



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE
QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS
Posgrado en Ciencias Químicas**

**“Papel del estado oxidativo sobre las características
asociadas a troncalidad en líneas celulares de cáncer
de mama”**

TESIS

presentada para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias Químicas
en el área de Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

IBT Andrea Pérez González

Directores de tesis

Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca
Departamento de Farmacia, FCQ BUAP

Dra. Paola Maycotte González
CONACYT- Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS

Diciembre, 2020

APOYOS ECONÓMICOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Celular II del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), HGZ 5 Metepec Unidades Médicas. Para la realización de este proyecto de investigación contamos con el financiamiento de los siguientes programas:

CONACYT Ciencia Básica No. 258123.

Fondos IMSS R-2015-785-069 FIS/IMSS/PRI0/15/049.

CONACYT: Becario CONACYT por 2 años (01/08/2018-31/07/2020), No. 840495

IMSS: Becario de investigación tipo I, No. 97222358



DEDICATORIA

*A mis padres, por ser el reflejo del amor incondicional que recibo de
Dios todos los días.*

*A mi hermana, por ser mi ejemplo de inteligencia y entereza en
cualquier circunstancia.*

A mi familia por creer siempre en mí, a veces más que yo misma.

*Al Pbro. Fernando Mellado, “mi padre Fer” porque sé que desde el
cielo siempre pidió por mí para nunca rendirme.*

*A mis profesores, quienes me han inculcado la curiosidad y amor por
el conocimiento*

*A mis amigos y amigas que son regalos, aprendizajes y experiencias
que Dios ha puesto en mi camino para valorar y disfrutar más la vida.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias,

A Dios por el don de la vida, por mis talentos que con amor y esmero pongo al servicio de mis hermanos. Gracias por guiarme e iluminarme en los momentos más críticos, gracias Señor por toda tu sabiduría (“Te basta mi gracia” 2 Corintios 12, 9)

A mis padres por cuidarme y brindarme todo su amor y apoyo incondicional, por hacer de mí una persona íntegra, y por ser mi ejemplo de responsabilidad y compromiso en mi trabajo

A mi mamá, por sus consejos, por su fortaleza, por ser mi ejemplo de “mujer” de lucha, perseverancia, dedicación y generosidad, siempre has sido mi principal inspiración para nunca conformarme, siempre procurando ser una mejor hija, hermana, profesionalista y ciudadana. Gracias mamá por custodiar mis proyectos y sueños, por creer en mí, te amo y admiro para toda la vida.

A mis directores de tesis, Dra. Paola y Dr. Alfonso, gracias por sus consejos, apoyo, exigencias, profesionalismo y entrega que me motivaron a dar y hacer lo mejor en mi proyecto.

A mis sinodales, Dr. Samuel y Dr. Marco por sus contribuciones y críticas hacia mi trabajo, sus perspectivas y opiniones fueron un gran reto para mí, pero a la vez fue una distinción poder escucharlas y aprender de su capacidad de análisis.

A mis profesores, Dra. Nora, Dr. Brambila, Dra. Irma, Dra. Lulú por todo el conocimiento compartido, y por ser una inspiración y ejemplo de pasión y entrega a la ciencia, me llevo todo lo valioso de sus clases

A Gaby, por ser más que una amiga, una hermana. Por tu fidelidad y lealtad, por cumplir tu promesa de siempre contar la una con la otra, gracias por acompañarme en cada paso, gracias por tus consejos, tu escucha, tu comprensión, por seguir compartiendo todos mis logros, por tener siempre las palabras que sanan mi corazón y alma, en fin, por ser un ángel en mi vida.

A mis amigos de maestría Adi, Hugo, Ivonne y Estefi, se han quedado para siempre en mi corazón, gracias por todo lo que aprendí a nivel personal de ustedes, por ser mis compañeros de lucha en este juego de resistencia, por todos los momentos divertidos, risas, “nuestras escapadas”, las clases no hubieran sido lo mismo sin ustedes, son los mejores amigos que pude encontrar en esta etapa de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, Adi por tu generosidad, inocencia y por contagiarme con tu alegría y entusiasmo; a Lili, Benito e Isra, gracias por su paciencia y vocación para enseñarme. Los admiro por todo el esfuerzo que han realizado para llegar hasta donde están, gracias por tantos aprendizajes en lo profesional y personal. Gracias por brindarme su amistad y por todos los momentos compartidos.

A Dalia, Rubí. Aurora por su apoyo en las sesiones de citometría de flujo, aprender de ustedes fue un privilegio; y a Evoli, gracias por todo su apoyo durante mi proyecto, ya que siendo tan jóvenes fueron un ejemplo para mí de generosidad y dedicación para motivarme a dejar una huella indeleble en la ciencia

Papel del estado oxidativo sobre las características asociadas a troncalidad en líneas celulares de cáncer de mama

RESUMEN. Las especies reactivas de oxígeno (EROs) están implicadas en la transformación celular, a través de la activación de vías de señalización de proliferación y supervivencia celular en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama. En México y en el mundo, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres y, a pesar de los avances en los tratamientos dirigidos, la tasa de mortalidad ha aumentado en los últimos años. En tumores primarios y líneas celulares de cáncer de mama se han identificado una pequeña población dentro del tumor, definida como células troncales de cáncer de mama (BCSC) a la cual se le atribuye la recurrencia y mal pronóstico después del tratamiento en pacientes. También, a las BCSC se les asocia con un estado de bajos niveles de EROs, sin embargo, aún no está clara la relación entre el nivel de EROs, la supervivencia celular y el mantenimiento de la población tipo troncal en los distintos subtipos de cáncer de mama. En este trabajo, se determinaron los cambios en la frecuencia relativa media de poblaciones de altos (“ROS High”) y bajos (“ROS Low”) niveles de EROs con y sin antioxidantes: N-acetil cisteína (NAC), Difenileno yodonio (DPI) y Mitotempo (Mito), por citometría de flujo. Después, se evaluó el efecto de los mismos tratamientos antioxidantes en la viabilidad celular (proliferación y muerte celular) y se analizó la relación entre las poblaciones “ROS High” y “ROS Low” con el nivel de marcadores asociados a troncalidad CD44/CD24 por citometría de flujo. Nuestros resultados sugieren que tanto la NOX como la mitocondria participan en la producción de EROs en las líneas celulares estudiadas, donde la principal fuente de EROs en la MCF7 (Luminal ER+) es la NOX y en las líneas celulares MDAMB468 (TN) y MDAMB231 (TN), tanto la NOX como la mitocondria contribuyeron de manera similar a la producción de EROs. En todas las líneas celulares evaluadas, el NAC disminuyó la proliferación y viabilidad celular. El tratamiento con Mito mostró que en las líneas celulares MCF7, MDAMB231 y BT549, las EROs mitocondriales tienen un papel importante en la proliferación celular. En cuanto a la población troncal, nuestros datos no sugieren que la población CD44⁺/CD24^{-low} en líneas celulares de cáncer de mama tenga niveles más bajos de EROs que el total de la población celular, pero sí encontramos una posible asociación con los marcadores CD24 y CD44 de manera individual. Al respecto, en todas las líneas celulares estudiadas se encontraron poblaciones con altos niveles de CD44 y altos niveles de EROs, así como, poblaciones con niveles más bajos de EROs que el total de la población celular con bajos niveles de CD44, particularmente para las células del subtipo TN. Así mismo, en tres de las cuatro líneas celulares estudiadas, los niveles de CD24 correlacionaron con altos y bajos niveles de EROs. Estos datos sugieren en las líneas celulares estudiadas una relación de CD44 y CD24 con los niveles de EROs y una posible relación, particularmente de CD44 con el sistema antioxidante celular.

PALABRAS CLAVE: cáncer de mama, EROs, BCSC, antioxidantes, troncalidad, CD44, CD24

Role of oxidative state on stemness-associated features in breast cancer cell lines

ABSTRACT: Reactive oxygen species (ROS) have been related to cell transformation, through the activation of cell proliferation and survival signaling pathways in different types of cancer, including breast cancer. In Mexico and worldwide, breast cancer is the leading cause of death from malignant tumors in women and, despite advances in targeted treatments, the mortality rate has increased in recent years. Several studies in primary tumors and breast cancer cell lines have identified a small cell population within the tumor defined as breast cancer stem cells (BCSC), to which recurrence and poor prognosis in patients has been attributed. Also, BCSC have been associated with low levels of ROS. However, the relationship between ROS levels, cell survival and the maintenance of the stem-like population in breast cancer subtypes has not been clearly defined. In this work, we determined the changes in the mean relative frequency (MRF) of populations with high (“ROS High”) and low (“ROS Low”) ROS levels with and without antioxidants: N-acetyl cysteine (NAC), Diphenylene iodonium (DPI) and Mitotempo (Mito) by flow cytometry. Then, we evaluated the effect of antioxidant treatment on cell proliferation and cell death) and we analyzed the relationship between “ROS High” and “ROS Low” subpopulations with the stemness associated markers CD44 and CD24 by flow cytometry. Our results suggest that the both NOX and mitochondria contribute to ROS production in the breast cancer cell lines studied, being NOX the main ROS source in the MCF7 cell line (Luminal ER+), while in MDAMB468 (TN) and MDAMB231 (TN) both NOX and mitochondria contribute similarly to ROS production. In all the cell lines evaluated, NAC decreased cell proliferation and viability. Likewise, treatment with Mito showed that in MCF7, MDAMB231 and BT549 cell lines, mitochondrial ROS have an important role in cell proliferation. Our data does not suggest that BCSC when evaluated as the CD44⁺/CD24^{-/low} population in breast cancer cell lines has ROS low levels when compared to the bulk of cells. However, we found an association of CD24 and CD44 with ROS levels individually. We found in all the cell lines studied that the “ROS High” population had high CD44 levels. Also, “ROS Low” populations had low CD44 levels, particularly for TN cell lines. Likewise, in three of the four cell lines studied, CD24 levels correlated with high and low ROS levels. These data suggest a relationship between CD44 and CD24 with ROS levels in the breast cancer cell lines studied, and a possible relationship, particularly for CD44 with the cellular antioxidant system.

KEY WORDS: Breast cancer, ROS, BCSC, antioxidants, stemness, CD44, CD24

ÍNDICE

CAPÍTULO I	13
1.MARCO TEÓRICO	14
1.1 INTRODUCCIÓN.....	14
1.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)	15
1.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE	17
1.4 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE EROs	17
1.5 FUENTES DE GENERACIÓN DE EROs	18
1.5.1 Mitocondria.....	19
1.5.2 NOX.....	21
1.5.3 Fuentes adicionales de EROs	23
1.6 ANTIOXIDANTES EXÓGENOS.....	25
1.7 EROs Y SEÑALIZACIÓN REDOX FISIOLÓGICA	27
1.8 EROs Y SEÑALIZACIÓN REDOX EN CÁNCER.....	29
1.8.1 Vía de las MAPK	29
1.8.2 Vía de PI3K/AKT1	31
1.8.3 Vía de NF- κ B.....	31
1.8.4 Proteína supresora de tumores p53.....	32
1.8.5 Factor nuclear eritroide 2 tipo 2 (NRF2)	33
1.8.6 Factor inducible de hipoxia (HIF1)	34
1.9 MITOCONDRIA Y NOX EN CÁNCER.....	35
1.10 CÁNCER DE MAMA	36
1.10.1 Etiología.....	37
1.10.2 Estadios.....	37
1.10.3 Clasificación de cáncer de mama.....	39
1.11 CÉLULAS TRONCALES TUMORALES (CSC).....	42
1.11.1 Métodos de detección de las BCSC.....	44
1.11.2 Marcadores asociados a troncalidad en cáncer de mama	47
1.11.2.1 CD44	47
1.11.2.2 CD24	49
1.11.2.3 Aldehído deshidrogenasa (ALDH).....	51
1.12 EROs Y TRONCALIDAD.....	54
1.13 EROs Y BCSC.....	55
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	58
3. JUSTIFICACIÓN	60
4. HIPÓTESIS	61
5. OBJETIVOS	61
CAPÍTULO II	62
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	63
7. METODOLOGÍA	63
7.1 Líneas y medios de cultivo celulares	63
7.2 Determinación de EROs por tinción con DHE y citometría de flujo.....	64
7.3 Evaluación de la proliferación y muerte celular.....	66
7.4 Evaluación de los marcadores asociados a troncalidad CD44 y CD24 por citometría de flujo	66
CAPÍTULO III	68
8. RESULTADOS	69

9. DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO IV	90
10. CONCLUSIONES	91
10.1 <i>Perspectivas</i>	91
11. REFERENCIAS	92
12. ANEXOS	102
12.1 <i>ANEXO I</i>	102
12.2 <i>ANEXO II</i>	103
12.3 <i>ANEXO III</i>	106
12.4 <i>ANEXO IV</i>	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios de cáncer de mama	38
Tabla 2. Clasificación molecular de cáncer de mama	40
Tabla 3. Clasificación de cáncer de mama y su aproximación por inmunohistoquímica	42
Tabla 4. Características de las líneas celulares de cáncer de mama	103
Tabla 5. Clasificación por inmunohistoquímica y molecular aproximada de las líneas celulares de cáncer de mama	103
Tabla 6. Propiedades de los fluoróforos seleccionados para determinar los marcadores asociados a troncalidad CD44 y CD24	109

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Gráfica 1. Poblaciones de niveles altos (“ROS High”) y bajos (“ROS Low”) de EROs basales por citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de mama.	70
Gráfica 2. Los tratamientos antioxidantes dirigidos a EROs totales (NAC), EROs provenientes de la NOX (DPI) y EROs mitocondriales (Mito) modifican las poblaciones “ROS High” y ROS Low” de manera diferencial en las líneas celulares de cáncer de mama.	72
Gráfica 3. Los tratamientos antioxidantes dirigidos a eros totales (NAC) y mitocondriales (Mito) disminuyen la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de mama.	73
Gráfica 4. El tratamiento antioxidante dirigido a EROs totales (NAC) induce muerte celular en las líneas celulares de cáncer de mama.	74
Gráfica 5. Poblaciones definidas por el nivel de CD44-V540/CD24-PE en las líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos moleculares.	76
Gráfica 6. La población “ROS Low” no corresponde a un fenotipo CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} en las líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a los diferentes subtipos moleculares	77
Gráfica 7. Análisis de las poblaciones “ROS High” y “ROS Low” con respecto a los niveles de CD44 (a) y CD24 (b) en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad	78

Figura 1. Producción de eros (O_2^- y H_2O_2) por la CTE mitocondrial	20
Figura 2. Esquema general de las NOX en membranas	22
Figura 3. Antioxidantes exógenos	27
Figura 4. Cáncer de mama. Modificado de www.nationalbreastcancer.org	37
Figura 5. CSC en las neoplasias malignas humanas	43
Figura 6. Marcadores asociados a troncalidad en líneas celulares de cáncer de mama.....	45
Figura 7. Estructura del gen y proteína de CD44	49
Figura 8. Modelo molecular de CD24	51
Figura 9. Papel del aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) en células troncales tumorales (CSC).....	53
Figura 10. Diagrama general de trabajo.....	63
Figura 11. Formación del producto 2-hidroxietidio (2-OH-E+) mediante la reacción del DHE con el O_2^-	105
Figura 12. Definición de poblaciones celulares de niveles altos (“ROS High”) y bajos de (“ROS Low”) de EROs por citometría de flujo, en las líneas celulares de cáncer de mama.....	106
Figura 13. Análisis de viabilidad celular por captación de imágenes en el sistema de microscopia en tiempo real “Incucyte ZOOM”.....	108
Figura 14. Asignación de “gates” mediante lo controles fluorescencia menos uno (FMOs), en poblaciones celulares seleccionadas de acuerdo al nivel de CD44-V450/ CD24-pe y de EROs (DHE), en líneas celulares de cáncer de mama, por citometría de flujo	110

ABREVIATURAS

ABC: casete de unión a ATP
ADN: ácido desoxirribonucleico
AKR1C1: aldoceto reductasa 1C1
AKT1: serina/treonina cinasa 1/ proteína cinasa B
ALDH1: aldehído deshidrogenasa 1
ARN: ácido ribonucleico
ASK1: MAP3K5/MAPKKK5 proteína cinasa de la cinasa de la cinasa activada por mitógeno/ cinasa regulada por señal de apoptosis 1
ATM: serina treonina cinasa/ proteína mutada de ataxia-telangiectasia
ATP: adenosina trifosfato
BAD: agonista de la muerte celular asociado a BCL2
BAX: BCL2 asociado X
BCL2: familia de proteínas de linfoma de células B 2
BCLXL: BCL2L1 familia de proteínas de linfoma de células B 2 proteína tipo 1
BCSC: células troncales de cáncer de mama
BIM: BCL2L11 BCL2 tipo 11
BRCA1: proteína susceptible a cáncer de mama tipo 1
BRCA2: proteína susceptible a cáncer de mama tipo 2
CAT: catalasa
COX: PTGS prostaglandina endoperóxido sintasa/ ciclo-oxigenasas
CSC: células troncales de cáncer
Cys: cisteína
CTE: cadena de transporte de electrones
DPI: Difenileno yodonio
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER: ESR1 receptor de estrógenos
ERK: MAPK3 proteína cinasa activada por mitógeno/cinasa regulada por señal extracelular
ERN: especies reactivas de nitrógeno
EROs: especies reactivas oxígeno
ESC: células troncales embrionarias

FAD: flavin adenin dinucleótido
FOXOs: factores de transcripción “*forkhead*” de caja O
GAPDH: gliceraldehído 6 fosfato deshidrogenasa
GDP: guanosina difosfato
GLUT1: SLC2A1 portador de solutos familia 2 miembro 1/ transportador de glucosa 1
GM-CS: CSF1/2 factor estimulante de colonias granulocito macrófagos
GPI: glucosil-fosfatidilinositol
GPX1: glutatión peroxidasa 1
GCLM: glutamato cisteína ligasa /gamma glutamil cisteína sintetasa/ glutatión sintetasa
GSH: glutatión reducido
GSR: glutatión reductasa
GSSG: glutatión oxidado
GST: glutatión-S-transferasa
GTP: guanosina trifosfato
HER2: ERBB2/ receptor tipo II del factor de crecimiento epidérmico humano
HGF: factor de crecimiento de hepatocito
HIF1- α : HIF1A factor inducible de hipoxia 1 subunidad alfa
HIF1- β : HIF1B factor inducible de hipoxia subunidad beta
HNE: 4-hidroxi-2-nonenal
HO1: HMOX1 hemo-oxigenasa 1
HRE: elementos de respuesta a hipoxia
HSC: células troncales hematopoyéticas
IFN- γ : Interferón γ
I- κ B: NFKBIA/NFKBIB proteínas inhibidoras de κ B
IKK: cinasas de I- κ B
JNK: cinasa de c-Jun N terminal
KEAP1: proteína 1 asociada tipo Kelch ECH
Ki67: marcador de proliferación celular
LDHA: lactato deshidrogenasa A
LOX: lipo-oxigenasas
LPS: lipopolisacárido
MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos
MDR1: ABCB1 subfamilia B casete de unión a ATP/ gen de eflujo a multifármacos

MEK: MDK/MAP2K cinasa de la cinasa activada por mitógeno/ cinasa de la cinasa ERK

Mito: Mitotempo

MSC: células troncales mesenquimales

NAC: N- acetil cisteína

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- κ B: factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de células B activadas

NOS: óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH oxidasa

NQO1: NADPH quinona deshidrogenasa 1

NRF2: NFE2L2 factor nuclear eritroide 2 tipo 2

NSC: células troncales neuronales

OCT4: POU5F1 factor de transcripción 1 dominio POU clase 5/ factor de transcripción de unión a octamero 4

ODD: dominio de degradación inducible de oxígeno

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaqueta

PDPK1: proteína cinasa 1 dependiente de 3 fosfoinositido

PDK1: cinasa de piruvato deshidrogenasa 1

PGD: fosfogluconato deshidrogenasa

PHD: EGLN1 factor 1 inducible de hipoxia de la familia egl-9/ prolilhidroxilasa

PI3K: PIK3CA subunidad alfa catalítica de cinasa de 3 fosfatidilinositol-4,5- bifosfato/ cinasa de 3-fosfatidilinositol

PKC: proteína cinasa C

POX: peroxidasa

PR: PGR receptor de progesterona

PRDX1: peroxiredoxina

PTEN: fosfatasa y homólogo de tensina

PTPN1: no receptor tipo 1 proteína tirosina fosfatasas

RAC1: Rac GTPasa

RHD: dominio de homología Rel

RTK: receptores tirosina cinasa

Ser: Serina

SOD: superóxido dismutasa

SOX2: factor de transcripción de la caja SRY-2

SRC: proto-oncogen no receptor cinasa de tirosina

SRXN1: sulfiredoxina

TN: triple negativo

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral alfa

TRX: tioredoxina

TXNRD1: tioredoxina reductasa 1

Tyr: tirosina

VHL: ubiquitina ligasa E3 von Hippel-Lindau

XOX: XDH xantina deshidrogenasa/ xantina oxidasa

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular



CAPÍTULO I

**MARCO TEÓRICO, INTRODUCCIÓN,
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS**



1. MARCO TEÓRICO

1.1 INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (EROs), incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\bullet$), se generan por la reducción parcial del oxígeno molecular (O_2) (Halliwell, 2006). A niveles fisiológicos, las EROs participan en procesos de proliferación, diferenciación, crecimiento y supervivencia celular (Sies-Jones, 2020; Ding et al., 2015; Shi et al., 2012; Trachootham et al., 2009). Estos niveles fisiológicos se han determinado experimentalmente y su concentración en células de hígado es de alrededor de 1-10 nM de H_2O_2 (Sies-Jones, 2020; Sies, 2017). Sin embargo, el desequilibrio entre la formación y eliminación de estas especies conlleva a un incremento en su concentración (>100 nM de H_2O_2 en células de hígado), que entre otros efectos desencadena la transformación celular, y por tanto se asocia a patologías como el cáncer (Sies-Jones, 2020; Sies, 2017; Shi et al., 2012; Trachootham et al., 2009). De esta forma, en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, se ha demostrado que las células tumorales tienen mayores niveles de EROs, comparadas con sus contrapartes no transformadas y esto se ha asociado al mantenimiento de su señalización oncogénica (Sarmiento et al., 2019; Moloney et al., 2017; Trachootham et al., 2009)

A nivel mundial, el cáncer de mama es el tipo de cáncer con la mayor incidencia (24.2% de 8.6 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados) y mortalidad (15% de 4.2 millones de muertes) en mujeres, seguido del cáncer colorrectal y de pulmón (IARC, 2018). Incluso, se considera como el cáncer más común en 154 de los 185 países incluidos en el GLOBOCAN 2018 (IARC, 2018). En México, la neoplasia de mama es también el motivo más importante de muerte por tumores malignos en la población femenina. En tanto que en el periodo de 2011 a 2016 existió un incremento en la tasa de mortalidad en mujeres mayores a 20 años a causa de esta enfermedad (INEGI, 2018).

En la clínica, los subtipos moleculares de cáncer de mama se identifican mediante inmunohistoquímica en base a la expresión del receptor de estrógenos (ER), receptor de

progesterona (PR) y el receptor tipo II del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Jiang et al., 2016), esto permite predecir el desarrollo de la enfermedad y el tratamiento más adecuado. Los subtipos Luminal A (ER+, PR+/-, HER2-) y Luminal B (ER+, PR+/-, HER2+) son tratados con terapia endocrina (Ciccarese et al., 2008), el subtipo positivo a HER2 (ER-, HER2+) se trata con terapia dirigida a este receptor, como el anticuerpo monoclonal trastuzumab; mientras que el subtipo TN (ER-, PR-, HER2-) aún carece de una terapia dirigida y efectiva, siendo el de mayor recurrencia y peor pronóstico en pacientes (Jiang et al., 2016; Lehmann et al., 2011; Sandhu et al., 2010).

En las líneas celulares de cáncer de mama, particularmente las del subtipo TN, se propone que los altos niveles de EROs tengan una función pro-tumorigénica posiblemente al regular señales de proliferación y supervivencia celular (Sarmiento et al., 2019; Moloney et al., 2017). Así mismo, las células troncales de cáncer de mama (BCSC) con capacidad de reconstituir el tumor de mama, se asocian a niveles bajos de EROs con respecto a las células de su progenie más diferenciada (Zhou et al., 2014; Shi et al., 2012; Diehn et al., 2009). Cabe mencionar que a esta pequeña población celular identificada dentro de la masa tumoral se le atribuye la recurrencia, la resistencia a la terapia (ej. quimioterapia y radioterapia) y la diseminación metastásica del tumor de mama en pacientes (Velasco et al., 2018; Pires et al., 2016).

Actualmente, no es clara la relación que existe entre los niveles de EROs y la población tipo troncal en cáncer de mama, por tanto, el presente trabajo contribuirá en el conocimiento del papel de las EROs sobre las características asociadas a troncalidad definidas por los marcadores de troncalidad CD44 y CD24 en líneas celulares de cáncer de mama, perteneciente a diferentes subtipos moleculares.

1.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)

Las EROs son moléculas que se forman del metabolismo del O₂ y sus productos de reacción con otras moléculas (Ahmad et al., 2017; Ray et al., 2011). En el caso de las especies reactivas de nitrógeno (ERN), éstas son una subclase de las EROs que contiene nitrógeno y que se originan en la reacción de las EROs con el óxido nítrico (NO•) (Breitenbach et al., 2018).

Hay dos tipos de EROs: del tipo radical libre y no radical libre, que resultan de la reducción parcial monoeléctrica y progresiva del O_2 (Halliwell, 2006). Dentro de las especies del tipo radical libre se incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), que se caracterizan por contener uno o más electrones no apareados en su orbital atómico o molecular externo. En tanto que las especies no radicalarias, es decir, carentes de electrones sin aparear son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ozono (O_3), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el ión hidróxido (OH^-) (Shi et al., 2012; Halliwell, 2006).

El O_2 es un potente oxidante con dos electrones no apareados paralelos, lo que le confiere la capacidad de recibir un par de electrones de especies no radicales (Halliwell, 2006). Debido a esta particularidad en la distribución de sus electrones, la reducción del O_2 es univalente o de un electrón a la vez (Halliwell, 2006). Si se le agrega un electrón a la forma más reactiva del O_2 , el estado singlete sigma $O_2^1\Sigma_g^+$ se genera $O_2^{\cdot-}$, una siguiente adición univalente electrónica produce el ion peróxido (O_2^{2-}) con un enlace de oxígeno más débil. La adición de dos electrones más elimina el enlace dando iones óxido (O^{2-}). El producto de la reducción de dos electrones del $O_2^1\Sigma_g^+$ es el H_2O_2 y de cuatro electrones dos moléculas de agua (H_2O) (Li et al., 2016; Halliwell, 2006).

El HO^{\cdot} se forma por la interacción entre el H_2O_2 y metales de transición reducidos como el cobre (Cu^{2+}) y el hierro (Fe^{2+}) (Ahmad et al., 2017; Halliwell, 2006). El H_2O_2 acepta un electrón más produciendo a HO^{\cdot} y el HO^- (Halliwell, 2006). En los sistemas biológicos, esta misma reacción ocurre por la abstracción de un electrón de un átomo de compuestos como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, modificando su conformación y estructura (Lushchak, 2014). Los principales productos de oxidación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y de lípidos en membranas celulares son la 8-oxo-2-desoxiguanosina (8-oxo-dG) (Halliwell, 1999) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), respectivamente (Li et al., 2016; Ursini et al., 2016).

El NO^{\cdot} y el $O_2^{\cdot-}$ reaccionan rápidamente para formar el $ONOO^-$, cuya ruptura puede formar productos altamente nocivos como dióxido nítrico (NO_2^{\cdot}) y HO^{\cdot} (Halliwell, 2006). El $ONOO^-$ también reacciona con el CO_2 generando el nitrosoperoxocarboxilato ($ONOOCOO^-$), que se descompone en dos potentes agentes oxidantes, el NO_2^{\cdot} y el radical carbonato $CO_3^{\cdot-}$

(Halliwell, 2006). Como consecuencia cualquier sistema que produzca NO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede causar daño biológico, lo cual es muy común en distintas enfermedades (Halliwell, 2006).

1.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE

Las células de mamíferos regulan el contenido de EROs mediante un sistema de enzimas antioxidantes capaces de neutralizar las EROs, al reaccionar directamente con estas especies químicas, o bien aceptando electrones derivadas de las mismas (Bigarella et al., 2014). Las enzimas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa 1 (GPX1), la glutatión reductasa (GSR), la peroxiredoxina (PRDX1), la tioredoxina (TRX) y la tioredoxina reductasa 1 (TXNRD1) (Sies-Jones, 2020). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ es rápidamente dismutado a H_2O_2 por la SOD. El H_2O_2 se convierte a H_2O mediante la catalasa, una proteína hemo (Fe^{2+}), localizada en el peroxisoma (Sies-Jones, 2020; Shi et al., 2012). Esta misma reacción resulta del acoplamiento con la conversión de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) en la reacción catalizada por la GPX1 (Shi et al., 2012). Las moléculas no enzimáticas que degradan el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 , para prevenir el daño oxidativo son el GSH, los flavonoides y las vitaminas A, C y E (Moloney et al., 2017).

1.4 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE EROs

En los sistemas biológicos, el tiempo de vida de las EROs es de nanosegundos a segundos, dependiendo de su reactividad y del nivel de antioxidantes celulares (Dikalov-Harrison, 2014). Por lo tanto, la detección de EROs requiere de sondas que reaccionen rápidamente con estas para competir con los antioxidantes y que puedan generar productos estables que puedan ser cuantificados (Dikalov-Harrison, 2014). Entre las técnicas de detección de EROs más utilizadas se encuentra la trampa de spin, donde los radicales libres se unen produciendo aductos covalentes que son detectados por espectroscopía de resonancia de spin; las sondas quimioluminiscentes (ej. lucigenina, luminol, coelenterazine); las sondas fluorescentes (ej. dihidroetidio “DHE”, MitoSOX, diclorodihidrofluoresceína diacetato “DCFH-DA”,

dihidrorodamina, N-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina “Amplex Red”); la detección de $O_2^{\cdot-}$ por citocromo c y las sondas de spin de hidroxilamina cíclica (Dikalov-Harrison, 2014).

1.5 FUENTES DE GENERACIÓN DE EROs

Los principales productos de las reacciones de oxidación intracelulares son el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 . Éstos son producidos por la catálisis de las enzimas oxidasas, como las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas (NOX), peroxidasa (POX), ciclo-oxigenasas (COX), lipo-oxigenasas (LOX), xantina oxidasas (XOX), las enzimas citocromo p450 (CYP) y la óxido nítrico sintasa (NOS) no acoplada, ubicadas en diferentes compartimentos celulares u orgánulos como las membranas celulares (ej. mitocondria), peroxisomas y el retículo endoplásmico (Moloney et al., 2017; Ding et al., 2015). Las principales fuentes endógenas de $O_2^{\cdot-}$ son: la mitocondria y las NOX (Desouki et al., 2005; Sies-Jones, 2020), las cuales se abordarán en las siguientes secciones. Además, el $O_2^{\cdot-}$ se forma mediante reacciones de autooxidación de pequeñas moléculas como catecolaminas, ácido ascórbico y flavinas reducidas que reaccionan directamente con el O_2 (Halliwell-Cross, 1994), o por la autooxidación de proteínas de unión a Fe^{2+} , como metaloproteínas o proteínas transportadoras, importantes en el metabolismo del Fe^{2+} y la respuesta inmune (Ursini et al., 2016). La mayoría del $O_2^{\cdot-}$ es rápidamente convertido en H_2O_2 por la SOD citoplásmica o mitocondrial. El H_2O_2 es considerado un segundo mensajero por su capacidad de difusión y de permear membranas celulares a través de miembros específicos de la familia de las acuaporinas (Moloney et al., 2017).

Las EROs producidas por las diferentes fuentes son cruciales para el desarrollo de la célula, ya que participan en la regulación de procesos celulares como la proliferación, diferenciación, crecimiento, sensado de O_2 y la inmunidad adaptativa (Moloney et al., 2017; Ding et al., 2015; Trachootham et al., 2009). Así mismo, las EROs derivadas tanto de la mitocondria como de las NOX, han mostrado tener un papel regulador en la sobrevivencia y la muerte celular (Moloney et al., 2017; Bae et al., 2011).

1.5.1 Mitocondria

En la membrana interna de la mitocondria, la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte de electrones (CTE) favorece el gradiente electroquímico necesario para la síntesis de adenosina trifosfato (ATP), en la fosforilación oxidativa (Galluzzi et al., 2010). Se ha estimado que del 90-95% del O_2 es reducido en la mitocondria para la formación de H_2O por la citocromo oxidasa-C (Halliwell, 2006), y del 0.1-2% es convertido en EROs (Kalyanaraman et al., 2018; Bigarella et al., 2014; Bae et al., 2011; Dikalov, 2011; Tahara et al., 2009; Desouki et al., 2005).

La mitocondria es una fuente continua de $O_2^{\cdot-}$ como subproducto de la fosforilación oxidativa, que resulta de la reducción parcial prematura del O_2 por la fuga de electrones en los complejos I y III durante la oxidación no favorable del radical ubiquinona (QH^{\cdot}) en la CTE (Figura 1) (Ursini et al., 2016; Bigarella et al., 2014). El $O_2^{\cdot-}$ generado en este proceso es rápidamente dismutado a H_2O_2 por la Mn-SOD y la Cu/Zn-SOD ubicada en la matriz y el espacio intermembrana mitocondrial, respectivamente (Bae et al., 2011). Otras enzimas antioxidantes como las GPX1, PRDX3 o PRDX5 también se encuentran en la matriz mitocondrial para reducir el H_2O_2 a H_2O (Figura 1) (Kalyanaraman et al., 2018; Bae et al., 2011).

