



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CENTRO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Estudio de la secreción de citocinas mediada por especies reactivas de oxígeno
(ERO) en cáncer de mama”**

Tesis presentada para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Químicas en el
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Presenta

M.C. Fabiola Lilí Sarmiento Salinas

Directora de tesis:

D.C. Lourdes Millán Pérez Peña

Centro de Química, Instituto de Ciencias-BUAP

Asesora de tesis:

D. C. Paola Maycotte González

CONACYT- Centro de Investigación Biomédica de Oriente -IMSS

Puebla, Puebla

Noviembre del 2020



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Bertha Alicia León Chávez, Dra. Paulina Cortes Hernández, Dra. Rosana Pelayo Camacho, Dr. Julio Morán Andrade y el Dr. Samuel Treviño Mora, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **Estudio de la secreción de citocinas mediada por especies reactivas de oxígeno (ERO) en cáncer de mama**”, que presenta la alumna **Fabiola Lilí Sarmiento Salinas** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los doce días del mes de noviembre del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dra. Bertha Alicia León Chávez

Dra. Paulina Cortes Hernández

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Dr. Julio Morán Andrade

Dr. Samuel Treviño Mora

Oficio de los sinodales escanead

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Celular II del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP).

Para la realización de mi posgrado obtuve los siguientes apoyos:

CONACYT. Becario CONACYT por 4 años (2016-2020). Numero de beca: 291137

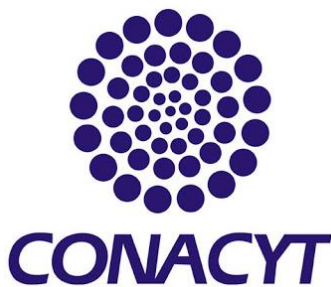
Apoyo económico complementario para la realización de estudios de maestría y doctorado en ciencias en el área de la salud. IMSS. Becario por 2 años (2018-2020). Número de beca: 97221301

Este trabajo de tesis obtuvo los siguientes financiamientos

CONACYT Ciencia Básica No. 258123.

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

Proyecto VIEP-BUAP 2018.



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



Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment

Fabiola Lilí Sarmiento-Salinas^{1,2}, Alan Delgado-Magallán^{1,2}, José Benito Montas-Alvarado¹, Dalla Ramirez-Ramirez¹, Juan Carlos Flores-Alonso¹, Paulina Cortés-Hernández¹, Julio Reyes-Leyva¹, Irma Herrera-Camacho¹, Mari Cruz Anaya-Ruiz¹, Rosana Polayo¹, Lourdes Millán-Pérez-Peña¹ and Paola Maycotte^{3*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Carlo Pizar-Pascual,
National Autonomous University of
Mexico, Mexico

Reviewed by:

Chris Antognelli,
University of Perugia, Italy
Franklin David Ruzjansk,
Federal University of Rio de
Janeiro, Brazil

*Correspondence:

Paola Maycotte
bobrusmike@gmail.com;
pmaycotte@conacyt.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 03 April 2019

Accepted: 21 May 2019

Published: 07 June 2019

Citation:

Sarmiento-Salinas FL,
Delgado-Magallán A,
Montas-Alvarado JB,
Ramirez-Ramirez D, Flores-Alonso JC,
Cortés-Hernández P, Reyes-Leyva J,
Herrera-Camacho I, Anaya-Ruiz M,
Polayo R, Millán-Pérez-Peña L and
Maycotte P (2019) Breast Cancer
Subtypes Present a Differential
Production of Reactive Oxygen
Species (ROS) and Susceptibility to
Antioxidant Treatment.
Front. Oncol. 9:480.
doi: 10.3389/fonc.2019.00480

¹Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Mexico, ²Posgrado en Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico, ³Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico de Acapulco, Acapulco de Juárez, Mexico, ⁴Centro de Química, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico, ⁵CONACYT-Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Mexico

Due to their crucial role in cell metabolism and homeostasis, alterations in mitochondrial biology and function have been related to the progression of diverse diseases including cancer. One of the consequences associated to mitochondrial dysfunction is the production of reactive oxygen species (ROS). ROS are known to have a controversial role during cancer initiation and progression and although several studies have tried to manipulate intracellular ROS levels using antioxidants or pro-oxidation conditions, it is not yet clear how to target oxidation for cancer therapy. In this study, we found differences in mitochondrial morphology in breast cancer cells when compared to a non-tumorigenic cell line and differences in mitochondrial function among breast cancer subtypes when exploring gene-expression data from the TCGA tumor dataset. Interestingly, we found increased ROS levels in triple negative breast cancer (TNBC) cell lines and a dependency on ROS for survival since antioxidant treatment induced cell death in TNBC cells but not in an estrogen receptor positive (ER+) cell line. Moreover, we identified the mitochondria as the main source of ROS in TNBC cell lines. Our results indicate a potential use for ROS as a target for therapy in the TNBC subtype which currently has the worst prognosis among all breast cancers and remains as the only breast cancer subtype which lacks a targeted therapy.

Keywords: breast cancer, ROS, mitochondria, mitochondrial morphology, mitochondrial ROS

INTRODUCTION

Breast cancer is a highly heterogeneous disease whose classification has proven to be central for proper patient management, follow-up, clinical trial selection and focus on translational research (1). Breast cancer classification has gradually shifted from a classification based on morphological findings into a more integrative approach which incorporates tumor biomarkers and molecular

Reactive Oxygen Species: Role in Tumor Progression and their Contribution to Carcinogenesis

Fabiola Lili Sarmiento-Salinas^{1,2}, Andrea Pérez-Gonzalez^{1,2}, Dayssi Adilene Acosta-Casique^{1,2}, Alfonso Daniel Diaz-Fonseca², Samuel Treviño², Nora Hilda Rosas-Murrieta², Julio Reyes-Leyva¹, Lourdes Millán Perez-Peña² and Paola Maycotte^{4,*}

¹Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Km 4.5 Carretera Atlixco-Metepec HGZ5 Puebla, 74360, Mexico

²Posgrado en Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, 72570, Mexico

⁴Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) - Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Puebla, Mexico

*Corresponding author. bisbenzimida@gmail.com; pmaycottego@conacyt.mx

Agradecimientos

A mis directoras de tesis **Dra. Lourdes Millán Pérez Peña** y **Dra. Paola Maycotte González**, gracias por brindarme la oportunidad de aprender de ustedes, por ayudarme a crecer personal y profesionalmente y por ser mis guías en el camino de la ciencia. Agradezco infinitamente su apoyo, paciencia y dedicación.

A la **Dra. Rosana Pelayo Camacho** y a la **Dra. Dalia Ramírez Ramírez** del **Laboratorio de Oncoinmunología**, por su apoyo y aportación a este proyecto de investigación, quiero expresarles mi respeto y admiración por ser excelentes científicas y personas.

Al **Dr. Julio Moran Andrade** del **Instituto de Fisiología Celular** de la **UNAM**, por facilitarme algunos de los reactivos empleados en la parte experimental de este proyecto.

A mis compañeros **Benito, Alam, Lupita, Andy** y **Johari**, por su invaluable apoyo en la parte experimental y aún más por el apoyo emocional. El laboratorio no sería lo mismo sin las bromas, las risas, el café, las terapias de catarsis y el compañerismo de todos ustedes.

A mi esposo **Salomón Assad**, por ser mi compañero, por apoyarme y cuidar de nuestra familia. Agradezco tu honestidad, tu amor y tu presencia en los momentos difíciles, gracias por estos 7 años a mi lado. Te amo.

A mi pequeño gran amor, **Salomón Assad Sarmiento**, no existen las palabras adecuadas para expresar lo que me haces sentir, tu sonrisa traviesa inunda de alegría mi alma, tu corazón hace latir al mío, tu vida cambio y le dio sentido a la mía. Hijito, aunque aún eres muy pequeño, has sido mi mejor maestro y eres mi prueba tangible de que el verdadero amor existe. Gracias por elegirme como tu mamá.

A mis padres, **Edith** y **Bonifacio** por su gran amor, por su apoyo incondicional y por creer en mi cuando ni siquiera yo misma lo hago, sin lugar a dudas la vida ha sido generosa conmigo por tenerlos a mi lado.

ÍNDICE

CAPÍTULO I ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBEJTIVOS

1. Introducción	2
1.1 Antecedentes	4
1.2 Factores de riesgo en cáncer de mama	5
1.3 Tratamiento en el cáncer de mama	6
1.3.1 Quimioterapia	7
1.3.2 Terapia endocrina	8
1.3.3 Terapia dirigida e inmunoterapia	9
1.3.4. Cirugía	10
1.3.5 Radioterapia	10
1.4 Biología redox	10
1.4.1 Especies reactivas de oxígeno	10
1.4.2 Formación de ERO de interés biológico	11
1.5 Fuentes de ERO	12
1.5.1 Mitocondria	12
1.5.2 NADPH oxidasas (NOX)	13
1.5.3 Fuentes adicionales de ERO	14
1.6 Antioxidantes	16
1.7 Efecto de las ERO sobre las macromoléculas biológicas	18
1.7.1 Efecto sobre las proteínas	19
1.7.2 Efecto sobre los lípidos	19
1.7.3 Efecto sobre los ácidos nucleicos	19
1.8 Vías de señalización mediadas por ERO.	20
1.8.1 Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células <i>B</i> activadas (NF- κ B)	20
1.8.2 Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)	21
1.8.3 Factor inducible por hipoxia (HIF-1a)	22
1.8.4 Fosfoinosítido 3- cinasas (PI3K)	22
1.8.5 Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2 (NRF2)	23
1.9 ERO y cáncer	25
1.9.1 Papel promotor de las ERO en la tumorigénesis	27
1.9.2 Papel supresor de las ERO en la tumorigénesis	28
1.10 Papel de las ERO en la secreción de citocinas	30
2. Antecedentes directos	35
2.1 El estado funcional de las mitocondrias, muestra una relación con los subtipos de cáncer de mama	36
2.2 Las líneas celulares carcinogénicas muestran una mayor fragmentación mitocondrial en comparación con una línea celular no tumorigénica.	36
2.3 El análisis de componentes de genes relacionados con el estrés oxidante separó claramente a los tumores basales de los otros subtipos de cáncer de mama.	38
3. Justificación	40
4. Hipótesis	41
5. Objetivo general	41

5.1 Objetivos específicos	41
---------------------------	----

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

6. Metodología	43
6.1 Diseño experimental	43
6.2 Cultivos celulares	44
6.3 Cuantificación de ERO totales con dihidroetidio	45
6.3.1 Preparación y almacenamiento del dihidroetidio	45
6.3.2 Determinación de ERO totales por microscopía de fluorescencia	45
6.3.3 Determinación de ERO totales por citometría de flujo	46
6.4 Cuantificación de ERO mitocondriales con MitoSox Red	47
6.4.1 Preparación y almacenamiento del MitoSox Red	47
6.4.2 Preparación y almacenamiento Mitotracker Green	47
6.4.3 Determinación de ERO mitocondriales por microscopía de fluorescencia	48
6.4.4 Determinación de ERO mitocondriales por citometría de flujo	49
6.5 Manipulación y evaluación de los niveles de ERO con antioxidantes	49
6.5.1 Preparación y almacenamiento de la N-acetilcisteína	50
6.5.2 Preparación y almacenamiento del antioxidante MitoTempo	50
6.6 Manipulación y evaluación de los niveles de ERO con prooxidantes	50
6.7 Ensayos de proliferación	51
6.8 Ensayos de muerte celular	51
6.9 Evaluación de la secreción del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) mediante ensayo de ELISA	52
6.10 Evaluación de la secreción de citocinas proinflamatorias	53
6.11 Análisis de datos en el programa FlowJo V10	54
6.12 Análisis estadístico	55

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. Resultados	
5.1 Las líneas celulares triple negativo (TN) tienen niveles basales de ERO mayores que las líneas ER+ y la no tumorigénica.	57
5.2 Los niveles basales de ERO de las líneas celulares de cáncer de mama pueden modificarse con el uso de oxidantes y antioxidantes.	61
5.3 Las líneas celulares TN muestran una mayor susceptibilidad al tratamiento antioxidante	63
5.4 Las líneas celulares triple negativo muestran niveles elevados de ERO mitocondriales	67
5.5 Las poblaciones ERO ^{high} y ERO ^{low} de células positivas a DHE pueden modificarse con el tratamiento antioxidante con N-Acetilcisteína y MitoTempo	71
5.6 Las líneas celulares TN no muestran susceptibilidad al tratamiento con inhibidores de ERO mitocondriales	74
Las líneas celulares de cáncer de mama TN muestran una mayor secreción del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) y ésta puede inhibirse con el antioxidante N-acetilcisteína.	77
5.8 Las líneas TN secretan niveles elevados de IL-6 e IL-8	78
6. Discusión de resultados	81

