiben el proceso de autofagia de forma específica y en diferentes etapas del proceso [27, 192], se encuentran bajo investigación *in vitro* y hasta el momento la CQ e HCQ son los únicos fármacos utilizados en ensayos clínicos [27]. Además, existe una amplia evidencia que justifica la eficacia y seguridad del tratamiento con CQ [27, 55, 56, 157].

Sin embargo, cada tipo de cáncer tiene características específicas así como cada subtipo tumoral posee características intrínsecas, haciéndolos más susceptibles a un tratamiento respecto a otros subtipos. En el caso del subtipo TN de CM el tratamiento con CQ en conjunto con otra terapia [72, 193], parecen ser un buen enfoque terapéutico. No obstante, para el caso del subtipo RE+, el tratamiento con CQ parece inducir respuestas asociadas a una mayor agresividad. Derivado de esto, se hacen necesarios estudios adicionales en organismos completos para demostrar si el tratamiento con CQ podría inducir la formación de metástasis en modelos de cáncer de mama RE+. En este sentido, la inducción de la TEM en pacientes se ha asociado al proceso de metástasis y a la resistencia a la terapia [170, 173], por lo que es imprescindible evitar inducirla. Actualmente, existen diversos ensayos clínicos donde se emplea la CQ/HCQ ya sea como monoterapia o como terapia neoadyuvante. Sin embargo, en la mayoría de estos ensayos, el universo de estudio son tumores sólidos sin estratificar [27, 42, 194], por lo que cabe la posibilidad de que se utilice CQ en pacientes con CM RE+. Por lo que se sugiere estratificar a las pacientes para determinar quién se beneficiará de este tratamiento y quién no, y así proponer terapias adecuadas para cada subtipo tumoral, eficaces y seguras.

9 Conclusiones

La inhibición de la autofagia y el tratamiento con CQ inducen una TEM parcial en líneas celulares RE+, en la cual, ambos enfoques disminuyeron los niveles de E-cadherina. Sin embargo, el tratamiento prolongado con CQ indujo cambios morfológicos, la expresión de FT-TEM como *SNAIL*, *SLUG* y *TWIST1*; acompañándose de un incremento de ERO, las cuales mediaron la secreción de MIF, la migración y la TEM. A pesar de que la inhibición de la autofagia no indujo un fenotipo morfológico y funcional asociado a la TEM,

probablemente las células se encuentran sensibilizadas para sufrir esta transición bajo otro estímulo o a largo plazo.