La CTE consta de cinco complejos de subunidades proteicas ubicadas en la membrana interna de la mitocondria (complejos proteicos respiratorios I-IV y la F1Fo-ATP sintasa) y dos factores solubles (citocromo-C y la coenzima-Q) (Galluzzi et al., 2010). El complejo I, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)-ubiquinona oxidorreductasa transfiere electrones recibidos del NADH al complejo III a través de la coenzima-Q (Bae et al., 2011; Tahara et al., 2009). El complejo I es una de las principales fuentes de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial en la CTE, ya que el $O_2^{\cdot-}$ es producido en la matriz mitocondrial por el transporte de electrones hacia el complejo III vinculado al NADH, debido a la acumulación constante del QH^{\cdot} o durante el transporte reverso de electrones del succinato al NAD^+ en el complejo II cuando hay alta proporción $NADH/NAD^+$, vía coenzima Q (Bae et al., 2011; Tahara et al., 2009). El transporte reverso de electrones es estimulado por altos potenciales de membrana ($\Delta\Psi$) que actúan como barrera

energética para el transporte de electrones, por estados altamente reducidos de los complejos I y III, por bajas tasas de respiración (Tahara et al., 2009), por una baja relación ADP/ATP, por sobreabundancia de sustratos oxidables o por citocromos completamente reducidos (Ursini et al., 2016). Todos estos factores incrementan la probabilidad de fuga de electrones y la consecuente formación de EROs (Tahara et al., 2009).

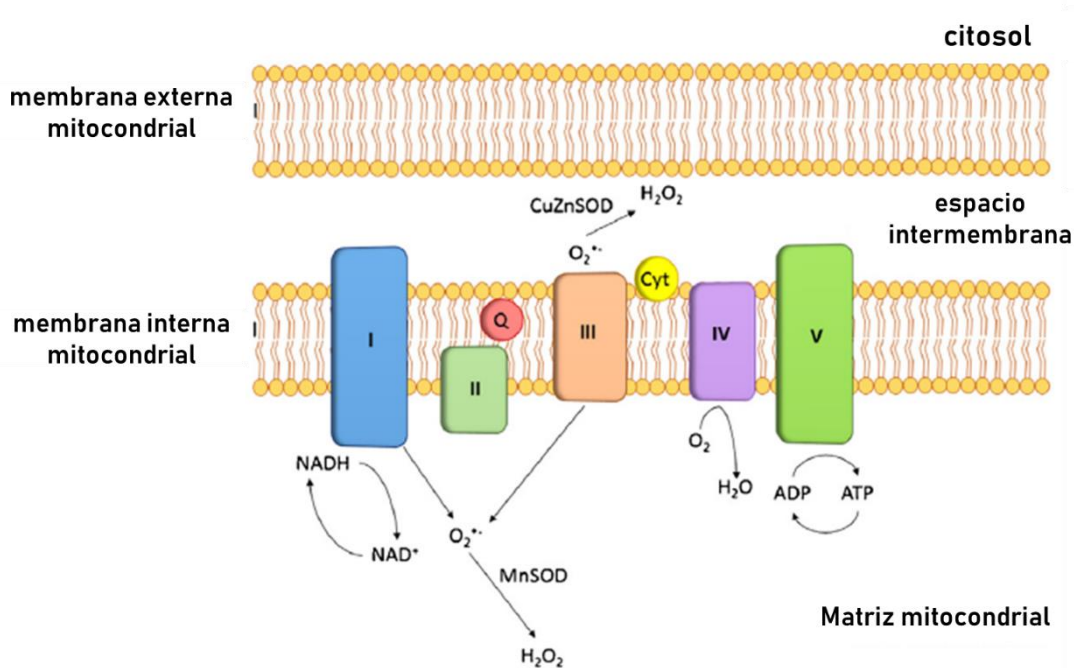


Figura 1. Producción de EROs ($O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2) por la CTE mitocondrial. Modificado de Moloney et al., 2017

El complejo III ubiquinol-citocromo-C oxidorreductasa recibe electrones de la coenzima Q y los transfiere al citocromo c (Cyt c) (Galluzzi et al., 2010). La coenzima Q acepta dos electrones transferidos del complejo I o II para formar la ubiquinona reducida o ubiquinol (QH_2) (Galluzzi et al., 2010). Debido a que Cyt c solo puede aceptar un electrón, el primer electrón es transferido al Cyt c1 a través de una proteína Fe-S, resultando la formación transitoria del QH^{\bullet} ; después, este electrón reduce al Cyt c y es transferido al complejo IV (Galluzzi et al., 2010). Finalmente, el O_2 recibe cuatro electrones derivados de los citocromos c reducidos (grupo hemo- Fe^{2+}) oxidándolos a citocromo c férrico (Fe^{3+}), en la consecuente formación de H_2O (Halliwell,

2006). Es así como en el complejo III de la CTE, el $O_2^{\cdot-}$ es generado por la reacción prematura del electrón del QH[•] con el O_2 en el espacio intermembrana del complejo III (Bae et al., 2011).

Por otra parte, la mitocondria no sólo es una fuente de EROs, sino que también puede ser un blanco celular de éstas, ya que se ha detectado daño oxidativo en proteínas 4Fe-4S en los complejos de la CTE, así como productos de oxidación en ADN y membrana mitocondriales (Dikalov, 2011).

1.5.2 NOX

Las NOX son una familia de complejos de proteínas de membrana hemo-flavina catalíticas, ubicadas en mitocondria, retículo endoplásmico y membrana citoplasmáticas, cuya única función conocida es la de generar el $O_2^{\cdot-}$ (Figura 2c), mediante la transferencia de un electrón del NADPH al O_2 (Kucera et al., 2016; Frazziano et al., 2012). Las enzimas NOX constan de seis hélices transmembrana e histidinas de unión para los dos citocromos tipo b no idénticos ubicados entre las hélices III y V. Las enzimas contienen secuencias de unión para los cofactores secuenciales activos redox: NADPH y flavin adenosin dinucleótido (FAD) en su dominio C-terminal citoplasmático (Figura 2a) (Breitenbach et al., 2018; Skonieczna et al., 2017; Block-Gorin, 2012).

Se han identificado 7 isoformas catalíticas de NOX (NOX1-5) y las dual oxidasas (1-2) con características bioquímicas, estructurales y de localización subcelular que las distingue (Block-Gorin, 2012). Los componentes de los complejos proteicos de NOX incluyen: la subunidad catalítica conocida como gp91phox, la proteína de unión no catalítica de 22 kDa, (p22phox), un organizador citosólico (p47phox o NOXO1), un activador (p67phox o NOXA1) y otras proteínas (p40phox y Rac GTPasa: RAC1) (Figura 2b). Las subunidades citosólicas varían con cada isoforma de NOX, sin embargo, NOX4 y NOX5 pueden ser independientes de las subunidades citosólicas, y se encuentran constitutivamente activas o reguladas por calcio intracelular (Wind et al., 2010; Brown-Griendling, 2009).

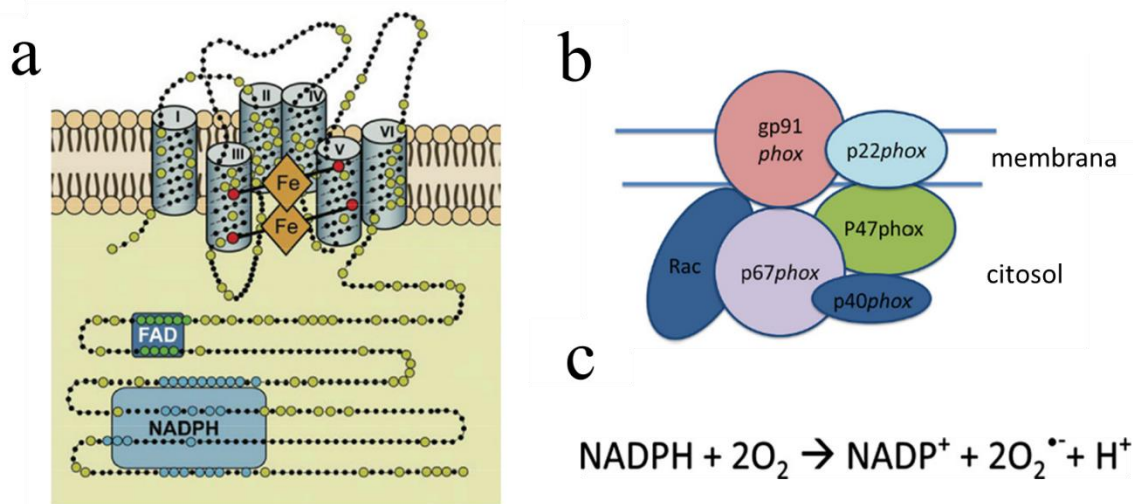


Figura 2. Esquema general de las NOX en membranas. a) Estructura molecular de las NOX; b) Subunidades proteicas de las NOX; c) Reacción catalizada por las NOX. Modificado de Breitenbach et al., 2018.

La generación metabólica del $O_2^{\bullet-}$ por las NOX ocurre en la activación de fagocitos (ej. neutrófilos y macrófagos) como parte del sistema inmunológico de defensa del organismo, para la eliminación de patógenos o células transformadas (Ahmad et al., 2017; Kucera et al., 2016; Frazziano et al., 2012). La función de la enzima NOX2 en la respuesta inmune innata es la mejor estudiada de entre la familia de proteínas NOX (Skonieczna et al., 2017; Brown-Griendling, 2009). La activación de NOX2 en los fagosomas requiere a p22_{phox} y el reclutamiento de las subunidades regulatorias (Skonieczna et al., 2017; Block-Gorin, 2012; Brown-Griendling, 2009). Estas subunidades citosólicas mantienen a los cofactores FAD y NADPH cercanos, para favorecer el transporte de electrones (Skonieczna et al., 2017). Durante la estimulación celular, la activación de NOX2 es mediada por la fosforilación de la proteína cinasa C (PKC) δ , que a su vez fosforila p47_{phox} de la NOX2 (Breitenbach et al., 2018; Block-Gorin, 2012; Brown-Griendling, 2009). El cambio de conformación generado en la subunidad p47_{phox} organiza la translocación de la subunidad activadora p67_{phox} y p40_{phox}, que se acoplan a través del dominio de homología no receptor de cinasa de Tyr (SRC) a la región rica en prolina de p22_{phox} y el subsecuente reclutamiento de RAC1 (Breitenbach et al., 2018; Skonieczna et al., 2017; Block-Gorin, 2012; Brown-Griendling, 2009).

En las diferentes isoformas de las NOX, una vez que se forma el complejo NOX activo en el lado citoplasmático, el par de electrones donados del NADPH son transferidos a FAD, el cual es reducido a FADH₂ (Block-Gorin, 2012). Luego, un electrón derivado del FADH₂ se transfiere al primer citocromo tipo b (Fe²⁺) que solo acepta un electrón (Skonieczna et al., 2017; Block-Gorin, 2012). El O₂ unido al segundo grupo hemo del citocromo tipo b, es reducido por el electrón derivado del primer centro de hierro (Skonieczna et al., 2017; Block-Gorin, 2012). De esta forma se generan dos O₂^{•-} en el lado opuesto de la membrana (ej. lumen del retículo endoplásmico o en el espacio extracelular) dependiendo de la ubicación de la isoforma de NOX (Breitenbach et al., 2018). Lo siguiente, es la probable dismutación del O₂^{•-} a H₂O₂ por una enzima SOD estrechamente acoplada o de manera espontánea a bajos pH (Breitenbach et al., 2018; Skonieczna et al., 2017; Block-Gorin, 2012).

1.5.3 Fuentes adicionales de EROs

La XOX es una metaloflavoproteína homodimérica que contiene molibdeno (Mo⁶⁺ /Mo⁴⁺), FAD y dos centros Fe-S no idénticos, además de que esta enzima es una fuente fisiológica de O₂^{•-}, H₂O₂ y NO[•] (Battelli et al., 2016). La XOX es una enzima oxidativa inusual, debido a que la fuente del átomo de O₂ que se transfiere a su sustrato, se origina del H₂O. Los electrones ganados a través de la oxidación de una molécula de H₂O por el cofactor de Mo⁶⁺ /Mo⁴⁺ para formar las especies oxidantes activas se transfieren finalmente al O₂ a través de los componentes del sitio activo FAD y el centro de Fe-S (Trager, 2007). En condiciones normales, la vía de producción de EROs que involucra a la XOX genera bajas concentraciones de O₂^{•-} durante la conversión de hipoxantina a xantina, y la posterior reacción de xantina a ácido úrico, las dos últimas etapas del catabolismo de purinas (Battelli et al., 2016; Ahmad et al., 2017). No obstante, la degradación de ATP en condiciones de estrés metabólico activa la XOX incrementando la producción de O₂^{•-} (Ahmad et al., 2017). En condiciones patológicas de isquemia y reperfusión ocurre la mayor contribución de la XOX como fuente EROs (Ahmad et al., 2017).

Las LOX son una familia de dioxigenasas de hierro no hemo, que catalizan la reacción de O_2 con ácidos grasos poliinsaturados libres o esterificados con una especificidad regional, conocida como peroxidación lipídica (Pidgeon et al., 2007). El mayor producto electrofílico de la peroxidación lipídica es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), que es capaz de modificar proteínas blanco de señalización, al unirse de manera no covalente en residuos de cisteína (Forman et al., 2014). En linfocitos, la LOX es activada por el $TNF-\alpha$, generando una alta producción de EROs (Ahmad et al., 2017). En el caso de la COX, ésta genera EROs estimulada por la señalización mediada por $TNF\alpha$, la interleucina 1, LPS bacteriano y el promotor tumoral 4-*o*-tetradecanoilfobol-13-acetato (TPA) (Ahmad et al., 2017) para activar y controlar respuestas inflamatorias (Sies-Jones, 2020).

La citocromo P450 (CYP) es una superfamilia de hemotiolato mono-oxigenasas (Zangar et al., 2004; Danielson, 2002) ubicadas en la mitocondria y en el retículo endoplásmico (microsomas) (Bae et al 2011). Estas enzimas catalizan la oxidación de moléculas hidrofóbicas orgánicas, como lípidos, hormonas esteroideas y xenobióticos (ej. contaminantes ambientales, agroquímicos, aleloquímicos de plantas, pesticidas sintéticos, esteroides, prostaglandinas y ácidos grasos) (Danielson, 2002). La CYP hidroxila su sustrato generando H_2O , por la transferencia de dos electrones del NADPH al O_2 (Zangar et al., 2004). El $O_2^{\cdot-}$ se produce porque una porción del oxígeno activado se libera de la enzima sin ninguna modificación de sustrato (Zangar et al., 2004). El H_2O_2 se deriva de la fuga de electrones durante la protonación del peroxicitocromo p450 un intermediario de la reacción (Zangar et al., 2004). El siguiente sitio de liberación de electrones sucede cuando dos electrones más modifican al peroxitocromo p450, se libera el segundo oxígeno y se forma la molécula de agua, incluso en ausencia de sustratos la cadena de transporte de electrones microsomal continúa para oxidar el NADPH y así seguir fomentando la formación de EROs (Zangar et al., 2004).

Las NOS (endotelial, neuronal e inducible) son fuentes de EROs citoplasmáticas. La NOS endotelial produce $O_2^{\cdot-}$ a través de su dominio oxigenasa en una reacción dependiente de calmodulina/ Ca^{2+} (Forrester et al., 2018). El NO^{\cdot} es una importante molécula de señalización sintetizada a partir de la oxidación de arginina a citrulina por la NOS. Este radical libre es

requerido para la modulación del flujo sanguíneo y el funcionamiento neuronal normal (Pizzino et al., 2017). Por otra parte, el NO^\bullet tiene solo un electrón no apareado, lo que le permite unirse fuertemente al Fe^{2+} en los grupos hemo, esto es crucial para su actividad biológica para activar la guanilato ciclasa y para ralentizar la respiración mitocondrial al unirse al citocromo c oxidasa (Pacher et al., 2007). Finalmente, el NO^\bullet es eliminado al reaccionar con la oxihemoglobina para formar nitrato (Pacher et al., 2007).

1.6 ANTIOXIDANTES EXÓGENOS

Para determinar la importancia de las EROs en los sistemas biológicos se han empleado antioxidantes exógenos que funcionan como “captadores” o inhibidores de EROs, cuya actividad terapéutica ha sido demostrada ya que disminuyen los efectos de la acumulación de EROs en diferentes enfermedades (Samuni et al., 2013; Wind et al., 2010). En este apartado se describen los tres antioxidantes utilizados en este trabajo: N-acetil cisteína (NAC), Difenileno yodonio (DPI) y Mitotempo (Mito).

El NAC es un tiol antioxidante, precursor acetilado de la L-Cys intracelular y la síntesis de GSH. (Qanungo et al., 2014; Samuni et al., 2013; Mezencev et al., 2013). La Cys es el aminoácido de menor concentración intracelular de los tres aminoácidos que conforman el GSH y es por lo tanto el sustrato que puede limitar la velocidad de síntesis de GSH en enfermedades relacionadas al estrés oxidativo, como enfermedades autoinmunes, psiquiátricas, neurodegenerativas, del corazón y cáncer (Samuni et al., 2013). El NAC es un derivado de Cys con un grupo acetilo unido al átomo de nitrógeno y como la mayoría de los grupos tioles (RSH), puede ser oxidado por un amplio espectro de especies radicales y no radicales, e incluso puede funcionar como un nucleófilo (donador de pares de electrones) (Samuni et al., 2013). La reactividad de los aniones tiolato (R-Cys-S⁻) hacia el dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet), ion trióxido de carbono ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) o $\text{O}_2^{\bullet-}$ es mayor comparado con el R-SH con excepción del HO^\bullet que abstrae eficientemente el átomo de hidrógeno (Samuni et al., 2013). La reactividad R-Cys-S⁻ hacia las especies oxidantes no radicalarias como el H_2O_2 , ácido hipocloroso (HClO) y NOO^\bullet también es

mayor que en el R-SH (Samuni et al., 2013) (Figura 3). Otras actividades biológicas que se le atribuyen al NAC son la reducción de puentes disulfuro, detoxificación de radicales ubiquinona y unión transitoria a iones metálicos pesados (Samuni et al., 2013).

Los inhibidores de NOX más comunes son el DPI, la apocinina, el 4- (2-amino-etil) - benzolsulfonil-fluoruro (AEBSF), y la triazolo pirimidina VAS3947 (Wind et al., 2010). El DPI es un inhibidor no competitivo de flavoenzimas (Riganti et al., 2004), cuya constante de inhibición (K_i) determinada en NOX de membrana de neutrófilos humanos es $5.6 \mu\text{M}$ (pH 7.4, 20°C) (O Donnell et al., 1993). Tanto el DPI como sus análogos derivados de yodonio muestran un mecanismo de reacción vía radical donde un electrón es abstraído de un nucleófilo para formar un radical que luego regresa al nucleófilo para formar aductos covalentes (Riganti et al., 2004; O Donnell et al., 1993). En las NOX de neutrófilos humanos, se propone que los centros redox reducidos donadores del electrón al DPI es el FAD o el citocromo tipo b, generando un radical que después vuelve a la flavina o al cofactor hemo directamente o hacia algún aminoácido cercano al sitio activo para la formación de un aducto covalente fenilado (Riganti et al., 2004; O Donnell et al., 1993) (Figura 3), disminuyendo la actividad de la NOX.

El DPI disminuye la formación de EROs mediada por la NADPH oxidasa, pero también inhibe otras flavo-enzimas como la óxido nítrico sintasa (NOS), la xantina oxidasa (XOX,) y la CYP oxidoreductasa (Wind et al., 2010; Li-Trush, 1998). Así mismo, el DPI puede disminuir la actividad del complejo I (NADPH ubiquinona oxidoreductasa) lo que puede limitar la fosforilación oxidativa y provocar producción de EROs (Li-Trush, 1998). De ahí que sea importante determinar la concentración de DPI con capacidad antioxidante en los sistemas experimentales.

En cuanto al cloruro de trifenilfosfonio, conocido como Mitotempo (Mito), es un “depurador químico” de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y un compuesto mimético de la SOD2 mitocondrial. Además, el compuesto trifenilfosfonio catiónico lipofílico que lo conforma, le confiere la capacidad de atravesar bicapas lipídicas y acumularse en las mitocondrias, por lo que es ampliamente empleado para la reducción de EROs mitocondriales (Yang et al, 2018) (Figura 3). El potencial de membrana negativo de la membrana interna de la mitocondria favorece que compuestos

cargados positivamente, como es el caso del Mito, puedan ser internalizados en la matriz mitocondrial en contra de su gradiente de concentración (Figura 3) (Zielonka et al, 2014). En lo que se refiere al grupo funcional unido al trifenilfosfonio (TPP⁺) del Mito, éste contiene un grupo nitróxido (-N-O[•]) que exhibe la actividad mimética de SOD mitocondrial, un grupo hidroxilo (-OH) fenólico con la función de eliminar radicales libres, un grupo tecnecio para su uso en imágenes metabólicas y un resto de hidroetidina que puede ser empleado como marcador específico tras reaccionar con el O₂^{•-} (Zielonka et al, 2014).

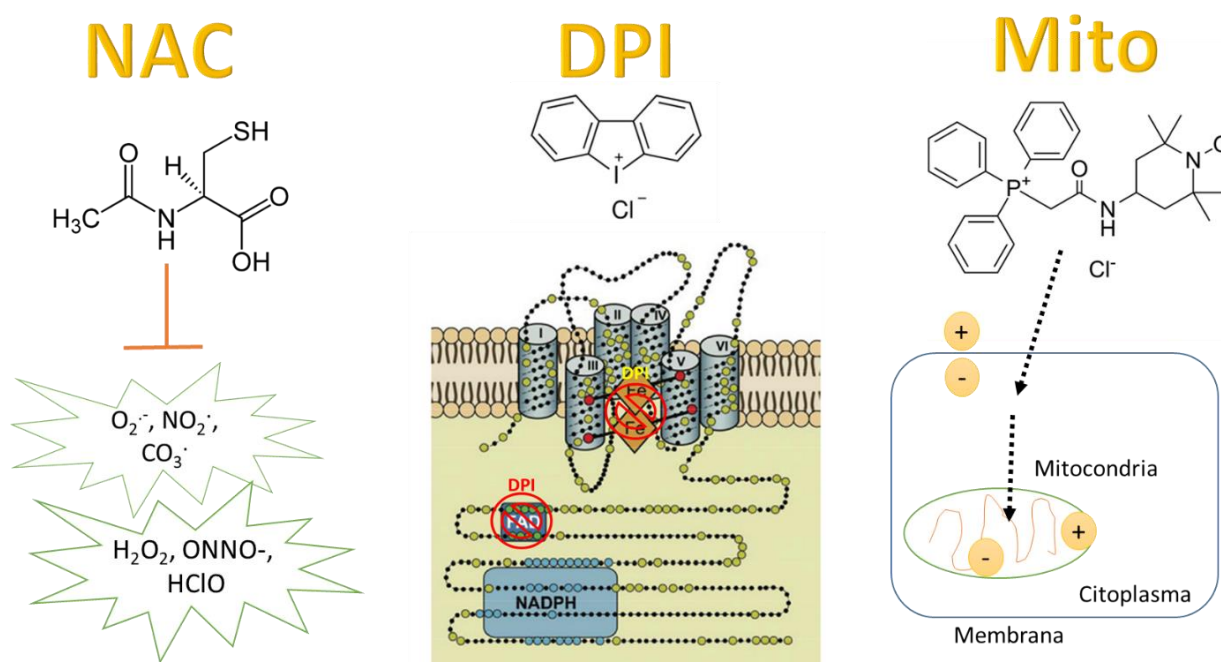


Figura 3. Antioxidantes exógenos. NAC, precursor de glutatión reducido y tiol antioxidante (Mezencev et al, 2013; Samuni et al, 2013; Qanungo et al, 2014); DPI, inhibidor no competitivo de la NOX (O'Donnell et al., 1993); y Mito (mimético de SOD2, elimina O₂^{•-} mitocondrial) (Yang et al, 2018; Zielonka et al, 2017).

1.7 EROs Y SEÑALIZACIÓN REDOX FISIOLÓGICA

Las EROs se han implicado en diversas vías de señalización celular, ya que pueden regular la actividad proteica mediante reacciones de oxidación. Así, en condiciones fisiológicas, los niveles bajos o moderados de H₂O₂ (1-10 nM en células de hígado) (Sies-Jones, 2020; Ding

et al., 2015; Sies, 2017; Shi et al., 2012; Trachootham et al., 2009) activan o desactivan las funciones de proteínas mediante modificaciones oxidativas reversibles (Sies-Jones, 2020; Shi et al., 2012). El H_2O_2 genera cambios de conformación en proteínas específicas a través de la oxidación de residuos de cisteína (Cys), en grupos tiolato (Pr-Cys-S^-), selenocisteínas y metioninas con la consecuente formación del sulfenato (Pr-Cys-SO^-) (Sies-Jones, 2020). El Pr-Cys-SO^- es generalmente inestable y puede reaccionar con el GSH, resultando en la conjugación de la proteína o su glutationilación (Pr-Cys-GS) (Sies-Jones, 2020). En las reacciones posteriores forman puentes disulfuro intermoleculares (Pr-Cys-S-S-Cys) o intramoleculares ($\text{Pr}_1\text{-Cys-SS-Cys-Pr}_2$) (Sies-Jones, 2020). El Pr-Cys-SO^- puede reaccionar nuevamente con el H_2O_2 a sulfinato (Pr-SO_2^-) y luego a sulfonato (Pr-SO_3^-) (Sies-Jones, 2020), estas reacciones son oxidaciones irreversibles.

El O_2^- reacciona con grupos de Fe-S en proteínas ($\text{O}_2^- + \text{Pr-[4Fe-4S]} \rightarrow \text{Pr-[3Fe-4S]} + \text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) (Sies-Jones, 2020). El ONOO^- conduce a la nitración de residuos de tirosina (Tyr) ($\text{Pr-Tyr} + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{Pr-Tyr-NO}_2$) y el NO^\cdot produce la nitrosilación de Cys; teniendo afecciones funcionales directas en las proteínas (Sies-Jones, 2020). Los puentes disulfuro y los residuos de Cys glutationilados y nitrosilados son reducidos a grupos tiol (Pr-SH) nuevamente por el sistema de TRX o por el sistema de GSH; el SO_2^- pueden ser reducido por la sulfiredoxina (SRXN1), estas reacciones reversibles son esenciales para la señalización redox (Sies-Jones, 2020). De esta manera, las EROs funcionan como importantes moléculas de señalización redox (Lee, B. et al., 2019; Moloney et al., 2017; Ding et al., 2015; Trachootham et al., 2009).

No obstante, debido a su alta reactividad química, las cantidades excesivas de EROs (>100 nM de H_2O_2) (Sies-Jones, 2020; Sies, 2017), independientemente de su origen endógeno o exógeno, pueden provocar senescencia, muerte o transformación celular, por la peroxidación irreversible e inespecífica de biomoléculas (Sies-Jones, 2020; Ding et al., 2015; Shi et al., 2012; Trachootham et al., 2009). Por tanto, un adecuado balance entre la generación y eliminación de las EROs mantiene el equilibrio entre el funcionamiento normal y patológico celular (Zibara et al., 2017; Ding et al., 2015; Trachootham et al., 2009). Los estados patológicos asociados a producción excesiva de EROs incluyen la autoinmunidad y el cáncer (Lee, B. et al., 2019).

1.8 EROs Y SEÑALIZACIÓN REDOX EN CÁNCER

En el contexto de cáncer, las células tumorales tienen mayores niveles de EROs, comparadas con sus contrapartes no transformadas, para mantener su señalización oncogénica (Sarmiento et al., 2019; Moloney et al., 2017; Trachootham et al., 2009). Los efectos biológicos inducidos por la sobreproducción de EROs incluyen la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores de tumor, el metabolismo celular aumentado, la disfunción mitocondrial, la inestabilidad genómica, inflamación, metástasis y angiogénesis. Esto último se ve compensado por una sobrerregulación de la actividad antioxidante que favorece la evasión a apoptosis (Lee, B. et al., 2019; Moloney et al., 2017; Trachootham et al., 2009).

Las EROs regulan la carcinogénesis a través de modificaciones oxidativas en proteínas implicadas en la activación de vías de proliferación, pro-sobrevivencia, resistencia a quimioterapia y protección ante señales de muerte celular. Entre ellas se encuentran la vía de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la vía de cinasa de fosfatidilinositol-4,5- bifosfato /proteína cinasa B (PI3K/AKT1/PKB), la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B), y la vía del factor inducible de hipoxia 1 (HIF1) (Prasad et al., 2017; Trachootham et al., 2009). En contraste, se ha propuesto que los niveles tóxicos de EROs que sobrepasan la capacidad antioxidante tengan efectos anti-tumorigénicos al generar estrés oxidativo y desencadenar muerte celular (Moloney et al., 2017).

1.8.1 Vía de las MAPK

En diversos tipos de cáncer incluido el cáncer de mama, de ovario, melanoma y leucemia, las MAPK (Moloney et al, 2017) son estimuladas por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), insulina o citocinas como TNF- α , LPS, interleucina 1 β (IL-1 β) o por EROs (H₂O₂), a través de la cinasa regulada por señal de apoptosis 1 (ASK1) (Sies et al, 2020; Liu et al 2018; Son et al, 2013). Las MAPK son una familia de cinasas de serina/treonina que fosforilan transportadores, proteínas de citoesqueleto, factores de transcripción, proteínas del poro nuclear

y otras proteínas cinasas para la activación o desactivación de efectores ubicados en el núcleo (Sies et al, 2020). Las MAPK efectoras a nivel nuclear son ERK 1/2, cinasa de c-Jun N terminal (JNK) y p38 (Son et al, 2013), implicadas en proliferación, diferenciación, migración, sobrevivencia, muerte celular e inflamación (Liu et al, 2018; Shi et al, 2012).

La vía de las MAPK es activada a partir de un cambio conformacional de RAS, una GTPasa, estimulada por la activación de receptores tirosina cinasa (RTK) como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor del factor de necrosis tumoral α (TNFR) (Liu et al., 2018). RAS unido a GDP (inactivo) cambia a RAS unido a GTP (activo), mediante una proteína intercambiadora de nucleótido (GEF) (Liu et al., 2018). La activación de RAS estimula el reclutamiento y activación de RAF1, la primera cinasa que desencadena la cascada de fosforilación de sus sustratos MEK y ERK (Liu et al., 2018).

En diferentes tipos de cáncer incluido el cáncer de páncreas, colon, tiroides y melanoma, RAS se encuentra constitutivamente activo, debido a una mutación en el sitio de unión a GTP, encendiendo la vía de manera constitutiva e independiente del estímulo (Liu et al., 2018). De manera importante, las células transformadas con RAS oncogénico presentan mayor producción de EROs ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) (Trachootham et al., 2009), y éstas se han involucrado en la activación constante de su vía de señalización. Así, el H_2O_2 regula la vía de las MAPK al promover la fosforilación de los receptores de factores de crecimiento (ej. EGFR) de manera independiente de su ligando (ej. EGF), así como, al oxidar e inactivar a reguladores negativos de la vía, las Tyr fosfatasas que contienen el dominio de homología SRC 2 (SHP-2), manteniendo la señal proliferativa (Hegedús et al., 2018; Son et al., 2013).

En células no estimuladas, la forma reducida de TRX inhibe la actividad de ASK1 por la interacción directa con su dominio N terminal (Son et al., 2013; Katagiri et al., 2010). Bajo condiciones de estrés oxidante, los grupos tiol ubicados en el sitio activo de la TRX reaccionan con el H_2O_2 , generando un enlace disulfuro (Son et al., 2013; Katagiri et al., 2010). Este hecho produce un cambio de conformación de TRX y la consecuente disociación de ASK1, una vez activada, ASK1 desencadena la activación de JNK y p38 (Son et al., 2013).

1.8.2 Vía de PI3K/AKT1

La activación de RAS mencionada anteriormente estimula varias rutas de señalización, como la ruta PI3K. La PI3K fosforila a fosfatidilinositoles en membrana plasmática en respuesta a la unión de factores de crecimiento (ej. EGF y PDGF) e insulina (Sies-Jones, 2020) a sus RTK. Esto permite el reclutamiento de AKT1, una cinasa de serina/treonina que inicia la cascada de fosforilación que culmina en la activación de la cinasa mTOR (Sies -Jones, 2020).

En cáncer de mama, de ovario, de endometrio, glioblastomas y melanomas, el H₂O₂ mitocondrial y de las NOX reacciona e inactiva a la fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) lipídica además de las proteínas tirosina fosfatasa (PTP1N), Cdc25 fosfatasas y proteína fosfatasa 1 (PP1) (Sies-Jones, 2020; Moloney et al., 2017; Sies, 2017), importantes reguladores negativos de la vía PI3K/AKT1, evitando que la señal proliferativa se detenga. En cáncer de ovario, se ha reportado que el H₂O₂ puede activar a AKT1 de forma independiente de EGF (Moloney et al., 2017). Finalmente, AKT1 puede fosforilar e inactivar a proteínas pro-apoptóticas incluyendo a BAD (agonista de la muerte celular asociado a BCL2), BAX (BCL2 asociado X), BIM (BCL2 tipo 11) y los factores de transcripción “*Forkhead*” de caja O (FOXO), promoviendo la sobrevivencia celular (Moloney et al., 2017).