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

7. Conclusiones	92
8. Perspectivas	93
9. Referencias	94

ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1. Las líneas celulares TN tienen un alto porcentaje de células positivas a DHE</i>	59
<i>Gráfica 2. Las líneas celulares tumorigénicas muestran baja sensibilidad al tratamiento oxidante</i>	60
<i>Gráfica 3. Las líneas celulares TN tienen mayores niveles basales de ERO totales que las líneas celulares no tumorigénica y luminal</i>	61
<i>Gráfica 4. El tratamiento oxidante incrementa la población alta en ERO (ERO^{high})</i>	62
<i>Gráfica 5. El tratamiento antioxidante disminuye la población alta en ERO (ERO^{high}).</i>	63
<i>Gráfica 6. Las líneas TN muestran una mayor tasa de muerte celular con el tratamiento antioxidante</i>	65
<i>Gráfica 7. Las líneas TN muestran una mayor disminución en la proliferación con el tratamiento antioxidante.</i>	66
<i>Gráfica 8. La mitocondria es la principal fuente de ERO en las líneas TN.</i>	69
<i>Gráfica 9. El tratamiento con Antimicina A incrementa las ERO en las líneas celulares con menores niveles de ERO mitocondriales</i>	70
<i>Gráfica 10. Las ERO totales pueden modificarse con el antioxidante NAC.</i>	72
<i>Gráfica 11. Los niveles basales de ERO mitocondriales pueden modificarse con el antioxidante MitoTEMPO.</i>	73
<i>Gráfica 12. La inhibición de ERO mitocondriales no tiene un efecto importante sobre la muerte celular</i>	75
<i>Gráfica 13. La inhibición de las ERO mitocondriales no tiene un efecto importante sobre la proliferación celular.</i>	76
<i>Gráfica 14. Las líneas celulares de cáncer de mama TN muestran una mayor secreción del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF).</i>	77
<i>Gráfica 15. El antioxidante NAC disminuyó la secreción de MIF en las líneas celulares de cáncer de mama</i>	78
<i>Gráfica 16. Las líneas TN secretan altos niveles de IL-6 e IL-8.</i>	80

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Fuentes de ERO y su papel a nivel celular.</i>	16
<i>Figura 2. Vías de señalización mediadas por ERO.</i>	24
<i>Figura 3. Las ERO juegan un papel fundamental en el cáncer.</i>	26
<i>Figura 4. Las ERO inducen la secreción de citocinas por diferentes mecanismos.</i>	33
<i>Figura 5. Una firma génica relacionada con las mitocondrias reveló que existen diferencias importantes en la biología mitocondrial de los subtipos de cáncer de mama.</i>	36
<i>Figura 6. Las líneas celulares de cáncer de mama tumorigénicas muestran diferencias morfológicas con respecto a la línea no tumorigénica.</i>	38
<i>Figura 7. El sistema redox es diferente en función al subtipo de cáncer de mama.</i>	39
<i>Figura 8. Análisis de datos obtenidos en el citómetro de flujo.</i>	54
<i>Figura 9. Las líneas celulares TN, mostraron un mayor número de núcleos teñidos con DHE (núcleos rojos) en comparación con las líneas celulares ER+ y no tumorigénica</i>	58
<i>Figura 10. Las líneas TN muestran un mayor número de células positivas a IP con el tratamiento antioxidante</i>	64
<i>Figura 11. Las líneas celulares TN muestran mayor fluorescencia con el colorante MitoSox Red.</i>	68
<i>Figura 12. Las líneas celulares MDAMB468 y MDAMB231 tienen fuentes de ERO adicionales a la mitocondria.</i>	71
<i>Figura 13. La líneas celulares TN secretan interleucinas proinflamatorias de manera basal al medio de cultivo.</i>	79

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama</i>	4
<i>Tabla 2. Alternativas terapéuticas para el cáncer de mama en función al subtipo de cáncer.</i>	7
<i>Tabla 3. Tipos de ERO.</i>	11
<i>Tabla 4. Isoformas de NOX sobreexpresadas en los tipos de cáncer más comunes.</i>	14
<i>Tabla 5. Clasificación de los principales antioxidantes.</i>	17
<i>Tabla 6. Papel promotor y supresor de las ERO en la carcinogénesis.</i>	29
<i>Tabla 7. Características de las líneas celulares provenientes de la mama.</i>	44
<i>Tabla 8. Voltajes utilizados en cada línea celular para las lecturas en el citómetro de flujo, para la determinación de ERO totales.</i>	46
<i>Tabla 9. Voltajes utilizados en cada línea celular para las lecturas en el citómetro de flujo para la cuantificación de ERO mitocondriales.</i>	49

ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT1	Serina treonina cinasa 1
Ang4	Angiogenina 4
AR	Receptor de andrógenos
ATP	Adenosin trifosfato
BCL-2	Regulador de apoptosis
BRCA1	Cáncer de mama 1
BRCA2	Cáncer de mama 2
CAT	Catalasa
CDKN2A	Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina
c-FOS/FOS	Protooncogén Fos
c-Jun/JUN	Protooncogén Jun
c-Myc/MYC	Protooncogén Myc
COX	Ciclooxigenasa
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
CXCR1	Receptor de quimiocina con motivo C-X-C 1
CXCR2	Receptor de quimiocina con motivo C-X-C 2
CXCR4	Receptor de quimiocina con motivo C-X-C 4
CYP	<i>Citocromo P450</i>
DHE	Dihidroetidio
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ER	Receptor de estrógenos
MAPK/ERK	MAP cinasa 1
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ER-α	Receptor de estrógenos alfa
ETC	Cadena de transporte de electrones
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
GST	Glutación s transferasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2
HIF-1α	Factor Inducible por Hipoxia
HOCl	Ácido hipocloroso
IκBs	Inhibidor de NF- κ B
IKKα	Cinasa inductora de NF- κ B alfa
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-6	Interleucina 6

INF-γ	Interferón gamma
JNK	Cinasas c-Jun N-terminal
KEAP1	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
MADH4/SMAD4	Miembro de la familia SMAD 4
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MDA	Malondialdehído
Mn-SOD	Manganeso superóxido dismutasa
NAC	N-acetil cisteína
NF-KB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Natural Killer
NLRP3	Dominio pirina 3 de la familia NLR
NO\cdot	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasas
NRF2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2
O$2^{\cdot-}$	Anión superóxido
O$21\Delta g$	Oxígeno singulete delta
O$21\Sigma g^+$	Oxígeno singulete sigma
O3	Ozono
OH\cdot	radical hidroxilo
ONOO$^-$	Anión peroxinitrito
TP53/p53	Proteína supresora de tumores 53
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS	Buffer de fosfatos
PD-1	Ligando 1 de muerte programada
PDGF	Proteína de muerte celular programada 1
PDH	Protil hidroxilasa
PI3K	Fosfoinosítido 3-cinasas
PR	Receptor de progesterona
PRX	Peroxiredoxina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RO\cdot	Radical alcoxilo
RO2^{\cdot}	Radical peroxilo
SDF-1	Factor 1 derivado de células estromales
SOD	Superóxido dismutasa
STAT1/3	Transductor de señal y activador de la transcripción 1/3
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TN	Triple negativo
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRX	Tiorredoxina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VHL	Proteína Von Hippel-Lindau
XO	Xantina oxidasa

RESUMEN: El cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres a nivel mundial, es una enfermedad compleja y de etiología multifactorial, lo cual dificulta su tratamiento. Esta enfermedad se clasifica mediante inmunohistoquímica en tres subtipos: el subtipo positivo a receptores hormonales (ER+), el cual responde a la terapia hormonal, el subtipo positivo al receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2+), que se trata con el anticuerpo monoclonal trastuzumab y el cáncer de mama triple negativo (TN) que carece de biomarcadores para su diagnóstico y para terapia dirigida. Existe una amplia información acerca de alteraciones presentes en las células cancerosas, por ejemplo, el incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO), que está asociado al daño al ADN, la inestabilidad genómica, la activación de distintas vías de señalización relacionadas con la supervivencia y la proliferación celular y al incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias, propiciando el origen y progresión del cáncer. En el presente trabajo, se determinaron los niveles y el origen de las ERO en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, lo que permitió establecer una correlación entre los niveles basales de ERO y el subtipo de cáncer de mama, siendo el TN el que presentaba mayores niveles de ERO, en comparación con el subtipo ER+ y el control no tumorigénico. Se demostró que las líneas celulares TN son más sensibles al tratamiento con el antioxidante general N-acetilcisteína, pero no responden de igual modo al antioxidante mitocondrial MitoTempo. Por otro lado, se estableció una correlación entre los niveles elevados de ERO y el incremento en la secreción de diferentes citocinas proinflamatorias, ya que las líneas TN, mostraron tasas elevadas de MIF, IL-6 e IL-8. De manera importante, la secreción de MIF se redujo al proporcionar un tratamiento antioxidante con N-acetilcisteína. Por todo lo anterior, se propone que las ERO podrían tener un alto potencial como biomarcadores de malignidad y como blanco de terapia en cáncer TN, que actualmente tiene el peor pronóstico y sigue siendo el único subtipo de cáncer de mama que carece de una terapia dirigida.

Palabras clave: ERO, interleucinas proinflamatorias, antioxidantes, MIF, NAC, MitoTEMPO.

ABSTRACT: Breast cancer is the leading cause of death from neoplasia in women worldwide, it is a complex disease with a multifactorial etiology, which makes its treatment difficult. Breast cancer is classified by immunohistochemistry into three subtypes: the hormone receptor positive (ER +) subtype, which responds to hormonal therapy; the epidermal growth receptor type 2 subtype positive (HER2 +), which is treated with the monoclonal antibody trastuzumab and triple negative breast cancer (TN), which lacks biomarkers for diagnosis and targeted therapy. There is extensive information about alterations present in cancer cells, as an example, an increase in reactive oxygen species (ROS), which has been associated with DNA damage, genomic instability, the activation of different signaling pathways related to survival and cell proliferation and increase in the secretion of proinflammatory cytokines, promoting the origin and progression of cancer. In the present work, ROS levels and potential sources were determined in different breast cancer cell lines, which allowed us to establish a correlation between basal levels of ROS and the breast cancer subtype, with TN showing the highest levels of ROS, compared to the ER+ subtype and the non-tumorigenic control. TN were also more responsive to treatment with the general antioxidant N-acetylcysteine, but not to the mitochondrial antioxidant MitoTempo. On the other hand, a correlation was established between elevated ROS levels and increased secretion of different proinflammatory cytokines, because the TN lines showed high rates of MIF, IL-6 and IL-8. Importantly, MIF secretion decreased when cells were treated with the antioxidant N-acetylcysteine. Therefore, it is proposed that ROS are potential biomarkers of malignancy and as a target for therapy in TN cancer, which currently has the worst prognosis and remains the only subtype of breast cancer that lacks a targeted therapy.

Key words: ROS, proinflammatory interleukins, antioxidants, MIF, NAC, MitoTEMPO.

CAPÍTULO I.
ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

1. Introducción

El cáncer de mama es considerado un grave problema de salud pública, debido a que es la neoplasia más común en mujeres, ya que representa alrededor del 25 % de todos los cánceres femeninos y se diagnostican anualmente 1.8 millones de casos nuevos al año en todo el mundo¹. En América Latina, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente con 199, 734 nuevos casos diagnosticados anualmente, en México se diagnostican 27, 000 casos nuevos cada año¹. Es una enfermedad altamente compleja, heterogénea y de etiología multifactorial², lo que a lo largo del tiempo ha dificultado su detección temprana y oportuna y de manera muy importante ha limitado su tratamiento, razón por la cual presenta una alta tasa de mortalidad³.

Actualmente, se conocen distintos aspectos biológicos, genéticos y moleculares de este tipo de cáncer, lo que hace posible clasificarlo en diferentes subtipos y a su vez permite conocer el pronóstico de la enfermedad, establecer un tratamiento dirigido o diseñar y desarrollar biomarcadores y terapias dirigidas para cada subtipo⁴. Ejemplo de ello, es la clasificación que se realiza mediante inmunohistoquímica, de la cual se conocen tres subtipos de cáncer de mama: aquellos que son positivos a receptores hormonales (PR+/ER+) y responden a la terapia endocrina; el subtipo de cáncer de mama enriquecido con el receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2+), que se trata con el anticuerpo monoclonal trastuzumab y el subtipo triple negativo (TN), el cual carece de terapia dirigida y cuya única opción de tratamiento es la quimioterapia^{4,5}.

Existe una amplia información acerca de las alteraciones presentes en las células cancerosas, por ejemplo, se han descrito cambios metabólicos, mutaciones, vías de señalización alteradas y en fechas recientes, se ha asociado el incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) con la carcinogénesis. Las ERO son subproductos del consumo de oxígeno y del metabolismo celular, se forman de la reducción parcial del oxígeno molecular y son moléculas de vida corta altamente inestables, entre las cuales podemos mencionar al anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH \cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁶. Estas especies se forman de manera natural en las células y tienen un papel fundamental en distintas vías de señalización. Sin embargo, el aumento intracelular de las mismas y la disminución de los sistemas antioxidantes, pueden ocasionar importantes daños estructurales en las células como daños al ADN, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, oxidación de los aminoácidos de las

proteínas, entre otros, lo que se conoce como estrés oxidante, el cual está asociado a diferentes enfermedades como el daño cardiovascular, el envejecimiento, la artritis reumatoide ⁷, enfermedades neurodegenerativas ⁸ y cáncer ^{6,9}.

Hoy en día, se sabe que diferentes tipos de células tumorales producen niveles elevados de ERO en comparación con sus células homólogas no tumorales, además de mostrar una mayor dependencia de sistemas antioxidantes¹⁰. Estas características pueden tener diversas funciones en las células cancerosas, por ejemplo, la activación de vías de señalización protumorigénicas, la activación de vías relacionadas con la proliferación y supervivencia celular, daños al ADN, inestabilidad genómica, inactivación de genes supresores de tumores y la resistencia al tratamiento^{9,11}. Algunos de los tipos de cáncer en los que se ha observado una elevación de las ERO son la leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, cáncer gástrico y cáncer de mama⁹. Contrariamente, también se sabe que las ERO pueden tener un papel antitumorigénico, ya que pueden desencadenar la muerte celular inducida por estrés oxidante.