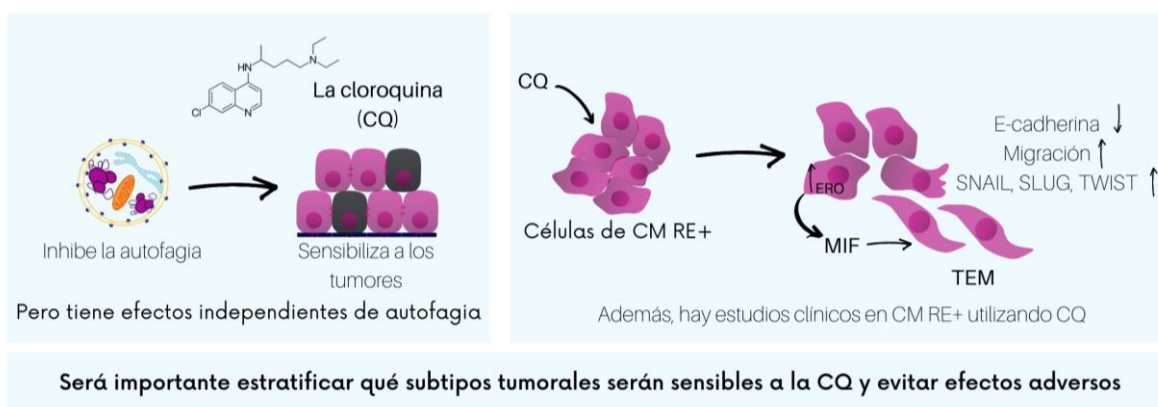


Figura 22. Resumen gráfico del trabajo. Existe evidencia en la que se ha descrito que las células tumorales utilizan el proceso autofágico para sobrevivir al estrés, por lo que la inhibición de éste se propone como un blanco farmacológico. Se ha utilizado a la cloroquina (CQ) como fármaco inhibidor de la autofagia, mostrando una sensibilización de las células tumorales a la muerte celular. Sin embargo, la CQ también posee efectos independientes de autofagia como el incremento de ERO y la activación de NF- κ B. En este trabajo demostramos que el tratamiento con CQ induce TEM en las líneas RE+ de CM, caracterizada por cambios en la morfología, una disminución de E-cadherina, un incremento en la migración celular y en la inducción de FT-TEM (*SNAIL*, *SLUG* y *TWIST*). El tratamiento con CQ indujo un incremento de ERO, las cuales mediaron la secreción de MIF, citocina proinflamatoria, responsable de la TEM. En ensayos clínicos será importante estratificar qué subtipos tumorales serán sensibles al tratamiento con CQ.

10 Perspectivas

- Analizar si el tratamiento con CQ en líneas RE+ puede inducir cambios metabólicos y de troncalidad asociados a la TEM
- Determinar la capacidad de formar focos metastásicos de las células RE+ tratadas con CQ en un modelo murino
- Analizar si las células MCF7 A7 con un cultivo prolongado pueden inducir TEM, alguna característica asociada a la troncalidad o resistencia a fármacos

11 Bibliografía

1. Organization, W.H. *Breast cancer*. WHO 2017 2017-06-22 09:04:38; Available from: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
2. Baldassarre, G. and B. Belletti, *Molecular biology of breast tumors and prognosis*. F1000Res, 2016. 5.
3. Shah, R., K. Rosso, and S.D. Nathanson, *Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer*. World J Clin Oncol, 2014. 5(3): p. 283-98.

4. Salud, S.d. *Cáncer de Mama. Introducción*. 2018; Available from: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/cancer-de-mama-introduccion>.
5. Partida, V. *Proyecciones de la población económicamente activa de México y de las entidades federativas, 2005-2050*. 2008; Available from: <http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/PEA/pea.pdf>.
6. Aguila, E., et al., *Envejecer en México: condiciones de vida y salud*, in *Población*. 2011.
7. Engin, A., *Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors*, in *Obesity and Lipotoxicity*, A.B. Engin and A. Engin, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 571-606.
8. Momenimovahed, Z. and H. Salehiniya, *Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world*. *Breast cancer* (Dove Medical Press), 2019. **11**: p. 151-164.
9. Fuster, J.J., et al., *Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease*. *Circulation research*, 2016. **118**(11): p. 1786-1807.
10. Gyamfi, J., et al., *Multifaceted Roles of Interleukin-6 in Adipocyte-Breast Cancer Cell Interaction*. *Transl Oncol*, 2018. **11**(2): p. 275-285.
11. Skol, A.D., M.M. Sasaki, and K. Onel, *The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past BRCA and towards clinical relevance*. *Breast Cancer Research*, 2016. **18**(1): p. 99.
12. Polyak, P., *Heterogeneity in breast cancer*. 2011. **121**(10): p. 3786-3788.
13. Zubair, M., S. Wang, and N. Ali, *Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis*. *Frontiers in Pharmacology*, 2021. **11**: p. 2487.
14. Waks, A.G. and E.P. Winer, *Breast Cancer Treatment: A Review*. *Jama*, 2019. **321**(3): p. 288-300.
15. Siersbæk, R., S. Kumar, and J.S. Carroll, *Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor α function in breast cancer*. *Genes Dev*, 2018. **32**(17-18): p. 1141-1154.
16. Bhat-Nakshatri, P., et al., *A single-cell atlas of the healthy breast tissues reveals clinically relevant clusters of breast epithelial cells*. *Cell Rep Med*, 2021. **2**(3): p. 100219.
17. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-752.
18. Lu, S., et al., *Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype*. 2013. **26**(4): p. 485-495.
19. Burstein, H.J., *Systemic Therapy for Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2020. **383**(26): p. 2557-2570.
20. Prat, A., et al., *Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer*. *The Breast*, 2015. **24**: p. S26-S35.
21. Moore, G., et al., *Top Notch Targeting Strategies in Cancer: A Detailed Overview of Recent Insights and Current Perspectives*. *Cells*, 2020. **9**(6).
22. Zhu, H., et al., *Correlation of Notch1, pAKT and nuclear NF- κ B expression in triple negative breast cancer*. *Am J Cancer Res*, 2013. **3**(2): p. 230-9.
23. Sharma, A., et al., *A monoclonal antibody against human Notch1 ligand-binding domain depletes subpopulation of putative breast cancer stem-like cells*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(1): p. 77-86.
24. Han, Y., D. Liu, and L. Li, *PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer*. *American journal of cancer research*, 2020. **10**(3): p. 727-742.
25. Maycotte, P., et al., *STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious*. *Cancer Res*, 2014. **74**(9): p. 2579-90.
26. Cooper, G., *Protein Degradation*, in *The Cell: A molecular approach*. 2000, Sinauer Associates.