1.8.3 Vía de NF- κ B

La alteración de la vía de NF- κ B se asocia con enfermedades inflamatorias y con la iniciación y progresión tumoral. En cáncer, NF- κ B se relaciona a la resistencia a apoptosis, al inducir la expresión de varios genes anti-apoptóticos, incluidos la familia de BCL2 (proteínas de linfoma de células B 2) y Bcl-X_L (proteína parecida a BCL2 tipo 1). Además, NF- κ B puede inducir características de malignidad al modular la transcripción de genes relacionados a proliferación celular y angiogénesis, como ciclina D1 - elemento clave de la fase G1/S en el ciclo celular-, c-Myc y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Moloney et al., 2017). Incluso, NF- κ B contribuye al mantenimiento del nivel de EROs oncogénico a través de la regulación de la expresión de genes antioxidantes como la SOD, CAT y la TRX (Moloney et al., 2017).

NF- κ B normalmente se localiza en el citoplasma como un heterodímero, el p50 / p65 (RelA) que es la forma más abundante (Lingappan, 2018). El dominio de homología REL (RHD) en estas proteínas es responsable de la dimerización, el reconocimiento y la unión al ADN (Lingappan, 2018; Morgan-Liu, 2011), así como la interacción con sus proteínas inhibitoras (I- κ B) (Lingappan, 2018). Las proteínas I- κ B enmascaran el dominio de unión al ADN de las proteínas NF- κ B / REL y las mantienen en el citoplasma. Por otra parte, las señales inflamatorias (ej. TNF- α o LPS) inducen la fosforilación de las I- κ B por las cinasas de I- κ B (IKK), que conducen a la ubiquitinación y degradación de I- κ B. Una vez que NF- κ B se ha activado, se transloca al núcleo y activa la transcripción de sus genes blanco (Lingappan, 2018). Los heterodímeros de NF- κ B pueden modificarse directamente en condiciones de mayor estrés oxidativo (Lingappan, 2018; Morgan-Liu, 2011). El residuo de Cys-62 en el dominio RHD de la subunidad p50 es propenso a la oxidación, lo que disminuye su unión al ADN (Morgan-Liu, 2011). Este dominio se oxida en el citoplasma, pero se reduce en el núcleo, esta reducción restaura su unión a ADN por la proteína de unión a ARN y el factor de exportación (APE1/REF1) en el núcleo (Morgan-Liu, 2011). La fosforilación de Ser-276 en p65/RelA ocurre por la activación dependiente de H₂O₂ de PKAc, para la expresión transcripcional de los genes de NF- κ B. (Morgan-Liu, 2011). Así pues, el H₂O₂ activa NF- κ B al inducir la fosforilación de I- κ B, que lo conduce a degradación por proteosoma (Schoonbroodt et al., 2000). El H₂O₂ potencia la dimerización de IKK γ /NEMO para mediar la fosforilación y activación de IKK β , ya sea por la inhibición de la fosfatasa de IKK o por la oxidación directa de IKK para la persistente activación de NF- κ B (Morgan-Liu, 2011). La importancia de las EROs en la regulación de la actividad de NF- κ B se demuestra en células de carcinoma oral escamoso donde la disminución de la actividad de SOD resultó en una elevada producción de EROs y una mayor actividad de NF- κ B (Moloney et al., 2017).

1.8.4 Proteína supresora de tumores p53

La función fisiológica de la proteína supresora de tumores p53 incluye arresto celular, senescencia o muerte celular después del daño a ADN, lo cual previene la acumulación de

mutaciones oncogénicas (Sies-Jones, 2020). Las EROs están implicadas en la fosforilación de p53 mediada por la MAPK p38 α , proteína mutada de ataxia-telangiectasia (ATM) y ERK (Liu et al., 2008). El H₂O₂ modula la transactivación de los genes blanco de p53 en condiciones normales o aberrantes, a través de la oxidación de sus residuos de cisteína, lo que favorece la expresión de genes antioxidantes (ej. CAT, SOD2, GPX1) que reducen la acumulación de EROs, la regulación del ciclo celular y la liberación de EROs mitocondriales para desencadenar apoptosis (Moloney et al., 2017; Ding et al., 2015). De manera interesante, la pérdida o mutación de p53 en más del 50% de cánceres favorece la acumulación de EROs que favorece la señalización oncogénica y supervivencia celular (Moloney et al., 2017).

1.8.5 Factor nuclear eritroide 2 tipo 2 (NRF2)

Existe evidencia de que la hiperactivación del NRF2 está implicada en la promoción de la actividad antioxidante en células de cáncer, lo cual estimula el crecimiento del tumor, su supervivencia y la resistencia a la terapia (Sies-Jones, 2020; Ryoo et al., 2018; Ryoo et al., 2016). NRF2 regula genes divergentes para coordinar la detoxificación de xenobióticos: transportadores de casete de unión a ATP (ABC) y el gen de eflujo a multifármacos (MDR1); la detoxificación celular: hemo-oxigenasa (HO), NADPH quinona deshidrogenasa 1 (NQO1), aldo-ceto reductasa 1C1 (AKR1C1); el metabolismo: gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), fosfogluconato deshidrogenasa (PGD); y el mantenimiento de la homeostasis redox ante estrés oxidativo, por medio de la expresión de genes antioxidantes (ej. SOD, GPX1, CAT, GSR, PRDX1, TXNRD1) o genes implicados en la síntesis de GSH: glutatamato cisteína ligasa/glutatión sintetasa (GCLM) y glutatión-S-transferasa (GST) (Ryoo et al., 2016). La proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (KEAP1) es el regulador negativo de la actividad de NRF2. En condiciones basales, sin ningún tipo de estímulo de estrés, NRF2 está inactivo por la formación de un complejo con KEAP1 en el citoplasma. NRF2 es ubiquitinado y conducido a degradación proteosomal por KEAP1 a través de la proteína Cullin-3 (CUL3) que forma parte del complejo de ubiquitina ligasa E3. KEAP1 es una proteína de unión a actina rica en residuos de cisteína susceptibles a oxidación. Cuando las células son expuestas a estrés oxidativo o a un incremento en los niveles de EROs, la formación de puentes disulfuro (ej. Cys151, Cys273, Cys288) en

KEAP1, favorece su disociación de NRF2. Esto previene la degradación de NRF2 y promueve su translocación al núcleo para la activación de sus genes blanco (Ryoo et al., 2016). Los mecanismos moleculares que involucran la activación y acumulación de NRF2 aberrante en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, colon, hígado y gástrico (Moloney et al., 2017) son: a) mutaciones somáticas de KEAP1 o NRF2; b) silenciamiento epigenético del gen de KEAP1; c) la acumulación aberrante de proteínas que compiten por la unión con NRF2 y KEAP1 (Ryoo et al., 2016).

1.8.6 Factor inducible de hipoxia (HIF1)

La hipoxia surge en tumores primarios o metastásicos como resultado de una deficiencia en el suministro de O₂ en los tumores (Moloney et al., 2017). Las células cancerosas se adaptan a la hipoxia a través de HIF1, un interruptor metabólico que activa la glicólisis (Moloney et al., 2017). En cáncer, la glicólisis previene la acumulación de EROs al suministrar intermediarios para las vías de pentosas fosfato y la glutaminólisis, que generan los agentes reductores NADPH y GSH, respectivamente (Moloney et al., 2017).

HIF1 es un factor de transcripción heterodimérico, que consiste en dos subunidades proteicas una sensible a oxígeno HIF1- α y otra expresada constitutivamente HIF1- β (Zhou et al., 2014; Sies-Jones, 2020). La actividad de HIF1 es regulada por modificaciones postraduccionales del dominio de degradación inducible de oxígeno (ODD) en la subunidad α por la prolilhidroxilasa (PHD) en residuos de prolina (402 y/o 564), la HIF1- α hidroxilada es ubiquitinada por la ubiquitina ligasa E3 von Hippel–Lindau (VHL), y conducida a degradación en el proteosoma 26S (Zhou et al., 2014). En respuesta a bajos niveles de O₂, HIF1- α dimeriza con HIF1- β uniéndose al sitio de elementos de respuesta a hipoxia (HRE), para activar a sus genes blanco como el transportador de glucosa 1 (GLUT1), lactato deshidrogenasa (LDHA), cinasa de piruvato deshidrogenasa (PDK1) y VEGF (Zhou et al., 2014; Shi et al., 2012). Las enzimas que se mencionaron promueven el cambio metabólico dependiente de fosforilación oxidativa a glicólisis, lo cual disminuye el consumo de O₂, disminuye la actividad respiratoria e incrementa la formación de EROs mitocondriales (Zhou et al., 2014; Shi et al., 2012).

En normoxia, el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 participan en la acumulación de HIF1- α , al inhibir la actividad de PHD por la probable oxidación de su cofactor Fe^{2+} (Movafagh et al., 2015). En cáncer gástrico (Wu et al., 2017) y pancreático (Movafagh et al., 2015), la activación de HIF1 se relaciona ampliamente a angiogénesis, transporte de glucosa, migración y metástasis tumoral (Shi et al., 2012).

1.9 MITOCONDRIA Y NOX EN CÁNCER

Se han encontrado diversas alteraciones asociadas a la función mitocondrial y a la producción de EROs mediada por la mitocondria y por las NOX en distintos tipos de tumores. Con respecto a la mitocondria, estudios realizados en células de cáncer pancreático (Wang et al., 2015), cáncer de mama (Zhao et al., 2013; LeBleu et al., 2014), cáncer gástrico (Tamura et al., 2014) y carcinoma escamoso de cérvix (Porporato et al., 2014), sugieren un papel importante de la producción de EROs mitocondriales en la malignidad. En estos trabajos, las mitocondrias activas pero disfuncionales, es decir, que presentan cambios en su morfología, disminución en actividad respiratoria, incremento en proteínas de fisión mitocondrial, promueven una mayor capacidad migratoria e invasiva, asociada a un fenotipo metastásico.

Por otro lado, en líneas celulares de cáncer o en tumores humanos se ha reportado un incremento en el mRNA y/o la expresión de proteínas de las NOX (NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5) y sus subunidades regulatorias al compararlas con sus controles en etapas tempranas (Skonieczna et al., 2017). En células transformadas de riñón con RAS mutado, la NOX 1 estimula la proliferación celular y el crecimiento independiente de anclaje (Skonieczna et al., 2017). En carcinoma renal, la alta actividad de NOX2 se relaciona al proceso inflamatorio y a la formación de invadopodia (Skonieczna et al., 2017; Fitzgerald et al., 2012); y en células de cáncer de colon, la inducción del fenotipo invasivo por TPA (12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato) incrementó la expresión de NOX2 y de la metaloproteínasa-7 (MMP7) (Banskota et al., 2015). Todos estos eventos favorecen la metástasis.

Finalmente, también se ha reportado interacción entre ambas fuentes de EROs. La alta expresión de NOX4 en mitocondria se ha relacionado con disfunción y daño al ADN mitocondrial (Kalyanaraman et al., 2018). Interesantemente, las células de melanoma con sobreexpresión de AKT1 median la producción de EROs intracelulares al inducir un incremento en la expresión de NOX4, esto aumentó las mutaciones en ADN mitocondrial implicadas en la deficiencia respiratoria, que a su vez sostienen la formación de EROs mitocondriales (Govindarajan et al., 2007). En este mismo estudio, AKT1 también condujo a una sobreexpresión de VEGF que promovió la angiogénesis para el establecimiento del tumor *in vivo* (Govindarajan et al., 2007).

De esta forma, se pone de manifiesto la importancia de las NOX y la mitocondria en el mantenimiento del nivel de EROs con un papel importante en las características de malignidad en diferentes tipos de cáncer, incluidos melanomas, hepatomas, leucemia, gliomas, cáncer de páncreas, gástrico, vejiga, colon, pulmón, próstata y mama (Moloney et al., 2017; Block-Gorin, 2012).

1.10 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se define como el crecimiento descontrolado de las células epiteliales que se originan en los ductos o lóbulos de la mama (Figura 3) (Reilly, 2007). El cáncer de mama que ha invadido el estroma de mama circundante es el invasivo primario y el que se ha diseminado de los ganglios linfáticos drenantes a órganos distantes es el avanzado o metastásico (Reilly, 2007).

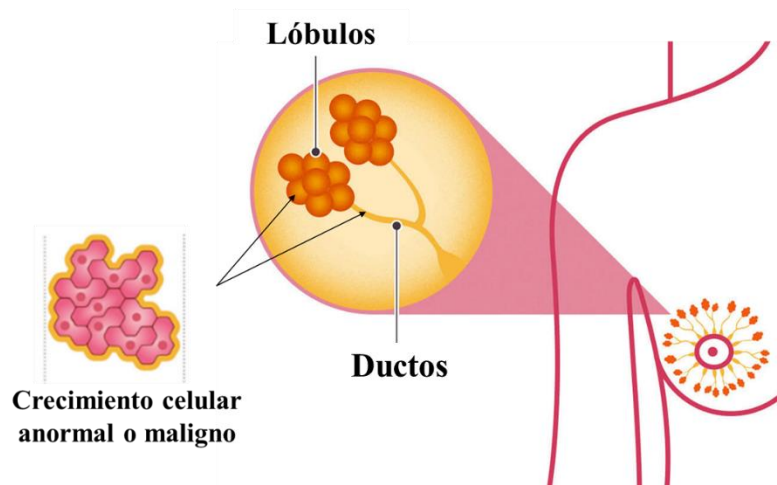


Figura 4. Cáncer de mama. Modificado de www.nationalbreastcancer.org

1.10.1 Etiología

Los principales factores de riesgo que predisponen al desarrollo de esta patología en mujeres están antecedentes familiares de cáncer de mama, mutaciones genéticas en el gen de proteína susceptible a cáncer de mama tipo 1 (BRCA)1 y tipo 2 (BRCA2); la obesidad y factores conductuales (ej. consumo de alcohol y tabaco) (Reilly, 2007). Los factores hormonales que incrementan el riesgo de contraer la enfermedad en mujeres son el inicio de la menstruación a edades tempranas, menopausia tardía o el consumo de hormonas estrogénicas como anticonceptivos orales (Reilly, 2007).

1.10.2 Estadios

De acuerdo al “National Cancer Institute”, una vez que el paciente se ha diagnosticado con cáncer de mama, el siguiente paso es determinar el estadio de la enfermedad (Tabla 1). La estadificación del cáncer de mama considera el tamaño del tumor, la propagación a ganglios linfáticos (número y ubicación) y metástasis o diseminación a otras áreas del cuerpo (Tabla 1). En etapas tempranas del cáncer de mama, el tratamiento inmediato es generalmente la cirugía o radiación, o una combinación de ambos con buen pronóstico, en tanto que, la quimioterapia no se considera necesaria. En el estadio 3 del cáncer de mama la cirugía ya no es suficiente, por lo

que, se opta por la mastectomía y radiación para el tratamiento local y terapia hormonal o quimioterapia para el tratamiento sistémico.

Tabla 1. Estadios de cáncer de mama

<i>Estadio</i>	<i>Sub-clasificación</i>	<i>Características</i>
0 No invasivo	Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i>	Crecimiento anormal no invasivo
I No invasivo	IA	Tamaño de tumor: <2 cm No hay extensión a ganglios linfáticos
	IB	Tamaño de tumor: <2 cm, crecimiento celular anormal en ganglios linfáticos (0.2 mm a 2.0 mm)
II Invasivo	IIA	Caso 1: crecimiento anormal no asociado a células cancerosas y <4 ganglios linfáticos tienen células cancerosas Caso 2: Tamaño de tumor <2 cm y <4 ganglios linfáticos tienen células cancerosas Caso 3: Tamaño de tumor de 2-5 cm sin extensión a ganglios linfáticos
	IIB	Caso 1: Tamaño de tumor de 2-5 cm y <4 ganglios axilares tienen células cancerosas Caso 2: Tamaño >5 cm sin extensión a ganglios linfáticos
	IIIA	Caso 1: Sin tumor asociado con células cancerosas, con extensión de 4-9 ganglios linfáticos cercanos Caso 2: Tamaño de tumor >5 cm y crecimiento celular anormal en ganglios linfáticos (0.2 mm a 2.0 mm) Caso 3: Tamaño del tumor >5 cm y extensión a 1,2 o 3 ganglios linfáticos axilares
III Invasivo	IIIB	El tumor es de cualquier tamaño, es invasivo a pared torácica o la piel de la mama, inflamación y úlceras, extensión hasta 9 ganglios linfáticos
	IIIC	Invasivo Caso 1: No hay tumor real en la mama o el tumor puede ser de cualquier tamaño, es invasivo a pared torácica o la piel de la mama, inflamación y úlceras, extensión >10 ganglios linfáticos axilares Caso 2: No hay tumor real en la mama o el tumor puede ser de cualquier tamaño, extensión en ganglios linfáticos de la clavícula
IV Metastásico	N/A	Diseminación a cerebro, huesos, pulmones e hígado

1.10.3 Clasificación de cáncer de mama

El cáncer de mama abarca una variedad heterogénea de tipos de tumores que se clasifican según sus características histológicas y moleculares (ATCC, 2015). Los análisis genómicos de tumores epiteliales y líneas celulares de mama clasifican a este tipo de cáncer en subtipos moleculares que son diferentes en incidencia, supervivencia y respuesta al tratamiento (Jiang et al, 2016; Prat et al, 2010; Prat-Perou, 2009). Los subtipos moleculares de cáncer de mama que se han reportado son Luminal A, Luminal B, enriquecido en el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2+), tipo Basal y bajo en claudinas (Tabla 2) (Jiang et al., 2016; Prat et al., 2013; Prat-Perou, 2011; Prat et al., 2010).

En tumores de mama derivados de pacientes, el subtipo luminal A tienen bajo riesgo de recaída y buen pronóstico, mientras los subtipos Luminal B, HER2+ y Basal tienen un alto riesgo de recurrencia (Prat-Perou, 2011). Aproximadamente del 70-75% de los cánceres de mama invasivos expresan receptores hormonales (receptor de estrógeno ER y receptor de progesterona PR) (Sandhu et al., 2010). Las neoplasias malignas ER+ se clasifican como cánceres luminales. Los subtipos Luminal B se diferencian del subtipo Luminal A, por la expresión de HER2, su tasa de proliferación y el grado histológico (Tabla 2) (Prat-Perou, 2011; Sandhu et al., 2010). Por otra parte, el análisis de alteraciones genómicas en los subtipos moleculares muestra que la mutación más frecuente en el subtipo Luminal A fue en PIK3CA y, en los subtipos HER2+ y basal fue en TP53 (Russnes et al., 2011).

En cuanto al subtipo basal, este se denomina así porque los tumores son positivos a marcadores que se expresan en células epiteliales basales que tienen contacto con la lámina basal del ducto de la mama (Ricardo et al., 2011; Sandhu et al., 2010; Prat et al., 2010; Prat-Perou, 2009) (Tabla 2). Los carcinomas basales (Basal-like) se caracterizan por tener altos niveles de EGFR, keratinas basales (5/6) y en su mayoría son del subtipo triple negativo (ER⁻, PR⁻, HER2⁻). El subtipo de tumor “bajo en claudinas”, inicialmente descrito como Basal B (Neve et al., 2006), presenta la expresión más baja de genes implicados en la adhesión epitelial célula-célula y de diferenciación epitelial luminal (Tabla 2), así como, altos valores en la

proporción del ARNm CD44/CD24 y CD49f/EpCAM (Prat et al., 2010). Además, este subtipo de tumor presenta una alta expresión de marcadores mesenquimales comparado con el subtipo Basal (Le et al., 2018) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación molecular de cáncer de mama

<i>Subtipo molecular</i>	<i>Características</i>
<i>Luminal A</i>	Baja expresión del marcador de proliferación Ki67 ^{a,c} Expresión de receptores hormonales (ER+, PR+/-) ^{b,c} Baja frecuencia de mutación, pocos reordenamientos cromosómicos ^d
<i>Luminal B</i>	Alta expresión del marcador de proliferación Ki67 ^{a,c} Expresión de receptores hormonales (ER+, PR+/-) ^{b,c} Expresión de HER2 ^c Amplificaciones de alto nivel ^d
<i>HER2+</i>	Alta expresión del marcador de proliferación Ki67 ^a Alta expresión de genes asociados a ciclo celular ^c Amplificaciones de alto nivel, aberraciones de brazo cromosómico y altos niveles de rearrreglos más complejos (17q) donde se encuentra el gen ERBB2/HER2 ^d
<i>Basal-like</i>	Alta expresión del marcador de proliferación Ki67 ^a Positivos a marcadores de célula epitelial basal: CK5/6, CK14 o CK17, laminina, P-caderina, vimentina y EGFR ^b Múltiples translocaciones y reordenamientos segmentarios ^d En su mayoría son del subtipo TN por inmunohistoquímica ^{b,c} .
<i>Bajo en claudinas</i>	Baja expresión de genes de adhesión epitelial célula-célula (ej. E-cadherina y claudinas 3, 4 y 7) y de diferenciación epitelial luminal (ej. CD24, EpCAM) ^c Alta expresión de genes relacionados al proceso de transición epitelio-mesenquimal (ej. TWIST, ZEB1, SNAI2, MMP2,

TGFBR2, entre otros), genes de respuesta inmune y genes asociados a proceso biológicos de célula troncal^c

Alta expresión de marcadores mesenquimales (vimentina, N-caderina, y represores de E-caderina como TWIST)^c

a: ATCC, 2015; b: Sandhu et al., 2010; c: Prat-Perou, 2011; d: Russnes et al., 2011. ER: Receptor de estrógenos; PR: Receptor de progesterona; IHC: inmunohistoquímica; CK: Citoqueratina MEC: matriz extracelular; HO-1: hemoxigenasa 1; EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; ERK: MAPK regulada por señal extracelular; ABC: casete de unión a ATP; EpCAM: molécula de adhesión epitelial.

La clasificación mediante inmunohistoquímica de tumores de cáncer de mama ha demostrado ser una buena opción que correlaciona con la expresión génica para clasificar a los tumores en subtipos moleculares (Jiang et al., 2016; Prat-Perou, 2011). La determinación del subtipo molecular permite predecir el desarrollo de la enfermedad y el tratamiento más adecuado y específico para cada paciente (Jiang et al., 2016; Sandhu et al., 2010). En la práctica clínica, la clasificación en subtipos se hace mediante inmunohistoquímica determinando la expresión del receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor tipo II del factor de crecimiento epidérmico (HER2), clasificándose en Luminal A (ER+, PR+/-, HER2-), Luminal B (ER+, PR+/-, HER2+), positivo a HER2 (HER2+) y TN (ER-, PR-, HER2-) (Cardenas et al., 2015; Sandhu et al., 2010) (Tabla 3).

Los subtipos luminales, son tratados con terapia endocrina (ej. tamoxifeno, un antagonista de los receptores de estrógeno) o con inhibidores de aromatasa (ej. letrozol, anastrozol) (Jiang et al., 2016; Ciccarese et al., 2008). El subtipo luminal B se trata con inhibidores del ER y trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido a HER2, y el subtipo HER2+ también con trastuzumab (Jiang et al., 2016; Sandhu et al., 2010). Los subtipos TN no expresan receptores hormonales (Lehmann et al., 2011; Prat et al., 2010; Sandhu et al., 2010) por lo que, aún no cuentan con una terapia dirigida, siendo los de mayor recurrencia y peor pronóstico (Lehmann et al., 2011; Sandhu et al., 2010) (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de cáncer de mama y su aproximación por inmunohistoquímica (Cardenas et al., 2015)

<i>Subtipo molecular</i>	<i>ER</i>	<i>PR</i>	<i>HER2</i>	<i>Tratamiento</i>
<i>Luminal A</i>	(+)	(+/-)	(-)	<i>Tamoxifeno</i>
<i>Luminal B</i>	(+)	(+/-)	(+)	<i>Tamoxifeno/Trastuzumab</i>
<i>HER2(+)</i>	(-)	(-)	(+)	<i>Trastuzumab</i>
<i>TN</i>	(-)	(-)	(-)	<i>Sin terapia dirigida</i>

Los estudios realizados en tejidos primarios, xenoinjertos de pacientes y líneas celulares establecidas de diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, han identificado a una pequeña población celular dentro de la masa tumoral conocida como células troncales de cáncer de mama (BCSC), con capacidad de reconstituir el tumor de mama, y a la cual se le atribuye la recurrencia, la resistencia a la terapia (ej. quimioterapia y radioterapia) y la diseminación metastásica en pacientes (Velasco et al., 2018; Pires et al., 2016). Incluso, se ha visto una asociación entre la proporción de las BCSC dentro del tumor de mama y su malignidad e invasividad (Velasco et al., 2018).

En secciones posteriores se describen las propiedades de las células troncales tumorales (CSC) que favorecen el mantenimiento y la progresión tumoral en distintas neoplasias malignas.

1.11 CÉLULAS TRONCALES TUMORALES (CSC)

Las CSC de las neoplasias malignas sólidas humanas, incluidas la de mama, cerebro, colon, cérvix, próstata, pulmón, cabeza y cuello, melanoma, tiroides y páncreas (Skonieczna et al., 2017; Korkaya et al., 2011; Ryoo et al., 2018) son una pequeña población de células dentro de la masa del tumor con capacidad de autorrenovación y diferenciación, dando lugar a una población heterogénea de células tumorales (Skonieczna et al., 2017; Xu et al., 2017; Park et al., 2010) (Figura 5), propiedades que comparten con células troncales hematopoyéticas, embrionarias y tisulares (Zhou et al., 2014).

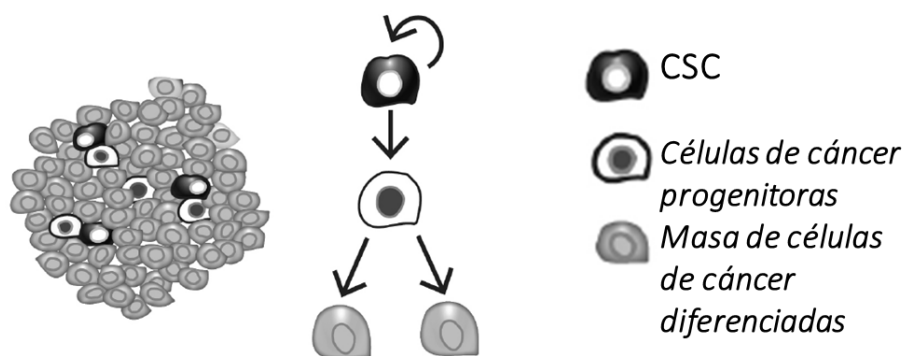


Figura 5. CSC en las neoplasias malignas humanas. Modificado de Velasco et al., 2018

El proceso de autorrenovación consiste en que durante la división celular de la célula troncal se producen una (asimétrica) o dos (simétrica) células hijas que conservan la propiedad de autorrenovación (Kreso-Dick, 2014; Shi et al., 2012). Esto asegura que la población de células troncales se mantenga para el crecimiento clonal a largo plazo y se reconstituya la heterogeneidad del tumor (Kreso-Dick, 2014; Takahashi et al., 2011).

Las dos teorías que describen la evolución genética de las poblaciones que conforman el tumor a partir de las CSC, indican que las células cancerosas más diferenciadas adquirieron propiedades de autorrenovación, o bien, la célula troncal de tejido normal se transformó como resultado de la acumulación de mutaciones somáticas oncogénicas, bajo la influencia de factores microambientales extrínsecos (Lee, B. et al., 2019; Xu et al., 2017).

Las CSC se identifican dentro de la masa tumoral mediante ensayos establecidos que comprueban su capacidad de autorrenovación, y se basan en las premisas de que: a) Las CSC expresan proteínas de superficie celular características (ej. CD49f, CD133, CD44, CD24); presentan una alta actividad de enzimas detoxificantes, como la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1); muestran sobreexpresión de factores de transcripción asociados a la pluripotencialidad como factor de transcripción de región determinante del sexo Y-caja 2 (SOX2), el factor de transcripción de unión a octamero 4 (OCT4) y Nanog (Toledo et al., 2018; Zhao et al., 2017); b) Las CSC forman agregados celulares en forma de esferas (ej. mamoesferas, neuroesferas) en cultivo en placas de ultra baja adherencia, lo que las distingue

de las células más diferenciadas que mueren bajo estas condiciones (Velasco et al., 2018; Jiao et al., 2015; Lombardo et al., 2015; Iglesias et al., 2013; Dontu et al., 2003); y c) las CSC inician y mantienen tumores heterogéneos en ratones inmunodeficientes o singénicos tras trasplantarse en serie, lo cual es la principal evidencia de troncalidad en células de cáncer (Velasco et al., 2018; Xu et al., 2017; Dontu et al., 2003).

1.11.1 Métodos de detección de las BCSC

Las BCSC se identificaron inicialmente como una población celular asociada al fenotipo $CD44^+/CD24^{-low}$ en tumores de pacientes de cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003). CD44 es una glicoproteína transmembranal altamente expresada en células troncales hematopoyéticas, embrionarias y tisulares (Zhao et al., 2017), mientras que CD24 es un indicador de diferenciación epitelial (Ricardo et al., 2011).

En tumores y líneas celulares de cáncer de mama, las células $CD44^+/CD24^{-low}$ exhiben resistencia a los medicamentos, propiedades invasivas y capacidad para iniciar tumores (Zhao et al., 2017; Liu et al., 2014; Al-Hajj et al., 2003) y, por tanto, son marcadores ampliamente utilizados para evaluar características de troncalidad. Sin embargo, se sabe que las células $CD44^+/CD24^{-low}$ se encuentran altamente enriquecidas en los subtipos basales de cáncer de mama y esta población no siempre correlaciona con la capacidad de formar colonias o con su potencial tumorigénico (Velasco et al., 2018; Iglesias et al., 2013; Park et al., 2010). Por lo tanto, por sí solos, no pueden utilizarse como marcadores de troncalidad en todos los subtipos de cáncer de mama y se sugiere complementarlos con estudios funcionales (Velasco et al., 2018; Iglesias et al., 2013; Park et al., 2010).

Otro de los marcadores utilizados para medir troncalidad en varios tipos de tumores malignos es la actividad de ALDH (Toledo et al., 2018), cuya expresión es alta en células troncales hematopoyéticas, embrionarias y epiteliales (Zhao et al., 2017; Gao et al., 2014; et al., 2007; Prat-Perou, 2009; French-Clarkson, 2012). En cáncer de mama, la actividad de ALDH puede enriquecer la población troncal a partir de la población de células $CD44^+/CD24^{-low}$ en fracciones que son altamente tumorigénicas, al generar tumores heterogéneos *in vivo* a partir de

injertos de solo 20 células (Ginestier et al., 2007; Prat-Perou, 2009; French-Clarkson, 2012) (Figura 6) y la alta expresión de ALDH1 se ha asociado con tumores de alto grado en cáncer de mama (Ricardo et al., 2011; Park et al., 2010). En cuanto a los factores de transcripción pluripotentes sobreexpresados en BCSC se encuentran Nanog, SOX2, factor tipos Kruppel 4 (Klf4), proteína tipo Sal 4 (Sall4) y Cmyc (Zhao et al., 2017), y éstos se pueden utilizar adicionalmente como marcadores de troncalidad.

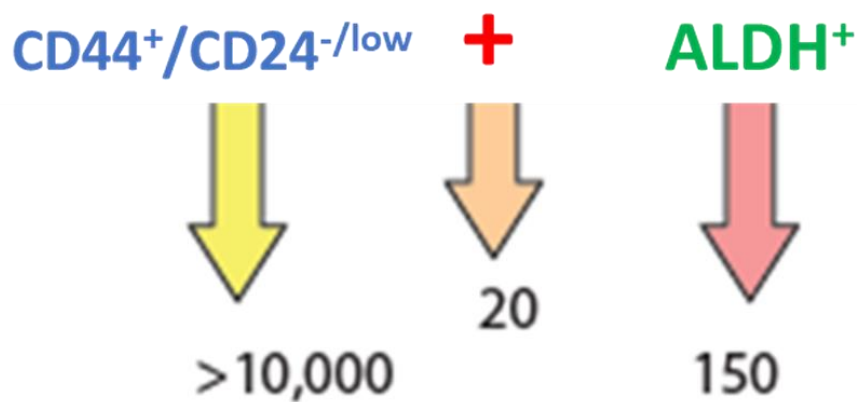


Figura 6. Marcadores asociados a troncalidad en líneas celulares de cáncer de mama. Densidades celulares mínimas enriquecidas en marcadores CD44⁺CD24^{-/low}, ALDH1⁺ y ALDH1⁺CD44⁺CD24^{-/low}, derivadas de tumores primario de mama, con capacidad de formar mamoferas *in vitro* y de iniciar tumores heterogéneos *in vivo* (Shao et al., 2016; Liu et al., 2014; French-Clarkson, 2012; Ginestier et al., 2007)

Las proteínas propuestas como marcadores para evaluar BCSC se han asociado a características de malignidad y al subtipo molecular en cáncer de mama (Ricardo et al., 2011). La expresión de CD24 se ha asociado a la expresión de marcadores epiteliales (citoqueratina 18, MUC1 y GATA3) mientras que la alta expresión de CD44 se ha asociado con la metástasis a nódulos linfáticos y a la expresión de marcadores basales (EGFR, citoqueratina 5, P-caderina, citoqueratina 14 y vimentina) sugiriendo una correlación para la expresión de CD24 con los tumores de tipo luminal y una relación entre la expresión de CD44 con los tumores tipo basal (Ricardo et al., 2011; Park et al, 2010). También, se ha sugerido una relación entre la expresión de estos marcadores con la célula de origen del tumor o una relación de la población

CD44⁺/CD24^{-low} con la población troncal dependiente del subtipo de cáncer de mama (Ricardo et al., 2011).