De acuerdo con lo anterior, las células tumorales expresan niveles elevados de proteínas antioxidantes para desintoxicar los niveles elevados de ERO, de tal manera que son capaces de establecer un equilibrio redox, manteniendo la señalización protumorigénica y la resistencia a la apoptosis, razón por la cual, la manipulación de las ERO puede representar un blanco potencial para las terapias contra el cáncer⁹. Se han descrito diferentes vías en las cuales las ERO podrían estar implicadas en la oncogénesis mediando la proliferación y supervivencia celular; por ejemplo: la regulación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK), la del factor nuclear κ B (NF- κ B), la vía de fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K/AKT), la regulación del factor Inducible por Hipoxia-1 α (HIF-1 α) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)^{10,12-14}.

Por otro lado, se sabe que las ERO pueden activar complejos multiproteicos como el inflammasoma, el cual media la secreción de interleucinas proinflamatorias implicadas en la sobrevivencia de células cancerosas como la IL-1 β y la IL-18^{15,16}.

1.1 Antecedentes

El cáncer de mama se define como el crecimiento descontrolado de las células del epitelio de los conductos o lobulillos de las mamas con la capacidad de diseminarse ¹⁷. Los subtipos de cáncer de mama se identifican habitualmente mediante inmunohistoquímica, por la presencia de receptores como: el receptor de estrógeno (ER+), el receptor de progesterona (PR+) y el receptor HER2 y esto define el pronóstico de la paciente y su tratamiento ^{4, 5, 18}.

Otra clasificación del cáncer de mama, es la clasificación molecular que al igual que la clasificación por inmunohistoquímica permite predecir el grado de la enfermedad, la cual se muestra en la siguiente tabla:

Subtipo	Perfil Genético	Hallazgos moleculares	Fenotipo por inmunohistoquímica
Luminal A	Alta expresión de genes epiteliales luminales y genes relacionados con ER.	Mutaciones en PI3K, MAPKs y GATA3.	ER+, PR \geq 20%, HER2-, Ki67 bajo.
Luminal B	Menor expresión de genes epiteliales luminales y genes relacionados con ER. Mayor expresión de genes relacionados con la proliferación y HER2, que las luminal A.	Similar a la luminal A, pero con una mayor prevalencia de mutaciones en p53 y Rb. Así como mutaciones en Myc y FOXM1.	ER+, PR <20% HER2+ o Ki67 alto.
HER 2	Alta expresión de genes relacionados con HER2, baja expresión de genes relacionados con ER.	HER2 amplificado	ER-, PR-, HER2+
Basal	Alta expresión de genes de proliferación y de epitelio basal. Baja expresión de genes relacionados con HER2 y ER.	Mutaciones en p53, pérdida de la función de Rb y BRCA1. Amplificación de MYC y PI3K.	ER-, PR-, HER2

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama. Esta clasificación se basa en perfiles de expresión génica, aunque es muy útil por su valor predictivo en la enfermedad, no se usa comúnmente en la práctica clínica debido a la complejidad y costo de la técnica ¹⁹.

1.2 Factores de riesgo en cáncer de mama

Los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama son el inicio de la menstruación a edades tempranas, la nuliparidad, la historia familiar con antecedentes de cáncer de mama, mutaciones genéticas (BRCA1 y BRCA2), la obesidad, factores conductuales (por ejemplo el tabaquismo), entre otros ^{2, 20, 21}.

Factores reproductivos: Dentro de estos factores se incluyen la menstruación a edades tempranas, la nuliparidad o la edad tardía del primer embarazo y la menopausia tardía. La relación entre estos eventos y el desarrollo de cáncer mamario se debe a un mayor tiempo de exposición a estrógenos. De hecho, los factores reproductivos están fuertemente asociados con el desarrollo de cancer mamario ER+ ^{22 23}.

BRCA1 y BRCA2: Se trata de dos genes que se encuentran en el cromosoma 17q21 y 13q12, respectivamente. Ambos codifican proteínas supresoras de tumores, por lo cual se ha observado que la deficiencia o mutación de estos genes induce la aparición de cáncer. Por ejemplo, la deficiencia de BRCA1 conduce a la desregulación del ciclo celular y a la inestabilidad genómica. Por otro lado, el gen BRCA2 regula la reparación de roturas de doble cadena en el ADN, ya que interactúa con RAD51 y DMC1, por lo cual su deficiencia o una mala función están asociadas a la inestabilidad genómica. Con respecto al cáncer de mama, se sabe que las mutaciones en estos genes incrementan considerablemente el riesgo de desarrollar la enfermedad, de hecho alrededor de 5 al 10% de todos los cánceres de mama son causados por la aparición de estas mutaciones ²³.

Obesidad: Diversos estudios han demostrado que hay una asociación significativa entre la obesidad y el cáncer de mama, ya que se ha relacionado esta condición con el incremento de la producción de estrógenos, el aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias y el incremento del estrés oxidante ²⁴.

Tabaquismo: El consumo de tabaco está asociado principalmente a la incidencia en cáncer pulmonar. Así mismo, existe una correlación entre el tabaquismo y otros tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama²⁵. Es bien sabido, que el humo del tabaco contiene más de 60 carcinógenos conocidos, de esos 60 se ha documentado que al menos 20 sustancias químicas inducen tumores mamarios en modelos de roedores ²⁶, sin embargo y pese a estas evidencias, el

mecanismo por el cual el tabaquismo puede inducir cáncer mamario, no está perfectamente dilucidado.

1.3 Tratamiento en el cáncer de mama

El tratamiento en el cáncer de mama es multidisciplinario y puede incluir cirugía y radioterapia. El tratamiento sistémico incluye la quimioterapia, la terapia endocrina y en fechas recientes, la terapia dirigida a blancos moleculares y la inmunoterapia ²⁷.

Actualmente, la clasificación mediante inmunohistoquímica ha resultado ser de gran utilidad al momento de proporcionar un tratamiento dirigido. El subtipo de cáncer con receptores hormonales positivos (ER+/PR+) (70% de los casos) suele tratarse con terapia hormonal. En el caso del cáncer de mama positivo al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2+) (15-20% de los casos) se usan tratamientos dirigidos contra HER2, particularmente trastuzumab. Finalmente, el subtipo de cáncer triple negativo (TN) (15% de los casos) carece de un tratamiento dirigido y se trata mediante el uso de quimioterapia ^{4,27}. Según el estadio de la enfermedad al diagnóstico, en el cáncer de mama no metastásico los objetivos principales son: erradicar el tumor, los ganglios linfáticos regionales y evitar la metástasis. En el caso del cáncer de mama metastásico los objetivos terapéuticos se enfocan en prolongar la vida y en proporcionar terapia paliativa, ya que actualmente no hay una cura para estas pacientes ⁴. En la tabla 2 se describe con mayor detalle el tratamiento que se proporciona a las pacientes en función al subtipo de cáncer de mama.

	<i>ER+ / HER2-</i>	<i>HER 2+ / (ER+ o ER-)</i>	<i>Triple Negativo</i>
Definición histopatológica	Tumores que muestran una tinción positiva a receptores hormonales.	Tumores que presentan una tinción positiva a HER2(+) o una amplificación del gen.	Tumores que no presentan tinción positiva a receptores hormonales ni al receptor HER2.
Patogénesis molecular	El receptor de estrógeno que regula vías de crecimiento oncogénicas.	El receptor HER 2 se encuentra sobreexpresado.	Desconocida
Terapia sistémica	<i>Terapia endocrina (todas las pacientes):</i> Tamoxifeno, letrozol, anastrozol y exemestano. Vía oral por un periodo de 5 a 10 años. <i>Quimioterapia (algunas pacientes):</i> Adriamicina/ ciclofosfamida Adriamicina/ ciclofosfamida/paclitaxel Docetaxel/ciclofosfamida Vía intravenosa por 12 a 20 semanas.	<i>Quimioterapia y terapia dirigida contra HER2 (todas las pacientes):</i> Paclitaxel/trastuzumab Adriamicina/ ciclofosfamida/paclitaxel /trastuzumab. Docetaxel/carboplatino/ trastuzumab. Terapia intravenosa, por un periodo de 12 a 20 semanas. <i>Terapia endocrina y terapia dirigida contra HER2 (pacientes que son positivas a HER2 y receptores hormonales):</i> Tamoxifeno, letrozol, anastrozol y exemestano. Vía oral por un periodo de 5 a 10 años.	<i>Quimioterapia (todas las pacientes):</i> Adriamicina/ ciclofosfamida Adriamicina/ ciclofosfamida/paclitaxel Docetaxel/ciclofosfamida Vía intravenosa, por un periodo de 12 a 20 semanas. Sin terapia dirigida

Tabla 2. Alternativas terapéuticas para el cáncer de mama en función al subtipo molecular. La terapia en cáncer de mama consiste en terapia hormonal para las pacientes con presencia de receptores hormonales, para pacientes con el subtipo HER2+ la terapia consiste en el anticuerpo monoclonal trastuzumab, que está dirigido a este receptor y finalmente las pacientes TN que carecen de terapia dirigida ⁴.

1.3.1 Quimioterapia

Es un tratamiento contra el cáncer que utiliza medicamentos para detener el crecimiento de las células cancerosas, ya sea matando las células o deteniendo la división celular. Puede administrarse por vía oral o intravenosa para que los fármacos entren al torrente sanguíneo y puedan llegar a las células cancerosas en todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Por otro lado,

cuando la quimioterapia se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los fármacos afectan principalmente a las células cancerosas en esas áreas (quimioterapia regional). La forma en que se administra la quimioterapia depende del tipo y la etapa del cáncer que se esté tratando ²⁷.

Algunos fármacos quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de cáncer de mama incluyen:

Taxanos: Ejercen su acción al unirse a la β -tubulina, componentes de los microtúbulos que dan lugar a la formación de microtúbulos estables. Como se sabe los microtúbulos son importantes componentes del uso mitótico, por lo cual son esenciales para la división celular, básicamente los taxanos frenan la mitosis, lo que explica su acción antineoplásica. Ejemplos de estos venenos mitóticos son: paclitaxel y docetaxel ²⁸.

Antraciclinas: Este tipo de fármaco presenta acción citostática y citotóxica. Esto se debe a su capacidad para formar radicales libres e inducir peroxidación de lípidos y ocasionar daños a nivel de membrana celular. Sin embargo, su mecanismo mejor caracterizado es la unión al ADN ya sea intercalándose o formando uniones covalentes, lo que lleva a la modificación de bases, que a su vez son responsables en la replicación y transcripción del ADN, cuando estos dos procesos no ocurren adecuadamente se induce la reparación o la muerte celular ²⁹.

Compuestos platinados: inducen daño en el ADN, lo que da como resultado la activación de la tirosin cinasa c-ABL y la fosforilación de TAp73, formando homotetrámeros que se unen a sus genes diana como PUMA y NOXA, dando como resultado la apoptosis ³⁰.

1.3.2 Terapia endocrina

Consiste en eliminar o bloquear la acción de las hormonas con la finalidad de evitar que las células cancerosas crezcan y se diseminen, ya que está demostrado que algunas hormonas que produce el organismo provocan el crecimiento celular en algunos tipos de cáncer incluido el cáncer de seno. Como ejemplo tenemos al estradiol, producido por los ovarios. Para bloquear su efecto se emplea el tratamiento con tamoxifeno. También se puede usar la terapia hormonal con un agonista de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), se administra a algunas mujeres premenopáusicas que acaban de recibir un diagnóstico de cáncer de mama con

receptor hormonal positivo. Estos agonistas actúan disminuyendo el estrógeno y la progesterona del cuerpo. Así mismo puede proporcionarse la terapia hormonal con un inhibidor de la aromatasas que se administra en mujeres posmenopáusicas que tienen cáncer de mama positivo al receptor hormonal. Los inhibidores de la aromatasas disminuyen el estrógeno del cuerpo bloqueando la enzima aromatasas encargada de convertir los andrógenos en estrógenos ²⁷.

1.3.3 Terapia dirigida e inmunoterapia

La terapia dirigida es un tratamiento en el que se emplean fármacos dirigidos a eliminar las células cancerosas sin dañar las células sanas. La terapia hormonal, los anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores de cinasa dependientes de ciclina e inhibidores de PARP son tipos de terapias dirigidas con utilidad clínica en el tratamiento del cáncer de mama ²⁷.

En este tipo de terapia los anticuerpos se unen específicamente a los antígenos tumorales de las células cancerosas lo que conduce a la erradicación de las mismas (inmunoterapia específica) ³¹.

El tratamiento con anticuerpos es un tipo de inmunoterapia pasiva donde se emplean anticuerpos monoclonales que se unen a receptores o antígenos en la superficie de las células tumorales bloqueando las interacciones receptor-ligando y reclutando las células efectoras contra el tumor. El ejemplo de esta terapia es el uso del trastuzumab, un anticuerpo monoclonal que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), inhibiendo la señalización del receptor en células cancerosas que sobreexpresan este receptor ^{4, 32}.