27. Amaravadi, R.K., A.C. Kimmelman, and J. Debnath, *Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions*. *Cancer Discov*, 2019. **9**(9): p. 1167-1181.
28. Dikic, I. and Z. Elazar, *Mechanism and medical implications of mammalian autophagy*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018. **19**(6): p. 349.
29. Fujiwara, Y., et al., *Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA*. *Autophagy*, 2013. **9**(3): p. 403-409.
30. Bento, C.F., et al., *Mammalian Autophagy: How Does It Work?* *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 685-713.
31. Ravikumar, B., et al., *Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(4): p. 1383-435.
32. Kuma, A., et al., *The role of autophagy during the early neonatal starvation period*. *Nature*, 2004. **432**(7020): p. 1032-1036.
33. Yoshii, S.R., et al., *Systemic Analysis of Atg5-Null Mice Rescued from Neonatal Lethality by Transgenic ATG5 Expression in Neurons*. *Dev Cell*, 2016. **39**(1): p. 116-130.
34. Karsli-Uzunbas, G., et al., *Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(8): p. 914-27.
35. Jung, C.H., et al., *mTOR regulation of autophagy*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(7): p. 1287-95.
36. Wirth, M., et al., *Molecular determinants regulating selective binding of autophagy adapters and receptors to ATG8 proteins*. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 2055.
37. Komatsu, M., et al., *The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(3): p. 213-23.
38. Wei, H., et al., *p62/SQSTM1 synergizes with autophagy for tumor growth in vivo*. *Genes Dev*, 2014. **1**(28): p. 1204-1216.
39. Lamark, T., S. Svenning, and T. Johansen, *Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm*. *Essays Biochem*, 2017. **61**(6): p. 609-624.
40. Qiang, L., et al., *Regulation of cell proliferation and migration by p62 through stabilization of Twist1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(25): p. 9241-6.
41. Mizushima, N. and T. Yoshimori, *How to Interpret LC3 Immunoblotting*. *Autophagy*, 2007. **3**(6): p. 542-545.
42. Maiuri, M.C. and G. Kroemer, *Therapeutic modulation of autophagy: which disease comes first?* *Cell Death Differ*, 2019. **26**(4): p. 680-689.
43. Mulcahy Levy, J.M. and A. Thorburn, *Autophagy in cancer: moving from understanding mechanism to improving therapy responses in patients*. *Cell Death Differ*, 2020. **27**(3): p. 843-857.
44. Rojas-Sanchez, G., et al., *Autophagy and Its Relationship to Epithelial to Mesenchymal Transition: When Autophagy Inhibition for Cancer Therapy Turns Counterproductive*. *Biology (Basel)*, 2019. **8**(4).
45. Myers, S., *Zinc Transporters and Zinc Signaling: New Insights into Their Role in Type 2 Diabetes*. *Int. Jour. of Endocrin.*, 2015. **2015**(167503): p. 1-7.
46. Qu, X., et al., *Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1809-20.
47. Takamura, A., et al., *Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors*. *Genes Dev*, 2011. **25**(8): p. 795-800.
48. Guo, J.Y., et al., *Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis*. *Genes Dev*, 2013. **27**(13): p. 1447-61.
49. Balvan, J., et al., *Oxidative Stress Resistance in Metastatic Prostate Cancer: Renewal by Self-Eating*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0145016.