La evaluación conjunta de CD44 y CD24 para la identificación de la población troncal en cáncer de mama ha producido resultados contradictorios principalmente atribuidos a la alta heterogeneidad en la expresión de estos marcadores en cada uno de los subtipos de cáncer de mama. La población CD44⁺/CD24^{-low} aislada de una línea celular de cáncer de mama luminal (MCF7) muestra mayor capacidad de formación de tumores (Yan et al., 2013) y de formar metástasis (Velasco et al., 2018), sugiriendo la utilidad de estos marcadores en los subtipos de cáncer de mama con características epiteliales, como los subtipos luminales (Ricardo et al., 2011). Del mismo modo, en tumores de cáncer de mama, la expresión conjunta de CD44⁺/CD24^{-low} se ha encontrado asociada a nódulos linfáticos positivos, negatividad para citoqueratina 5 y negatividad para vimentina, sugiriendo su uso potencial para tumores que no expresen estos marcadores mesenquimales (Ricardo et al., 2011).

En el subtipo TN, mientras que los tumores de tipo basal muestran una alta proporción de la población CD44⁺/CD24^{-low} (> al 10%), las líneas celulares de este mismo subtipo presentan una frecuencia de positividad heterogénea (1-80%). Esto se ha atribuido a distintos grados de diferenciación para las líneas celulares de los subtipos de cáncer de mama basal: mientras que algunos tienen altos niveles de expresión de CD24, sugerentes de un fenotipo epitelial más diferenciado, otras estarían formadas por células menos diferenciadas, mostrando fenotipos más mesenquimales y baja expresión de CD24 (Ricardo et al., 2011). Por tanto, la posible asociación de la expresión de CD44 y CD24 con otros marcadores de troncalidad resulta interesante para cada uno de los subtipos de cáncer de mama (Ricardo et al., 2011).

Por otro lado, se ha encontrado una alta proporción de células con alta actividad de ALDH1 en líneas celulares y en tumores de tipo basal de cáncer de mama, donde la alta expresión se asocia a un peor pronóstico. Por tanto, se ha sugerido que los marcadores CD44⁺/CD24^{-low}/ALDH1⁺ funcionen para evaluar células troncales con distintos niveles de diferenciación. Mientras que los marcadores CD44⁺/CD24^{-low} se relacionarían con carcinomas

que provengan de una célula troncal primitiva, el marcador ALDH1⁺ se asociaría a tumores provenientes de progenitores luminales más diferenciados (Ricardo et al., 2011).

En este trabajo se planteó originalmente evaluar una posible correlación de los diferentes marcadores asociados a troncalidad con los niveles de EROs en líneas celulares pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad. Sin embargo, sólo se evaluaron los marcadores CD44 y CD24, quedando pendiente la evaluación de ALDH. Por tanto, en la siguiente sección, se detallan características particulares de los marcadores asociados a troncalidad en cáncer de mama y su relación con EROs que serán importantes para la interpretación de resultados.

1.11.2 Marcadores asociados a troncalidad en cáncer de mama

1.11.2.1 CD44

El grupo de diferenciación (“cluster of differentiation”, CD) de glicoproteína multifuncional 44 es un receptor para componentes de la matriz extracelular (MEC), principalmente el ácido hialurónico (HA), y es también el marcador de CSC más común en diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama, próstata, vejiga, colon, ovario, estómago, cérvix, útero, nasofaríngeo, cabeza y cuello, pulmón y páncreas (Chanmee et al., 2015).

CD44 es una glicoproteína transmembrana que actúa como receptor para ligandos de la matriz extracelular, como el ácido hialurónico (HA), colágeno, fibronectina, laminina, osteopontina y factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) (Chanmee et al., 2015). En cuanto a la estructura de CD44, se forma de un dominio N-terminal con un módulo de homología, sitio donde se unen sus ligandos, especialmente HA; otros dominios son la región variable, dominio transmembrana y dominio C-terminal citoplasmático (Figura 7a) (Chanmee et al., 2015). El dominio citoplasmático de CD44 puede formar complejos con diferentes proteínas del citoesqueleto y componentes de señalización intracelular como las Rho-GTPasas, cinasa SRC y moléculas que regulan la adhesión y migración celular (Chanmee et al., 2015). La interacción entre CD44 y sus ligandos como el HA tiene un papel importante dentro de la

preservación del fenotipo troncal de células normales y de cáncer (Chen et al., 2018). En cáncer de colon, próstata y de mama CD44 regula la transmisión de señales en proceso de autorenovación, resistencia a multifármacos, activación de señales antiapoptóticas y metástasis (Chanmee et al., 2015).

Existen diferentes isoformas de CD44 derivadas del splicing alternativo del ARN mensajero de (ARNm) de CD44 (19 exones en humanos, 20 exones en murinos) con diferentes funciones celulares (Figura 7b) (Chen et al., 2018). La isoforma más pequeña de CD44 (80–85 kDa) conocida como CD44 estándar (CD44s), está codificada por los exones constantes (exones 1-5, 16-20) y es expresada predominantemente en células hematopoyéticas y en subconjuntos de células epiteliales normales (Nagano et al., 2013; Chen et al., 2018). La inclusión de los exones variantes (exones 7-15: V2-V10) mediante la proteína reguladora de splicing epitelial (ESRP) 1 y 2 entre los exones constantes, genera las isoformas variantes CD44 (CD44v), que están altamente expresadas en carcinomas epiteliales (Chen et al., 2018; Chanmee et al., 2015; Nagano et al., 2013).

Con relación al cáncer, ambas isoformas de CD44 se han asociado a fenotipos de malignidad. Las isoformas CD44v se han relacionado a la activación de receptores Tyr cinasa (MET, ERBB4), a transportadores de monocarboxilatos y a la inhibición de receptores de muerte en diversos tipos de cáncer, contribuyendo a la activación de vías de señalización relacionadas a la proliferación, metabolismo glicolítico e inhibición de la apoptosis (Nagano et al., 2013). Por otro lado, en carcinoma de mama, un cambio en la isoforma CD44v a la isoforma CD44s está relacionada con la adquisición de un fenotipo tipo mesenquimal, asociado a la activación de TGF- β (Nagano et al., 2013) y en líneas celulares de cáncer de mama, la expresión de CD44s también se ha asociado a la resistencia a quimioterapéuticos (Nagano et al., 2013; Ryoo et al., 2018). La expresión de CD44 también se ha asociado con la resistencia a daño oxidativo en células de cáncer (Chanmee et al., 2015). En células de cáncer gástrico, se ha reportado que CD44v contribuye a la detoxificación de EROs mediante su interacción con el transportador de cistina-glutamato xCT, promoviendo la entrada de cistina a la célula para la síntesis de GSH (Nagano et al., 2013; Ishimoto et al., 2011). La expresión de CD44s se ha relacionado también con la resistencia a doxorrubicina en células de cáncer de mama MCF7 y

MDA MB231, y la mayor expresión de CD44 se asoció con mayores niveles de NRF2, un factor de transcripción que regula genes antioxidantes y de detoxificación celular (Ryoo et al, 2018; Ryoo et al. 2016). También, en células de cáncer gástrico, la población celular CD44 (+) mostró una mayor expresión de genes antioxidantes (ej. GPX1 y PRDX1) (Ishimoto et al., 2011).

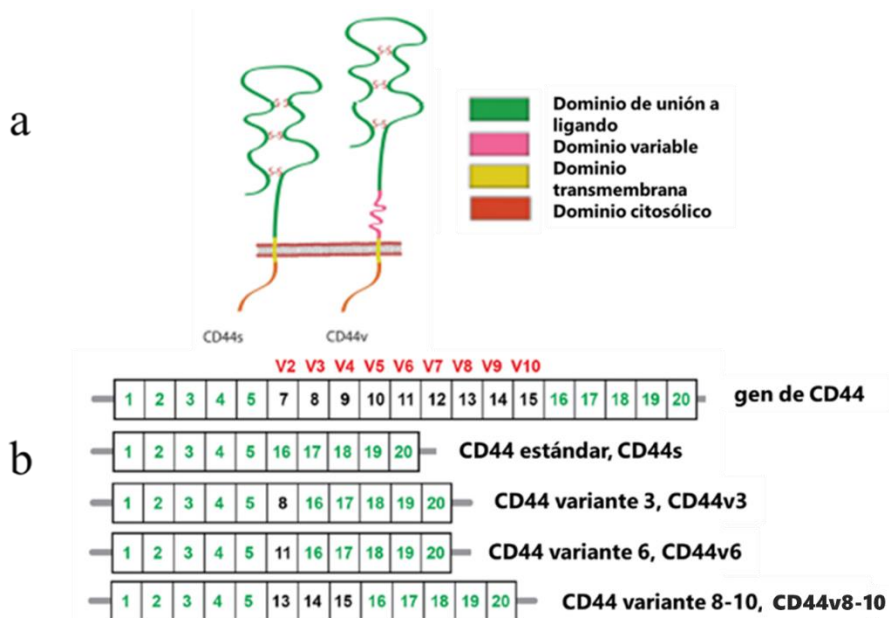


Figura 7. Estructura del gen y proteína de CD44. a) dominios estructurales de la proteína CD44; b) Gen completo de CD44 y las isoformas variantes de CD44. Modificado de Chen et al., 2018; Chanmee et al., 2015; Nagano et al., 2013.

Por lo general, los trabajos que estudian la expresión de CD44 y su relación con el fenotipo troncal no distinguen entre las diversas isoformas de CD44, pero su identificación podría ayudar a esclarecer cada una de sus funciones y las diferencias observadas entre el fenotipo troncal y los distintos niveles de CD44 en varios tipos de cáncer o subtipos de cáncer pertenecientes al mismo tejido.

1.11.2.2 CD24

CD24 es una pequeña proteína de superficie celular similar a la mucina, fuertemente glicosilada y unida a la membrana a través de glicosil- fosfatidilinosil (GPI). CD24 es un ligando

para P-selectina, un receptor de adhesión en células endoteliales activadas y plaquetas (Nakamura et al., 2017; Kristiansen et al., 2004) (Figura 8).

CD24 se expresa en células hematopoyéticas como células B y T; y en células no hematopoyéticas como células neurales, ganglionares, epiteliales, queratinocitos, células musculares, de páncreas y células troncales epiteliales (Fang et al., 2010; Toledo et al., 2018). La sobreexpresión de CD24 en linfocitos ha sugerido que los niveles de CD24 pueden determinar la capacidad de células B y T progenitoras tempranas para proliferar y sobrevivir (Fang et al., 2010). Por otra parte, CD24 es también un marcador reconocido de epitelio de mama (Rostoker et al., 2015). Las poblaciones celulares con niveles intermedios de CD24 en conjunto con niveles altos de integrina α (CD49f) muestran habilidad para reconstituir tejido epitelial de mama, es decir, regeneran una glándula de mama funcional *in vivo* (Rostoker et al., 2015; Diehn et al., 2009). Estudios comparativos en poblaciones celulares epiteliales de glándula mamaria bovina aisladas con estos dos marcadores asocian altos niveles de CD24 con la población progenitora epitelial luminal y las células maduras epiteliales de mama (Finot et al., 2018; Rauner-Barash, 2012).

Adicionalmente, en células derivadas de sitios primarios y metastásicos de tumor de mama se reporta que la población CD24 (-) fue capaz de formar xenoinjertos de tumor en ratones inmunodeficientes comparado con la población CD24 (+) sin capacidad tumorigénica (Al-Hajj et al., 2003), sugiriendo que la baja expresión de CD24 enriquece para la población de BCSC. En este mismo trabajo, se demostró que la población celular con fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} reestableció en pasajes seriales *in vivo*, los linajes celulares tumorigénicos (CD44⁺/CD24^{-/low}) y no tumorigénicos (CD44⁺/CD24⁺) (Al-Hajj et al., 2003). Por tanto, la población CD44⁺/CD24^{-/low} conservó la capacidad de autorrenovación y diferenciación para tumores de cáncer de mama. De manera importante, se sugiere que los progenitores luminales (que son CD24⁺) son la célula de origen mas probable para la mayoría de los carcinomas mamarios y que la pérdida de expresión de CD24 correlacionaría con una menor diferenciación y con tumores más mesenquimales (Ricardo et al., 2011; Prat-Perou, 2009)

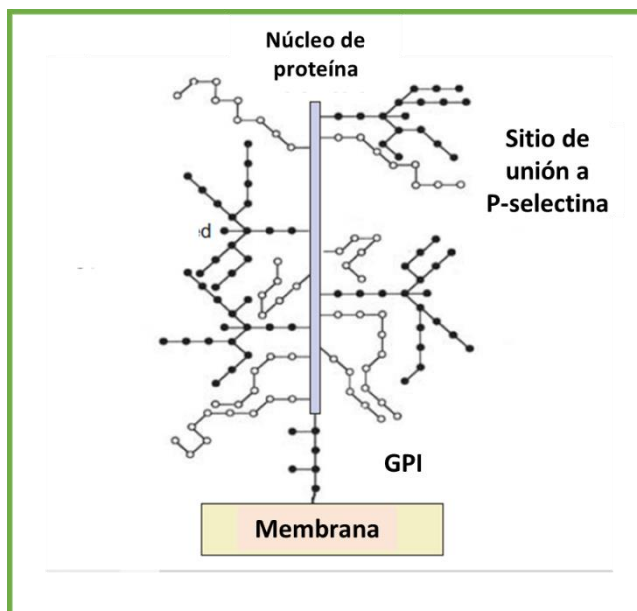


Figura 8. Modelo molecular de CD24. Modificado de Fang et al, 2010; Kristiansen et al, 2004

1.11.2.3 Aldehído deshidrogenasa (ALDH)

Otra estrategia para la identificación y purificación de CSC es el uso de marcadores funcionales o intracelulares (Toledo et al., 2018). El principal marcador funcional de CSC es la ALDH1, una enzima que pertenece a la superfamilia de enzimas ALDH, codificadas por 19 genes (Toledo et al., 2018) y que están implicadas en la regulación de funciones cruciales en células troncales normales y CSC (Muralikrishnan et al., 2020).

Las ALDH son enzimas citoplasmáticas dependientes de NAD(P)^+ involucradas en la oxidación irreversible de aldehídos intracelulares a ácidos carboxílicos débiles (Zhao et al., 2017; Gao et al., 2014, Singh et al., 2013;). La desintoxicación de los aldehídos reactivos es fundamental, ya que su toxicidad puede conducir a daño al ADN y muerte celular (Muralikrishnan et al., 2020) (Figura 9). Otro papel importante que se ha descrito para las enzimas ALDH es su participación en el metabolismo del ácido retinoico, que es importante para la expresión génica y la morfogénesis durante la fase de crecimiento en el desarrollo embrionario, diferenciación celular y homeostasis en vertebrados (Muralikrishnan et al., 2020).

Las enzimas ALDH clase I citosólicas catalizan la oxidación del *trans*-retinal y del 9-*cis*-retinal a ácido *trans*-retinoico y ácido 9-*cis*-retinoico (Muralikrishnan et al., 2020). De este modo, regulan la proliferación y diferenciación de células troncales (Singh et al., 2013) (Figura 9).

En las células cancerosas, se ha determinado que las isoformas ALDH1A1 y ALDH3A1 metabolizan la ciclofosfamida, un fármaco contra el cáncer, a una forma menos activa, lo cual contribuye a la resistencia a fármacos (Muralikrishnan et al., 2020). En pacientes con cáncer cervical y uterino, la alta expresión de ALDH1 se asoció a recurrencia, invasión metastásica a nódulos linfáticos y baja supervivencia (Muralikrishnan et al., 2020). En estos dos tipos de cáncer, así como en el cáncer de ovario, se ha demostrado que la población ALDH⁺ presentó múltiples características de célula tipo troncal como quimioresistencia, mayor expresión de genes de pluripotencialidad, baja regulación de genes de diferenciación, así como mayor habilidad para formar esferoides *in vitro*, comparadas con la subpoblación ALDH⁻ (Muralikrishnan et al., 2020; Wang et al., 2014).

Por otra parte, las células con alta actividad de ALDH (ALDH⁺) se han asociado con CSC derivadas de diferentes tipos de tumores sólidos como cáncer de colon, pulmón, cuello uterino, gástrico, colorrectal, próstata, mama, páncreas, melanoma y neuroblastoma (Muralikrishnan et al., 2020; Toledo et al., 2018). Esta población celular se caracteriza por tener un mayor potencial de proliferación, capacidad de formar colonias, autorrenovación, capacidad tumorigénica *in vivo*, metástasis y resistencia a fármacos (Muralikrishnan et al., 2020; Toledo et al., 2018).

Otra función atribuida a las enzimas ALDH en las células troncales es la eliminación de EROs, reduciendo el estrés oxidativo (Muralikrishnan et al., 2020) (Figura 9). Así, las enzimas ALDH favorecen la producción de NADPH, un cofactor de enzimas antioxidantes, o captan los radicales hidroxilos mediante grupos sulfhidrilo en residuos de cisteína o metionina (Singh et al., 2013). La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos, incluidos el taxano y el platino, generan estrés oxidativo y elevan los niveles de aldehídos derivados de la peroxidación lipídica. En el caso de la ALDH2 y ALDH1A1 se ha demostrado que detoxifican los aldehídos reactivos 4-HNE y malondialdehído (MDA), disminuyendo así el daño oxidativo generado en

membranas, proteínas y ADN (Singh et al, 2013). En líneas celulares de adenocarcinoma de ovario, se demostró que la población ALDH1^{high} presentó menores niveles de EROs asociados a una alta actividad antioxidante, mediada por la activación de NRF2 y la sobrerregulación de las enzimas antioxidantes SOD2 y HO-1, comparada con la población ALDH^{low} (Mizuno et al., 2014). Por lo tanto, se propone que las CSC ALDH^{high} tengan un nivel de EROs más bajo y menor daño oxidativo (Figura 9) que sus contrapartes de baja actividad de ALDH (ALDH^{low}) (Muralikrishnan et al., 2020).

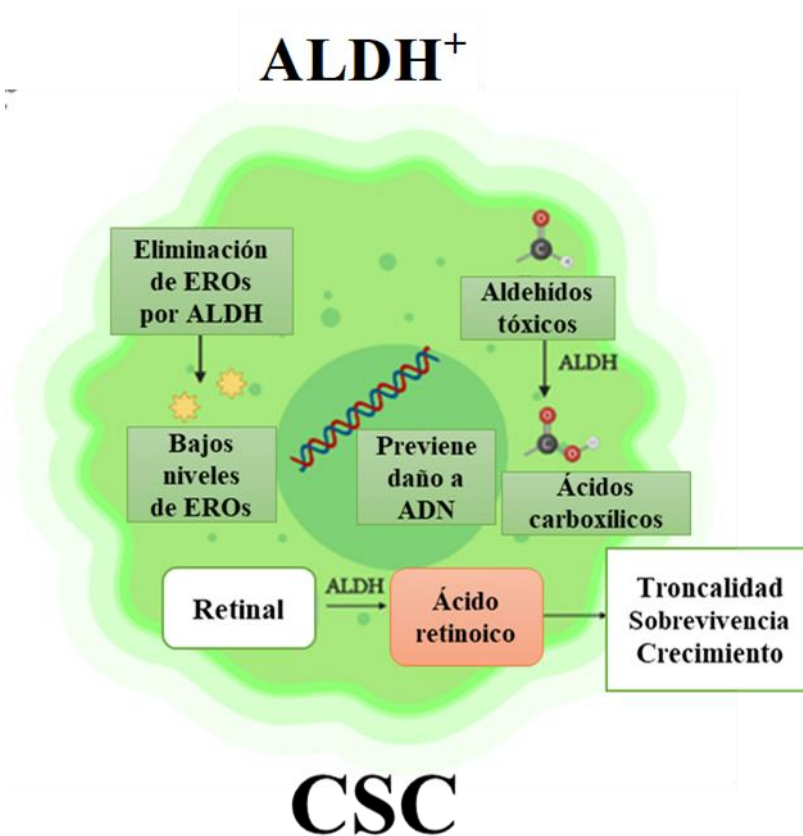


Figura 9. Papel del aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) en células troncales tumorales (CSC). La ALDH detoxifica aldehídos (endógenos y exógenos) a ácidos carboxílicos menos tóxicos, mantiene niveles bajos de EROs previniendo estrés oxidativo y daño al ADN y oxida el retinal a ácido retinoico, lo cual promueve la troncalidad, crecimiento y supervivencia en CSC. Modificado de Muralikrishnan et al, 2020.

Con base a lo descrito anteriormente, la actividad ALDH1 permite identificar y aislar las CSC, pero también se ha determinado que los miembros de la familia ALDH desempeñan

actividades biológicas importantes en las CSC, incluidas la respuesta al estrés oxidativo, la diferenciación y la resistencia a fármacos.

1.12 EROs Y TRONCALIDAD

Se ha demostrado que las células troncales del sistema nervioso central y las células troncales hematopoyéticas (HSC) tienen niveles más bajos de EROs que su progenie más madura (Bigarella et al., 2014). Así, una propiedad común entre las HSC, células troncales embrionarias (ESC), células troncales tisulares y las CSC es su bajo nivel de EROs, en comparación con su linaje más maduro (Zhou et al., 2014; Bigarella et al., 2014; Ryoo et al., 2018) y es en el sistema hematopoyético donde más evidencia existe sobre el papel del sistema antioxidante celular en el mantenimiento de la troncalidad (Zhou et al., 2014; Bigarella et al., 2014; Shi et al., 2012). Así, en HSC y en células progenitoras multipotentes hematopoyéticas de *Drosophila*, el incremento de EROs compromete su capacidad de autorenovación, al promover la entrada a ciclo celular y la activación de vías de diferenciación reguladas por la MAPK p38 (Zhou et al., 2014; Bigarella et al., 2014; Nagano et al., 2013). De manera análoga, en células troncales embrionarias, la acumulación de EROs se asocia a regulación a la baja de factores de transcripción pluripotentes (ej. OCT4, Nanog y SOX2) (Zhou et al., 2014), sugiriendo un papel importante del sistema antioxidante en el mantenimiento de los niveles bajos de EROs y de la pluripotencialidad.

En cuanto a las células leucémicas derivadas de la transformación de las HSC, recientes investigaciones han corroborado que también los niveles bajos de EROs son esenciales para el mantenimiento de las CSC (Bolton et al., 2013; Lagadinou et al., 2013). Mientras que en leucemia mieloide crónica las células troncales leucémicas requieren mayores niveles de EROs que las HSC para mantener la señal oncogénica propia de la enfermedad (Bolton et al., 2013), en la leucemia mieloide aguda se ha demostrado que las células leucémicas que generan xenoinjertos de tumor en ratones inmunodeficientes corresponden a una población minoritaria de la masa total del tumor con bajos niveles de EROs (Lagadinou et al., 2013). Por lo tanto, aunque estas diferencias podrían deberse a las características de cada una de las enfermedades,

las CSC leucémicas parecerían tener mayores niveles de EROs que las HSC para mantener su señalización oncogénica pero menores niveles de EROs que el resto de las células tumorales para mantener cierta capacidad de diferenciación.

De acuerdo con lo anterior, también se ha demostrado que las células troncales epiteliales de mama tienen niveles de EROs más bajos que las células progenitoras del mismo tejido (Diehn et al., 2009). En cuanto a las CSC, se ha reportado que las CSC muestran un estado reducido o de niveles bajos de EROs comparado con su progenie más diferenciada en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (Diehn et al., 2009), donde los niveles bajos de EROs se han asociado a una mayor actividad antioxidante mediada por la activación de factores de transcripción asociados a la troncalidad (Miran et al., 2018; Ding et al., 2015; Diehn et al., 2009), que favorece un estado quiescente o de lenta proliferación evitando el acortamiento de los telómeros y la acumulación de errores en la replicación o daños al ADN (Shi et al., 2012). Así, en general, las CSC muestran una mayor capacidad de reparación de ADN y resistencia al daño celular como el estrés oxidativo, exposición a compuestos químicos y radiación ionizante (Shi et al., 2012). Lo anterior garantiza el mantenimiento a largo plazo de la población celular encargada de reconstituir el tumor.

1.13 EROs Y BCSC

Las mitocondrias de las células troncales normales (ej. ESC, HSC) son inmaduras y relativamente inactivas en términos de producción de ATP, comparadas con mitocondrias aisladas de células diferenciadas (Bigarella et al., 2014). También, las HSC muestran baja velocidad respiratoria y bajos potenciales de membrana mitocondriales comparadas con su progenie (Du et al., 2014; Simsek et al., 2010), lo que se ha asociado a una baja producción de EROs mitocondriales. Es así como el metabolismo de las HSC, células troncales neuronales (NSC) y células troncales mesenquimales (MSC) dependiente de glicólisis, de la vía de pentosas fosfato y de una disminución de la fosforilación oxidativa, contribuye a mantener bajos los niveles de EROs, asociado a su quiescencia y capacidad de autorenovación (Bigarella et al., 2014).

Al igual que las HSC, se ha demostrado que las células troncales epiteliales normales de mama presentan bajos niveles de EROs que su progenie más diferenciada (Diehn et al., 2009). De manera importante, estas EROs pueden detectarse con MitoSOX, sugiriendo que provienen, al menos parcialmente, de la mitocondria (Diehn et al., 2009). Del mismo modo, las BCSC (CD44⁺/CD24^{-/low}) aisladas de tumores primarios de mama presentaron menores niveles de EROs que el resto de las células tumorales (Diehn et al., 2009). Estos bajos niveles de EROs se asociaron con una alta expresión de genes antioxidantes y a una mayor radioresistencia (Diehn et al., 2009).

Al respecto, en la mama normal, se han identificado dos poblaciones troncales, ambas con capacidad de autorenovación y diferenciación (Liu et al., 2014). Las células EpCAM⁻/CD49f⁺ de fenotipo CD44⁺/CD24⁻ expresaron genes basales/mesenquimales y se localizaron en la membrana basal de los ductos de la mama (Liu et al., 2014). Por otro lado, las células EpCAM⁻/CD49f⁺/ALDH⁺ fueron altamente proliferativas y con un perfil de expresión epitelial, además de que se encontraron presentes en la parte luminal de los lóbulos de la mama (Liu et al., 2014). Del mismo modo, en tumores de cáncer de mama, así como en líneas celulares no tumorigénicas y de cáncer de mama, se han identificado dos poblaciones troncales: una del tipo epitelial (E-BCSC) y otra del tipo mesenquimal (M-BCSC), ambas capaces de formar mamoesferas *in vitro* y con capacidad tumorigénica *in vivo* (Shao et al., 2016; Liu et al., 2014; French et al., 2012; Ginestier et al., 2007). Ambas poblaciones troncales mostraron diferencias en su ciclo celular, perfiles metabólicos y redox. Las M-BCSC se caracterizaron por la expresión de los marcadores de superficie celular CD44⁺/CD24^{-/low}, baja proliferación, alto grado de invasividad y localización en el frente invasivo (Liu et al., 2014). Por su parte, las E-BCSC mostraron una alta actividad de ALDH, alta capacidad proliferativa, localización en el interior del tumor (Liu et al., 2014) y mayores niveles de EROs comparados con la M-BCSC (Luo et al., 2018), pero menores niveles de EROs que la masa tumoral “bulk” con el fenotipo ALDH⁻/CD44⁺/CD24⁺. Esta última mostró los niveles más elevados de EROs (Luo et al., 2018; Liu et al., 2014). De manera importante, tratamientos que regularon los niveles de EROs, regularon la transición entre los distintos tipos de BCSC, ya que el tratamiento con H₂O₂ o 2-deoxiglucosa, un inhibidor glicolítico, incrementaron los niveles de EROs e indujeron una transición de las células M-BCSC hacia E-BCSC (Luo et al., 2018). Del mismo modo, la población de E-BCSC

fue más susceptible al tratamiento antioxidante con un inhibidor de TXN, incrementando la expresión de los marcadores de diferenciación epitelial (CD24 y citoqueratina 8/18) (Luo et al., 2018).

Las evidencias descritas anteriormente apoyan la noción de que las BCSC muestran menores niveles de EROs que la masa tumoral y que existen diferencias en niveles de EROs entre distintas poblaciones de BCSC. Por tanto, el propósito de este trabajo fue investigar si estos niveles bajos de EROs en BCSC ocurren en líneas celulares pertenecientes a distintos subtipos de cáncer de mama, comenzando por la evaluación de la población $CD44^+/CD24^{low}$ y quedando pendiente por evaluar la población $ALDH^+$ y la importancia de las EROs provenientes de la mitocondria o de la NOX en el mantenimiento de la población troncal.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo (Cardenas et al., 2019). Se estiman alrededor de 1.7 millones de casos nuevos cada año y fallecen 522,000 mujeres por esa enfermedad (Cardenas et al., 2019). En México, el cáncer de mama ha tenido un incremento constante en incidencia y mortalidad en las últimas tres décadas (Cardenas et al., 2019). De acuerdo con el reporte del Departamento de Epidemiología de la Secretaría de Salud, la incidencia se incrementó entre 2000 y 2013 llegando de 10.76 casos por 100,000 habitantes a 26.1 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años, estimando 23,873 nuevos casos en 2013 (Cardenas et al., 2019), por lo que significa un importante problema de salud pública.

En la población mexicana, la frecuencia promedio de subtipos moleculares definidos por inmunohistoquímica es la siguiente: receptores hormonales positivos 60% (Luminal A y Luminal B), HER-2 positivos 20.4% y TN 23.1%. (Cardenas et al., 2019). En general, los subtipos luminales ER+ presentan un buen pronóstico y sobrevivencia a largo plazo (80-85% de sobrevivencia a 5 años), en contraste con los subtipos (ER-): HER+ y TN con un pronóstico precario (50-60% sobrevivencia en 5 años) y mayor recurrencia (Lehmann et al., 2011; Sandhu et al., 2010). A pesar de que los subtipos TN son de los menos frecuentes se relacionan a tumores de mayor tamaño, estadios superiores con afectación ganglionar en el momento del diagnóstico y son biológicamente más agresivos (Sandhu et al., 2010). En la práctica clínica, los subtipos TN se tratan con quimioterapia y radioterapia, sin embargo, la proliferación reincide y existen casos frecuentes de metástasis temprana (Sandhu et al., 2010; Jiang et al., 2016), por lo que, aún no cuentan con una terapia dirigida y efectiva (Sandhu et al., 2010). En la búsqueda de tratamientos alternativos, algunos autores dirigen sus esfuerzos a las CSC, la población celular dentro del tumor asociada a la resistencia a la terapia, reincidencia tumoral y metástasis (Lee et al., 2019). Estudios en líneas celulares de cáncer de mama demuestran que las células resistentes a la terapia endocrina y citotóxica muestran características de BCSC (Velasco et al., 2018; Ryoo et al., 2018), y en pacientes de cáncer de mama, se ha reportado una asociación entre la proporción de las BCSC en el tumor y las características de malignidad e invasividad (Velasco et al., 2018).

Por otra parte, se ha demostrado que las BCSC tienen niveles bajos de EROs con respecto a las células del resto de la población tumoral (Zhou et al., 2014; Shi et al., 2012; Diehn et al., 2009), atribuido a una mayor actividad antioxidante. Esta última característica ha sido evaluada en células tipo troncal de líneas celulares de cáncer de mama y tumores primarios, donde se observa que al reducir su actividad antioxidante existe mayor susceptibilidad a la terapia (Miran et al., 2018; Diehn et al., 2009).

Debido a que el papel de las EROs en la regulación de la sobrevivencia celular en cáncer de mama y en el mantenimiento de la población tipo troncal en los diferentes subtipos moleculares de la enfermedad aún no es claro, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿Los tratamientos con antioxidantes inducen muerte celular en células de cáncer de mama?
¿Existe una relación entre la población tipo troncal $CD44^+/CD24^{low}$ y los niveles de EROs en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad?