En la inmunoterapia contra el cáncer se busca igualmente prevenir la carcinogénesis, la reincidencia del cáncer y las metástasis utilizando la respuesta inmune y crear un estado de vigilancia inmunológica que eliminará las células tumorales a medida que se presenten, ejemplo de ello son los linfocitos T citotóxicos (CTLs) que pueden buscar y destruir células metastásicas y las asesinas naturales (NK) que representan una respuesta de primera línea contra las células cancerígenas ³³.

1.3.4. Cirugía

La mayoría de las pacientes con cáncer de mama requiere cirugía para extirpar el tumor, en primera instancia puede recurrirse a la biopsia de ganglio centinela, el primer ganglio que recibe el drenaje linfático del tumor y es por lo tanto el primer sitio en donde se puede producir la propagación del cáncer. Posteriormente, se procede a eliminar el tumor mediante cirugía conservadora del seno o mastectomía radical. La primera consiste en extirpar el tumor y algún tejido normal alrededor de él, pero no el propio seno. Parte del revestimiento de la pared del pecho también se puede retirar si el cáncer está cerca de él. La mastectomía radical consiste en extirpar toda la mama que tiene cáncer, así como algunos ganglios linfáticos. Finalmente, la mastectomía radical modificada en la cual se extirpa toda la mama con cáncer, un porcentaje importante de los ganglios linfáticos, el revestimiento de los músculos del pecho y en algunos casos parte de los músculos de la pared torácica ²⁷.

1.3.5 Radioterapia

Consiste en un tratamiento contra el cáncer en el que se utilizan rayos X de alta energía y otros tipos de radiación para eliminar las células cancerosas y evitar que se propaguen. Puede ser tanto externa como interna. En la primera, se utiliza una máquina que envía radiación hacia el tumor de manera localizada. En la radioterapia interna se inyecta estroncio 89 (⁸⁹Sr) por vía intravenosa, el cual viaja a la superficie de los huesos en donde se libera la radiación, eliminando las células cancerosas que se han diseminado al sistema óseo ²⁷.

1.4 Biología redox

1.4.1 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas que se forman del metabolismo del oxígeno y sus productos de reacción con otras moléculas ^{34, 35}. Por otro lado, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son subclases de las ERO que contienen compuestos de nitrógeno y que se originan en la reacción de las mismas con el óxido nítrico (NO•) ³⁶. Ambas participan

en el desarrollo celular en procesos de proliferación, diferenciación, censado de oxígeno e inmunidad adaptativa, a través de su interacción con macromoléculas y modificaciones oxidativas reversibles ^{9, 37}. Las ERO se clasifican en 2 tipos: *radicales libres* y *no radicales libres* ^{34, 38} que resultan de la reducción parcial del oxígeno molecular (Tabla 3) ^{34, 35}.

Radicales	No radicales
Oxígeno singulete sigma ($O_2^1\Sigma g^+$)	Oxígeno singulete delta ($O_2^1\Delta g$)
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Ozono (O_3)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)
Alcoxilo (RO^{\cdot})	Ácido hipocloroso ($HOCl$)

Tabla 3. ERO de interés biológico. Las ERO se clasifican en especies radicales y no radicales, las primeras se caracterizan por su alta inestabilidad, ya que poseen uno o más electrones desapareados, característica que las hace altamente reactivas y les confiere la capacidad de generar más radicales, las segundas son moléculas más estables aunque si tienen poder oxidante, por lo tanto, tienen una menor reactividad y tienden a ser menos nocivas a corto plazo ³⁹.

1.4.2 Formación de ERO de interés biológico.

Oxígeno singulete: Las formas más reactivas del oxígeno son los dos estados singuletes: sigma ($O_2^1\Sigma g^+$) y delta ($O_2^1\Delta g$). El estado sigma es de tipo radical libre, porque tiene dos electrones no apareados, con el mismo número cuántico de spin o espines paralelos. El estado delta es del tipo no radical libre sin electrones no apareados, ya que sus electrones se ubican en un mismo orbital y son anti paralelos ³⁸. En los sistemas biológicos, la formación del oxígeno singulete es llevada a cabo por los fagocitos activados, los cuales están presentes cuando hay daño celular por un agente patógeno, lo que desencadena la liberación de proteasas y ERO para contrarrestar el daño ³⁹.

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$): La formación del radical o anión superóxido ocurre por la reducción univalente del oxígeno, es decir, si se le agrega un electrón al $O_2^1\Sigma g^+$ ³⁸. El anión superóxido tiene una función importante *in vivo*, ya que participa en la descarga respiratoria (aumento súbito de la producción) de las células fagocíticas activadas por contacto con partículas extrañas en los eventos inmunológicos ^{39, 40}.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): El peróxido de hidrógeno se forma gracias a la enzima superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$ formando esta ERO.

El H_2O_2 no es un radical libre, sin embargo, es una molécula con una alta lipofilia, lo que le permite atravesar con facilidad las membranas biológicas y reaccionar con el anión superóxido en presencia de metales de transición, lo que da pie a la formación del radical hidroxilo ³⁹. Así mismo, el H_2O_2 es una ERO de gran importancia biológica, debido a que tiene un papel importante en la activación e inactivación de vías de señalización relacionadas con distintas patologías como la neurodegeneración ⁴¹, el envejecimiento ⁴² y cáncer ⁹.

Radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$): El $\text{HO}\cdot$ se forma por la interacción entre el H_2O_2 y metales de transición reducidos como el cobre y el hierro ^{34,38}. Así mismo, la molécula de H_2O_2 acepta un electrón más que la divide a $\text{HO}\cdot$ y el anión hidroxilo (HO^-). Finalmente, el $\text{HO}\cdot$ acepta un electrón y un protón que resulta en la formación de una molécula de H_2O ⁴³. El $\text{HO}\cdot$ reacciona con cualquier componente molecular, además, los organismos vivos no tienen un mecanismo eliminador de esta especie de radical, por tanto, es altamente nociva ⁴⁴.

Anión peroxinitrito (ONOO^-): Si dos radicales libres reaccionan entre sí pueden compartir sus electrones no apareados formando un enlace covalente. Por lo tanto, el $\text{NO}\cdot$ y el O_2^- reaccionan rápidamente para formar el producto no radical peroxinitrito ONOO^- , el cual a pH fisiológico es protonado a ácido peroxinitroso ONOOH . Este agente de nitración puede dañar directamente proteínas, lípidos y ADN ⁴⁴. El ONOO^- es un potente oxidante que induce nitración de tirosina, lipoperoxidación y citotoxicidad y se han documentado niveles altos de esta ERO en diversas enfermedades ³⁹.

1.5 Fuentes de ERO

Las principales fuentes de ERO endógenas en células de mamíferos son: la cadena de transporte electrónico mitocondrial, las enzimas NADPH oxidasas (NOX), la xantina oxidasa y la NO sintasa no acoplada ^{45,46}.

1.5.1 Mitocondria

Las mitocondrias son uno de los mayores contribuyentes de ERO ⁹. Dentro de las principales funciones de las mitocondrias se encuentra la producción oxidativa de ATP, como parte del metabolismo energético ⁴⁷. Se ha estimado que del 90-95% del oxígeno molecular es

reducido en la mitocondria para la formación de H₂O por la citocromo C oxidasa ³⁸ y del 0.1-2% de ese oxígeno se convierte en O₂⁻ por su reducción prematura, durante la fuga de electrones en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones (CTE) ^{48,49}. La mayor parte del O₂⁻ que se produce en las mitocondrias, se dismuta a H₂O₂ por la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) en la matriz mitocondrial. Interesantemente, se ha documentado que las ERO generadas en el complejo I y III de la cadena de transporte de electrones, tienen un importante papel en la señalización celular, de modo tal que el O₂⁻ generado en los complejo I y III y el H₂O₂ presente en el espacio intermembranal y en la matriz mitocondrial, son necesarios para muchos procesos biológicos como diferenciación celular y la inmunidad adaptiva (Figura 1)⁹. Así mismo, se sabe que el incremento de ERO mitocondriales, está relacionada con múltiples enfermedades como la neurodegeneración ⁵⁰ y en algunos tipos de cáncer como leucemia linfocítica crónica ⁵¹, cáncer de próstata ⁵² y cáncer de mama ⁵³.

1.5.2 NADPH oxidasas (NOX)

Las NADPH oxidasas (NOX) son una familia de complejos proteicos de membrana hemoflavinas catalíticas ⁵⁴, ubicadas en mitocondria, retículo endoplásmico y membrana citoplasmáticas, cuya función principal es la de generar O₂⁻ mediante la transferencia de un electrón del NADPH al oxígeno molecular ^{55 56}. La familia NOX consta de 7 isoformas catalíticas: las NOX (1-5) y las oxidasas duales DUOX (1,2) que se clasifican dentro de esta familia de proteínas ya que poseen similitudes en términos de estructura y función enzimática. Las 7 isoformas son proteínas transmembrana con características bioquímicas, estructurales y de localización subcelular que las distingue ⁴⁵.

Las NOX transfieren electrones a través de las membranas biológicas para producir O₂⁻, lo siguiente es la dismutación del O₂⁻ a H₂O₂ a través de una superóxido dismutasa cobre/zinc (Cu, Zn SOD), el H₂O₂ que se genera puede difundirse a través de la membrana utilizando el canal de aquaporina, permitiendo que el H₂O₂ pueda afectar múltiples eventos de señalización celular (Figura 1.) ^{9,36,55}. Dada la capacidad de las ERO generadas por las NOX de actuar como segundos mensajeros, no es sorprendente que la desregulación de NOX esté implicada en un importante número de enfermedades que guardan cierta relación con el estrés oxidante, como el Alzheimer, Parkinson, enfermedades cardiacas y distintos tipos de cáncer.

En el contexto de cáncer, los niveles elevados de ERO generados por NOX tienen dos principales roles: la activación de vías de señalización que favorecen la supervivencia, la proliferación y la transformación celular; y por otro lado, la inestabilidad genómica, que favorece la aparición de mutaciones, dirigiendo de este modo la oncogénesis ^{57,58}. Algunos de los tipos de cáncer en los que se ha observado la desregulación a la alta de proteínas NOX y por ende un incremento de ERO y estrés oxidante, son el cáncer de vejiga, mama, colon y rectal, hígado, leucemia, pulmón, melanoma, esófago, ovario, pancreático, próstata, estómago y tiroides (Tabla 4) ⁹. Todo lo anterior, respalda el papel importante de las NOX en la tumorigénesis y en el mantenimiento de las distintas fases del desarrollo del cáncer ^{55,57,58}.

Tipo de cáncer	NADPH oxidasas
Mama	NOX1, NOX5
Vejiga	NOX1, NOX4
Colorrectal	NOX1, NOX4
Hígado	NOX1, NOX4
Leucemia	NOX2, NOX4, NOX5
Pulmón	NOX4, DUOX1,2
Melanoma	NOX2, NOX4, NOX5
Esófago	NOX5
Ovario	NOX1, NOX5
Páncreas	NOX4
Próstata	NOX1, NOX2, NOX4, NOX5, DUOX1,2
Estómago	NOX1
Tiroides	NOX4

Tabla 4. Isoformas de NOX sobre expresadas en los tipos de cáncer más comunes. Las NADPH oxidasas son proteínas de membrana cuya única función es la generación de ERO, se han encontrado sobre expresadas en un número importante de neoplasias, por lo cual podrían tener una importante función como blanco de terapia. Modificado de: Moloney y Cotter ⁹.

1.5.3 Fuentes adicionales de ERO

Además de la mitocondria y de las proteínas NOX, existen otras fuentes de ERO como las ciclooxigenasas, xantina oxidasas, óxido nítrico sintasas y citocromo p450⁵⁹, también se pueden producir en diferentes compartimentos celulares u orgánulos, como los peroxisomas y retículo endoplásmico^{9,37}.

Ciclooxigenasa (COX): Genera ERO estimulada por diferentes agentes como el TNF α , la interleucina 1, el lipopolisacárido bacteriano y el promotor tumoral 4-o-tetradecanoilforbol-

13-acetato (TPA) ³⁴. En relación al cáncer, se ha encontrado una asociación entre el incremento de la COX y diferentes neoplasias como el cáncer gástrico⁶⁰, colorectal⁶¹ y el cáncer de pulmón⁶².

Xantina oxidasa (XO): Es una metaloflavoproteína homodimérica que contiene molibdeno ($\text{Mo}^{6+} / \text{Mo}^{4+}$) como cofactor ⁵⁶. La vía de producción de ERO que involucra a la XO genera bajas concentraciones de O_2^- en condiciones normales. Esta enzima cataliza la oxidación de muchos substratos endógenos como las purinas y exógenos como el etanol, siendo su principal función a nivel fisiológico la oxidación de la hipoxantina y de la xantina a ácido úrico. La XO está implicada en el daño oxidante durante un proceso patológico denominado isquemia-reperusión³⁴.

Óxido nítrico sintasa (NOS): Es una enzima que cataliza la conversión de L- arginina a L-citrulina, produciendo óxido nítrico, el cual es un gas que modula varias funciones que incluyen la relajación del músculo liso, la neurotransmisión, la citotoxicidad celular inmune y las vías de nocicepción ⁶³.