50. Karantza-Wadsworth, V., et al., *Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2007. **21**(13): p. 1621-35.
51. Fung, C., et al., *Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(3): p. 797-806.
52. Hu, Y.L., et al., *Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma*. *Cancer Res*, 2012. **72**(7): p. 1773-83.
53. Bousquet, G., et al., *Targeting autophagic cancer stem-cells to reverse chemoresistance in human triple negative breast cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(21): p. 35205-35221.
54. Towers, C.G., D. Wodetzki, and A. Thorburn, *Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations*. *The Journal of Cell Biology*, 2019: p. jcb.201909033.
55. Kinsey, C.G., et al., *Protective autophagy elicited by RAF-->MEK-->ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers*. *Nat Med*, 2019. **25**(4): p. 620-627.
56. Mulcahy Levy, J.M., et al., *Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors*. 2017. **6**.
57. Marino, M.L., et al., *Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(36): p. 30664-76.
58. Zou, Y., et al., *The autophagy inhibitor chloroquine overcomes the innate resistance of wild-type EGFR non-small-cell lung cancer cells to erlotinib*. *J Thorac Oncol*, 2013. **8**(6): p. 693-702.
59. Selvakumaran, M., et al., *Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(11): p. 2995-3007.
60. Kinsey, C.G., et al., *Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers*. *Nat Med*, 2019. **25**(4): p. 620-627.
61. Mulcahy Levy, J.M., et al., *Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors*. *Elife*, 2017. **6**.
62. Levy, J.M., et al., *Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF(V600E) brain tumors*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(7): p. 773-80.
63. Zahedi, S., et al., *Effect of early-stage autophagy inhibition in BRAF(V600E) autophagy-dependent brain tumor cells*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(9): p. 679.
64. Maycotte, P., et al., *Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion*. *Mol Cancer Res*, 2015. **13**(4): p. 651-8.
65. Halcrow, P.W., J.D. Geiger, and X. Chen, *Overcoming Chemoresistance: Altering pH of Cellular Compartments by Chloroquine and Hydroxychloroquine*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 627639.
66. Qu, X., et al., *Autophagy inhibitor chloroquine increases sensitivity to cisplatin in QBC939 cholangiocarcinoma cells by mitochondrial ROS*. *PLOS ONE*, 2017. **12**(3): p. e0173712.
67. Herrera-Camacho, I., et al., *Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from Schizosaccharomyces pombe*. *Febs j*, 2007. **274**(23): p. 6228-40.
68. Yang, S., et al., *NF-κB Signaling Activation Induced by Chloroquine Requires Autophagosome, p62 Protein, and c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling and Promotes Tumor Cell Resistance*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(8): p. 3379-3388.
69. Barlowe, C.K. and E.A. Miller, *Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway*. *Genetics*, 2013. **193**(2): p. 383-410.
70. Cotzomi-Ortega, I., et al., *Autophagy and Its Role in Protein Secretion: Implications for Cancer Therapy*. *Mediators Inflamm*, 2018. **2018**.