3. JUSTIFICACIÓN

En México y en el mundo, el cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres por tumores malignos. A pesar de los avances que existen en los tratamientos dirigidos, en nuestro país la tasa de mortalidad a causa de esta enfermedad se ha incrementado en los últimos años. Diversos trabajos sugieren que los tratamientos actuales en cáncer de mama logran eliminar a la población celular del tumor más diferenciada, pero enriquecen a las BCSC (Ryoo et al., 2018; Velasco et al., 2018; Wu et al., 2015; Lee, B. et al., 2019), una pequeña población dentro de la masa tumoral con capacidad de reconstituir el tumor de mama. Incluso, la quimioterapia convencional (ej. cisplatino y doxorubicina), dirigida a las células proliferativas, no afecta a las BCSC que son quiescentes o de lenta proliferación (Muralikrishnan et al., 2020; Tian et al., 2018; Yang et al., 2019), esto causa una reducción en la eficacia de la terapia a largo plazo, recurrencia y mal pronóstico en pacientes. Por otra parte, las BCSC se asocian a características clínicas distintivas del cáncer como la malignidad, la invasividad y la diseminación metastásica del tumor de mama. Así mismo, las BCSC muestran los niveles más bajos de EROs dentro de la masa tumoral, lo que se ha atribuido a una mayor actividad antioxidante que confiere resistencia al daño oxidativo y favorece su sobrevivencia. Actualmente, la relación entre el nivel de EROs, su relación con los marcadores y el mantenimiento de la población de BCSC, así como su participación en la sobrevivencia celular en los diversos subtipos de cáncer de mama no es clara. Por lo tanto, el presente trabajo busca contribuir a la comprensión de la relación que existe entre el nivel basal de EROs y la sobrevivencia al tratamiento con antioxidantes y las características asociadas a troncalidad en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos moleculares de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis alternativa

Existe una relación entre el nivel basal de EROs y las características asociadas a troncalidad en líneas celulares de cáncer de mama

Hipótesis nula

No existe una relación entre el nivel basal de EROs y las características asociadas a troncalidad en líneas celulares de cáncer de mama

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar una probable relación entre el nivel basal de EROs, las características asociadas a troncalidad y su papel en la sobrevivencia celular en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad

Objetivos específicos

1. Determinar los niveles basales de EROs en líneas celulares de cáncer de mama, pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad
2. Evaluar el efecto del tratamiento con antioxidantes sobre la sobrevivencia de las líneas celulares de carcinoma mamario, pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad.
3. Evaluar una posible correlación entre las EROs y los marcadores asociados a troncalidad en las líneas celulares de neoplasia de mama, pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad



CAPÍTULO II

METODOLOGÍA



6. DIAGRAMA DE TRABAJO

En este apartado se muestra el diagrama general de trabajo (Figura 10) que se planteó originalmente en base a nuestros objetivos específicos:

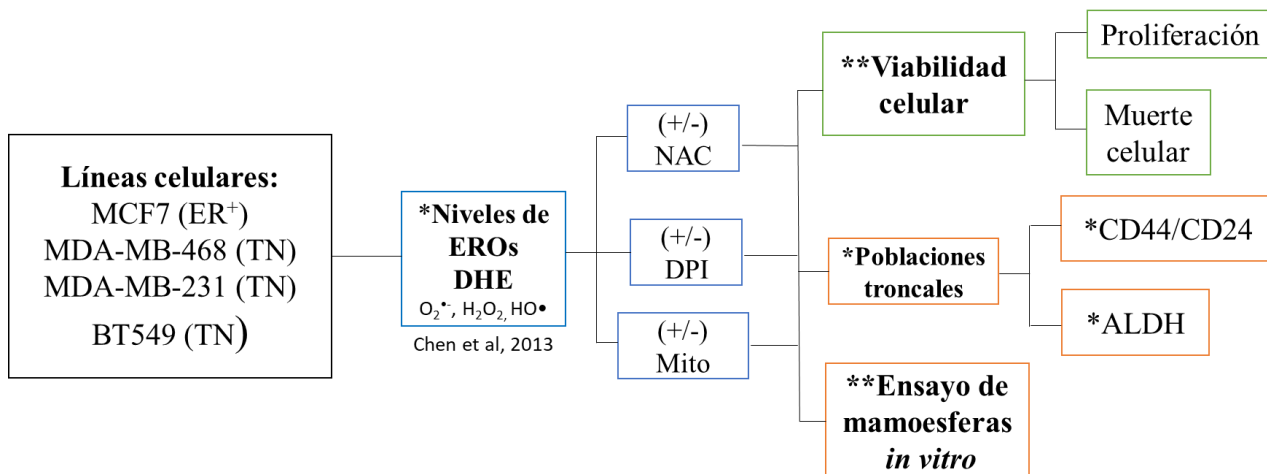


Figura 10. Diagrama general de trabajo. Técnicas: *Citometría de flujo (BD FACS Canto II), análisis de poblaciones celulares (software Flow Jo V10); ** Sistema de imagen celular en tiempo real “Incucyte ZOOM”. Objetivo 1 (azul), Objetivo 2 (verde), Objetivo 3 (naranja). DHE: Dihidroetidio, marcador de EROs (O₂^{•-}, H₂O₂, HO•); NAC: N acetil cisteína, precursor de glutatión y/o tiol antioxidante; DPI: difenileno yodonio, inhibidor no competitivo de las flavoenzimas como las NOX; Mito: Mitotempo, mimético de SOD mitocondrial

7. METODOLOGÍA

7.1 Líneas y medios de cultivo celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama que se evaluaron fueron MCF7, MDAMB468, MDAMB231 y BT549 (ANEXO I, Tabla 4 y 5). Las cuales se cultivaron en los siguientes medios: MCF7 en Earle’s MEM (Caisson, MEP14-1L) con Suero Bovino Fetal (SBF, Biowest S1650-500) al 10% y 10 µg/mL de insulina bovina; BT549 en RPMI-1640 (Caisson, RPP12-1L) con SBF al 10% y 7.5 µg/mL de insulina bovina; MDAMB231 y MDAMB468 en DMEM/Ham’s F12 (Caisson, DFP18-1L) con SBF al 10%. Los medios de cultivo contenían 100 U/mL de penicilina y 1 mg/mL de estreptomycin.

Según la clasificación molecular, la línea celular MCF7 pertenece al subtipo Luminal A (ER⁺/PR⁺), y las líneas MDAMB468, MDAMB231 y BT549 correlacionan con el subtipo basal, TN (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) (Jiang et al., 2016) (ANEXO I, Tabla 5). La línea celular MCF7 conserva características del epitelio de mama diferenciado como la habilidad para metabolizar el estradiol mediante los receptores de estrógeno citoplasmáticos (www.atcc.org). El análisis genómico del estado de diferenciación de la línea celular MCF7 muestra que ~ 98% de las células que la conforman muestran un fenotipo: CD49^{f⁻/low}/EpCAM⁺, es decir, de célula luminal madura, en tanto que solo el ~2% mostró un estado no diferenciado (EpCAM^{-/low}) (Prat et al., 2010). La línea celular MDAMB468 muestra un fenotipo intermedio epitelial-mesenquimal (ANEXO I, Tabla 5). Además, la línea MDAMB468 pertenece al subtipo basal, y se sabe que conserva características epiteliales, mientras que las líneas celulares MDAMB231 y BT549 pertenecen al subtipo bajo en claudinas, con características mesenquimales (Le et al., 2018; Prat et al., 2010) (ANEXO I, Tabla 5). Un análisis genómico para clasificar al cáncer de mama TN refiere una clasificación adicional para estas dos últimas líneas celulares, donde la BT549 corresponde a un fenotipo mesenquimal, con señalización implicada en motilidad celular, interacción con la matriz extracelular y vías de diferenciación, mientras que la MDAMB231 se clasifica como de tipo mesenquimal troncal, con vías de señalización parecidas al subtipo mesenquimal, además de genes relacionados a señalización por factores de crecimiento (EGFR, PDGR, ERK), transportadores ABC y señalización de adipocinas (Le et al., 2018; Lehmann et al., 2011) (Vease “Clasificación de cáncer de mama”, Tabla 3).

7.2 Determinación de EROs por tinción con DHE y citometría de flujo

Los niveles de EROs se determinaron por tinción con DHE (Sigma Aldrich 37291-25 MG; λ de excitación/emisión=518/606 nm; marcador de EROs: O₂⁻, H₂O₂, HO[•]) mediante la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (ANEXO II), con y sin tratamiento antioxidante: NAC (Sigma Aldrich A7250-50G), DPI (Sigma Aldrich D2926-10MG) y Mito (Sigma Aldrich SML0737-5MG) a las concentraciones indicadas en cada uno de los experimentos (ANEXO III).

La sonda fluorescente que empleamos para la detección de las EROs fue el DHE (Chen et al., 2013). El DHE reacciona con el O_2^- generando el 2-hidroxi-etidio (2-OH-E⁺) (ANEXO II, Figura 11) y productos intermediarios que a su vez reaccionan con $\bullet OH$ o H_2O_2 para formar el etidio (E⁺) (Chen et al., 2013), ambos compuestos son altamente fluorescentes. El E⁺ se determina a una longitud de onda (λ) de excitación de 500-530 nm y emisión de 590-620 nm (Chen et al., 2013). Por otro lado, la fluorescencia del 2-OH-E⁺ se detecta a una λ de excitación y emisión de 480 nm y 567 nm, respectivamente (Chen et al., 2013). Los productos fluorescentes del DHE pueden ser detectados por microscopia de fluorescencia, citometría de flujo o medición de 2-OH-E⁺ por HPLC (Dikalov-Harrison, 2014). En nuestro estudio los productos fluorescentes del DHE (E⁺ y 2-OH-E⁺) se midieron por citometría de flujo (Dikalov-Harrison, 2014) mediante el canal de fluorescencia rojo (BD FACS Canto II).

En el análisis de los datos obtenido por citometría de flujo, definimos dos poblaciones celulares de acuerdo a sus niveles de EROs, seleccionando el 5% de la población celular con mayores intensidades de fluorescencia para DHE (parte superior): “ROS High” y el 5% de la población celular con menores intensidades de fluorescencia para DHE (parte inferior): “ROS Low”, en el software FlowJoV10 (ANEXO II, Figura 12).

El efecto del tratamiento antioxidante se evaluó mediante cambios en la frecuencia relativa media en las poblaciones “ROS Low” y “ROS High”. Para este análisis se sembraron 8×10^4 - 1×10^5 células en placas de 12 pozos de las líneas celulares. Después de 24 h, se incubaron con los antioxidantes: NAC (15 y 30 mM), DPI (3 y 5 nM) y Mito (50 y 100 μM) (ANEXO III) durante 2 h a 37°C con 5% de CO_2 , se utilizó un control sin antioxidantes y un control de autofluorescencia sin DHE. Enseguida se agregó el DHE a una concentración final 10 μM (ANEXO III) por 30 minutos, a 37 °C 5% CO_2 en medio de cultivo protegiendo las muestras de la luz, ya que el compuesto es fotosensible. Después se hicieron 2 lavados con PBS 1X a temperatura ambiente, las células se tripsinizaron, se colectaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 100 μl de PBS 1X con 3% de SFB. Las muestras se filtraron en una malla de poro de 60 micras y se midieron por citometría de flujo (BD FACSCanto II, BD Biosciences). El análisis estadístico

se realizó en el software Graph Pad Prism, mediante la prueba Kruskal-Wallis, *post hoc* comparación de Dunn.

7.3 Evaluación de la proliferación y muerte celular

Para evaluar el efecto del tratamiento con los antioxidantes en la sobrevivencia celular se hicieron ensayos de proliferación y muerte celular por captación de imágenes en el sistema de microscopia en tiempo real “Incucyte ZOOM” (ANEXO III, Figura 13). Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad celular de 3000-5000 células por pozo y después de 24 h de incubación se trataron a las concentraciones indicadas anteriormente en 100 μ L de medio cultivo durante 24 h. La proliferación celular es expresada como % de confluencia cada 4 h durante 24 h (ANEXO III, Figura 13a). La muerte celular se midió después de 24 h mediante tinción con yoduro de propidio (IP, Sigma Aldrich P4170) 10 μ M (ANEXO III) por 10 min, la cual es expresada como % de confluencia roja (IP +) /% de confluencia total (Anexo III, Figura 13b). El análisis estadístico se realizó en el software Graph Pad Prism, para la proliferación celular se empleó la prueba estadística ANOVA de dos vías, *post hoc* comparación múltiple de Bonferroni y para la muerte celular se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía, *post hoc* comparación múltiple de Dunnet.

Nota.- Para el vehículo de DPI 3 y 5 nM, se utilizó la concentración equivalente de DMSO, es decir, de una solución 1 μ L/mL de DMSO en medio de cultivo, se tomó 1 μ L /mL y 1.7 μ L/mL de medio de cultivo para tratar las células.

7.4 Evaluación de los marcadores asociados a troncalidad CD44 y CD24 por citometría de flujo

Para identificar los marcadores asociados a troncalidad CD44, CD24 y su asociación con poblaciones “ROS Low” y “ROS High” en las líneas celulares de cáncer de mama se sembraron 8×10^4 - 1×10^5 células en placas de 12 pozos. Después de 24 h, se tiñeron con DHE (10 μ M, 30 minutos) a 37 °C 5% CO₂ en medio de cultivo protegiendo las muestras de la luz, ya que el compuesto es fotosensible. Después se hicieron 2 lavados con PBS 1X a temperatura ambiente.

Las muestras se tripsinizaron y se incubaron con los anticuerpos dirigidos a CD44 (BD Horizon V450 Mouse Anti-Human 561292, 1:100) y CD24 (BD Pharmingen PE Mouse Anti-Human 555428, 1:20) a 4 °C, por 30 minutos, evitando la exposición a la luz (ANEXO IV, Tabla 6). Ambos anticuerpos se titularon previamente, determinando la concentración más baja que daba la señal más alta de fluorescencia. Enseguida, las muestras se centrifugaron (3500 rpm/ 5 minutos), se removió el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µl de PBS 1X con 1% de SBF, a 4 °C por 5 minutos en oscuridad. Después, nuevamente se centrifugaron (3500 rpm/ 5 minutos), se resuspendieron en 100 µl de PBS 1X + 3% SBF y se filtraron para su análisis en el citómetro de flujo (BD FACS Canto II, BD Biosciences). El anticuerpo de CD44 esta conjugado al fluoróforo V450, que se excita por el láser violeta a una excitación y emisión máximas de 405 y 450 nm, respectivamente. La fluorescencia emitida fue detectada por el canal de fluorescencia Pacific Blue (BD FACS Canto II, ANEXO IV, Tabla 6). En el caso del anticuerpo de CD24, este está conjugado al fluoróforo ficoeritrina (PE), que se excita por el láser azul a excitación y emisión máximas de 496 y 578 nm, respectivamente. La fluorescencia emitida fue detectada por el canal de fluorescencia ficoeritrina (PE, BD FACS Canto II, ANEXO IV, Tabla 6). El análisis de poblaciones se realizó con el programa FlowJo V10.0., utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMOs) para la asignación de “gates” en las poblaciones celulares CD44-V540⁺, CD24-PE⁺ y DHE (+) (ANEXO IV, Figura 14).



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

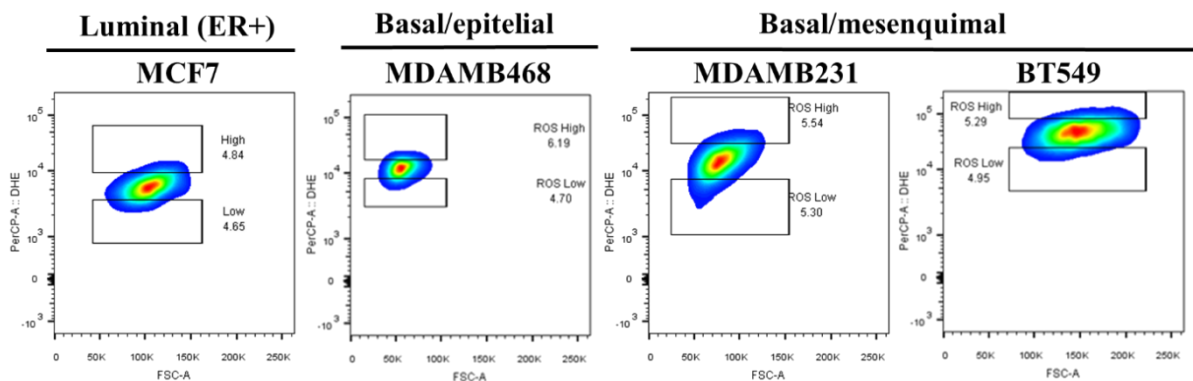


8. RESULTADOS

Para evaluar los niveles de EROs en las distintas líneas celulares de cáncer de mama, utilizamos tinción con DHE, marcador de EROs totales (O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$), midiendo la fluorescencia emitida por citometría de flujo. Como se reportó anteriormente, las líneas celulares estudiadas difieren en el nivel de EROs, observando que las líneas del subtipo TN tienen los niveles más altos de EROs comparado con la línea MCF7 del subtipo luminal (ER+) (Gráfica 1, Sarmiento et al., 2019).

Para evaluar el efecto de los distintos antioxidantes sobre los niveles basales de EROs en las distintas líneas celulares, evaluamos cambios en la frecuencia relativa media (FRM) de las poblaciones definidas como de niveles altos (“ROS High”) y bajos (“ROS Low”) de EROs después del tratamiento con los antioxidantes: NAC (15 y 30 mM), DPI (3 y 5 nM) y Mito (50 y 100 μ M). Dichas poblaciones se definieron seleccionando el 5% de la población celular con mayor intensidad de fluorescencia para DHE (parte superior): “ROS High”; y el 5% de la población celular de menor intensidad de fluorescencia para DHE (parte inferior): “ROS Low” (Gráfica 1).

El efecto de los antioxidantes sobre las poblaciones “ROS High” y “ROS Low” se muestran en la Gráfica 2. En la línea celular MCF7 (Luminal ER⁺) tratada con la menor concentración de NAC (15 mM), se observó una disminución significativa de la población “ROS High” (Gráfica 2a), sin efecto aparente en la “ROS Low” (Gráfica 1b) (N=4). En cuanto al tratamiento de la MCF7 con DPI, observamos que tanto la “ROS High” como la “ROS Low” tuvieron un decremento e incremento significativo (Gráfica 2), respectivamente, con ambas concentraciones (N=3). Por otra parte, la misma línea celular tratada con Mito (50 μ M) muestra un aumento significativo en la población “ROS Low” (Gráfica 1b), no así para su contraparte “ROS High” (Gráfica 2a) (N=3). Estos datos sugieren en la línea celular MCF7 una participación importante de la NOX, pero también de la mitocondria en menor medida, en la producción de EROs.



Gráfica 1. Poblaciones de niveles altos (“ROS High”) y bajos (“ROS Low”) de EROs basales por citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de mama. Selección de la “ROS High”: 5% de la población celular con mayores intensidades de fluorescencia para DHE (parte superior) y “ROS Low”: 5% de la población celular con menores intensidades de fluorescencia para DHE (parte inferior).

En la línea celular MDAMB468, únicamente observamos una disminución significativa en la población “ROS High” con la concentración más alta de Mito (N=3) (Gráfica 2a). En la misma línea celular, la población “ROS Low” se incrementó con las concentraciones más elevadas de DPI (N=3) y Mito (N=3) (Gráfica 2b), sugiriendo una participación considerable de la mitocondria y también de la NOX en la producción de EROs en esta línea celular.

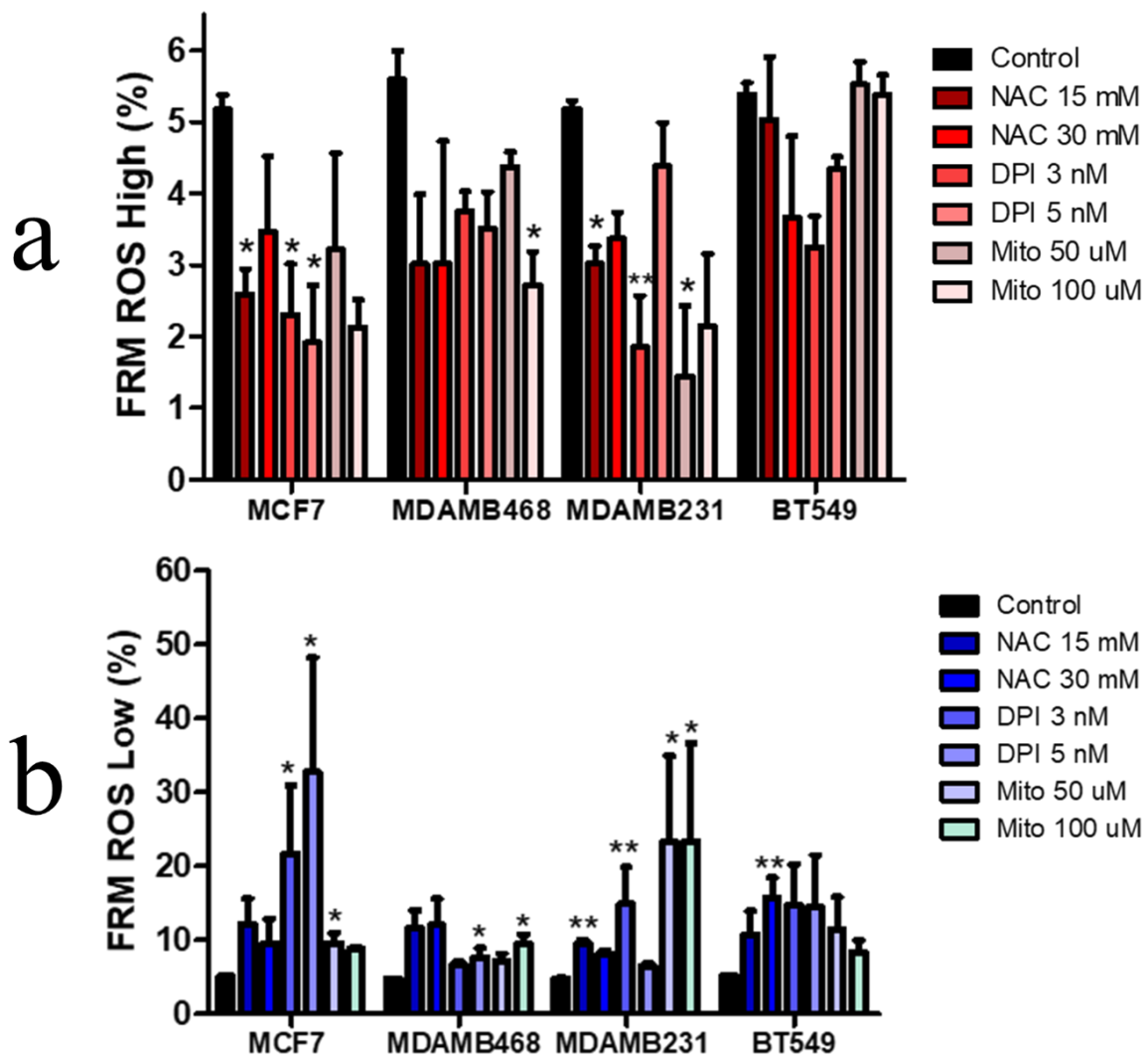
En la línea celular MDAMB231, las poblaciones “ROS High” y “ROS Low” disminuyeron y aumentaron, respectivamente, con las concentraciones más bajas de los tres antioxidantes (N=3-4) (Gráfica 2a/b), incluso en esta misma línea celular la concentración más alta de Mito (100 μ M) incrementó también la población “ROS Low” (N=3) (Gráfica 1b). Por lo tanto, al igual que en la línea celular MDAMB468, los datos sugieren una participación tanto de la NOX como de la mitocondria en los niveles totales de EROs en esta línea celular. En cuanto a la línea celular BT549 el único tratamiento que mostró un cambio en alguna de las poblaciones estudiadas fue el NAC (30 mM), el cual incrementó de forma significativa la población “ROS Low” (N=4) (Gráfica 2b), y no mostró ningún efecto en la población “ROS High”, donde ningún antioxidante tuvo efecto (Gráfica 2a). Estos datos en la línea celular BT549 sugieren que esta línea celular podría tener una fuente de EROs adicional a la NOX y mitocondria, o bien, que los niveles de EROs en esta línea celular son tan elevados (como se

muestra en la Gráfica 1) que la concentración utilizada de los antioxidantes tuvo poco efecto en esta línea celular.

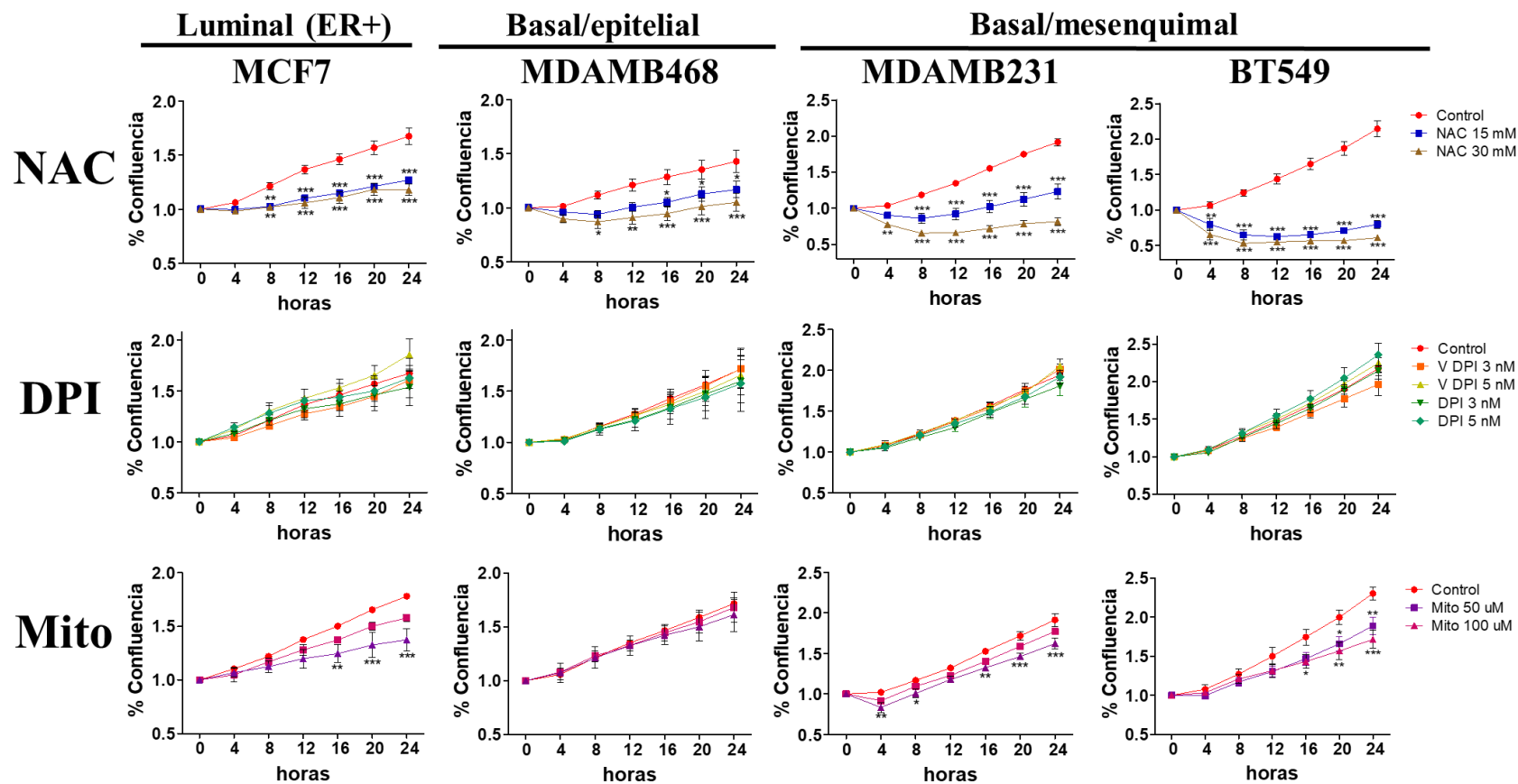
Para evaluar el papel de la EROs basales producidos por la NOX y/o la mitocondria en la viabilidad celular, las células se trataron con los distintos antioxidantes y se evaluó la proliferación (Gráfica 3) y muerte celular (Gráfica 4). En todas las líneas celulares utilizadas, el tratamiento con NAC disminuyó significativamente la proliferación celular (N=3-5) e indujo muerte celular (Gráficas 3 y 4). En la línea celular MCF7 tratada con NAC, la proliferación se ve reducida a partir de las 8 horas, al igual que la línea MDAMB468, sin embargo, ésta última requirió una alta concentración de NAC (30 mM) para que el efecto fuera significativo (Gráfica 3). Por otro lado, el efecto más pronunciado se observó en las líneas MDAMB231 y BT549 tratadas con NAC, donde la proliferación disminuyó desde las 4 horas. De manera importante, estas dos líneas celulares tuvieron los niveles más elevados de EROs (como se muestra en la Gráfica 1).

Las líneas celulares tratadas con el DPI proliferaron normalmente (Gráfica 3) y el tratamiento no indujo muerte celular (Gráfica 4) en ninguna de las líneas celulares estudiadas, sugiriendo que **las EROs producidas por la NOX no tienen un efecto importante en la proliferación ni en el mantenimiento de la sobrevivencia celular de estas líneas celulares.** En lo que refiere al tratamiento con Mito, se observó una disminución en la proliferación en las líneas celulares MCF7, MDAMB231 y BT549 (Gráfica 3) y no se observó efecto alguno en la muerte celular (Gráfica 4). Estos datos sugieren que, en estas tres líneas celulares, las EROs mitocondriales estimulan la proliferación celular pero no tienen un papel importante en la sobrevivencia celular.

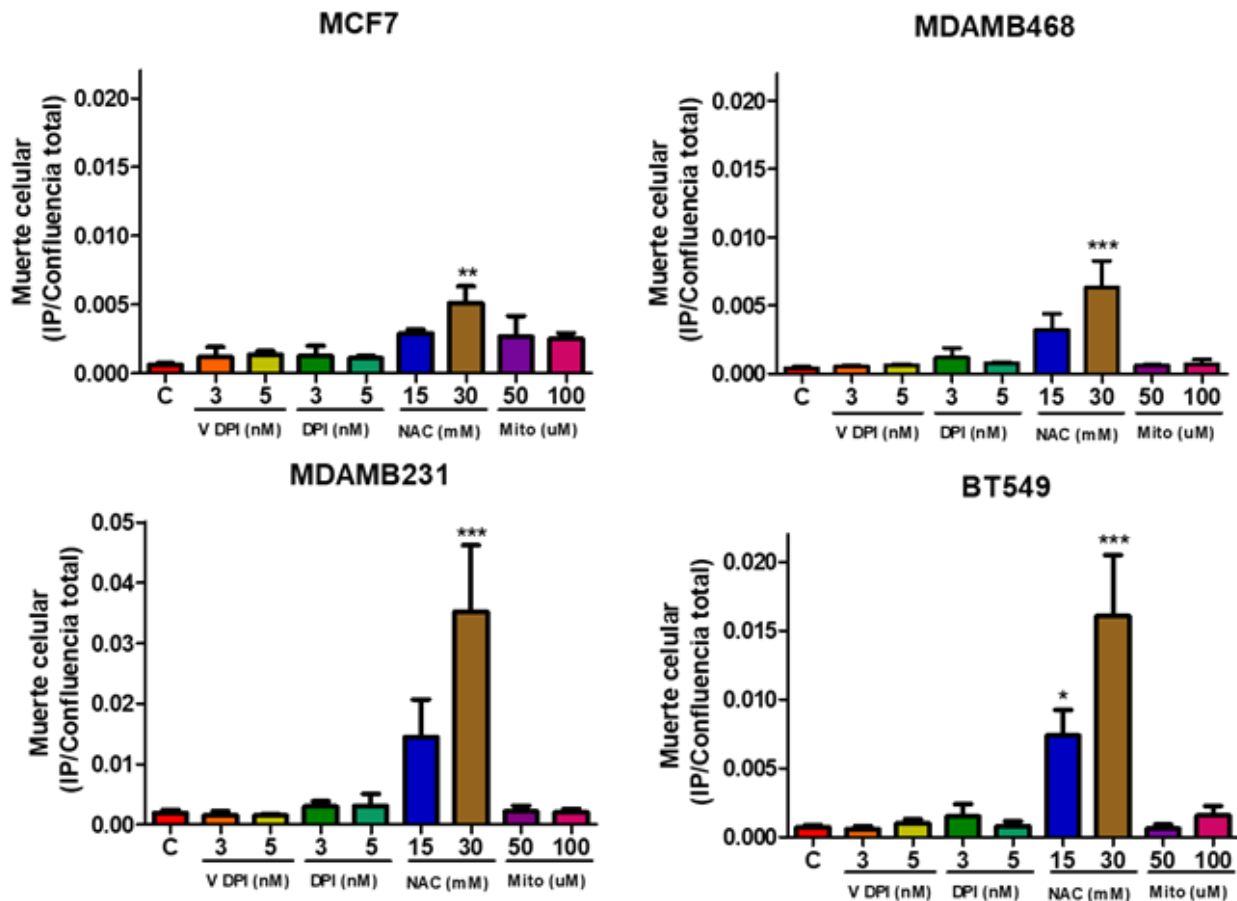
Posteriormente, se identificaron los marcadores asociados a troncalidad CD44 y CD24 en cada línea celular de cáncer de mama por citometría de flujo. Como se ha descrito anteriormente (Ricardo et al, 2011), el fenotipo predominante en los subtipos basal/mesenquimal fue de CD44⁺/CD24⁻ (88.77±3.00-93.10±1.42%), en el basal/epitelial fue CD44⁺/CD24⁺ (93.03±5.22%) y en el Luminal (ER⁺) fue CD44⁻/CD24⁺ (50.10±8.10%) (Gráfica 5).