Citocromo P450 (CYP): Es una superfamilia de proteínas tipo hemotiolato^{64, 65} que cataliza la oxidación de moléculas hidrofóbicas orgánicas, como lípidos, hormonas esteroideas y xenobióticos⁶⁵. La reacción más común de este tipo de enzimas es una reacción de monoxigenasa, en la cual la CYP une un O_2 para hidroxilar su sustrato⁶⁶. El O_2^- se produce porque una porción del oxígeno activado se libera de la enzima sin ninguna modificación del sustrato. El H_2O_2 se deriva de la fuga de electrones durante la protonación del peroxicitocromo p450, un intermediario de la reacción⁶⁴.

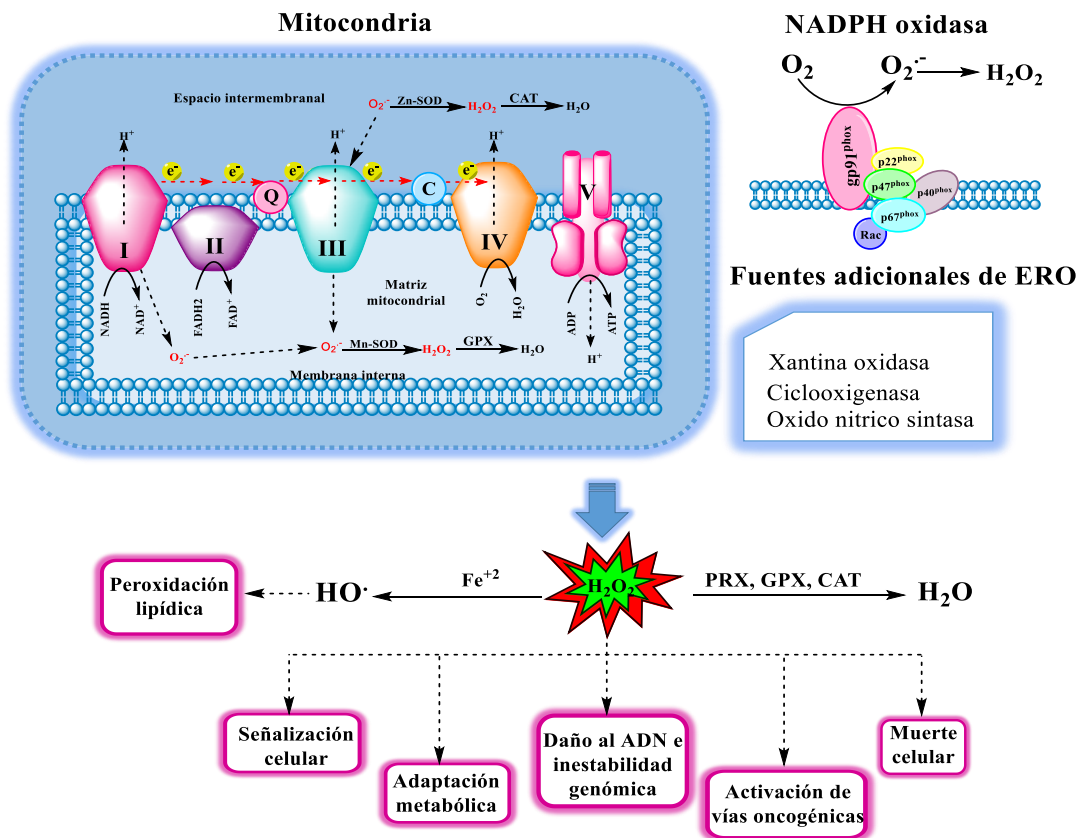


Figura 1. Fuentes de ERO y su papel a nivel celular. Las ERO pueden tener distintos orígenes en la célula, siendo la mitocondria la principal productora de ERO gracias a la fuga de electrones durante la fosforilación oxidativa. Otra fuente importante son las proteínas NADPH oxidasas cuya única función es la generación de ERO. También se conocen otras fuentes de ERO como las ciclooxygenasas, xantina oxidasas, óxido nítrico sintasas y citocromo P450, la cuales se han encontrado desreguladas en múltiples enfermedades incluido el cáncer. Por otra parte, así como la célula tiene sistemas que producen ERO, también cuenta con sistemas antioxidantes que le permiten amortiguar y defenderse de los potenciales daños a macromoléculas biológicas que las ERO pueden ocasionar, ejemplo de estos antioxidantes son: la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , la catalasa (CAT), la peroxiredoxina (PRX) y la glutatión peroxidasa (GPX), cuya función es convertir al H_2O_2 en H_2O . Finalmente, cabe destacar que algunas ERO, tienen un importante papel en la señalización celular, siendo el H_2O_2 la molécula con mayor capacidad señalizadora.

1.6 Antioxidantes

Un *antioxidante* es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otra molécula, generalmente sustratos biológicos como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, evitando de este modo la formación de radicales libres y en consecuencia previniendo el daño celular. El sistema antioxidante es altamente complejo ya que contrarresta eficientemente los niveles de ERO, por la acción de moléculas que pueden ser

exógenas o endógenas para proteger a la célula del daño de los altos niveles de radicales libres. Un cambio en el balance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes es denominado como *estrés oxidante*, que lleva a una alteración en la señalización redox y/o a daño molecular en proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, y puede llevar a la muerte celular ⁶⁷⁻⁶⁹. Por lo tanto, el equilibrio entre ERO y antioxidantes, es esencial para la supervivencia y la señalización celular normal ⁹.

La desintoxicación de ERO se logra mediante antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos, que participan en la recolección de ERO, principalmente eliminando al O_2^- y al H_2O_2 . En la Tabla. 5 se muestra una clasificación de este tipo de antioxidantes.

Enzimáticos	No enzimáticos
Superóxido dismutasa (SOD)	Glutación
Superóxido reductasa (SOR)	Flavonoides
Catalasa (CAT)	Vitamina A
Glutación peroxidasa (GPX)	Vitamina C
Glutación reductasa (GPR)	Vitamina E
Peroxirredoxina (PRX)	Ácido α -Lipoico
Tiorredoxina (TRX)	Carotenoides

Tabla 5. Clasificación de los principales antioxidantes. Las defensas antioxidantes consisten en prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otra molécula. Se han descrito un grupo de enzimas especializadas o antioxidantes enzimáticos, que son capaces de inactivar por diferentes mecanismos a las ERO. Los antioxidantes no enzimáticos, son moléculas que actúan como cofactores de enzimas antioxidantes o pueden oxidarse después del contacto con ERO ³⁹.

Las *superóxido dismutasas* (SOD) son metaloenzimas ubicadas en diferentes compartimentos de la célula, están incluidas la Cu, Zn-SOD citoplasmática, la Mn-SOD mitocondrial y la SOD extracelular. Éstas desempeñan un papel crucial en la eliminación del O_2^- , ya que catalizan la conversión O_2^- a O_2 y H_2O_2 , este último es removido posteriormente por la *catalasa* (CAT) o *glutación peroxidasa* (GPX) ⁷⁰. La CAT, que se localiza principalmente en el citosol y en los peroxisomas, cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 , como defensa del daño oxidante producido por el H_2O_2 ⁷¹. La GPX cataliza la reacción de oxidación de GSH a disulfuro de glutación (GSSG) utilizando para ello H_2O_2 ⁶⁷.

Por otro lado, la *peroxirredoxina* (PRX) y la *tiorredoxina* (TRX), facilitan la reducción de peroxinitritos e hidroperóxidos a H_2O , usando un sitio activo de cisteína, es decir permiten la oxidación de sus residuos de cisteína para neutralizar a las ERO como H_2O_2 . Las PRX son

abundantes en muchos compartimentos celulares como el citosol, el retículo endoplásmico, las mitocondrias y los peroxisomas ^{9, 72-74}.

Entre las principales moléculas antioxidantes no enzimáticas se encuentra el glutatión (GSH), un péptido que participa como sustrato en la actividad de enzimas antioxidantes como la *glutatión peroxidasa* (GPx), la *glutatión reductasa* (GR) y la *glutatión S transferasa* (GST). Su mecanismo de acción consiste en reducir enlaces disulfuro formados por oxidación de las proteínas citoplasmáticas a cisteína, ya que es un excelente donador de electrones. Protege del estrés oxidante, ya que actúa como cofactor de enzimas detoxificantes, elimina al radical hidroxilo y al oxígeno singulete directamente, y regenera las vitaminas C y E a su forma activa, ^{9, 75}.

Otros antioxidantes no enzimáticos son el ácido α -lipóico, el cual es activo tanto en lípidos como en fase acuosa. Los carotenoides son antioxidantes liposolubles, el más importante es el α -caroteno, que está presente en membranas y lipoproteínas, evitando la peroxidación lipídica. Los flavonoides que también inhiben la peroxidación lipídica y disminuyen la formación del radical hidroxilo por la reacción química de Fenton ⁷⁵. La vitamina E es liposoluble y reacciona más rápido que los ácidos grasos poliinsaturados con radicales peroxilo y por lo tanto rompen la reacción en cadena de la peroxidación lipídica ⁷⁶. El ácido ascórbico o vitamina C, es hidrosoluble y colabora con la vitamina E para regenerar el α -tocoferol de los radicales α -tocoferol en las membranas y lipoproteínas ⁷⁷.

1.7 Efecto de las ERO sobre las macromoléculas biológicas

Como se mencionó con anterioridad, el desbalance de ERO y antioxidantes, da origen al *estrés oxidante*, el cual produce daño a nivel celular, como consecuencia del daño a la estructura y función biológica de las macromoléculas biológicas más abundantes en la célula como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

1.7.1 Efecto sobre las proteínas

Uno de los efectos más críticos de las ERO es el daño que causa a las proteínas, debido a que puede causar la pérdida de la actividad catalítica de las enzimas, daño a la integridad de las proteínas estructurales o interrumpir la regulación de vías metabólicas. Se ha documentado que las ERO pueden oxidar residuos de aminoácidos como la cisteína, romper los enlaces peptídicos e inducir la agregación proteica. Todos los efectos negativos que pueden tener las ERO sobre las proteínas se han vinculado a múltiples enfermedades como el Alzheimer, la artritis reumatoide y el cáncer ^{9, 39, 59}

1.7.2 Efecto sobre los lípidos

El principal efecto de las ERO en los lípidos, es la peroxidación lipídica, que se produce cuando hay contacto de los lípidos de la membrana con un agente oxidante o con una ERO. Esta lipoperoxidación tiene como consecuencia alteraciones en la estructura de la membrana, afectando su integridad. La peroxidación lipídica genera especies como malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), que son moléculas citotóxicas porque pueden funcionar como agentes electrófilos capaces de interactuar con otros componentes celulares como proteínas y ácidos nucleicos. Algunas enfermedades con las que se ha relacionado la peroxidación lipídica son la neurodegeneración, el envejecimiento prematuro y enfermedades cardíacas ⁷⁸.

1.7.3 Efecto sobre los ácidos nucleicos

Las ERO pueden dañar al ADN ya que pueden reaccionar con las bases nitrogenadas, principalmente con la guanina y con la desoxirribosa. El daño producido al ADN es de suma importancia, ya que esto da origen a la inestabilidad genómica y a la aparición de mutaciones, que pueden resultar en la apoptosis, necrosis y en el origen de enfermedades como el cáncer ⁹.

1.8 Vías de señalización mediadas por ERO

La generación de ERO tiene un papel importante de manera natural, puesto que activan vías de señalización que controlan la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte celular programada ⁹. Sin embargo, el incremento de las ERO y en consecuencia del estrés oxidante, se ha asociado a múltiples enfermedades como la neurodegeneración ^{8, 80}, enfermedades crónicas inflamatorias como la artritis reumatoide ⁷ y el lupus eritematoso sistémico ⁸¹ y de manera más reciente con el cáncer. Se han descrito múltiples vías en las cuales las ERO tienen un papel señalizador, como segundos mensajeros, modificando, inactivando o activando proteínas que tienen un rol fundamental en distintas vías de señalización que están asociadas a la carcinogénesis, ejemplos de estas vías son NF-κB, MAPKs, HIF1α, PI3K y NRF2 ^{9, 11} que se resumen en la Figura 2.

1.8.1 Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB)

La familia de NF-κB está formada por las proteínas c-Rel, p65, RelB, p50 / p105 (NFκB1) y p52 / p100 (NF-κB2), que forman dímeros o heterodímeros que tras su activación modulan la transcripción de sus genes blanco. Estas proteínas están reguladas negativamente por las IκBs (inhibidores) que comprenden IκBα, IκBβ, IκBε, p100 y p105 y de manera positiva por las IKKs (activadores) conformada por IKKα, IKKβ e IKKγ ⁸²⁻⁸⁴. NF-κB es un factor de transcripción asociado a diferentes procesos celulares como la respuesta inflamatoria e inmune ^{82, 83}. Las proteínas de la familia de NF-κB son de gran interés en el campo de la medicina, ya que se han asociado al inicio y a la progresión del cáncer ⁸² y a la quimioresistencia. Lo anterior se debe a que su activación regula negativamente a Bcl-2 y Bcl-XL, modula la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular como la ciclina D1 y c-Myc, además de genes que participan en la metástasis como VEGF y también favorecen la transcripción y secreción de citocinas proinflamatorias relacionadas con la carcinogénesis como la IL-1β e IL-6 ^{85, 86}.

Se ha encontrado una relación entre la actividad constitutiva del factor NF-κB y algunos tipos de cáncer, como el cáncer cervicouterino ⁸⁷, el cáncer de mama ^{88, 89}, el cáncer colorrectal

⁹⁰ y la leucemia mieloide aguda ⁹¹.