71. Dupont, N., et al., *Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1β*. EMBO J, 2011. **30**(23): p. 4701-11.
72. Cotzomi-Ortega, I., et al., *Autophagy inhibition in breast cancer cells induces ROS-mediated MIF expression and M1 macrophage polarization*. Cell Signal, 2021. **86**: p. 110075.
73. Lee, J.P., et al., *Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages*. Autophagy, 2016. **12**(6): p. 907-16.
74. Dai, J., et al., *Autophagy Inhibition Contributes to ROS-Producing NLRP3-Dependent Inflammasome Activation and Cytokine Secretion in High Glucose-Induced Macrophages*. Cell Physiol Biochem, 2017. **43**(1): p. 247-256.
75. Lock, R., et al., *Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion*. Cancer Discov, 2014. **4**(4): p. 466-79.
76. Sullivan, N., et al., *Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells*. Oncogene, 2009. **28**(33): p. 2940-7.
77. Xie, G., et al., *IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures*. Int J Oncol, 2012. **40**(4): p. 1171-9.
78. Gyamfi, J., et al., *Multifaceted Roles of Interleukin-6 in Adipocyte–Breast Cancer Cell Interaction*. Transl Oncol, 2018. **11**(2): p. 275-85.
79. Walter, M., et al., *Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells*. Oncogene, 2009. **28**(30): p. 2745-55.
80. Cotzomi-Ortega, I., et al., *Autophagy Inhibition Induces the Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) with Autocrine and Paracrine Effects on the Promotion of Malignancy in Breast Cancer*. Biology, 2020. **9**(1): p. 20.
81. Bloom, B.R. and B. Bennett, *Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity*. Science, 1966. **153**(3731): p. 80-2.
82. Bucala, R. and S.C. Donnelly, *Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 281-5.
83. Kim, K.W. and H.R. Kim, *Macrophage migration inhibitory factor: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis*. Korean J Intern Med, 2016. **31**(4): p. 634-42.
84. Lang, T., et al., *MIF: Implications in the Pathoetiology of Systemic Lupus Erythematosus*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 577.
85. Toldi, J., et al., *Macrophage migration inhibitory factor as a diagnostic and predictive biomarker in sepsis: meta-analysis of clinical trials*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 8051.
86. de Jong, Y.P., et al., *Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF*. Nature Immunology, 2001. **2**(11): p. 1061-1066.
87. Richard, V., N. Kindt, and S. Saussez, *Macrophage migration inhibitory factor involvement in breast cancer (Review)*. Int J Oncol, 2015. **47**(5): p. 1627-33.
88. He, X.X., et al., *Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer*. Mol Med, 2009. **15**(1-2): p. 1-10.
89. Gámez-Pozo, A., et al., *PTRF/cavin-1 and MIF proteins are identified as non-small cell lung cancer biomarkers by label-free proteomics*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33752.
90. Soumoy, L., et al., *Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Melanoma*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
91. Arenberg, D., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent induction of angiogenic CXC chemokines in an animal model of NSCLC*. Cancer Research, 2005. **65**(9 Supplement): p. 1099.

92. Balogh, K.N., D.J. Templeton, and J.V. Cross, *Macrophage Migration Inhibitory Factor protects cancer cells from immunogenic cell death and impairs anti-tumor immune responses*. PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0197702.
93. Brock, S.E., et al., *MIF family members cooperatively inhibit p53 expression and activity*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99795.
94. Funamizu, N., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induces epithelial to mesenchymal transition, enhances tumor aggressiveness and predicts clinical outcome in resected pancreatic ductal adenocarcinoma*. Int J Cancer, 2013. **132**(4): p. 785-94.
95. Jäger, B., et al., *CXCR4/MIF axis amplifies tumor growth and epithelial-mesenchymal interaction in non-small cell lung cancer*. Cellular Signalling, 2020. **73**: p. 109672.
96. Merk, M., et al., *The Golgi-associated Protein p115 Mediates the Secretion of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6896-906.
97. Flieger, O., et al., *Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter*. FEBS Lett, 2003. **551**(1-3): p. 78-86.
98. Jankauskas, S.S., et al., *Evolving complexity of MIF signaling*. Cellular Signalling, 2019. **57**: p. 76-88.
99. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
100. Kim, M.J., et al., *Macrophage migration inhibitory factor interacts with thioredoxin-interacting protein and induces NF-κB activity*. Cellular Signalling, 2017. **34**: p. 110-120.
101. Zhang, M., L. Yan, and J.A. Kim, *Modulating mammary tumor growth, metastasis and immunosuppression by siRNA-induced MIF reduction in tumor microenvironment*. Cancer Gene Therapy, 2015. **22**(10): p. 463-474.
102. Dillekås, H., M.S. Rogers, and O. Straume, *Are 90% of deaths from cancer caused by metastases?* Cancer Med, 2019. **8**(12): p. 5574-5576.
103. Suarez-Carmona, M., et al., *EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression*. Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 805-823.
104. Acloque, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1438-49.
105. Huang, J., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review)*. International Journal of Oncology, 2018. **47**(3): p. 840-848.
106. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
107. Kim, D.H., et al., *Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview*. J Clin Med, 2017. **7**(1).
108. Zeineddine, D., et al., *The Oct4 protein: more than a magic stemness marker*. Am J Stem Cells, 2014. **3**(2): p. 74-82.
109. Xu, S., et al., *Expression of Twist, Slug and Snail in esophageal squamous cell carcinoma and their prognostic significance*. Oncol Lett, 2021. **21**(3): p. 184.
110. Tian, Y., et al., *Combined Snail and E-cadherin Predicts Overall Survival of Cervical Carcinoma Patients: Comparison Among Various Epithelial-Mesenchymal Transition Proteins*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 22.
111. Zhao, X.H., et al., *Molecular detection of epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells from pancreatic cancer patients: Potential role in clinical practice*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(1): p. 138-50.