Gráfica 2. Los tratamientos antioxidantes dirigidos a EROs totales (NAC), EROs provenientes de la NOX (DPI) y EROs mitocondriales (Mito) modifican las poblaciones “ROS High” y ROS Low” de manera diferencial en las líneas celulares de cáncer de mama. Los niveles de EROs en las líneas celulares de cáncer de mama se determinaron por tinción con DHE con y sin el tratamiento antioxidante: NAC (15 y 30 mM), DPI (3 y 5 nM) y Mito (50 y 100 μ M) por 2 h, mediante citometría de flujo, observando el cambio en la frecuencia relativa media (FRM) en las poblaciones “ROS High” (5% de la población celular con mayor intensidad de fluorescencia, a) y “ROS Low” (5% de la población celular con menor intensidad de fluorescencia, b). Las gráficas muestran la media \pm EEM de 2 a 4 experimentos independientes Prueba estadística Kruskal Wallis *post hoc* comparación múltiple de Dunn, *diferente al control, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



Gráfica 3. Los tratamientos antioxidantes dirigidos a EROs totales (NAC) y mitocondriales (Mito) disminuyen la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de mama. El efecto en la proliferación celular de las líneas celulares de cáncer de mama con y sin el tratamiento antioxidante: NAC (15 y 30 mM), DPI (3 y 5 nM) y Mito (50 y 100 μ), se evaluó mediante el % de confluencia por captación de imágenes cada 4 horas por 24 horas, en el sistema de microscopía en tiempo real “Incucyte ZOOM”. Las gráficas muestran la media ± EEM de 3 o 5 experimentos independientes. Prueba estadística: ANOVA de dos vías, *post hoc* comparación múltiple de Bonferroni, *diferente al control $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

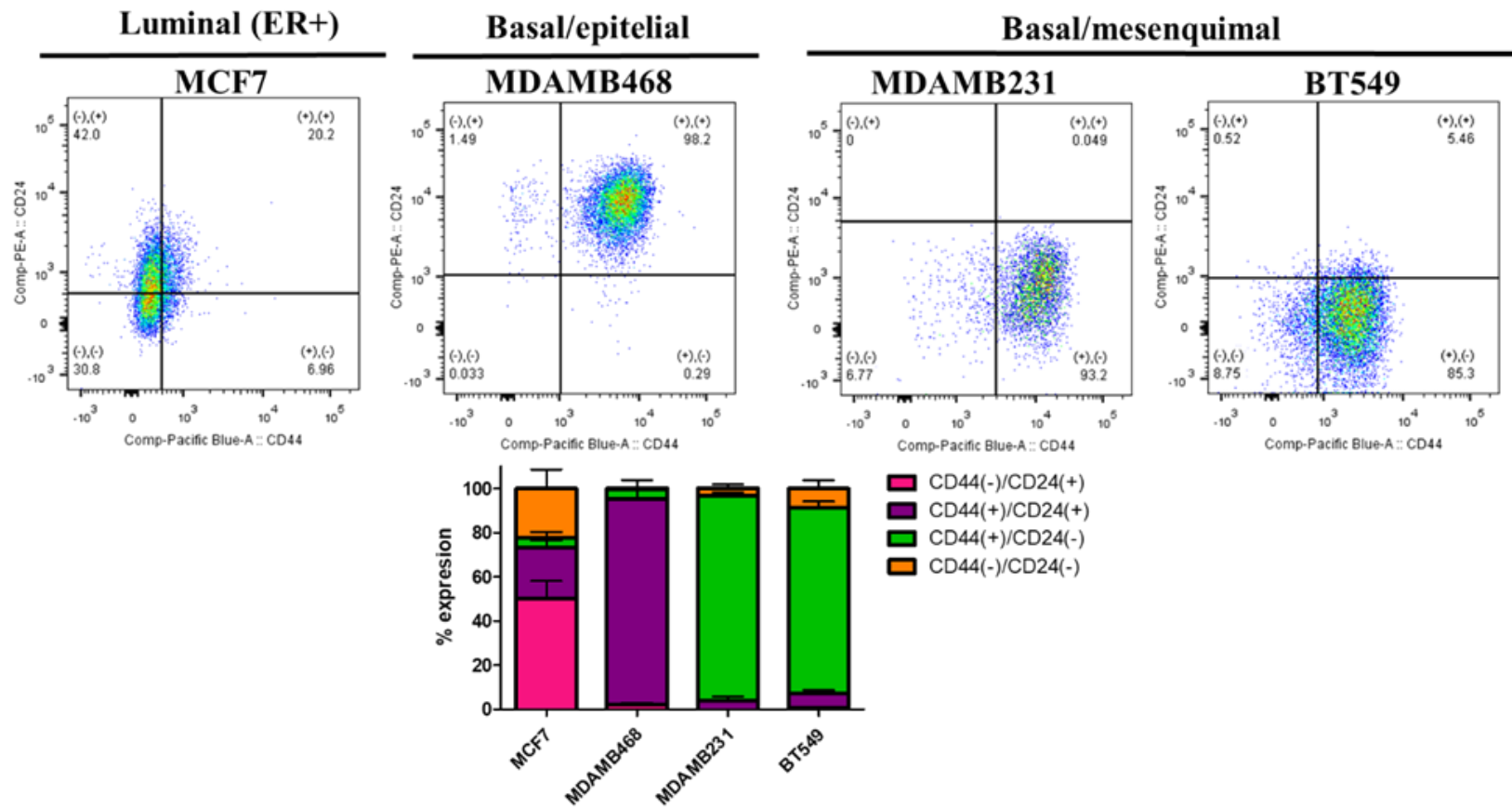


Gráfica 4. El tratamiento antioxidante dirigido a EROs totales (NAC) induce muerte celular en las líneas celulares de cáncer de mama. El efecto en muerte celular de las líneas celulares de cáncer de mama con y sin el tratamiento antioxidante: NAC (15 y 30 mM), DPI (3 y 5 nM) y Mito (50 y 100 μ M), se determinó por tinción con yoduro de propidio (IP) (10 μ M, 10 minutos), considerando la proporción del % de confluencia roja (IP +) /% de confluencia total en el sistema de microscopia en tiempo real “Incucyte ZOOM”. Las gráficas muestran la media \pm EEM de 3 o 5 experimentos independientes. Prueba estadística: ANOVA de dos vías, *post hoc* comparación múltiple de Dunnet, *diferente al control $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

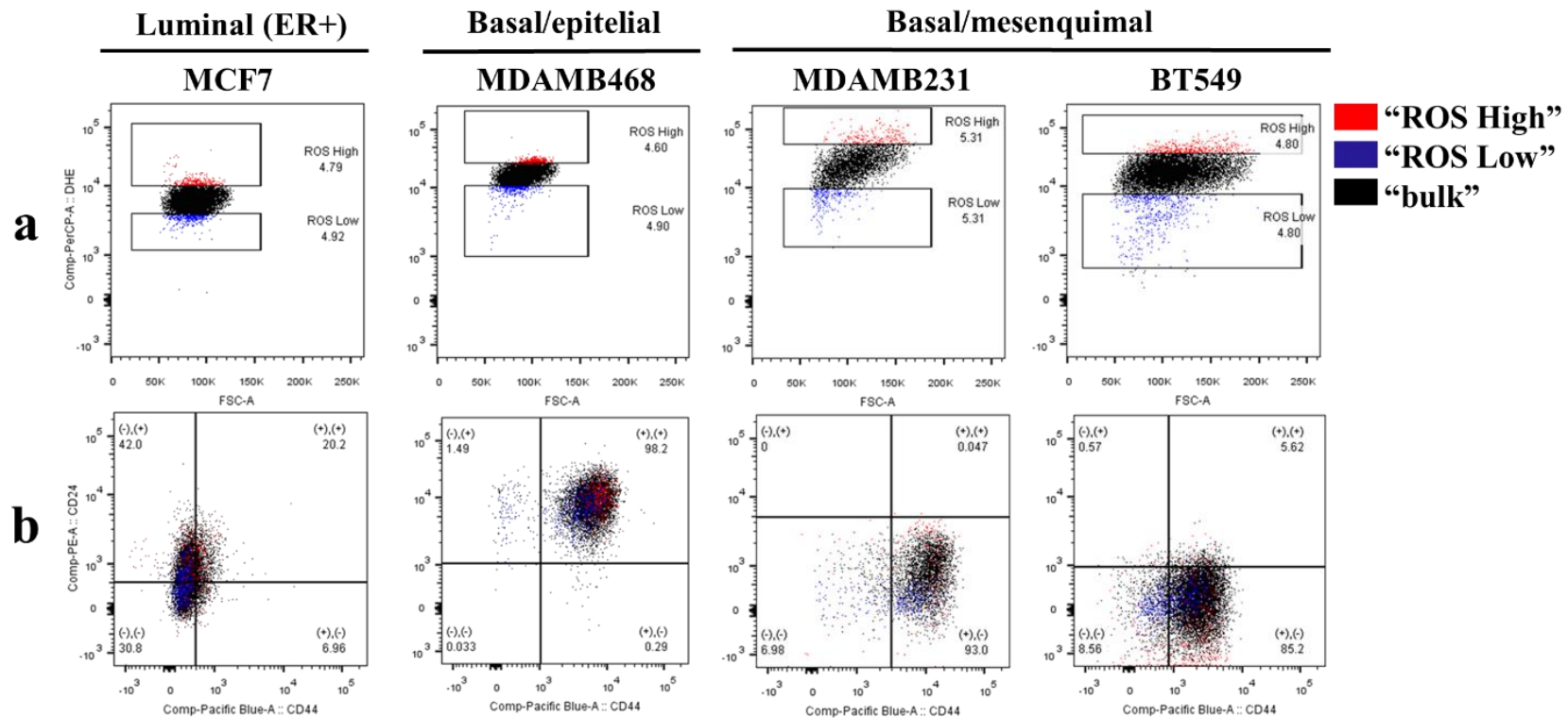
Para evaluar una probable correlación entre los niveles de EROs con las poblaciones celulares que expresan los marcadores asociados a troncalidad CD44 y CD24, se realizó una triple tinción y las células se evaluaron por citometría de flujo (Figura 16). Este ensayo consistió en analizar la distribución de las poblaciones “ROS High” (rojo) y “ROS Low” (azul) definidas previamente (Gráfica 1) respecto a los fenotipos CD44⁻/CD24⁺, CD44⁺/CD24⁺, CD44⁺/CD24⁻ y CD44⁻/CD24⁻. Contrario a lo que se esperaba, en todas las líneas celulares estudiadas no observamos una relación entre la población “ROS Low” con el fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low}. Por el contrario, en todas las líneas celulares, la población “ROS High” (marcada en rojo) se observó en niveles altos de CD44 de la población celular y de manera más evidente en las líneas celulares MCF7 y MDAMB468. La población “ROS Low” (marcada con azul) tuvo menores niveles de CD44 en todas las líneas celulares, así como menores niveles de CD24 en las líneas celulares MCF7, MDAMB468 y MDAMB231 (Gráfica 6). Este hecho nos sugirió que probablemente existía una relación entre los niveles de cada una de estas proteínas (CD44 y CD24) y los niveles de EROs dentro de la población celular.

Para evaluar si las poblaciones “ROS High” o “ROS Low” correlacionaban con altos o bajos niveles de CD44 o de CD24, se analizaron los histogramas de cada una de las poblaciones, incluyendo la población celular total “bulk” de las líneas celulares de cáncer de mama y se graficaron respecto al nivel de CD44 (Gráfica 7a) y CD24 (Gráfica 7b). Observamos que, en todas las líneas celulares, la subpoblación “ROS High” mostró niveles elevados de CD44 y que en general la subpoblación “ROS Low” tuvo niveles bajos de CD44 (Gráfica 7a). De manera importante, en las tres líneas celulares del subtipo TN se observó una población con niveles bajos de EROs y con niveles más bajos de CD44 que el resto de las células de la población celular (Gráfica 7a).

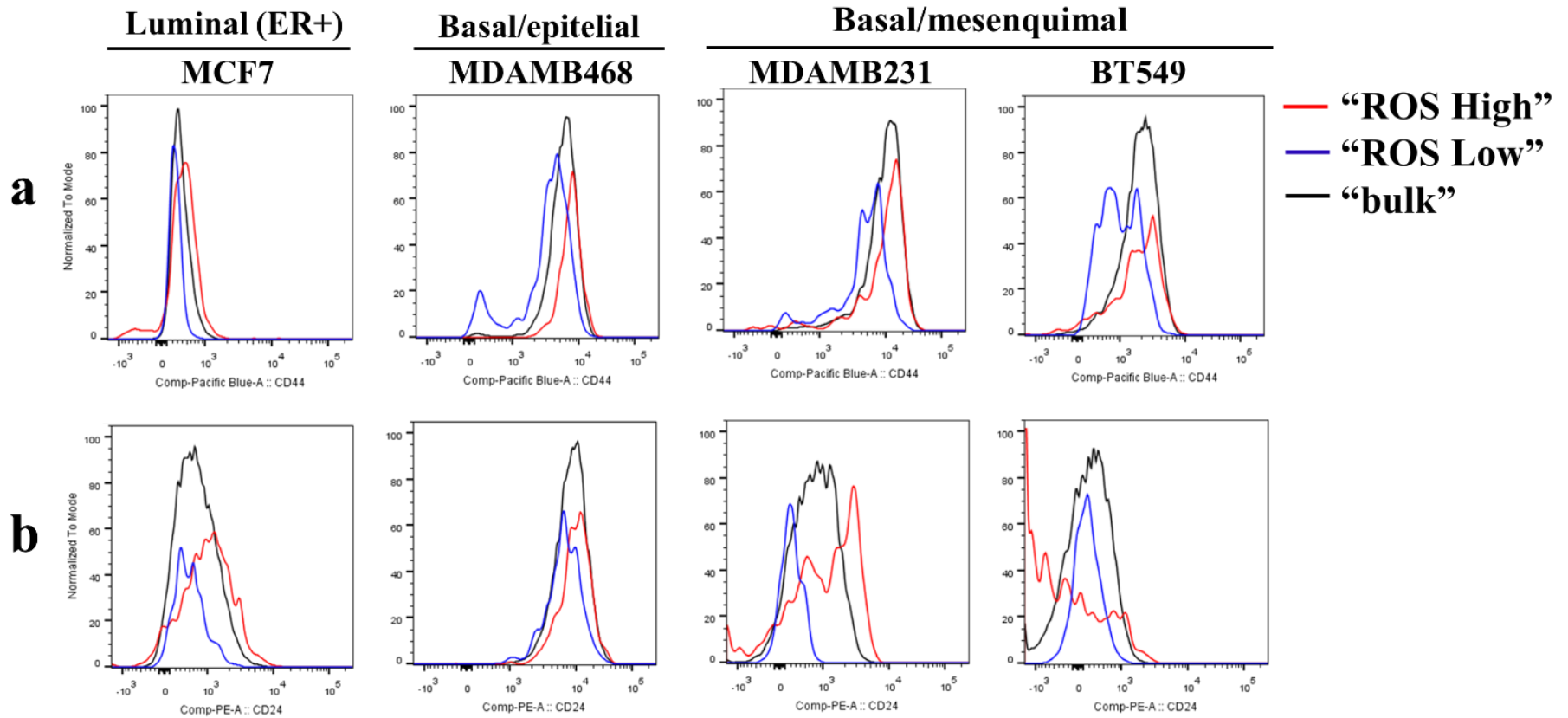
Con respecto a CD24, nuestros resultados muestran que en las líneas celulares MDAMB468 y MDAMB231, la población “ROS Low” muestra menores niveles de CD24 (Gráfica 7b). Por su parte, en las líneas celulares estudiadas la población “ROS High” tuvo altos niveles de CD24 con excepción de la línea celular BT549 (Gráfica 7b).



Gráfica 5. Poblaciones definidas por el nivel de CD44-V540/CD24-PE en las líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos moleculares. Para determinar el nivel de marcadores asociados a troncalidad CD44 /CD24 en las líneas celulares, las muestras se tripsinizaron e incubaron con los anticuerpos dirigidos a CD44-V450 (1:100) y CD24- PE (1:20) a 4 °C por 30 minutos, midiendo la emisión de fluorescencia por citometría de flujo. En el análisis de poblaciones celulares CD44/CD24 realizado en el software FlowJoV10, los “gates” se asignaron mediante los controles fluorescencia menos uno (FMOs), considerando la autofluorescencia; la población CD44-V450⁺/DHE (+), para evaluar el canal o detector ficoeritrina (PE); la población celular CD24-PE⁺/DHE (+) para evaluar el canal o detector Pacific Blue y la población celular CD44-V450⁺/CD24-PE⁺ para evaluar el canal o detector proteína de clorofila peridínina (PerCP) (ANEXO IV, Figura 14).



Gráfica 6. La población "ROS Low" no corresponde a un fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} en las líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a los diferentes subtipos moleculares (N=2-3). Para determinar el nivel de los marcadores asociados a troncalidad CD44 /CD24 en las poblaciones "ROS High" y "ROS Low", las muestras se tiñeron después de 24 h de cultivo con DHE (10 μM, 30 minutos) a 37 °C 5% CO₂, posteriormente se tripsinizaron e incubaron con los anticuerpos dirigidos a CD44-V450 (1:100) y CD24-PE (1:20) a 4 °C por 30 minutos, midiendo la fluorescencia emitida por citometría de flujo. En el análisis de poblaciones celulares en el software FlowJoV10 se seleccionó el 5% la población celular con mayor y menor intensidad de fluorescencia, definiéndolas como poblaciones "ROS High y ROS Low", respectivamente (a). Después se observó la distribución de las poblaciones "ROS High" y "ROS Low" de acuerdo a su nivel de CD44-V540/CD24-PE (b).



Gráfica 7. Análisis de las poblaciones “ROS High” y “ROS Low” con respecto a los niveles de CD44 (a) y CD24 (b) en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad (N=2-3). Para determinar el nivel de los marcadores asociados a troncalidad CD44 y CD24 en las poblaciones “ROS High” y “ROS Low”, las muestras se tiñeron después de 24 h de cultivo con DHE (10 μ M, 30 minutos) a 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂, posteriormente se tripsinizaron e incubaron con los anticuerpos dirigidos a CD44-V450 (1:100) y CD24- PE (1:20) a 4 $^{\circ}$ C por 30 minutos, midiendo la fluorescencia emitida por citometría de flujo. Este análisis representa los histogramas de las poblaciones “ROS High”, “ROS Low” y el “bulk” celular con respecto a su nivel de CD44 (a) y CD24 (b).

9. DISCUSIÓN

Estudios recientes en diversos tipos de cáncer demuestran que las células cancerosas tienen niveles elevados de EROs, las cuales tienen un papel importante en la sobrevivencia y en la malignidad. Lo anterior se ha atribuido a las características metabólicas de las células cancerosas (Ding et al., 2015; Bigarella et al., 2014), al mantenimiento de la inestabilidad genómica y a las vías de señalización protumorigénicas que se encuentran reguladas por EROs (Bigarella et al., 2014; de Sá Junior et al., 2017).

Diversos trabajos en la literatura han propuesto que las células troncales epiteliales de la mama y las BCSC presentan menores niveles de EROs comparados con su progenie más diferenciada o con el resto de las células cancerosas. Este bajo nivel de oxidación se ha atribuido a una mayor actividad antioxidante, propiedad presente en las células troncales en general. Esta misma característica, en las BCSC, estaría relacionada con su alta resistencia a la terapia citotóxica (Diehn et al., 2009). Al respecto, diversos estudios han reportado que la población celular resistente a la terapia en los tumores de mama presenta características tipo troncal (Ryoo et al., 2018; Wu et al., 2015; Creighton et al., 2009). Además, en diferentes tipos de cáncer incluido el cáncer de mama, se ha descrito que las terapias convencionales utilizadas en la clínica para el tratamiento del cáncer enriquecen a las CSC o eliminan únicamente a las células proliferativas y más diferenciadas (Muralikrishnan et al., 2020; Ryoo et al., 2016; Tian et al., 2018; Yang et al., 2019). Por tanto, es importante identificar de manera precisa la población de BCSC e identificar blancos específicos para esta población celular que ayuden a mejorar el tratamiento. En cáncer de mama, la población de BCSC se ha caracterizado principalmente como la población $CD44^+/CD24^{-/low}$, $ALDH^+$ o $CD44^+/CD24^{-/low}/ALDH^+$ en tumores de cáncer de mama, en modelos animales y en modelos *in vitro*. Sin embargo, estos marcadores no siempre permiten aislar células con capacidad formadora de colonias o con potencial tumorigénico, además de que se encuentran en una alta proporción de las células en algunos modelos (Velasco et al., 2018; Ricardo et al., 2011), contrario a lo que se esperaría para un marcador de BCSC. Por tanto, los bajos niveles de EROs en CSC y su alta capacidad antioxidante (Ding et al., 2015)

resultan una característica interesante que podría utilizarse como biomarcador o blanco de tratamiento específico para esta población celular.

Estudios recientes en tumores y líneas celulares de cáncer de mama han aislado dos poblaciones celulares con capacidad tumorigénica, de formar esferas en suspensión y de reconstituir la población celular original con características independientes del subtipo de cáncer de mama (Liu et al., 2014). Una de estas poblaciones caracterizada como CD44⁺/CD24^{-low} se localizó en el frente invasivo del tumor, con características mesenquimales, baja capacidad proliferativa y expresión génica similar a las células troncales basales de la glándula mamaria normal (Liu et al., 2014). Al aislarse en líneas celulares, esta misma subpoblación celular mostró los niveles más bajos de EROs comparados con la subpoblación ALDH⁺ y la población celular total “bulk”, alta expresión de enzimas glicolíticas y fue sensible al inhibidor glicolítico 2-deoxiglucosa (Luo et al., 2018).

La segunda subpoblación celular con características troncales mostró una elevada actividad de ALDH (ALDH⁺), se localizó en las zonas hipóxicas más centrales del tumor, mostró expresión de marcadores epiteliales, de proliferación celular y expresión génica similar a las células troncales epiteliales de la glándula mamaria normal (Liu et al., 2014). Cuando esta subpoblación celular se aisló en líneas celulares de cáncer de mama, mostró una mayor masa y actividad mitocondriales y altos niveles de EROs provenientes de la mitocondria al compararse con la subpoblación CD44⁺/CD24^{-low} y un nivel de EROs menor al compararse con la población celular total “bulk” (Luo et al., 2018). Esta subpoblación ALDH⁺ también se caracterizó por mostrar una alta capacidad antioxidante, asociada a una alta expresión de NRF2, alta actividad de GSH/TXN y fue sensible al tratamiento conjunto de inhibidores de GSH/TXN (Luo et al., 2018).

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Sarmiento et al., 2019) y de otros grupos de investigación (Raniga et al., 2020) han demostrado que los altos niveles de EROs son una característica del subtipo de cáncer de mama TN. El tratamiento con NAC, un precursor de GSH indujo muerte celular en las líneas celulares del subtipo TN (Sarmiento et al., 2019). Estos altos niveles de EROs también se han asociado a una importante actividad antioxidante. Las líneas

celulares del subtipo TN tienen una alta actividad de TRX y fueron sensibles a un inhibidor de esta enzima (Raniga et al., 2020). Los resultados anteriores sugieren que un balance adecuado de los niveles de EROs, particularmente para las células del subtipo TN, es necesario para mantener su señalización oncogénica sin inducir muerte celular. De manera importante, se sabe que las líneas celulares del subtipo TN tienen niveles elevados de la población celular CD44⁺/CD24^{-low} (Ricardo et al., 2011). Por lo tanto, en este trabajo, estudiamos la subpoblación troncal caracterizada por los marcadores CD44 y CD24 y su posible asociación con niveles bajos de EROs en líneas celulares pertenecientes a distintos subtipos de cáncer de mama con el propósito futuro de evaluar el papel de tratamientos antioxidantes sobre las poblaciones troncales (CD44⁺/CD24^{-low} y ALDH⁺) en nuestro modelo.

Evaluamos tres antioxidantes distintos: NAC (tiol antioxidante y precursor de GSH), DPI (inhibidor de flavoenzimas utilizado para inhibir NOX) y Mito (un mimético de SOD dirigido al O₂⁻ mitocondrial) y medimos su efecto sobre las EROs totales mediante la disminución en la frecuencia relativa media la población “ROS High” (5% de la población celular con los niveles más elevados de fluorescencia para DHE) o mediante el aumento de la población “ROS Low” (5% de la población celular con los niveles más bajos de fluorescencia para DHE).

En las líneas celulares MCF7 y MDAMB231, el tratamiento con NAC disminuyó la población “ROS High” y esta mostró una tendencia a disminuir en las otras dos líneas celulares estudiadas. Así mismo, en las líneas celulares MDAMB231 y BT549 el mismo tratamiento incrementó significativamente la población “ROS Low” y se observó una tendencia a aumentar en las líneas MCF7 y MDAMB468 (Gráfica 2). Por tanto, la línea celular donde no pudimos observar un efecto significativo con el tratamiento de NAC fue la MDAMB468, aunque los resultados sugieren que el efecto podría ser significativo si se aumentará el número de repeticiones (N=2). En las cuatro líneas celulares evaluadas, el tratamiento con NAC redujo la proliferación e indujo muerte celular (Gráficas 3 y 4) pero el efecto fue más evidente en las líneas celulares MDAMB231 y BT549. Esto sugiere que las líneas celulares con los niveles más altos de EROs basales (Gráfica 1 y Sarmiento et al., 2019) son más sensibles al tratamiento antioxidante. Este efecto podría atribuirse a la reducción directa de alguna proteína regulada por EROs importante para el mantenimiento de la sobrevivencia celular de estas líneas celulares.

Algunos blancos de oxidación que se propone estén activos en cáncer de mama TN son las MAPK, HIF-1 α y NF- κ B (Moloney et al., 2017; Wang et al., 2015; Liou-Storz, 2010).

Con respecto al DPI, en todas las líneas celulares menos en la BT549 se observó una disminución en la población “ROS High” o un aumento en la población “ROS Low”. El efecto más importante fue en la línea celular MCF7 donde ambas concentraciones de DPI modificaron las poblaciones “ROS High” y la “ROS Low” (Gráfica 2). Esto sugiere que en esta línea celular existe una contribución importante de la NOX en la producción de EROs. Por otra parte, en las líneas celulares estudiadas el tratamiento con DPI no tuvo efecto alguno en la proliferación ni en la muerte celular (Gráfica 3 y 4). Estos resultados sugieren que, en las líneas celulares evaluadas, las EROs producidas por la NOX no tienen un papel relevante en la proliferación ni en la sobrevivencia celular. Dado que el efecto antioxidante se evaluó únicamente a las dos horas de tratamiento, se deberá de evaluar si el DPI sigue disminuyendo las EROs a tiempos más avanzados para fortalecer esta conclusión.

En cuanto al tratamiento con Mito, se observó efecto antioxidante en todas las líneas celulares, menos en la BT549 (Gráfica 2). En las líneas celulares MCF7, MDAMB231 y BT549, el tratamiento con Mito 100 μ M disminuyó la proliferación celular sin inducir muerte celular (Gráfica 3 y 4). Los datos anteriores nos indican que las EROs mitocondriales tienen un papel importante en la proliferación de estas líneas celulares, pero no en el mantenimiento de la sobrevivencia celular (Gráfica 3 y 4). Al respecto, en células de cáncer, los altos niveles de EROs se han asociado a un fenotipo altamente proliferativo (Nazarewicz et al., 2013). Al respecto, en la línea celular B6 de melanoma tratada con Mito, se reportan menores niveles de EROs mitocondriales y una reducción en la fosforilación de AKT1 y ERK1/2, cinasas implicadas en proliferación celular (Moloney et al, 2017; Nazarewicz et al, 2013), incluso, se observa un incremento en la muerte celular y la inducción de senescencia (Nazarewicz et al., 2013).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que en la línea celular MCF7, la cual tiene los niveles más bajo de EROs y que pertenece al subtipo luminal (ER+), tanto la NOX como la mitocondria contribuyen a la producción de EROs, las EROs mitocondriales tienen un papel

importante en la proliferación celular y el tratamiento con el antioxidante general (NAC) indujo muerte celular, aunque en niveles menores que en las células TN. Esto último sugiere un papel importante de las EROs basales en la sobrevivencia de esta línea celular. En las líneas celulares MDAMB468 y MDAMB231, ambas del subtipo TN, tanto el DPI como el Mito tuvieron un efecto antioxidante, sugiriendo, al igual que en la línea celular MCF7, la participación de ambas fuentes en la producción de EROs en estas líneas celulares. Aunque el efecto antioxidante parece ser más evidente para el Mito en ambas líneas celulares, esto deberá corroborarse haciendo más réplicas. El tratamiento con Mito indujo una disminución en la proliferación celular en la línea celular MDAMB231, pero no en la MDAMB468, sugiriendo un papel importante de las EROs mitocondriales en la proliferación de esta línea celular. Finalmente, en la línea celular BT549, sólo la concentración más alta de NAC pudo disminuir las EROs, aumentando la población “ROS Low”. Esta línea celular tiene los niveles más elevados de EROs y a pesar de que el DPI mostró una tendencia a disminuir la población “ROS High”, los resultados no fueron significativos. Estos resultados sugieren que la inhibición de una de las fuentes de EROs puede ser compensada por la otra fuente, o alternativamente, que las concentraciones de los antioxidantes no fueron suficientes para disminuir los niveles tan elevados de EROs que se observan en esta línea celular. De manera importante, el Mito sí disminuyó la proliferación de esta línea celular, sugiriendo un papel importante de los EROs mitocondriales en su proliferación.

Por tanto, nuestros datos sugieren que, en las líneas celulares estudiadas, tanto la NOX como la mitocondria contribuyen a la producción de EROs basales. En tres de ellas (MCF7, MDAMB468 y MDAMB231), ambas fuentes parecen tener un papel importante, mientras que en la BT549 la fuente más importante parece ser la NOX, por el efecto que se observa con el tratamiento con DPI, sin ninguna modificación por el tratamiento con Mito (N=2). No obstante, requerimos un mayor número de réplicas para asegurar lo anterior. Otra posible explicación para esta última línea celular es que la concentración utilizada de Mito no haya sido suficiente para disminuir sus niveles de EROs mitocondriales. De tal manera que es necesario hacer más experimentos para evaluar estas posibilidades.

Con respecto a las líneas MDAMB468 y MDAMB231, sabemos que tienen mutaciones que se han relacionado a la producción de EROs tanto por la mitocondria como por la NOX

(Lim- Leprivier, 2019). Estudios previos en nuestro grupo de trabajo han reportado en las líneas celulares MDAMB468 y MDAMB231, una alta producción de EROs mitocondriales, además de que diversas isoformas de NOX se han encontrado sobreexpresadas en cáncer de mama, como la NOX1 y NOX5 (Moloney et al., 2017; Block-Gorin, 2012; Desouki et al., 2005). También, estas líneas celulares presentan mutaciones relacionadas a la producción de EROs. La línea celular MDAMB468 expresa EGFR y muestra altos niveles de activación de este (McKnight et al., 2020; Jiang et al., 2016) y la línea MDAMB231 tiene mutaciones que activan a KRAS y BRAF (www.atcc.org). Ambas mutaciones se relacionan con la activación de la vía de las MAPK, la cual está regulada por EROs y se asocian a la producción de EROs mitocondriales (Serasinghe et al., 2015). Al respecto, en fibroblastos con *KRAS*^{V12} mutado y líneas celulares de cáncer de colon con KRAS mutado, se ha reportado la activación de la MAPK p38 para inducir la proteína cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinosítido (PDPK1), que activa a su vez la PKC δ . Esta última cinasa fosforila y activa la subunidad p47phox de la NOX, induciendo la translocación de NOX1 a la membrana plasmática, lo que resulta en la generación de EROs (Park et al., 2014). Adachi y colaboradores (2008) proponen también que en cáncer colorectal con KRAS mutado, la generación de EROs dependiente de NOX1 es sostenida a través de la fosforilación dependiente de la vía RAF-MEK-ERK del factor de transcripción GATA6, el cual puede activar la transcripción de NOX1. Por otro lado, estudios recientes describen reacciones de convergencia entre las principales fuentes de EROs, donde NOX4 media la estimulación de la producción de EROs producidas en la mitocondria al activar PKC ϵ (Desouki et al., 2005). La PKC ϵ fosforila y abre canales de potasio dependiente de ATP mitocondrial (mitoKATP), modificando el gradiente de pH en la membrana interna mitocondrial (Δ pH) y la producción mitocondrial de EROs (Dikalov, 2011). También, en células de riñón embrionario sin suero, se describe una asociación entre EROs mitocondriales y la activación de la NOX1 (Lee et al., 2006). Los autores sugieren que las EROs mitocondriales contribuyen a la acumulación temprana de las EROs (pocos minutos) necesarias para activar la vía PI3K/RAC1/NOX1 que contribuirían a mantener el nivel de EROs sostenida (4-8 h) (Lee et al., 2006). Con respecto al papel pro-tumorigénico de las EROs y su relación con la activación de la vía de las MAPK, Weinberg y colaboradores (2010) demostraron en líneas celulares con KRAS mutado que el principal sitio de generación de EROs inducido por KRAS es el sitio de QH \cdot en el complejo III y que este evento es crítico para proliferación celular y el crecimiento

independiente de anclaje. Por tanto, la producción de EROs mediada por ambas fuentes y su posible retroalimentación, estarían contribuyendo a la proliferación celular en estas líneas celulares.

En este trabajo observamos diferencias importantes en el efecto de los antioxidantes, mientras que, en todas las líneas celulares estudiadas, el tratamiento con NAC disminuyó la proliferación e indujo muerte celular, el DPI no tuvo efecto en la proliferación o en la inducción de muerte. Además de que, en tres de las cuatro líneas celulares estudiadas, el Mito disminuyó la proliferación celular (Gráfica 3 y 4). Algunas posibles explicaciones que proponemos son que el NAC elimina las EROs citoplasmáticas derivadas de diferentes fuentes, en comparación con el DPI dirigido únicamente a las EROs generadas por la NOX. En segundo lugar, el efecto de NAC puede ser más estable y sostenido, al ser un tiol antioxidante y precursor de cisteína que contribuiría en la síntesis de GSH para la reducción de enlaces disulfuro en proteínas, alterando así sus estructuras e interrumpiendo el acceso con sus ligandos (Samuni et al., 2013). En este punto, cabe aclarar que estudiamos la capacidad antioxidante del DPI a las 2 horas de tratamiento. No obstante, el DPI es un inhibidor de la actividad de flavoenzimas, por lo que no podemos descartar reacciones inespecíficas en proteínas implicadas en otros procesos metabólicos, a tiempos prolongados. Al respecto, en monocitos/macrófagos no estimulados, se demostró que el complejo I de la cadena respiratoria de la mitocondria fue blanco del DPI, inhibiendo la reducción de las proteínas Fe-S posiblemente a través de la reacción irreversible que tiene con el flavin mono nucleótido (FMN), comprometiendo la fosforilación oxidativa, (Li-Trush, 1998) que se asocia a la generación de más EROs. Para confirmar lo anterior se propone realizar un curso temporal de niveles de EROs con cada uno de los antioxidantes.