La activación de NF- κ B también se ha asociado a múltiples factores como, estímulos inflamatorios, la radiación, infecciones virales o bacterianas y de manera importante al daño al DNA que está asociado al incremento de ERO. Se sabe que las ERO específicamente el H₂O₂ pueden activar a NF- κ B induciendo la fosforilación de las I κ Bs (inhibidores) lo que conduce a su degradación en el proteosoma ⁹², permitiendo de este modo a las proteínas dimerizadas de NF- κ B trasladarse al núcleo y activar la transcripción de sus genes diana que incluyen genes que tienen una relación directa con el origen, progresión y metástasis de distintos tipos de cáncer, así como con genes relacionados con la detoxificación y la resistencia a fármacos y con el estrés oxidante, como la CAT y la SOD ^{85, 86, 93}.

1.8.2 Proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs)

Las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia de serina / treonina cinasas que controlan diversas respuestas celulares, como la proliferación, migración, diferenciación y muerte celular. Esta familia incluye principalmente a las proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), c-Jun cinasas N-terminales (JNK) y p38. La vía de las MAPK se activa principalmente por factores de crecimiento (EGF y PDGF) y citocinas generalmente proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y se ha encontrado una asociación entre la activación de éstas proteínas y los niveles elevados de ERO ⁹⁴.

Se ha demostrado que las ERO tienen la capacidad de oxidar residuos de cisteína, ya que oxidan rápidamente los grupos tiol, formando puentes disulfuro, lo que induce modificaciones específicas que pueden activar o inactivar la función de éstas. En la vía de las MAPKs se ha descrito que las ERO pueden propiciar la fosforilación y activación directa de los receptores de EGF y PDGF y éstos a su vez estimular a RAS y posteriormente a ERK. Por otro lado, se ha descrito que algunas de las cinasas que conforman a esta familia de proteínas como ASK1 son sensibles a la oxidación por ERO, debido a que esta proteína se encuentra unida a la TRX, que al ser oxidada por una ERO como el H₂O₂, se disocia de ASK1 y por lo tanto, se activa e induce la fosforilación de un residuo de treonina dentro del dominio de ASK1 ⁹³. Dentro de los genes

diana que están regulados por las MAPKs y están asociados a la carcinogénesis podemos mencionar a STAT1/3, c-FOS, Myc, c-Jun.

1.8.3 Factor inducible por hipoxia (HIF-1 α)

El factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) es un factor de transcripción que ha sido ampliamente estudiado por su asociación con distintos tipos de cáncer, como el cáncer gástrico⁹⁵, pancreático⁹⁶ y de próstata⁹⁷, se sabe que regula genes relacionados con la angiogénesis como VEGF y PDGF, así como CXCR4 y SDF-1/CXCL12, genes relacionados con la migración celular.

Este factor de transcripción se activa principalmente en condiciones de hipoxia y por ERO mitocondriales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, los cuales oxidan e inactivan a la proil hidroxilasa PHD, que tiene como función promover la ubiquitinación y posterior degradación por el complejo VHL de HIF-1 α , permitiendo de este modo su activación y transcripción de los genes que regula.

1.8.4 Fosfoinosítido 3- cinasas (PI3K)

Las fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K) son una familia de enzimas lipídicas capaces de fosforilar el grupo 3'-OH de fosfatidilinositoles (PtdIns) en la membrana plasmática. Son proteínas de gran interés biológico, ya que su activación culmina en la modulación transcripcional de genes relacionados con el crecimiento, supervivencia y proliferación celular, por lo que están íntimamente relacionadas con la carcinogénesis^{98, 99}. La sobreexpresión y sobreactivación, principalmente de la PI3K tipo I, se ha reportado en distintos cánceres como el cáncer pancreático, pulmonar, ovárico y mamario^{100, 101}.

Esta vía de señalización está regulada negativamente por PTEN, una fosfatasa que desfosforila PI3K, inhibiendo su actividad de cinasa. PTEN es sensible a la oxidación por H₂O₂ debido a sus residuos de cisteína ricos en grupos tiol, lo que conduce a la inactivación de esta fosfatasa y en consecuencia a la desregulación de PI3K¹⁰²⁻¹⁰⁵

1.8.5 Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2 (NRF2)

Nrf2 es el maestro regulador de la respuesta antioxidante. Es un factor de transcripción que modula la expresión de proteínas antioxidantes como la CAT, la SOD y el GSH, es por esta razón que le confiere protección a las células contra agentes oxidantes y tiene también una función desintoxicante ¹⁰⁶. Por otro lado, se ha escrito que NRF2 puede modular la transcripción de interleucinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y la IL-11, que se han vinculado a distintas neoplasias ¹⁰⁷. NRF2 es una proteína que se activa por estímulos oxidantes, se encuentra regulada por las proteínas KEAP1, que al estar ensambladas con NRF2 lo vuelven sensible a la ubiquitinación y su posterior degradación en el proteosoma. Se sabe que las proteínas reguladoras de NRF2, son susceptibles a la oxidación por ERO como el H₂O₂, que tiene la capacidad de oxidar los residuos de cisteína del sitio activo de las proteínas KEAP1, de esta manera al estar oxidadas e inactivas, NRF2 es liberado y se trasloca al núcleo para activar la transcripción de sus genes blanco ^{108, 109}.

Por todo lo descrito anteriormente, NRF2 tiene un papel crucial en la carcinogénesis, así como en la progresión y resistencia a la quimioterapia y radioterapia, que son tratamientos que producen un incremento en ERO y que por ende estimularían la sobreexpresión de NRF2 ¹⁰⁹. Finalmente, es importante mencionar que NRF2 está asociado a un mal pronóstico en diversos tipos de cáncer, por ejemplo el cáncer de cabeza y cuello ¹¹⁰, pulmón ¹¹¹, ovario ¹¹² y de mama ¹¹³.

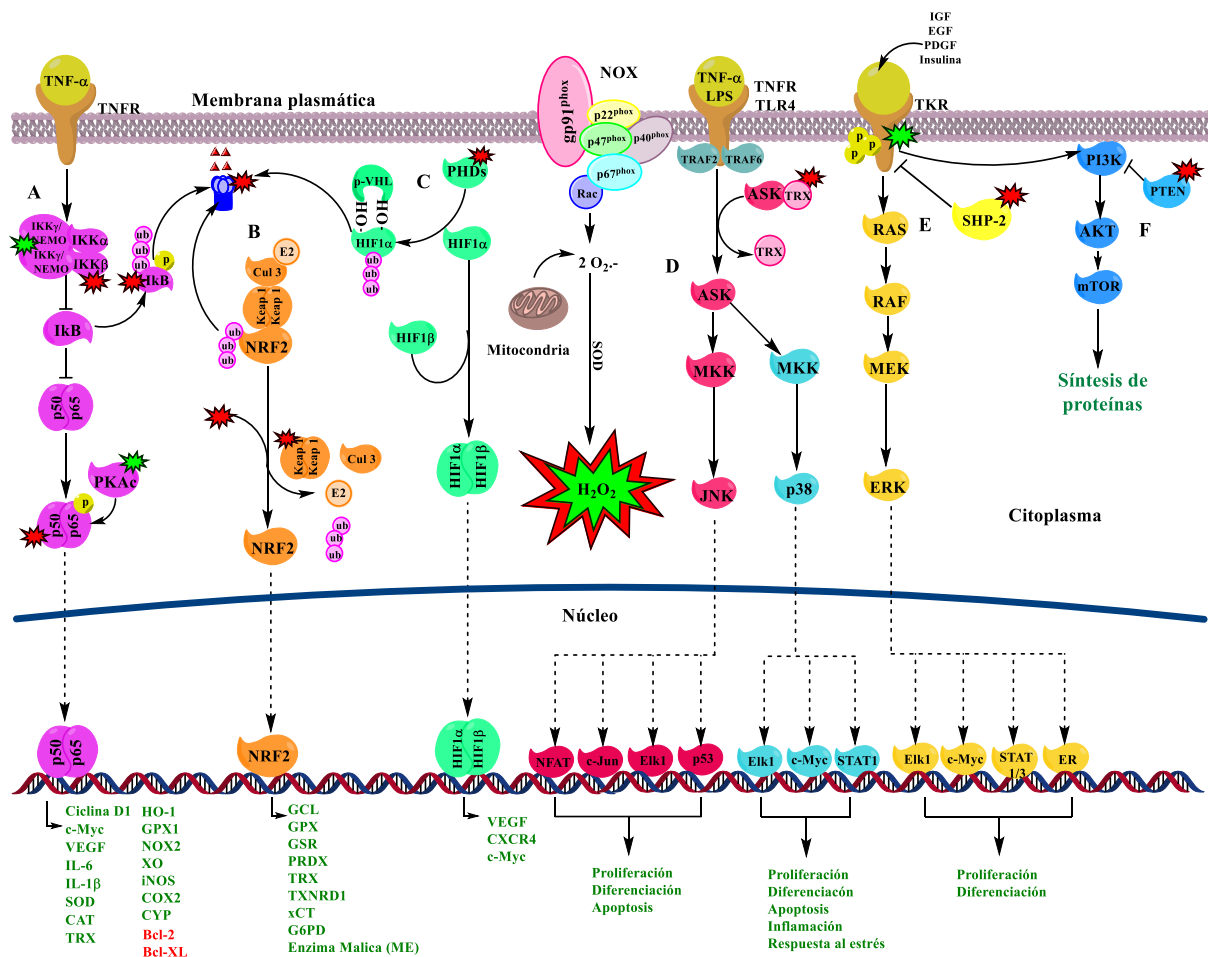


Figura 2. Vías de señalización mediadas por ERO. Las ERO tienen la capacidad de inactivar (estrella roja) o activar (estrella verde) proteínas que regulan vías de señalización involucradas en el inicio y progresión del cáncer. En A, se muestra la vía de NF-κB, que es activada por las ERO, favoreciendo la dimerización de (IKKγ/NEMO), induciendo la fosforilación de los inhibidores de NF-κB (IκBs), que posteriormente se degradan vía proteosoma, así mismo, induciendo la fosforilación de los dímeros p50/p65 mediante la activación de PKAc, con lo cual NF-κB se trasloca al núcleo e induce (verde) o inhibe (rojo) la transcripción de genes relacionados con la supervivencia, crecimiento y proliferación celular, además de genes relacionados con el estrés oxidante. En B, se muestra la vía NRF2, la cual se activa tras la oxidación de KEAP 1, lo que induce el desensamble de NRF2 y su posterior translocación al núcleo. En C, las ERO favorecen la oxidación de las prolilhidroxilasas (PHDs), que son clave para la unión de la proteína p-VHL con HIF-1α, para su posterior ubiquitinación y degradación en el proteosoma. En D, la TRX se oxida en presencia de H₂O₂ y se separa de ASK, induciendo la fosforilación de MKK, que a su vez fosforila a JNK o p38, facilitando la transcripción de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, la inflamación y la respuesta al estrés. En E, la fosfatasa SHP-2, se inhibe en presencia de H₂O₂, mientras que el receptor TRK permanece fosforilado, activándose las vías, como la de RAS-RAF-MEK-ERK, que inducen la transcripción de genes que modulan, la proliferación y diferenciación celular. Finalmente, en F, la fosfatasa PTEN se oxida e inactiva por ERO, activándose la vía PI3K/AKT/mTOR, relacionada con la biosíntesis de proteínas.

1.9 ERO y cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por tener un alto número de mutaciones y procesos biológicos alterados, lo cual le permite a este tipo de células sobrevivir, proliferar e incluso invadir otros sitios del organismo afectado. Dentro de las múltiples alteraciones que poseen las células cancerosas se encuentran niveles elevados de ERO, que pueden alterar distintos aspectos del funcionamiento celular, por ejemplo, pueden provocar daño al DNA, inestabilidad genómica, incremento en la tasa de mutaciones, inducción de la activación de vías protumorigénicas e inhibición de genes supresores de tumores ^{9, 114, 115}. Así mismo, se ha descrito en diferentes neoplasias con altos niveles de ERO, que estas células cancerosas son capaces de activar a niveles elevados sus sistemas antioxidantes como NRF2, para contrarrestar y sobrevivir a la alta tasa de estrés oxidante ^{111, 112}.

Es importante mencionar que los niveles de ERO en cada etapa del cáncer juegan un papel importante. En condiciones normales, las ERO pueden ser atenuadas gracias a las diferentes enzimas antioxidantes como la CAT y la SOD, de tal manera que la célula puede reparar el daño y sobrevivir adecuadamente (Figura 3A) ^{9, 114, 116}. Sin embargo, cuando los niveles de ERO superan al sistema antioxidante, la célula pierde su capacidad de reparación, se induce el daño al DNA, lo que lleva a la inestabilidad genómica y a la aparición de mutaciones relacionadas con la carcinogénesis y por ende a la formación de células precancerosas (Figura 3B) ^{9, 114, 116}. Por otra parte, cuando el tumor ya está establecido, los altos niveles de ERO contribuyen al mantenimiento de vías de señalización protumorigénicas, que incluyen rutas relacionadas con la muerte y proliferación celular, la angiogénesis, la invasión y metástasis y con la sobre activación de sistemas antioxidantes y desintoxicantes. Esto último permite a la célula cancerosa tolerar los altos niveles de ERO y evadir la muerte celular (Figura 3C) ^{9, 114, 116}. Sin embargo, el incremento exacerbado de ERO y la ineficacia de los sistemas antioxidantes, pueden conducir al arresto celular, senescencia y apoptosis, (Figura 3D), por lo que evidentemente las ERO tienen un papel dual en el cáncer ^{9, 114}.