112. van Nes, J.G., et al., *Co-expression of SNAIL and TWIST determines prognosis in estrogen receptor-positive early breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **133**(1): p. 49-59.
113. Leptin, M., *twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development*. *Genes Dev*, 1991. **5**(9): p. 1568-76.
114. Wang, Y., et al., *The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013. **13**(9): p. 963-72.
115. Olmeda, D., et al., *SNAIL1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(24): p. 11721-31.
116. Kajita, M., K.N. McClinic, and P.A. Wade, *Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(17): p. 7559-66.
117. Kurrey, N.K., et al., *Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(9): p. 2059-68.
118. Li, Y., et al., *Slug contributes to cancer progression by direct regulation of ERalpha signaling pathway*. *Int J Oncol*, 2015. **46**(4): p. 1461-72.
119. Gao, J., et al., *TGF-β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells*. *Cancer Cell Int*, 2014. **14**(1): p. 72.
120. Yu, Q., et al., *Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010. **29**(1): p. 119.
121. Wang, Y., et al., *Critical role for transcriptional repressor Snail2 in transformation by oncogenic RAS in colorectal carcinoma cells*. *Oncogene*, 2010. **29**(33): p. 4658-70.
122. Barrallo-Gimeno, A. and M.A. Nieto, *The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer*. *Development*, 2005. **132**(14): p. 3151-61.
123. Zhang, K., et al., *The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis*. *Nature Cell Biology*, 2013. **15**(6): p. 677-687.
124. Thisse, B., et al., *Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos*. *Embo j*, 1988. **7**(7): p. 2175-83.
125. M, et al., *EMT: 2016*. *Cell*, 2016. **166**(1): p. 21-45.
126. Hong, J., et al., *Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness*. *Cancer Res*, 2011. **71**(11): p. 3980-90.
127. Sarmiento-Salinas, F.L., et al., *Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression*. *Life Sci*, 2021. **284**: p. 119942.
128. Zhang, J., et al., *ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**.
129. Hayes, J.D., A.T. Dinkova-Kostova, and K.D. Tew, *Oxidative Stress in Cancer*. *Cancer Cell*, 2020. **38**(2): p. 167-197.
130. Chatterjee, R. and J. Chatterjee, *ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness*. *European Journal of Cell Biology*, 2020. **99**(2): p. 151073.
131. Lee, S.Y., et al., *Reactive oxygen species induce epithelial-mesenchymal transition, glycolytic switch, and mitochondrial repression through the Dlx-2/Snail signaling pathways in MCF-7 cells*. *Mol Med Rep*, 2019. **20**(3): p. 2339-2346.
132. Dong, R., et al., *Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells*. *Braz J Med Biol Res*, 2007. **40**(8): p. 1071-8.