Con respecto a la inducción de muerte por el tratamiento antioxidante en todas las líneas celulares, es probable que la reducción de las EROs citoplásmicas derivadas de ambas fuentes lograda con el NAC sea necesaria para disminuir la proliferación y aumentar la muerte celular, lo que no se lograría con los antioxidantes DPI y Mito dirigido a la NOX y la mitocondria, respectivamente. Para evaluar esta posibilidad, se propone hacer los ensayos de proliferación y viabilidad celular con ambos antioxidantes, donde se tendría que observar el mismo efecto del NAC si lo sugerido es cierto. Finalmente, no podemos descartar un efecto inespecífico del NAC

que no involucre su papel antioxidante, por lo tanto, deberán realizarse más experimentos con otros antioxidantes generales (ej. edaravona, α -tocoferol, trolox, ácido α lipoico) (Uchihara et al., 2019; Qanungo et al., 2014; Pazdro et al., 2012) para descartar esta posibilidad.

Para evaluar una posible asociación de los niveles de EROs con la población $CD44^+/CD24^{-/low}$ en cada línea celular de cáncer de mama, inicialmente se determinó el nivel de marcadores CD44 y CD24 por citometría de flujo (Gráfica 5). De acuerdo con lo reportado anteriormente (Ricardo et al., 2011), la línea celular MCF7 del subtipo Luminal (ER+) tuvo células en los cuatro cuadrantes, con la mayoría (alrededor del 50%) con fenotipo $CD44^+/CD24^+$ (Gráfica 5). La alta expresión de CD24 en tumores y líneas celulares de cáncer de mama se ha relacionado a células más diferenciadas con características epiteliales (Ricardo et al., 2011). En la línea celular MDAMB468 del subtipo Basal, que se sabe que conserva características epiteliales (E-caderina⁺) (Le et al., 2018), la mayoría de las células (alrededor del 98%) se encontraron en el cuadrante positivo para ambos marcadores $CD44^+/CD24^+$ (Gráfica 5, Ricardo et al., 2011). Finalmente, las líneas celulares MDAMB231 y BT549, tuvieron más del 80% de la población celular en el cuadrante $CD44^+/CD24^-$ (Gráfica 5; Ricardo et al., 2011). En cáncer de mama, esta característica se ha asociado con propiedades troncales y a la expresión de marcadores mesenquimales. Al respecto, se ha asociado una alta expresión de CD44 con tumores y líneas celulares más agresivos, además de que se asocia a la expresión de marcadores basales (EGFR, CK5, P-caderina, CK14 y vimentina). Lo anterior se traduce en baja sobrevivencia y peor pronóstico en pacientes (Ricardo et al., 2011). Incluso en carcinoma ductal invasivo de mama, la población celular $CD44^+$ se asocia a un perfil génico mesenquimal relacionado a procesos de motilidad celular, proliferación y angiogénesis (Shipitsin et al., 2007). Por tanto, estos datos concuerdan con lo reportado anteriormente, ya que la línea celular luminal estudiada (MCF7) mostró altos niveles de CD24, asociados a sus características epiteliales, mientras que las tres líneas celulares TN mostraron altos niveles de CD44, lo que se asocia con sus características más agresivas.

Para evaluar una posible relación entre niveles de EROs con las CSC evaluadas como la población $CD44^+/CD24^{-/low}$, identificamos las poblaciones “ROS Low” (5% de la población celular con menor fluorescencia para DHE) y “ROS High” (5% de la población celular con

mayor fluorescencia para DHE) en una gráfica que representa los niveles de CD44 y CD24 (Gráfica 6). Contrario a lo esperado, no se encontró una relación entre la población con niveles bajos de EROs y el fenotipo CD44⁺/CD24^{-low} que anteriormente se ha reportado como una población celular con niveles bajos de EROs comparadas con células CD44⁻/CD24⁺ (Luo et al., 2018; Diehn et al., 2009). Sin embargo, sí observamos que la población “ROS Low” por lo general se encontraba con niveles más bajos de CD44 en la población celular total, y que en dos líneas celulares (MCF7 y MDAMB468), la población “ROS High” presentaba niveles más elevados de CD44 (Gráfica 6b), sugiriendo una posible asociación de los niveles de EROs con los marcadores CD44 y CD24 de manera independiente. Para facilitar esta comparación, los resultados se representaron en histogramas (Gráfica 7). De esta forma, encontramos que, en todas las líneas celulares la población “ROS High” presentó niveles más elevados de CD44 que la población celular total “bulk” mientras que la población “ROS Low” presentó niveles más bajos de CD44. De manera interesante, en las líneas celulares del subtipo TN, se observó una población “ROS Low” con niveles de CD44 menores a la población celular total “bulk” (Gráfica 7a). Si consideramos que CD44 es un marcador mesenquimal, en estas tres líneas celulares la población “ROS Low” podría representar una población distinta a la población celular total asociada a pérdida de características mesenquimales, que probablemente corresponda a la población troncal, sin embargo, se requieren ensayos funcionales que lo confirmen. Los datos anteriores sugieren una relación entre el nivel de CD44 y los niveles intracelulares de EROs en todas las líneas celulares estudiadas. Existe evidencia que relaciona la expresión y el nivel de CD44 con niveles elevados de EROs. Lee y colaboradores (2019) observaron un aumento en la expresión de CD44 y otros marcadores mesenquimales al tratar la línea celular MCF7 con EROs (H₂O₂ y menadiona, un generador de O₂⁻). De manera análoga, Lin y colaboradores (2013) describieron una asociación entre niveles elevados de EROs y CD44, así como otros marcadores mesenquimales en esferoides de carcinoma nasofaríngeo, comparados con células adherentes. En este trabajo, cuando los esferoides se trataron con NAC como tratamiento antioxidante, los niveles de CD44, vimentina, SNAIL y N-cadherina (marcadores mesenquimales) disminuyeron. Así mismo, el silenciamiento genético de CD44 indujo la disminución en los niveles del transportador de cistina (xCT), en los niveles de GSH y un incremento en el nivel de EROs. Los trabajos anteriores nos permiten sugerir que, en las líneas celulares de cáncer de mama evaluadas, la expresión de CD44 participa en el mantenimiento del nivel EROs intracelular en

la población “ROS High”, a niveles elevados pero compatibles con la sobrevivencia celular. Estos resultados sugieren una asociación de los altos niveles de EROs, así como de CD44 con las características celulares mesenquimales celulares más que con las características asociadas a troncalidad.

La glicoproteína CD44 se ha asociado previamente a la activación del sistema antioxidante (Ryoo et al., 2018; Chanmee et al., 2015; Nagano et al., 2013; Ishimoto et al., 2011). Con relación a esto, los factores de transcripción que son regulados por EROs como AP-1 y NF-kB, se unen estrechamente a la región conservada del promotor de CD44, activando su expresión (Chen et al., 2018). En células de cáncer de mama TN tratadas con un inhibidor de NF-kB, se observó una disminución de CD44, proliferación e invasividad (Chen et al., 2018). Por otra parte, en células de cáncer de mama MCF7 y MDAMB231 la expresión de CD44 total y de su isoforma CD44s se han relacionado con la resistencia a doxorubicina y con mayores niveles de NRF2 (Ryoo et al., 2018), un factor de transcripción que regula genes antioxidantes y de detoxificación celular (Ryoo et al., 2016). Por tanto, los altos niveles de EROs parecen regular la expresión de CD44 mediante la activación de factores de transcripción y CD44 a su vez, parece mediar la activación del sistema antioxidante.

Con respecto a CD24, se observa que, en todas las líneas celulares, la población “ROS Low” presenta niveles más bajos de CD24 que la población celular total “bulk” (Gráfica 7b). En las líneas celulares MCF7, MDAMB468 y MDAMB231 la población “ROS High” tuvo niveles elevados de CD24 (Gráfica 7b). Interesantemente, en la línea celular MDAMB231, la población “ROS High” presenta dos picos, sugiriendo dos poblaciones con distintos niveles de CD24 (Gráfica 7b). Finalmente, en la línea celular BT549, no se encontró una relación entre niveles de EROs y CD24 (Gráfica 7b). Si consideramos que CD24 es un marcador de diferenciación epitelial, podríamos proponer que para las líneas celulares que presentan características epiteliales (MCF7 y MDAMB468), la subpoblación “ROS Low” se asocia con niveles bajos de de CD24 y posiblemente a una población menos epitelial, lo cual podría asociarse a características mesenquimales o de troncalidad. Esto no aplicaría para las líneas celulares MDAMB231 o BT549, donde los niveles totales de CD24 son bajos.

Por lo tanto, en las líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diferentes subtipos de la enfermedad, no se encontró una asociación directa entre niveles bajos de EROs y la población troncal determinada como la población CD44⁺/CD24^{-low}. Sin embargo, nuestros datos sugieren una relación entre el nivel de CD44 con altos niveles de EROs, así como una posible relación con el sistema antioxidante celular. Por otro lado, en las líneas celulares que presentan características epiteliales (MCF7 y MDAMB468), la población “ROS Low” podría definir a la población troncal, ya que ésta correlacionó con niveles bajos de CD24 pero esto deberá corroborarse en ensayos funcionales. En cuanto a las líneas celulares del subtipo basal con características mesenquimales (MDAMB231 y BT549) y baja expresión de CD24, la población “ROS Low” no se relacionó con ninguna característica relacionada a troncalidad. Al respecto, en líneas celulares y en tumores de tipo basal de cáncer de mama se ha encontrado una alta proporción de células con alta actividad de ALDH1, otro marcador de troncalidad (Ricardo et al, 2011). Por lo que determinar una posible asociación entre la alta actividad de ALDH y el nivel de EROs será particularmente importante para las líneas celulares que corresponden al subtipo basal.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES



10. CONCLUSIONES

Con base al efecto de los tratamientos antioxidantes sobre las poblaciones de niveles altos y bajos de EROs concluimos que en tres de las líneas celulares evaluadas (MCF7, MDAMB468 y MDAMB231) tanto la NOX como la mitocondria contribuyen a la producción basal de EROs. La contribución principal a la generación de EROs en la MCF7 se debió a la NOX, y en las líneas celulares MDAMB468 y MDAMB231 a ambas fuentes. En las líneas celulares evaluadas, el NAC disminuyó la proliferación e indujo muerte celular, por lo que el nivel de EROs basal tiene un papel importante en la sobrevivencia celular. Así mismo, en las líneas celulares MCF7, MDAMB231 y BT549 tratadas con Mito, se demostró las EROs mitocondriales tienen un papel importante en la proliferación celular.

No se encontró una asociación directa entre la población troncal ($CD44^+/CD24^{-low}$) y niveles bajos de EROs, pero si observamos una relación entre altos niveles de CD44 con altos niveles de EROs, sugiriendo un papel importante de CD44 en el mantenimiento de la capacidad antioxidante que permita la sobrevivencia celular. En las líneas celulares del tipo TN (MDAMB468, MDAMB231 y BT549) la población de niveles bajos de EROs con niveles más bajos de CD44 que la población celular total podría asociarse a la pérdida de características de mesenquimalidad y corresponder a la población troncal. Por otra parte, en tres de las cuatro líneas celulares estudiadas (MCF7, MDAMB468 y MDAMB231), los niveles de CD24 correlacionaron con bajos niveles de EROs, sugiriendo una asociación con la pérdida de características de epitelialidad, por lo que podría definirse como la población troncal con bajos niveles de EROs, al menos para las líneas celulares MCF7 y MDAMB468 que presentan altos niveles de CD24 asociado a sus características epiteliales.

10.1 Perspectivas

Será importante determinar la posible modificación de las poblaciones CD44⁺/CD24^{-low}, CD44⁺ o CD24⁺ con el tratamiento antioxidante. Se sugiere evaluar la actividad de ALDH para determinar una posible asociación de EROs con este otro marcador de troncalidad, principalmente en las líneas celulares pertenecientes al subtipo basal mesenquimal. Así mismo, será necesario evaluar la capacidad de formar mamoesferas en las poblaciones de bajos y altos niveles de EROs de las líneas celulares de cáncer de mama con y sin los tratamientos antioxidantes, para concluir de manera contundente una posible asociación del nivel de EROs con las características asociadas a troncalidad en líneas celulares de cáncer de mama.

11. REFERENCIAS

- Adachi Y, Shibai Y, Mitsushita J, Shang WH, Hirose K, Kamata T. Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6. *Oncogene*. 2008;27(36):4921-4932.
- Ahmad, G.; Almasry, M.; Dhillon, A.S.; Abuayyash, M.M.; Kothandaraman, N.; and Cakar Z. (2017). “Overview and Sources of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Reproductive System”. *Oxidative Stress in Human Reproduction*, 1-16.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988.
- Atale N, Gupta S, Yadav UC, Rani V. (2014). “Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques”. *J Microsc*. 2014;255(1):7-19.
- ATCC (2015). “Breast Cancer Resource Book”. Recuperado de la red (02/08/2020) https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/breast_cancer_resource.ashx
- Bae, Y.S., Oh, H.; Rhee, S.G., Yoo, Y.D. (2011). “Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling”. *Mol. Cells*, 32, 491-509.
- Banskota, S., Regmi, S. C., & Kim, J. A. (2015). “NOX1 to NOX2 switch deactivates AMPK and induces invasive phenotype in colon cancer cells through overexpression of MMP-7”. *Molecular cancer*, 14, 123.
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016). Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 3527579.
- BD Bioscience (2002). Introduction to Flow Cytometry. A learning Guide. Recuperado de la red (02/08/2020) de <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>
- Bigarella, C.L.; Liang, R.; Ghaffari, S. (2014). “Stem cells and the impact of ROS signaling”. *Development 141*, 4206-4218.
- Bio-RAD Laboratories Inc (s.f.). Flow cytometry Basic Guide. Recuperado de la red de <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2017/flow/flow-cytometry-basics-guide.pdf>
- Block, K.; Gorin, Y. (2012). “Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation”. *Nature reviews. Cancer*, 12(9), 627–637.
- Bolton, E.; Schemionek, M.; Klein, H.U.; Flis, S.; Hoser, G.; Lange, T.; Nieborowska, M.; Maier, J.; Kerstiens, L., Koptyra, M., Muller, M.C., Hardik Modi, H.; Stoklosa, T.; Seferynska, I.; Ravi Bhatia, R.; Holyoake, T.L.; Koschmieder, S.; Skorski, T. (2013). “Genomic instability may originate from imatinib-refractory chronic myeloid leukemia stem cells”. *Blood*, 121, 4175-4182.
- Breitenbach, M.; Rinnerthaler, M., Weber, M.; Breitenbach-Koller, H.; Karl, T.; Cullen, P.; Sukaniya, B.; Haskova, D.; Hasek, J. (2018). “The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells”. *Wien Med Wochenschr*, 168:286–299
- Brown, D. I., Griendling, K. K. (2009). “NOX proteins in signal transduction”. *Free radical biology & medicine*, 47(9), 1239–1253.
- Bushnell, T. (s.f.). Why you need to use FMO controls for all Multicolor Flow Cytometry Experiments. Cheeky Scientist Technical Program. Recuperado de la red (02/08/2020) de <https://expert.cheekyscientist.com/why-use-fmo-controls-multicolor-flow-cytometry-experiment/>
- Bushnell, T. (2015). Modern Flow Cytometry. Excyte Expert Cytometry. Recuperado de la red 16/08/2020 de <https://www.amrepflow.org.au/public/documents/MFCeBook4.pdf>
- Cárdenas, J.; Bargallo, J.E.; Bautista, V.; Cervantes, G.; Erazo, A.A.; Flores, C.H.; Maffuz, A.; Perez, V.M.; Poitevin, A.; Salas, E.; Torrecillas, L.; Valero, V. (2015). Consejo Mexicano

- sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario, experiencia de 21 años. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14 (Supl 2), 1.
- Cárdenas, J.; Valle, A.A.E.; Arce, C.; Bargalló, J.E.; Bautista, V.; Cervantes, G.; Christian H. Flores, C.H.; Lluch, A., Maffuz, A.; Pérez, V.M.; Poitevin, A.; Salas, E.; Laura Torrecillas, L.; Valero, V. (2019). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Octava revisión. Colima 2019. *Gaceta Mexicana de Oncología*.
- Chanmee, T., Ontong, P., Kimata, K., Itano, N. (2015). “Key Roles of Hyaluronan and Its CD44 Receptor in the Stemness and Survival of Cancer Stem Cells”. *Frontiers in Oncology*, 1-8.
- Chen, C. Zhao, S., Anand Karnad, A.; Freeman, J.W. (2018). “The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications”. *Journal of Hematology & Oncology*, 11, 64
- Chen, J., Rogers, S. C., Kavdia, M. (2013). Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Annals of biomedical engineering*, 41(2), 327–337.
- Ciccarese, M., Lorusso, V.; Laurentis, M. (2008). “Controversies in adjuvant endocrine therapy for pre and post-menopausal women with breast cancer”. *European Journal of Cancer Supplements*, 6(14), 4-9.
- Creighton, C. J., Li, X., Landis, M., Dixon, J. M., Neumeister, V. M., Sjolund, A., Rimm, D. L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J. I., Fan, C., Zhang, X., He, X., Pavlick, A., Gutierrez, M. C., Renshaw, L., Larionov, A. A., Faratian, D., Hilsenbeck, S. G., Perou, C. M., ... Chang, J. C. (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13820–13825.
- de Sá Junior, P. L., Câmara, D., Porcacchia, A. S., Fonseca, P., Jorge, S. D., Araldi, R. P., & Ferreira, A. K. (2017). The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 2467940.
- Danielson P. B. (2002). The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current drug metabolism*, 3(6), 561–597.
- Desouki, M.M.; Kulawiec, M.; Bansal, S.; Das, G.M., Singh, K.K. (2005). “Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors”. *Cancer Biology & Therapy*. 4, 1367-1373
- Diehn, M.; Cho, R.W.; Lobo, N.A.; Kalisky, T.; Dorie, M.J.; Kulp, A.N.; Qian, D.; Lam, J.S.; Ailles, L.E.; Wong, M.; Joshua, B.; Kaplan, M.J.; Wapnir, I.; Dirbas, F.; Somlo, G.; Garberoglio, C.; Paz, B.; Shen, J.; Lau, S.K.; Quake, S.R.; Brown, J.M., Weissman, I.L.; Clarke, M.F. (2009). “Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells”. *Nature.*, 458(7239), 780–783
- Dikalov S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free radical biology & medicine*, 51(7), 1289–1301.
- Dikalov, S. I., Harrison, D. G. (2014). Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*, 20(2), 372–382.
- Ding, S.; Li, C.; Cheng, N.; Cui, X.; Xu, X.; Zhou, G. (2015). “Redox Regulation in Cancer Stem Cells”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-1
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., & Wicha, M. S. (2003). “*In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells”. *Genes & development*, 17(10), 1253–1270.
- Du, J., Li, Q., Tang, F., Puchowitz, M. A., Fujioka, H., Dunwoodie, S. L., Danielpour, D. and Yang, Y.C. (2014). “Cited2 is required for the maintenance of glycolytic metabolism in adult hematopoietic stem cells”. *Stem Cells Dev*, 23, 83-94.

- Fang, X.; Zheng, P.; Tang, J.; Liu, Y. (2010). “CD24: from A to Z”. *Cellular & Molecular Immunology*, 7, 100–103
- Finot, L., Chanat, E., & Dessauge, F. (2018). “Molecular signature of the putative stem/progenitor cells committed to the development of the bovine mammary gland at puberty”. *Scientific reports*, 8(1), 16194.
- Fitzgerald, J. P., Nayak, B., Shanmugasundaram, K., Friedrichs, W., Sudarshan, S., Eid, A. A., DeNapoli, T., Parekh, D. J., Gorin, Y., & Block, K. (2012). “NOX4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through Hypoxia-Induced interleukin-6 and 8- production”. *PloS one*, 7(1), e30712.
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation research*, 122(6), 877–902.
- Frazziano, G.; Champion, H.C., Pagano, P.J. (2012). NADPH oxidase-derived ROS and the regulation of pulmonary vessel tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302 (11), H2166-H2177.
- French R, Clarkson R. (2012). “The Complex Nature of Breast Cancer Stem-Like Cells: Heterogeneity and Plasticity”. *J Stem Cell Res Ther*, S7:009
- Galluzzi, L.; Morselli E.; Kepp O.; Viatle, I.; Rigoni, A.; Vacchelli, E.; Michaud, M.; Zischka, H.; Castedo, M.; Kroemer, G. (2010). “Mitochondrial gateway to cancer”. *Mol Aspects Med*. 31(1), 1-20.
- Gao, Y.J., Li, B., Wu, X.Y., Cui, J., Han, J.K. (2014). “Thyroid tumor-initiating cells: increasing evidence and opportunities for anticancer therapy (review)”. *Oncology reports*, 1035-1042
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., & Dontu, G. (2007). “ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome”. *Cell stem cell*, 1(5), 555–567.
- Govindarajan, B., Sligh, J. E., Vincent, B. J., Li, M., Canter, J. A., Nickoloff, B. J., Rodenburg, R. J., Smeitink, J. A., Oberley, L., Zhang, Y., Slingerland, J., Arnold, R. S., Lambeth, J. D., Cohen, C., Hilenski, L., Griendling, K., Martínez-Diez, M., Cuezva, J. M., & Arbiser, J. L. (2007). “Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma”. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 719–729.
- Halliwell, B. (2006). “Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life”. *Plant Physiol*. 141, 312–322
- Halliwell, B. (1999). “Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition”. *Mutation Research*, 443, 37–52.
- Halliwell, B.; Cross, C.E. (1994). “Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress”. *Environmental Health Perspectives*, 102, 5-11
- Hegedűs, C., Kovács, K., Polgár, Z., Regdon, Z., Szabó, É., Robaszkiewicz, A., Forman, H. J., Martner, A., & Virág, L. (2018). “Redox control of cancer cell destruction”. *Redox biology*, 16, 59–74.
- Iglesias, J.M., Beloqui, I., Garcia-F., Leis, O., Vazquez, A., Arrate, E., Cufi, S., Andres Pavon, A., Menendez, J.A., 4,5, Joaquin Dopazo, J., Martin, A.G. (2013). “Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin”. *PLOS ONE*, 8 (10), e77281.
- International Agency for Research on Cancer. 2018. Recuperado de la red (11/01/2019) de https://www.iarc.fr/wpcontent/uploads/2018/09/pr263_E

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2018. Recuperado de la red (11/01/2018) de http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
- Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., Baba, H., ... Saya, H. (2011). CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer cell*, 19(3), 387–400.
- Jiang, G., Zhang, S., Yazdanparast, A., Li, M., Pawar, A. V., Liu, Y., Inavolu, S. M., & Cheng, L. (2016). “Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer”. *BMC genomics*, 17 Suppl 7(Suppl 7), 525.
- Jiao, X., Rizvanov, A. A., Cristofanilli, M., Miftakhova, R. R., & Pestell, R. G. (2016). Breast Cancer Stem Cell Isolation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1406, 121–135.
- Kalyanaraman, B.; Cheng, G.; Hardy, M.; Quari, O.; Bennett, B.; Zielonka, J. (2018). “Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies”. *Redox Biology*, 15, 347–362.
- Katagiri K, Matsuzawa A, Ichijo H. (2010). “Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in redox signaling”. *Methods Enzymol.* 474:277-288.
- Korkaya, H., Liu, S., Wicha, M. S. (2011). “Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment”. *The Journal of clinical investigation*, 121(10), 3804–3809.
- Kreso A, Dick JE. (2014). “Evolution of the cancer stem cell model”. *Cell Stem Cell*, 14(3):275-291.
- Kristiansen, G., Sammar, M., Altevogt, P. (2004). “Tumour biological aspects of CD24, a muclike adhesion molecule”. *Journal of Molecular Histology*, 35, 255–262.
- Kucera, J.; Binó, L.; Štefková, K.; Jaroš, J., Vašílek, O.; Veřela, J.; Kubala, L., Pacherník, J. (2016). “Apocynin and Diphenylethylideneiodonium Induce Oxidative Stress and Modulate PI3K/Akt and MAPK/Erk Activity in Mouse Embryonic Stem Cells”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-14.
- Lagadinou, E.D.; Sach, A.; Callahan, K.; Rossi, R.M.; Neering, S.J.; Minhajuddin, M.; Ashton, J.M.; Pei, S.; Grose, V.; O’Dwyer, K.M., Liesveld, J.L.; Brookes, P.S.; Becker, M.W.; Jordan, C.T. (2013). “BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells”. *Cell Stem Cell*, 12, 329–341.
- Le, A. V., Szaumkessel, M., Tan, T. Z., Thiery, J. P., Thompson, E. W., & Dobrovic, A. (2018). “DNA Methylation Profiling of Breast Cancer Cell Lines along the Epithelial Mesenchymal Spectrum-Implications for the Choice of Circulating Tumour DNA Methylation Markers”. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2553.
- LeBleu, V. S., O’Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., de Carvalho, F. M., Damascena, A., Domingos Chinen, L. T., Rocha, R. M., Asara, J. M., & Kalluri, R. (2014). “PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis”. *Nature cell biology*, 16(10), 992–15.
- Lee, B., Ghode, P., & Ong, D. (2019). “Redox regulation of cell state and fate”. *Redox biology*, 25, 101056.
- Lee S.B., Bae I.H., Bae Y.S., Um H.D. (2006). Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J Biol Chem.*, 281(47):36228–36235.

- Lee, S.Y.; Ju, M.K.; Jeon, H.M.; Lee, Y.J. Kim, C.H.; Park, H.G.; Han, S.I.; Kang, H.S. (2019). “Reactive oxygen species induce epithelial-mesenchymal transition, glycolytic switch, and mitochondrial repression through the Dlx-2/Snail signaling pathways in MCF-7 cells”. *Molecular Medicine Reports*, 20, 2339-2346.
- Lehmann, B.D.; Bauer, J.A.; Chen, X.; Sanders, M.E.; Chakravarthy, A.B.; Shyr, Y.; Pietenpol; J.A. (2011). “Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies”. *The Journal of Clinical Investigation.*, 121, 2750-2765.
- Lim, J., & Leprivier, G. (2019). The impact of oncogenic RAS on redox balance and implications for cancer development. *Cell death & disease*, 10(12), 955.
- Lin, C. H., Hung, P. H., & Chen, Y. J. (2013). CD44 is associated with the aggressive phenotype of nasopharyngeal carcinoma through redox regulation. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 13266–13281.
- Lingappan K. (2018). NF-κB in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol*, 7, 81-86
- Liou, G. Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*, 44(5), 479–496.
- Li, R.; Jia, Z.; Trush, M.A. (2016). “Defining ROS in Biology and Medicine”. *React Oxyg Species*, 1(1): 9–21.
- Liu, B., Chen, Y., & St Clair, D. K. (2008). “ROS and p53: versatile partnership”. *Free radical biology & medicine*, 44(8), 1529–1535
- Liu, F., Yang, X., Geng, M., & Huang, M. (2018). “Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy”. *Acta pharmaceutica Sinica. B*. 8(4), 552–562.
- Liu, S.; Cong, Y.; Wang, D.; Sun, Y.; Deng, L.; Liu, Y.; Martin-Trevino, R.; Shang, L.; McDermott, S.P.; Landis, M.D.; Hong, S.; Adams, A.; D’Angelo, R; Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Clouthier, S.G.; Birnbaum, D.; Wong, S.T.; Zhan, M.; Chang, J.C.; Wicha, M.S. (2014). “Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts”. *Stem Cell Reports*, 2, 78–91
- Li Y, Trush MA. (1998). Diphenyleiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun...*, 253(2):295-299.
- Lombardo, Y., de Giorgio, A., Coombes, C. R., Stebbing, J., & Castellano, L. (2015). Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (97), 52671
- Luo, M.; Shang, L.; Brooks, M.D.; Jiagge, E.; Zhu, Y.; Buschhaus, J.M.; Conley, S.; Fath, M.A.; Davis, A.; Gheordunescu, E.; Wang, Y.; Harouaka, R.; Lozier, A.; Triner, D.; McDermott, S.; Merajver, S.D.; Luker, G.D.; Spitz, D.R.; Wicha, M.S. (2018). “Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling”. *Targeting Cell Metabolism.*, 28, 69-86.
- Lushchak, V.I. (2014). “Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification”. *Chemico Biological Interactions*, 224, 164-175.
- McKnight, B. N., Kim, S., Boerner, J. L., & Viola, N. T. (2020). Cetuximab PET delineated changes in cellular distribution of EGFR upon dasatinib treatment in triple negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 22(1), 37.
- Mezencev, R., Wang, L., Xu, W., Kim, B., Sulchek, T.A., Daneker G.W., McDonald, J.F. (2013). “Molecular analysis of the inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine on the proliferation and invasiveness of pancreatic cancer cells”. *Anti-Cancer Drugs*, 24, 504-18

- Miran T, Vogg ATJ, Drude N, Mottaghy FM, Morgenroth A. (2018). “Modulation of glutathione promotes apoptosis in triple-negative breast cancer cells”. *FASEB J.* 32(5):2803-2813.
- Mizuno, T., Suzuki, N., Makino, H., Furui, T., Morii, E., Aoki, H., Kunisada, T., Yano, M., Kuji, S., Hirashima, Y., Arakawa, A., Nishio, S., Ushijima, K., Ito, K., Itani, Y., & Morishige, K. (2015). Cancer stem-like cells of ovarian clear cell carcinoma are enriched in the ALDH-high population associated with an accelerated scavenging system in reactive oxygen species. *Gynecologic oncology*, 137(2), 299–305.
- Moloney, J.N.; Cotter T.G. (2017). “ROS signalling in the biology of cancer”. *Semin Cell Dev Biol.*, 1-15.
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). “Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling”. *Cell research*, 21(1), 103–115.
- Movafagh, S., Crook, S., Vo, K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *Journal of cellular biochemistry*, 116(5), 696–703.
- Muralikrishnan, V., Hurley, T. D., & Nephew, K. P. (2020). Targeting Aldehyde Dehydrogenases to Eliminate Cancer Stem Cells in Gynecologic Malignancies. *Cancers*, 12(4), 961.
- Nagano, O.; Okazaki, S.; Saya, H. (2013). “Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms”. *Oncogene*, 32, 5191–5198
- Nakamura, K.; Terai, Y.; Tanabe, A.; Yoshihiro J. Ono, Y.J.; Hayashi, M.; Maeda, K.; Fujiwara, S.; Ashihara, K.; Nakamura, M.; Tanaka, Y.; Tanaka, T.; Tsuneto, S.; Sasaki, H.; Ohmichi, M. (2017). “CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways”. *Reports*, 37, 3189-3200.
- National Cancer Institute. Breast cancer treatment (Adult). Recuperado de la red (09/05/2020) de https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq#section/_27
- Nazarewicz, R. R., Dikalova, A., Bikineyeva, A., Ivanov, S., Kirilyuk, I. A., Grigor'ev, I. A., & Dikalov, S. I. (2013). Does scavenging of mitochondrial superoxide attenuate cancer pro-survival signaling pathways? *Antioxidants & redox signaling*, 19(4), 344–349.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., Waldman, F. M., ... Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell*, 10(6), 515–527.
- O'Donnell, B. V., Tew, D. G., Jones, O. T., England, P. J. (1993). “Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase”. *The Biochemical journal*, 290, 41–49.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 87(1), 315–424.
- Park, M. T., Kim, M. J., Suh, Y., Kim, R. K., Kim, H., Lim, E. J., Yoo, K. C., Lee, G. H., Kim, Y. H., Hwang, S. G., Yi, J. M., & Lee, S. J. (2014). Novel signaling axis for ROS generation during K-Ras-induced cellular transformation. *Cell death and differentiation*, 21(8), 1185–1197.
- Park, S. Y., Lee, H. E., Li, H., Shipitsin, M., Gelman, R., & Polyak, K. (2010). Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(3), 876–887.