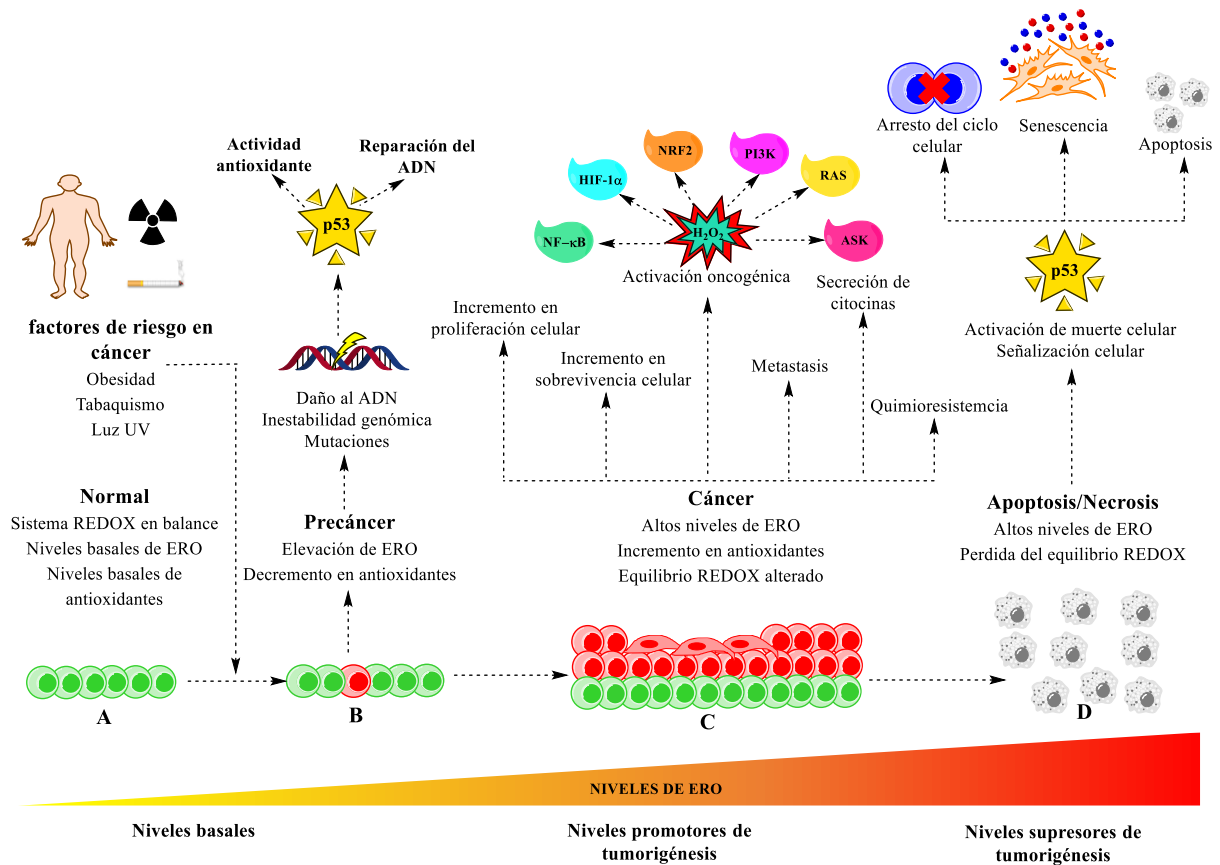


Figura 3. Las ERO juegan un papel fundamental en el cáncer. En condiciones basales, el sistema redox se encuentra en perfecto balance, sin embargo, algunos estímulos relacionados con la carcinogénesis como la obesidad, el tabaquismo y la exposición a la radiación, pueden inducir elevación de ERO y un desbalance de los sistemas antioxidantes, lo que favorece el daño al DNA, inestabilidad genómica y la aparición de mutaciones, que usualmente están presentes en lesiones precancerosas. Por otro lado, existe evidencia de que genes como p53, pueden activarse ante estos estímulos, induciendo la reparación del DNA y la actividad antioxidante. En contraste, cuando estos mecanismos de reparación son insuficientes, los niveles de ERO y antioxidantes se elevan, dando origen a un nuevo y alterado equilibrio redox, lo cual favorece la activación de las vías oncogénicas, que propician el incremento en la proliferación y sobrevivencia celular, la metástasis, la secreción de citocinas y la resistencia a fármacos. Finalmente, el incremento excesivo de ERO, induce la pérdida del equilibrio redox, lo que promueve la apoptosis y necrosis, gracias a la activación de p53, que induce vías de muerte, arresto del ciclo celular y senescencia^{9, 114, 116}.

1.9.1 Papel promotor de las ERO en la tumorigénesis

Existe una gran cantidad de información que establece una relación entre la acumulación excesiva de ERO y el cáncer, ya que se sabe que una característica importante de las células cancerosas es su alto nivel de ERO y su alta dependencia a sus sistemas antioxidantes. Las ERO generadas por las distintas fuentes en la célula o por agentes exógenos o ambientales, tienen un poderoso impacto sobre las características asociadas a la tumorigénesis y a la malignidad del cáncer. Los altos niveles de ERO están vinculados con la inestabilidad genómica, la activación de vías protumorigénicas como NF- κ B, MAPKs, HIF-1 α y PI3K ^{9, 11}, así como a la secreción de interleucinas proinflamatorias como IL-6, IL-18, IL-1 β e IL-11 ^{107, 117}. Estos eventos están directamente relacionados con el inicio y desarrollo del cáncer, ya que son vías que modulan la proliferación celular, regulan negativamente la apoptosis, propician el ambiente inflamatorio y median los procesos de invasión y metástasis ⁹.

Paralelamente, las células neoplásicas tienen una elevada actividad antioxidante, lo que les permite equilibrar los altos niveles de estrés oxidante, les confiere resistencia a quimioterapéuticos basados en el incremento de ERO y en algunos casos en particular, les permite activar mecanismos de detoxificación de fármacos ^{106, 118}. Un ejemplo de este tipo de mecanismos, es la vía NRF2 que es considerado el regulador antioxidante. NRF2 se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de cáncer ^{110, 111} y concretamente se han encontrado niveles superiores de esta proteína en las células iniciadoras de tumor, las cuales son altamente resistentes a la terapia antineoplásica y son las responsables de la recaída ¹¹⁹. Son múltiples neoplasias en las que se ha descrito una actividad protumorigénica del incremento de ERO y sus sistemas antioxidantes, entre las cuales podemos destacar a la leucemia mieloide aguda, el cáncer gástrico y el cáncer de mama. Las características asociadas al cáncer que se ven beneficiadas por el incremento de ERO se muestran en la Tabla 6.

1.9.2 Papel supresor de las ERO en la tumorigénesis

La inducción de un incremento en ERO intracelulares también puede ser empleado en la terapia contra el cáncer. De hecho, algunas de las terapias antineoplásicas pueden incrementar las ERO a niveles tóxicos ¹²⁰ o inhibir la defensa antioxidante, de tal manera que la célula es incapaz de resolver el estrés oxidante, activando de este modo diferentes vías de muerte celular inducidas por ERO, senescencia y apoptosis ^{121, 122}. Ejemplo de éstas terapias son los compuestos platinados, como el cisplatino ¹²³ y la terapia con antraciclinas como la doxorubicina ¹²⁴.

Un claro ejemplo de la activación de vías proapoptóticas mediadas por el incremento de estrés oxidante, es la activación de p53, lo que conduce al arresto del ciclo celular en la fase G2/M y promueve la senescencia ¹²⁵. También se ha observado que altos niveles de estrés oxidante promueven la activación de las proteínas BH3, que favorecen la liberación del citocromo c al citoplasma, induciendo muerte celular ¹²⁶. También, el incremento en ERO favorece la interacción de TNF- α con los receptores de muerte, lo que en consecuencia culmina en la activación de caspasas y muerte celular ⁹.

La inhibición de los sistemas antioxidantes también ha resultado ser un atractivo blanco de terapia. Por ejemplo, se ha observado que en líneas celulares de cáncer de mama el uso de inhibidores de la biosíntesis del glutatión, disminuye la población de células iniciadoras de tumor y las vuelve más susceptibles a la terapia oxidante ¹¹⁹.

Finalmente, es importante mencionar que el uso de antioxidantes ha mostrado resultados contradictorios en la terapia contra el cáncer. Diferentes autores han reportado efectos negativos ya que disminuyen la actividad de los agentes citotóxicos y favorecen el escape a mecanismos de muerte celular mediada por altos niveles de ERO. En contraste, se ha documentado que el uso de antioxidantes naturales y sintéticos como la N-acetilcisteína favorecen al tratamiento de algunas neoplasias, ya que éstos pueden disminuir la actividad de las vías de señalización protumorigénicas, lo que se traduce en un incremento de muerte celular, una menor proliferación y en la disminución de la secreción de citocinas proinflamatorias ¹²⁷.

Papel promotor de ERO en la carcinogénesis	Característica relacionada con el cáncer	Papel supresor de ERO en la carcinogénesis
<p>El uso de N-acetil cisteína en un estudio clínico produjo una disminución de marcadores de proliferación en células del tumor en pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos ¹²⁷</p> <p>Los niveles basales de ERO favorecen la malignidad en el cáncer de mama triple negativo ¹²⁸</p>	<p><i>Inicio y progresión del cáncer</i></p>	<p>Un mimético de las proteínas BH3 sensibilizó a células leucémicas incrementando ERO ¹²⁹</p> <p>En tratamiento con N-acetilcisteína o vitamina E incrementaron la progresión tumoral y disminuyeron la sobrevivencia en un modelo murino de cáncer de pulmón de manera dependiente de p53 ¹³⁰</p>
<p>El incremento en ERO, induce la activación de HIF-1a, lo cual indujo la pérdida de e-cadherina, facilitando la migración de las células MDA-MB468 de cáncer de mama triple negativo ¹³¹.</p>	<p><i>Migración, invasión y metástasis</i></p>	<p>El antioxidante N-acetilcisteína, favorece la metástasis en un modelo murino de melanoma maligno ¹³²</p>
<p>Las ERO producidas por la oxidasa dual 2 (DUOX2), favorecen la transición epitelio mesenquimal en un modelo de cáncer de colon, resistente al tratamiento 5 fluorouracilo, proceso que se revierte al proporcionar un tratamiento con NAC ¹³³.</p>	<p><i>Quimioresistencia y detoxificación de fármacos</i></p>	<p>La inhibición de NRF2 y del glutation, incrementan la sensibilidad al tratamiento citotóxico en cáncer de vejiga ¹²¹</p> <p>El uso de una molécula pequeña APR-246 (PRIMA-1Met) inhibió la capacidad antioxidante e indujo la activación de p53 mutante, promoviendo la muerte de células tumorales ¹²².</p>
<p>El DNA mitocondrial oxidado activa el inflammasoma y la posterior secreción de interleucinas inflamatorias ¹¹⁷</p> <p>El incremento en ERO inducido por agentes citotóxicos, activa el inflammasoma, con ello la secreción de IL-1β que media la quimiorresistencia ¹³⁴</p>	<p><i>Secreción de citocinas</i></p>	

Tabla 6. Papel promotor y supresor de las ERO en la carcinogénesis. Se han descrito diferentes roles de las ERO en la carcinogénesis, mientras en algunos tipos de cáncer las ERO son importantes para la activación oncogénica, en otros se muestra que la inhibición de éstas con tratamientos antioxidantes resulta perjudicial.

1.10 Papel de las ERO en la secreción de citocinas

Las ERO están implicadas en diferentes vías de señalización relacionadas a la inflamación, por lo cual, se ha propuesto una correlación entre los niveles intracelulares de éstas y la secreción de distintas citocinas, implicadas en diversas enfermedades como el cáncer ¹³⁵. Se sabe que el incremento en ERO puede inducir la secreción de citocinas principalmente proinflamatorias, por diferentes vías. Por ejemplo, las ERO mitocondriales inducen la activación del inflammasoma, específicamente la proteína NLRP3, la cual recluta a la proteína ASC y pro-caspasa 1, favoreciendo la activación de la caspasa 1 que posteriormente favorece la maduración de la Pro-IL-1 β a IL-1 β para que finalmente puedan secretarse ^{117, 136}. De igual manera, existe información en la cual se demuestra que las ERO inducen la activación de la vía de señalización de NF- κ B ¹³⁷, que es un factor de transcripción que regula la expresión de diferentes citocinas incluidas las IL-8 e IL-6, que están implicadas en diversas neoplasias, incluido el cáncer de mama.