133. Ranneh, Y., et al., *Crosstalk between reactive oxygen species and pro-inflammatory markers in developing various chronic diseases: a review*. Applied Biological Chemistry, 2017. **60**(3): p. 327-338.
134. DeNicola, G.M., et al., *Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 106-9.
135. Aiello, N.M., et al., *EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration*. Dev Cell, 2018. **45**(6): p. 681-695.e4.
136. Jolly, M.K., et al., *Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 155.
137. Sung, C.O., C.K. Park, and S.H. Kim, *Classification of epithelial-mesenchymal transition phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma is strongly associated with patient prognosis*. Mod Pathol, 2011. **24**(8): p. 1060-8.
138. Bae, Y.K., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype Is Associated with Clinicopathological Factors That Indicate Aggressive Biological Behavior and Poor Clinical Outcomes in Invasive Breast Cancer*. J Breast Cancer, 2015. **18**(3): p. 256-63.
139. Qi, L.N., et al., *Circulating Tumor Cells Undergoing EMT Provide a Metric for Diagnosis and Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma*. Cancer Res, 2018. **78**(16): p. 4731-4744.
140. Chude, C.I. and R.K. Amaravadi, *Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
141. Qu, Y., et al., *Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7).
142. Dai, X., et al., *Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping*. J Cancer, 2017. **8**(16): p. 3131-41.
143. Fabregat, A., et al., *The Reactome Pathway Knowledgebase*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D649-d655.
144. Albino, D., et al., *ESE3/EHF controls epithelial cell differentiation and its loss leads to prostate tumors with mesenchymal and stem-like features*. Cancer Res, 2012. **72**(11): p. 2889-900.
145. Zauli, G., et al., *Role of full-length osteoprotegerin in tumor cell biology*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(5): p. 841-851.
146. Simard, J.C., et al., *S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF- κ B(1.)*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72138.
147. Yang, Z., et al., *Analysis of risk factors for colon cancer progression*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 3991-4000.
148. Park, J., et al., *Chloroquine induces activation of nuclear factor-kappaB and subsequent expression of pro-inflammatory cytokines by human astroglial cells*. J Neurochem, 2003. **84**(6): p. 1266-74.
149. Yang, S., et al., *NF- κ B Signaling Activation Induced by Chloroquine Requires Autophagosome, p62 Protein, and c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling and Promotes Tumor Cell Resistance*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(8): p. 3379-3388.
150. Tian, A.-L., et al., *Lysosomotropic agents including azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine activate the integrated stress response*. Cell Death & Disease, 2021. **12**(1): p. 6.
151. Yang, J., et al., *Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020.
152. Pedre, B., et al., *The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species*. Pharmacology & Therapeutics, 2021. **228**: p. 107916.

153. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(1-2): p. 1-12.
154. Qian, M., X. Fang, and X. Wang, *Autophagy and inflammation*. Clin Transl Med, 2017. **6**.
155. Wang, L., X. Ye, and T. Zhao, *The physiological roles of autophagy in the mammalian life cycle*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2019. **94**(2): p. 503-516.
156. Marinković, M., et al., *Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018. **8023821**: p. 18.
157. Foth, M. and M. McMahon, *Autophagy Inhibition in BRAF-Driven Cancers*. Cancers, 2021. **13**(14).
158. Taher, M.Y., D.M. Davies, and J. Maher, *The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer*. Biochem Soc Trans, 2018. **46**(6): p. 1449-1462.
159. Verbaanderd, C., et al., *Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents*. Ecancermedicallscience, 2017. **11**: p. 781.
160. Maycotte, P., et al., *Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(2): p. 200–212.
161. Batlle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
162. Qin, W., et al., *Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells*. Oncotarget, 2015. **6**(37): p. 39839-54.
163. Sundling, K.E. and A.C. Lowe, *Circulating Tumor Cells: Overview and Opportunities in Cytology*. Adv Anat Pathol, 2019. **26**(1): p. 56-63.
164. Berx, G. and F.V. Roy, *The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression*. Breast Cancer Research, 2001. **3**(5): p. 289.
165. Bhatia, S., et al., *New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 71.
166. Lauzier, A., et al., *Colorectal cancer cells respond differentially to autophagy inhibition in vivo*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 11316.
167. Towers, C.G., et al., *Cancer Cells Upregulate NRF2 Signaling to Adapt to Autophagy Inhibition*. Dev Cell, 2019. **50**(6): p. 690-703.e6.
168. Singh, A. and J. Settleman, *EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer*. Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4741-4751.
169. Guo, W., et al., *Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state*. Cell, 2012. **148**(5): p. 1015-28.
170. Lambert, A.W. and R.A. Weinberg, *Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells*. Nature Reviews Cancer, 2021.
171. Fischer, K.R., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 472-6.
172. Zheng, X., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 525-530.
173. Jolly, M.K., et al., *Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas*. Pharmacol Ther, 2019. **194**: p. 161-184.
174. Xu, D., et al., *PD-L1 Expression Is Regulated By NF-κB During EMT Signaling In Gastric Carcinoma*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 10099-10105.
175. Sulaiman, A., Z. Yao, and L. Wang, *Re-evaluating the role of epithelial-mesenchymal-transition in cancer progression*. J Biomed Res, 2018. **32**(2): p. 81-90.
176. Jechlinger, M., et al., *Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression*. Oncogene, 2003. **22**(46): p. 7155-69.

177. Huber, M.A., et al., *NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 569-81.
178. Dhasarathy, A., et al., *The Transcription Factors Snail and Slug Activate the Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway in Breast Cancer*. PLOS ONE, 2011. **6**(10): p. e26514.
179. Prasad, C.P., et al., *Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3 β in invasive ductal carcinoma of breast*. BMC Cancer, 2009. **9**(1): p. 325.
180. Yang, M.H., et al., *Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2009. **50**(5): p. 1464-74.
181. Sistigu, A., et al., *Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting*. Cytokine Growth Factor Rev, 2017. **36**: p. 67-77.
182. Sarmiento-Salinas, F.L., et al., *Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 480.
183. Katewa, S.D. and S.S. Katyare, *Treatment with antimalarials adversely affects the oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria*. Drug Chem Toxicol, 2004. **27**(1): p. 41-53.
184. Mauthe, M., et al., *Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion*. Autophagy, 2018. **14**(8): p. 1435-1455.
185. Browning, D.J., *Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine, in Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*. 2014, © Springer Science+Business Media New York 2014. p. 35-63.
186. Chadwick, S.R. and P. Lajoie, *Endoplasmic Reticulum Stress Coping Mechanisms and Lifespan Regulation in Health and Diseases*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 84.
187. Giampietri, C., et al., *Cancer Microenvironment and Endoplasmic Reticulum Stress Response. Mediators of Inflammation*, 2015. **2015**: p. 417281.
188. Almanza, A., et al., *Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications*. Febs j, 2019. **286**(2): p. 241-278.
189. Jia, B., et al., *Autophagy inhibitor chloroquine induces apoptosis of cholangiocarcinoma cells via endoplasmic reticulum stress*. Oncol Lett, 2018. **16**(3): p. 3509-3516.
190. Peng, T.I. and M.J. Jou, *Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1201**: p. 183-8.
191. Norgard, R.J., et al., *Calcium signaling induces a partial EMT*. EMBO Rep, 2021. **22**(9): p. e51872.
192. Kondapuram, S.K., S. Sarvagalla, and M.S. Coumar, *Targeting autophagy with small molecules for cancer therapy*. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 2019. **5**: p. 32.
193. Charan, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor inhibition as a novel therapeutic approach against triple-negative breast cancer*. Cell Death Dis, 2020. **11**(9): p. 774.
194. Onorati, A.V., et al., *Targeting autophagy in cancer*. Cancer, 2018. **124**(16): p. 3307-3318.