- Pidgeon, G. P., Lysaght, J., Krishnamoorthy, S., Reynolds, J. V., O'Byrne, K., Nie, D., & Honn, K. V. (2007). Lipooxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer metastasis reviews*, 26(3-4), 503–524.
- Pires, B.R.; Amorim Í.S.D.E.; Souza, L.D.; Rodrigues, J.A.; Mencialha, A.L. (2016). “Targeting Cellular Signaling Pathways in Breast Cancer Stem Cells and its Implication for Cancer Treatment”. *Anticancer Research*, 36, 5681-5692.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763.
- Porporato, P.E.; Payen, V.L.; Perez-Escuredo, De Saedeleer, J.C.J.; Danhier, P.; Copetti, T.; Dhup, S.; Tardy, M.; Vazeille, T.; Bouzin, C.; Feron, O.; Michiels, C.; Gallez, B.; Sonveaux, P. (2014). “A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis”. *Cell Reports* 8, 754–766.
- Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer letters*, 387, 95–105.
- Prat, A., Karginova, O., Parker, J. S., Fan, C., He, X., Bixby, L., Harrell, J. C., Roman, E., Adamo, B., Troester, M., Perou, C. M. (2013). “Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes”. *Breast cancer research and treatment*, 142(2), 237–255.
- Prat, A., & Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*, 5(1), 5–23.
- Prat, A.; Perou, C.M. (2009). “Mammary development meets cancer genomics”. *Nature Medicine*, 15, 842-844.
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., Perou, C. M. (2010). “Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer”. *Breast cancer research*, 12(5), R68.
- Pazdro, R., & Burgess, J. R. (2012). Differential effects of α -tocopherol and N-acetyl-cysteine on advanced glycation end product-induced oxidative damage and neurite degeneration in SH-SY5Y cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1822(4), 550–556.
- Qanungo, S.; Uys, J.D.; Manevich, Y.; Distler, A.M.; Shaner, B.; Hill, E.G.; Mieyal, J.J.; Lemasters, J.J.; Townsend, D.M., Nieminen, A.L. (2014). “N-acetyl-L-cysteine sensitizes pancreatic cancers to gemcitabine by targeting the NF κ B pathway”. *Biomed Pharmacother*, 68(7), 855–864.
- Raniga, P. V., Lee, A. C., Sinha, D., Shih, Y. Y., Mittal, D., Makhale, A., Bain, A. L., Nanayakarra, D., Tonissen, K. F., Kalimutho, M., & Khanna, K. K. (2020). Therapeutic cooperation between auranofin, a thioredoxin reductase inhibitor and anti-PD-L1 antibody for treatment of triple-negative breast cancer. *International journal of cancer*, 146(1), 123–136.
- Rauner, G., & Barash, I. (2012). “Cell Hierarchy and Lineage Commitment in the Bovine Mammary Gland”. *PLoS one*, 7(1), e30113.
- Ray, P.D.; Huang, B.W.; Tsuji, Y. (2012). “Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling”. *Cell Signal*, 24(5): 981–990.
- Reilly, R. (2007). “Breast Cancer”. *xPharm The Comprehensive Pharmacology*, 1–9.
- Ricardo, S.; Filipe Vieira, A.F.; Gerhard, R.; Leitaõ, D.; Pinto, R.; Cameselle-Teijeiro, J.F.; Milanezi, F.; Schmitt, F.; Paredes, J. (2011). “Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype”. *J Clin Pathol*, 64, 937-946
- Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *J Biol Chem*. 2004;279(46):47726-47731.

- Rostoker, R.; Abelson, S.; Genkin, I.; Ben, S.; Sachidanandam, R.; Scheinman, E.J., Bitton, K.; Orr, Z.S. Caspi, A.; Tzukerman, M.; LeRoith, D. (2015). “CD24⁺ cells fuel rapid tumor growth and display high metastatic capacity”. *Breast Cancer Research*, 17, 78.
- Russnes, H. G., Navin, N., Hicks, J., & Borresen-Dale, A. L. (2011). Insight into the heterogeneity of breast cancer through next-generation sequencing. *The Journal of clinical investigation*, 121(10), 3810–3818.
- Ryoo, I., Choi, B., Ku, S., Kwak, M. (2018). “High CD44 expression mediates p62-associated NFE2L2/NRF2 activation in breast cancer stem cell-like cells: Implications for cancer stem cell resistance”. *Redox Biology*, 17, 246-258.
- Ryoo, I. G., Kim, G., Choi, B. H., Lee, S. H., & Kwak, M. K. (2016). Involvement of NRF2 Signaling in Doxorubicin Resistance of Cancer Stem Cell-Enriched Colonospheres. *Biomolecules & therapeutics*, 24(5), 482–488.
- Ryoo, I., Lee, S. Kwak, M.K. (2016). “Redox Modulating NRF2: A Potential Mediator of Cancer Stem Cell Resistance”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-14.
- Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta.*;1830(8):4117-4129.
- Sandhu, R.; Parker, J.S.; Jones, W.D.; Livasy, C.A.; Coleman, W.B. (2010). “Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy”. *Lab. Medicine.*, 41, 364-371.
- Sarmiento, F.L.; Delgado, A.; Montes, J.B.; Ramírez, D.; Flores, J.C.; Cortés, P.; Reyes, J.; Herrera, I.; Anaya, M.; Pelayo, R.; Millán-Pérez-Peña, L.; Maycotte, P. (2019). “Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment”. *Front. Oncol.*, 9, 1-13.
- Schoonbroodt, S.; Ferreira, V.; Best, M.; Boelaert, J.R.; Legrand, S.; Korner, M; Piette, J. (2000). “Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress”. *Journal of Immunology*, 164(8), 4292-4300
- Serasinghe, M. N., Wieder, S. Y., Renault, T. T., Elkholi, R., Ascioffa, J. J., Yao, J. L., Jabado, O., Hoehn, K., Kageyama, Y., Sesaki, H., & Chipuk, J. E. (2015). Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Molecular cell*, 57(3), 521–536.
- Shao, J., Fan, W., Ma, B., & Wu, Y. (2016). “Breast cancer stem cells expressing different stem cell markers exhibit distinct biological characteristics” *Molecular medicine reports*, 14(6), 4991–4998.
- Shipitsin, M., Campbell, L. L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., Halushka, M. K., Sukumar, S., Parker, L. M., Anderson, K. S., Harris, L. N., Garber, J. E., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Nikolsky, Y., Gelman, R. S., ... Polyak, K. (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer cell*, 11(3), 259–273.
- Shi, X.; Zhang, Y.; Zheng, J.; Pan J. (2012). “Reactive Oxygen Species in Cancer Stem Cells”. *Antioxid Redox Signal.*, 16, 1215–1228.
- Sies H. (2017). “Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress”. *Redox Biology* 11:613–619
- Sies, H.; Jones, D.P. (2020). “Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signaling agents”. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 1-21.

- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C. and Sadek, H. A. (2010). “The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche”. *Cell Stem Cell*, 7, 380-390.
- Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B. C., Matsumoto, A., Thompson, D. C., & Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free radical biology & medicine*, 56, 89–101.
- Skonieczna, M., Hejmo, T., Poterala-Hejmo, A., Cieslar-Pobuda, A., & Buldak, R. J. (2017). “NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9420539.
- Son Y, Kim S, Chung H-T, Pae H-O (2013). “Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases”. *Methods in enzymology*, 528, 27-48.
- Tahara, E.B.; Navarete, F.D.T.; Kowaltowski, A.J. (2009). “Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation”. *Free Radical Biology & Medicine*, 46,1283–1297.
- Takahashi, R. U., Takeshita, F., Fujiwara, T., Ono, M., & Ochiya, T. (2011). Cancer stem cells in breast cancer. *Cancers*, 3(1), 1311–1328.
- Tamura, M., Matsui, H., Tomita, T., Sadakata, H., Indo, H. P., Majima, H. J., Kaneko, T., & Hyodo, I. (2014). “Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion”. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 54(1), 12–17.
- Tian, J., Raffa, F. A., Dai, M., Moamer, A., Khadang, B., Hachim, I. Y., Bakdounes, K., Ali, S., Jean-Claude, B., & Lebrun, J. J. (2018). “Dasatinib sensitises triple negative breast cancer cells to chemotherapy by targeting breast cancer stem cells”. *British journal of cancer*, 119(12), 1495–1507.
- Toledo, M.E.; Bigoni, G.D.; Ibáñez, M.; Ortiz, E. (2018). “Cancer stem cell impact on clinical oncology”. *World Journal of Stem Cells*. 10(12): 183-227.
- Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. (2009). “Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?”. *Nat Rev Drug Discov*, 8(7):579-91
- Trager, W.F. (2007). Principles of Drug Metabolism 1: Redox Reactions. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 5, 87-132
- Uchihara, Y., Ohe, T., Mashino, T., Kidokoro, T., Tago, K., Tamura, H., & Funakoshi-Tago, M. (2019). N-Acetyl cysteine prevents activities of STAT3 inhibitors, Stattic and BP-1-102 independently of its antioxidant properties. *Pharmacological reports: PR*, 71(6), 1067–1078.
- Ursini, F.; Maiorino, M.; Forman, H.J. (2016). “Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living”. *Redox Biology*, 8, 205–215
- Velasco, M.A.; Velázquez, I.; Vásquez, L.X.; Pérez, S.M. (2018). “Targeting Breast Cancer Stem Cells: a methodological perspective Current”. *Stem Cell Research & Therapy*. 14, 1-10.
- Wang, P., Song, M., Zeng, Z. L., Zhu, C. F., Lu, W. H., Yang, J., Ma, M. Z., Huang, A. M., Hu, Y., & Huang, P. (2015). “Identification of NDUFAF1 in mediating K-Ras induced mitochondrial dysfunction by a proteomic screening approach”. *Oncotarget*, 6(6), 3947–3962.
- Wang, W., Nag, S. A., & Zhang, R. (2015). Targeting the NFκB signaling pathways for breast cancer prevention and therapy. *Current medicinal chemistry*, 22(2), 264–289.
- Wang, Y., Cardenas, H., Fang, F., Condello, S., Taverna, P., Segar, M., Liu, Y., Nephew, K. P., & Matei, D. (2014). Epigenetic targeting of ovarian cancer stem cells. *Cancer research*, 74(17), 4922–4936.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and

- ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8788–8793.
- Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, ME, Ho, H., Schmidt, HHHW., Wingler, K. (2010). Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Br J Pharmacol*. 161(4): 885–898
- Wu, T., Harder, B. G., Wong, P. K., Lang, J. E., & Zhang, D. D. (2015). Oxidative stress, mammospheres and Nrf2-new implication for breast cancer therapy?. *Molecular carcinogenesis*, 54(11), 1494–1502.
- Wu, Y., Yun, D., Zhao, Y., Wang, Y., Sun, R., Yan, Q., Zhang, S., Lu, M., Zhang, Z., Lu, D., & Li, Y. (2017). Down regulation of RNA binding motif, single-stranded interacting protein 3, along with up regulation of nuclear HIF1A correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Oncotarget*, 8(1), 1262–1277.
- Xu, X., Lu, Y., Li, Y., Prinz, R.A. (2017). Sonic Hedgehog Signaling in Thyroid Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 284
- Yan, W., Chen, Y., Yao, Y., Zhang, H., & Wang, T. (2013). Increased invasion and tumorigenicity capacity of CD44+/CD24- breast cancer MCF7 cells *in vitro* and in nude mice. *Cancer cell international*, 13(1), 62.
- Yang, S. G., Park, H. J., Kim, J. W., Jung, J. M., Kim, M. J., Jegal, H. G., Kim, I. S., Kang, M. J., Wee, G., Yang, H. Y., Lee, Y. H., Seo, J. H., Kim, S. U., & Koo, D. B. (2018). “MitotEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos” *Scientific reports*, 8(1), 10130.
- Yang Z, Guo F, Albers AE, Sehouli J, Kaufmann AM. (2019). “Disulfiram modulates ROS accumulation and overcomes synergistically cisplatin resistance in breast cancer cell lines”, *Biomed Pharmacother.*, 113, 108727
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology*, 199(3), 316–331.
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., Abel, P. W., & Tu, Y. (2013). “Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells”. *Oncogene*, 32(40), 4814–4824.
- Zhao, W., Li, Y., Zhang, X. (2017). “Stemness-related markers in cancer”. *Cancer Transl Med*. 3(3): 87–95
- Zhou, D.; Shao, L.; Spitz, D.R. (2014). Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells *Adv. Cancer Res.*, 122, 1-67.
- Zibara K, Zeidan A, Bjeije H, Kassem N, Badran B, El-Zein N (2017). ROS mediates interferon gamma induced phosphorylation of Src, through the Raf/ERK pathway, in MCF-7 human breast cancer cell line. *J Cell Commun Signal.*, 11(1):57-67.
- Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., & Kalyanaraman, B. (2017). “Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications”. *Chemical reviews*, 117(15), 10043–10120.

12. ANEXOS

12.1 ANEXO I

Tabla 4. Características de las líneas celulares de cáncer de mama

Línea celular	Fuente ^a	Histología	Mutaciones/ oncogenes expresados ^{b,c}
MCF7	Efusión pleural	AC ^a /CDI ^b	CDKN2A; PI3KCA; E545K; WNT7B
MDAMB468	Efusión pleural	AC ^a /CD ^b	PTEN; RB1; SMAD4; TP53
MDAMB231	Efusión pleural	AC ^a /CDI ^b	BRAF; CDKN2A; KRAS; NF2; WNT7B TP53; PDGFRA
BT549	Primario	CDI ^{a,b}	PTEN; RB1; TP53

a: ATCC, 2015; b: Lehmann et al, 2011; c: COSMIC database de www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/; AC: Adenocarcinoma; CD: Carcinoma ductal; CDI: Carcinoma ductal invasivo.

Tabla 5. Clasificación por inmunohistoquímica y molecular aproximada de las líneas celulares de cáncer de mama

Línea celular	Clasificación por inmunohistoquímica ^a			Clasificación molecular	
	ER	PR	HER2	Subtipo intrínseco ^b	Fenotipo ^{c,d}
MCF7	(+)	(+)	(-)	Luminal A	Luminal Vim (-)
MDAMB468	(-)	(-)	(+)	Basal like	Epitelial Vim (-)
MDAMB231	(-)	(-)	(-)	Bajo en claudinas	Mesenquimal Vim (+)
BT549	(-)	(-)	(-)	Bajo en claudinas	Mesenquimal Vim (+)

a: Jiang et al., 2016; b: Prat-Perou, 2011; c: Ricardo et al., 2011; d: Le et al., 2018. HER2: receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico; Vim: Vimentina.

12.2 ANEXO II

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una tecnología que permite la caracterización de partículas individuales, usualmente células, mediante el análisis de la dispersión de luz y fluorescencia emitidas cuando pasan a través de un haz de luz o láser de excitación a una λ determinada (Bio-RAD Laboratories Inc).

El citómetro de flujo cuenta con dos detectores lumínicos: el frontal (FSC), en dirección al haz de luz (aprox. 20°), capta la luz dispersada dependiente del tamaño de la partícula; y el lateral (SSC), colocado a 90° del láser de excitación, absorbe la luz dispersada en base a la complejidad o granularidad de la partícula (Bio-RAD Laboratories Inc; BD Bioscience, 2002). La intensidad de fluorescencia relativa que emiten las partículas al ser activadas por fluorescencia (FACS) es colectada por detectores de fluorescencia (BD Bioscience, 2002).

Cuando se requiere identificar un antígeno específico de algún tipo celular de utilizan anticuerpos monoclonales acoplados a un fluorocromo, un compuesto que tiene una λ de excitación y emisión de fluorescencia característica (Bio-RAD Laboratories Inc; BD Bioscience, 2002). Los fluoróforos son la parte de los fluorocromos que le confieren la propiedad de emitir fluorescencia. Algunos ejemplos de fluoróforos son isotiocinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), rodamina, rojo Texas, cianinas, unidos de manera covalente; además, Hoescht, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), naranja de acridina (Bio-RAD Laboratories Inc).

Finalmente, los detectores o fotomultiplicadores (PMT) producen señales eléctricas proporcionales a las señales ópticas que reciben, las cuales son digitalizadas para ser vistas en un software (BD Bioscience, 2002). De esta manera, es posible obtener una representación de las poblaciones con respecto a diferentes parámetros.

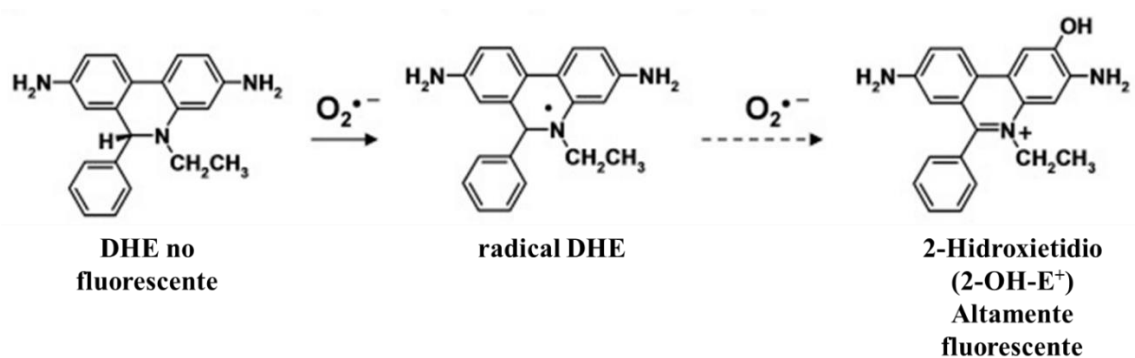


Figura 11. Formación del producto 2-hidroxietidio (2-OH-E⁺) mediante la reacción del DHE con el O₂^{•-}. Modificado de Dikalov-Harrison, 2014.

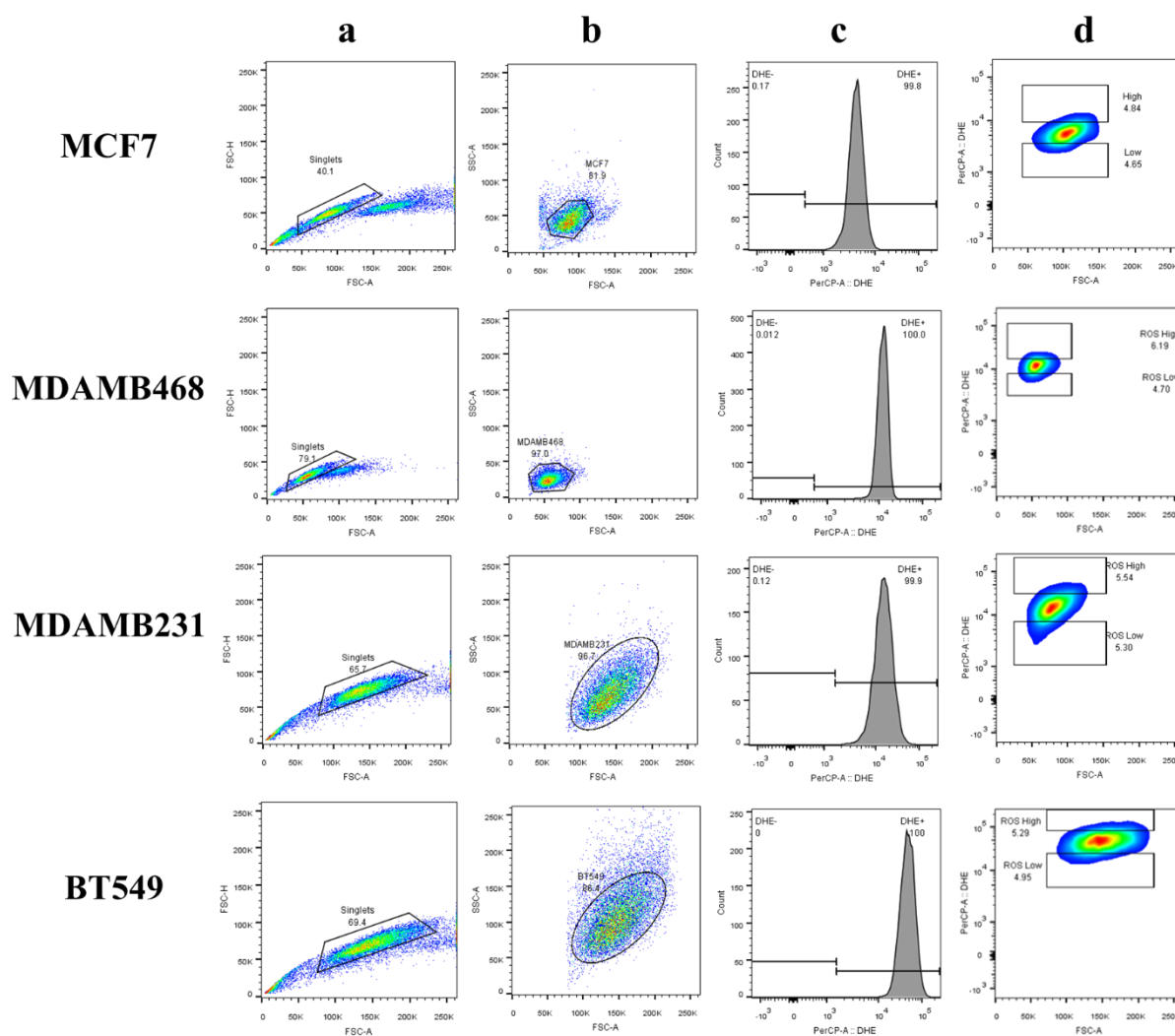


Figura 12. Definición de poblaciones celulares de niveles altos (“ROS High”) y bajos de (“ROS Low”) de EROs por citometría de flujo, en las líneas celulares de cáncer de mama. a) Selección de singletes o células individuales, descartando dobletes o residuos celulares; b) elección de la población celular característica de la línea celular; c) determinación de la población DHE (+) utilizando como referencia la autofluorescencia o la población DHE (-); d) asignación de “gates” para la población celular “ROS High” (parte superior) y “ROS Low” (parte inferior).

12.3 ANEXO III

Preparación de las soluciones stock del marcador de EROs (DHE) y los antioxidantes

a) Solución stock de dihidroetidio (DHE) 5 mM

Para la preparación de la solución stock de DHE (Sigma Aldrich 37291-25 MG) 5 mM, 25 mg del reactivo sólido se disolvieron en 16 mL de DMSO libre de humedad. Se agregaron algunos mL de DMSO directamente en el frasco del reactivo hasta asegurarse que no hubiera ningún precipitado, para después terminar de disolver en el volumen total en un tubo falcón de 50 mL, posteriormente se agitó la solución vigorosamente con un vórtex. La solución de reactivo se almacenó en alícuotas a -20 ° C protegidas de la luz.

Nota.- Para tratar las células se reemplaza el medio de cultivo de los tratamientos antioxidantes o sin tratamiento en el caso del control, con la solución de DHE 10 μ M, la autofluorescencia no se tiñe. La solución de DHE 10 μ M debe prepararse minutos antes del tratamiento para evitar que se degrade, se considera el volumen total del medio de cultivo requerido para las líneas celulares y el número de tratamientos, agregando 2 μ L por cada mL del medio de cultivo.

b) Solución stock de N-acetil cisteína (NAC) 1 M

Para la preparación de la solución stock de NAC (Sigma Aldrich A7250-50G) 1 M, se midieron 3.5 mL de PBS 1X, 0.816 g de NAC se fueron agregando lentamente con agitación constante hasta que se solubilizara, ya que si se agrega en una sola emisión precipita e incrementa el tiempo de disolución, después se ajustó el pH a 7.0 y se aforó la solución a 5 ml.

Nota: Para tratar las células con el NAC, se removió el sobrenadante de 24 h de cultivo y se agregaron por cada mL de medio de cultivo de incubación, 15 μ L y 30 μ L de NAC 1 M para las concentraciones 15 mM y 30 mM, respectivamente. Se recomienda utilizar el tratamiento de NAC el mismo día que se prepare, ya que el compuesto se desestabiliza después de congelado, disminuyendo su eficiencia para reducir las EROs, o bien, almacenar la solución del reactivo en alícuotas a -20 °C y puede utilizarse después de 24 y 48 h.

c) Solución stock de cloruro de difenileno yodonio (DPI) 3 mM

Para la preparación de la solución stock de DPI (Sigma Aldrich D2926-10MG) 3 mM se disolvieron 10 mg del reactivo sólido en 10.6 mL de DMSO. Primero se agregaron 1.5 mL de DMSO directamente en el frasco del reactivo agitando cuidadosamente con la micropipeta hasta asegurarse que la solución se observara homogénea. Después, en un tubo falcón de 15 ml se mezclaron estos 1.5 mL más los mililitros de DMSO restantes, en este caso 9.1 mL, enseguida la solución se agitó vigorosamente con un vórtex. La solución del reactivo se almacenó en alícuotas protegidas de la luz a -20 °C.

Nota: Para los tratamientos de DPI en las líneas celulares, se agregó 1 μ L en 1 mL de medio de cultivo en un tubo eppendorf, obteniendo la solución diluida de DPI 3 μ M, enseguida de esta solución se agregó 1 uL y 1.7 uL en por cada mL de medio directamente en la placa de cultivo, para los tratamientos de 3 y 5 nM respectivamente.

d) Solución stock de Mitotempo (Mito) 10 mM

Para la preparación de la solución stock de Mito (Sigma Aldrich SML0737-5MG) 10 mM, se disolvieron 5 mg del reactivo sólido en 9.8 mL de H₂O tridestilada estéril. Primero, se agregaron algunos ml de H₂O directamente en el frasco del reactivo hasta asegurarse que no hubiera ningún precipitado, para después terminar de disolver en el volumen total en un tubo eppendorf de 15 mL, posteriormente se agitó la solución vigorosamente con un vórtex. La solución del reactivo se almacenó en alícuotas a -20 °C protegido de la luz.

Nota: Para los tratamientos de Mito en las líneas celulares, se agregaron 5 y 10 μL en el medio directamente en la placa de cultivo, para los tratamientos 50 y 100 μM respectivamente.

e) Solución de yoduro de propidio (IP) 10 μM

El IP es un colorante catiónico fluorescente rojo con una excitación/emisión máxima de 535/617 nm (Atale et al., 2014), impermeable a la membrana plasmática celular, por lo que únicamente es captado por células muertas que han perdido la integridad de su membrana plasmática (Atale et al., 2014). Una vez que el IP difunde dentro de la célula llega hasta el núcleo donde se intercala al ADN de doble cadena (sin preferencia de secuencia) o al ARN, generando núcleos altamente fluorescentes (Atale et al., 2014). El IP es de uso común en ensayos de viabilidad celular, ya que su selectividad permite distinguir entre células vivas y muertas (www.thermofisher.com). La tinción de IP se mide por microscopia de fluorescencia, inmunohistoquímica, fluorimetría, citometría de flujo, microscopia de escaneo láser confocal y FISH (Atale et al., 2014).

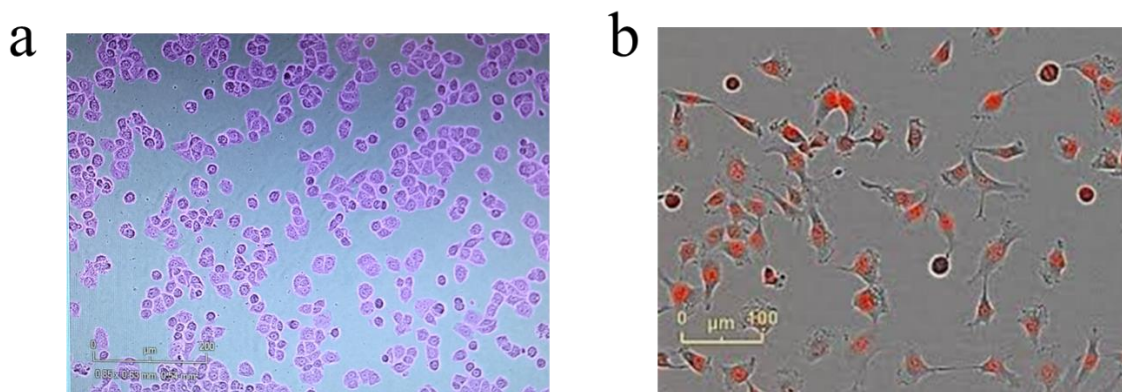


Figura 13. Análisis de viabilidad celular por captación de imágenes en el sistema de microscopia en tiempo real “Incucyte ZOOM”. a) Máscara de confluencia; b) Núcleos rojos teñidos con yoduro de propidio (IP^+)

Para el ensayo de muerte celular, la tinción de IP se realizó de la siguiente manera, se agregaron 10 μL de la solución stock de IP (Sigma Aldrich P4170) 1 mM por cada 100 μL de PBS 1X, resultando una solución 100 μM , en el volumen total, considerando el número de tratamientos y líneas celulares, posteriormente se agregaron 10 μL de esta segunda solución a

los pozos de la placa de cultivo, obteniendo la concentración de IP 10 μ M, y finalmente, se tomó la fotografía inmediatamente pasados los 10 minutos en el “Incucyte ZOOM”.

12.4 ANEXO IV

Tabla 6. Propiedades de los fluoróforos seleccionados para determinar los marcadores asociados a troncalidad CD44 y CD24

CD44	V450, colorante cumarina	violeta	“Pacific Blue”	406/450
CD24	PE, pigmento fotosintético aislado de algas rojas	azul	“PE”	496/578

PE: ficoeritrina; Ex máx: Excitación máxima; Em máx: emisión máxima

Procesamiento de datos de las poblaciones celulares CD44, CD24 y DHE en el FlowJoV10.

Los “gates” o regiones seleccionadas de poblaciones que comparten parámetros similares, fueron asignados utilizando controles de fluorescencia menos uno (FMOs) en el software FlowJoV10. Los controles FMOs consisten en agregar en la muestra todos los fluorocromos excepto uno, que es el que corresponde al canal o detector medido (Bio-RAD Laboratories Inc; BD Bioscience, 2002). Este método permite distinguir y delimitar señales positivas o negativas en las poblaciones celulares dentro de la muestra, así como, asegurarse que la fluorescencia emitida por los fluorocromos presentes no sea colectada por el canal evaluado, evitando así errores de medición (Bushnell, s.f., 2015).

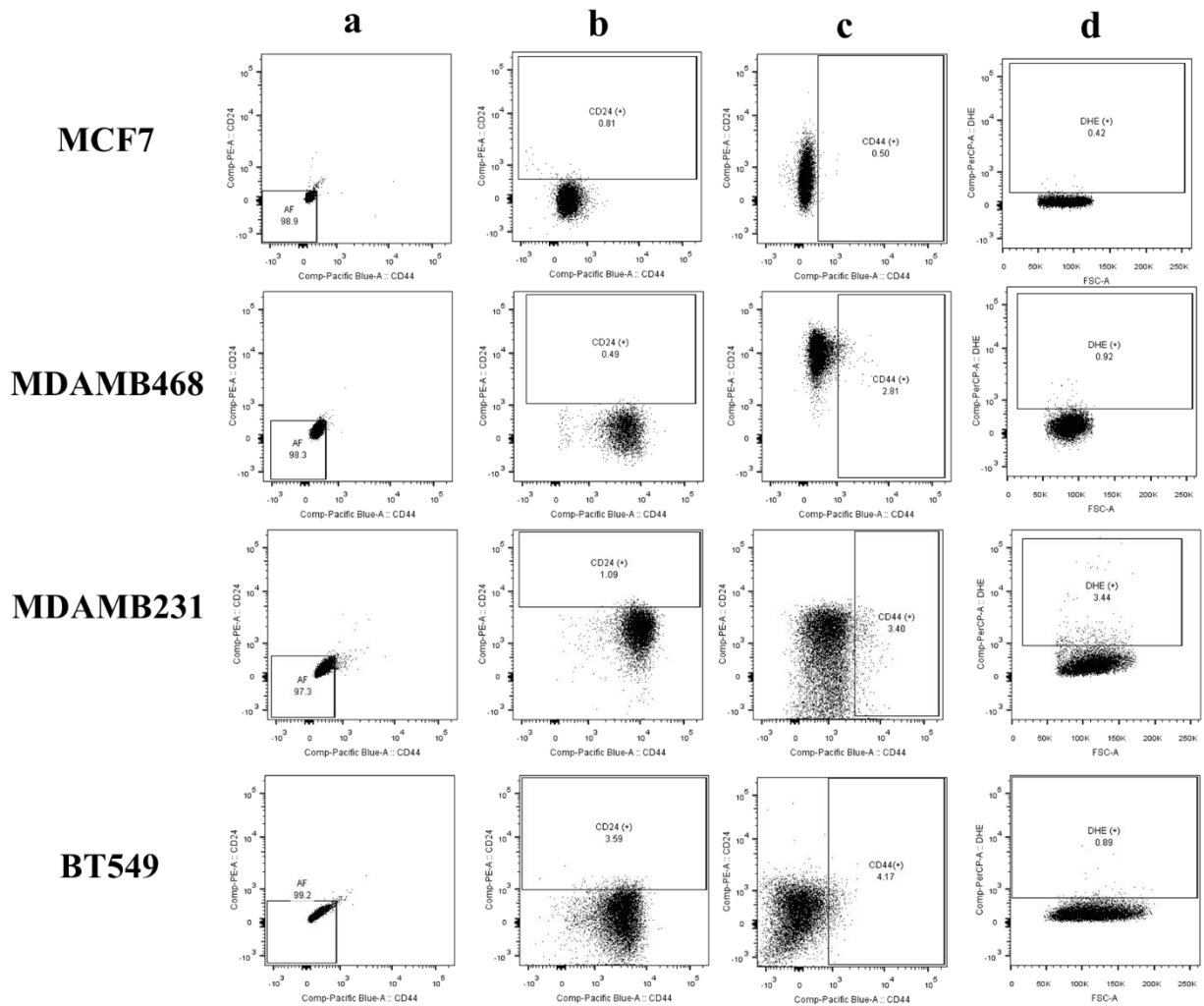


Figura 14. Asignación de “gates” mediante los controles de fluorescencia menos uno (FMOs), en poblaciones celulares seleccionadas de acuerdo con el nivel de CD44-V450/ CD24-PE y de EROs (DHE), en líneas celulares de cáncer de mama, por citometría de flujo. a) Autofluorescencia; b) Control CD44-V450⁺/DHE (+), para evaluar el canal o detector de ficoeritrina (PE, azul); c) Control CD24-PE⁺/DHE (+), para evaluar el canal o detector Pacific Blue (violeta); d) CD44-V450⁺/CD24-PE⁺ para evaluar el canal o detector de proteína de clorofila peridina (PerCP, rojo).