El cáncer es una enfermedad compleja que involucra varios factores para su origen y progresión. De los diversos factores que participan en la carcinogénesis, se sabe que las citocinas desempeñan un papel importante como mediadores de funciones que son vitales en los procesos neoplásicos. Para comprender el papel que juegan las citocinas en el cáncer, es necesario analizar la respuesta inmune ante las neoplasias. En una respuesta inmune normal, los antígenos son capturados por las células dendríticas, que posteriormente maduran y pueden presentar el péptido antigénico a las células T en los ganglios linfáticos, generando células T efectoras que migran a la zona de infección, inflamación o lesión. Esto es de suma importancia debido a que los linfocitos T producen diferentes citocinas como el IFN- γ y otros factores como el GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), los cuales son fundamentales para la maduración de las células dendríticas y la activación de macrófagos. Posteriormente, las células dendríticas y los macrófagos activados liberan citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12 o TNF- α que favorecen la respuesta de las células Asesinas Naturales (NK) y de las células T. Las células T CD4 + y CD8 +, junto con las células NK, pueden recibir señales de supervivencia y estimulación de IL-2, dando lugar a actividades efectoras completas, y producir IFN- γ adicional. Así mismo la regulación de la respuesta inmune normal implica citoquinas como IL-10 y TGF-

β para limitar la actividad de las células T y macrófagos y así reducir la inflamación, generar la terminación de la respuesta inmune y la protección del huésped de los daños mediados por el sistema inmunológico. Los tumores básicamente secuestran el mecanismo de inmunosupresión para evadir la respuesta inmune contra el cáncer, por lo cual, el estudio del papel que juegan las citocinas es fundamental. De igual manera, se sabe que una de las maneras en las que el cáncer puede evadir el sistema inmune es por la poca inmunogenicidad de las células tumorales. Es decir, las células cancerosas pueden expresar antígenos, sin embargo suelen pasar desapercibidos por el sistema inmune ³³ ya que pierden la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad ¹³⁸ o inducen la expresión de proteínas de escape inmunológico como PD-L1 ¹³⁹. Actualmente, se han desarrollado terapias enfocadas a incrementar la respuesta inmune contra el cáncer, como es el caso de los anticuerpos monoclonales contra CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) y PD-1 (proteína de muerte celular programada 1), que se emplean para tratar el melanoma maligno metastásico y otros tipos de cáncer, demostrando su actividad contra éstas neoplasias, favoreciendo la activación de linfocitos T y aumentando su capacidad de destruir células cancerosas ¹⁴⁰.

En cáncer de mama se ha descrito el papel protumorigénico para diversas citocinas, principalmente proinflamatorias (Figura 4), tal como es el de la IL-6, ya que es una de las principales citocinas en el microambiente tumoral, que favorece la tumorigénesis regulando distintas vías de señalización relacionadas con la apoptosis, la supervivencia, la proliferación, la angiogénesis, la invasividad y metástasis ¹⁴¹. Se sabe que la IL-6 se encuentra elevada en cáncer de mama triple negativo y no así en los otros subtipos ^{142, 143}; los niveles elevados de esta citocina se han asociado a un mal pronóstico y una menor tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de mama ¹⁴⁴. La desregulación de IL-6, se ha asociado con la activación de diferentes vías de señalización, destacando las vías de JAK/STAT, MAPKs, PI3K y NF- κ B que son vías que al sobreactivarse, favorecen la tumorigénesis ¹⁴⁴. Además, se ha observado que al inhibir la secreción de la misma o a su receptor, se produce una notable reducción en la proliferación, la migración, la angiogénesis y la metástasis, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* ¹⁴⁵. También se ha descrito que las células TN requieren de la señalización autocrina simultánea de IL-6 e IL-8 debido a que su coexpresión es necesaria para el crecimiento de tumores de xenoinjerto ¹⁴⁶ y que su inhibición ya sea por métodos farmacológicos o genéticos reduce la supervivencia

celular, la formación de colonias *in vitro*, así como el crecimiento de tumores xenoinjertados en modelos *in vivo* ¹⁴⁷.

Con respecto a la IL-8, existe evidencia de que se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer, como el de endometrio, vejiga y colon. También, se ha establecido que los niveles séricos de IL-8 pueden ser útiles como biomarcador en etapas tempranas y para monitorear la progresión del cáncer de colon y melanoma. En cáncer de mama, la sobreexpresión de IL-8 está asociada a una mayor invasividad y angiogénesis ¹⁴⁸, en específico en cáncer de mama triple negativo se ha encontrado una elevada expresión de esta citocina y se correlaciona con un mal pronóstico, ya que favorece la proliferación, la supervivencia y la migración de células neoplásicas. Cabe destacar que la secreción constante de la IL-8 está regulada por la vía de señalización de NF- κ B, misma que se encuentra expresada constitutivamente en líneas celulares y tumores del subtipo TN ^{149, 150}. El mecanismo por el cual, la IL-8 favorece la carcinogénesis, responde a la activación de sus receptores CXCR1 y CXCR2, posteriormente favorecen la activación de vías de señalización relacionadas con la tumorigénesis como la vía de PI3K, MAPKs y STAT3 ¹⁵¹.

Otra interleucina de interés es la IL-1 β , que al igual que otras interleucinas proinflamatorias es considerada de mal pronóstico cuando se detecta en suero de pacientes con cáncer de mama, próstata y colon ¹⁵². Su alta tasa de secreción se ha asociado a un incremento en la metástasis tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*; se ha demostrado en un modelo murino de cáncer mamario, que al inhibir su receptor IL-1R de manera farmacológica con el antagonista anakinra, se reduce notablemente la metástasis ósea ^{15, 152}. Así mismo, se han encontrado niveles elevados de otras citocinas como la IL-18 en tumores de cáncer de mama triple negativo, condición que se relaciona con formas inmaduras de las células NK y favorece una mejor expresión de la proteína PD-1, que es una proteína utilizada como mecanismo de escape inmunológico por las células neoplásicas ¹⁵³.

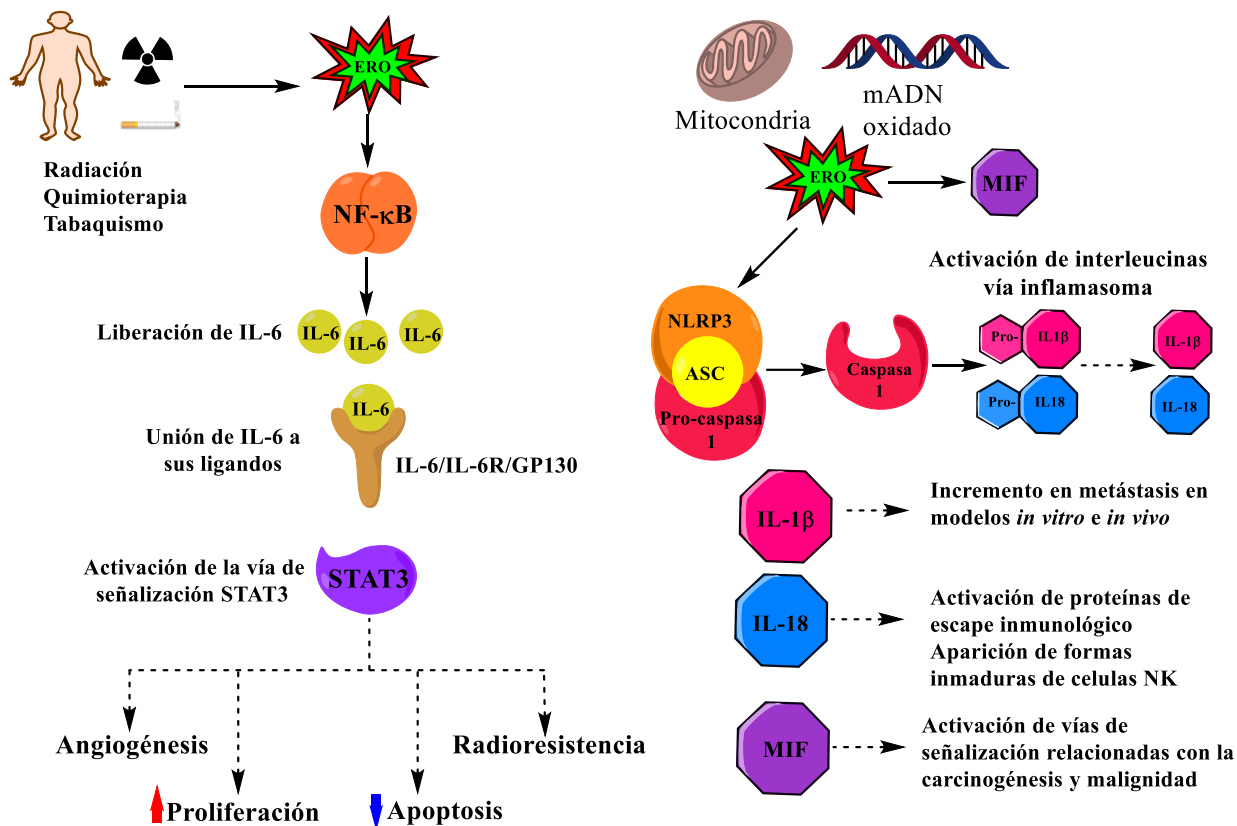


Figura 4. Las ERO inducen la secreción de citocinas por diferentes mecanismos. Las ERO producidas por el tratamiento, factores externos como la radiación o por factores como la obesidad pueden inducir la secreción de citocinas mediada por la activación de rutas como la de NF-κB que conlleva a la secreción de interleucinas como la IL-6, que está implicada en la carcinogénesis, ya que al unirse a su receptor (IL-6R o GP130) puede inducir la activación de la vía de señalización STAT3, que promueve la angiogénesis, la proliferación, la disminución de la apoptosis y la radioresistencia. Por otra parte, se ha documentado que el incremento en ERO mitocondriales, induce la secreción de MIF, así como la activación del inflammasoma mediada por ERO mitocondriales o por el ADNmt oxidado, induciendo la maduración de citocinas proinflamatorias como la IL-1β y la IL-18.

Del mismo modo, una citocina que en fechas recientes ha tomado un gran interés en la biología del cáncer, es el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), se trata de una citocina proinflamatoria, pleiotrópica y que se ha detectado en niveles elevados en diferentes enfermedades autoinmunes¹⁵⁴ y neoplasias incluido el cáncer de mama^{155, 156}. Para ejercer sus funciones, MIF puede actuar de manera autocrina y paracrina, uniéndose a cuatro receptores CD74, CXCR2, CXCR4 y CRCR7¹⁵⁷. Por ejemplo, la unión de MIF a su receptor CD74, en presencia del complejo CD44 y la tirosina cinasa Scr, conduce a la fosforilación de ERK 1/2¹⁵⁸ y a la activación de la vía PI3K/AKT¹⁵⁹. Entre sus múltiples funciones, esta citocina se

encuentra relacionada con la activación de otras vías de señalización como las MAPKs, PI3K, NF- κ B, HIF-1 α y la inactivación de la vía de p53¹⁶⁰, todas relacionadas, con la patogénesis del cáncer, de igual manera se le asocia un papel importante en la producción de interleucinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y INF- γ ¹⁶¹. Por lo tanto, MIF es una citocina que contribuye a través de varios mecanismos a la proliferación y supervivencia de células cancerosas además de tener un papel importante en la angiogénesis y la metástasis en diferentes tipos de cáncer¹⁶⁰.

Por todo lo anterior, es necesario destacar que las citocinas son capaces de promover la proliferación celular, ya que muchas de ellas controlan las principales vías de señalización relacionadas con la carcinogénesis alterando y acelerando la división celular, promoviendo la invasión y la adhesión de éstas células¹⁶². Por lo tanto, teniendo como antecedente el hecho de que las ERO modulan o tienen un papel importante en la secreción de citocinas proinflamatorias, la manipulación de las mismas con el uso de distintos antioxidantes podría ofrecer una alternativa en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

2. Antecedentes directos

2.1 El estado funcional de las mitocondrias, muestra una relación con los subtipos de cáncer de mama.

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo, en los cuales se hizo un análisis de agrupación jerárquica basado en la expresión de genes relacionados con las mitocondrias en muestras de tumores de bases de datos de TCGA (The Cancer Genome Atlas), mostró dos grupos principales. El grupo I se enriqueció con muestras luminales, mientras en el grupo II se observaron dos subgrupos heterogéneos; en el primer subgrupo del grupo, dos se observó enriquecimiento de muestras de tipo basal, junto con muestras positivas a HER2 y algunas muestras de tipo luminal. El otro subgrupo del grupo II, mostró un pequeño agrupamiento de muestras basales, otro de muestras HER2 y luminales B y un grupo grande de muestras luminales A y B. Cabe destacar que los tumores luminales del grupo II, mostraron una mayor similitud con tumores basales y enriquecidos con los tumores HER2, que aquellas muestras luminales del grupo I, evidenciando potenciales diferencias en la biología y función mitocondrial del subtipo luminal (Figura 5A).

Así mismo, el análisis de componentes principales de genes relacionados con la mitocondria evidenció aún más las diferencias mitocondriales en los subtipos de cáncer de mama (Figura 5 B), en donde se observó de lado izquierdo un grupo de los tumores luminales A y B, seguido de un grupo intermedio con muestras luminales B y enriquecidas en HER2 y finalmente un grupo a la derecha bien definido, que estaba enriquecido en muestras basales y algunas muestras HER2 ¹²⁸. Por lo tanto, el análisis de componentes de genes relacionados con la mitocondria, evidencia que las muestras se agruparon por el subtipo celular y por la malignidad del tumor, ya que los tumores luminales A se agruparon del lado izquierdo y los tumores basales, que presentan una mayor malignidad se agruparon hacia el lado derecho. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren importantes diferencias en la función mitocondrial entre tumores de diferentes subtipos de cáncer de mama ¹²⁸.

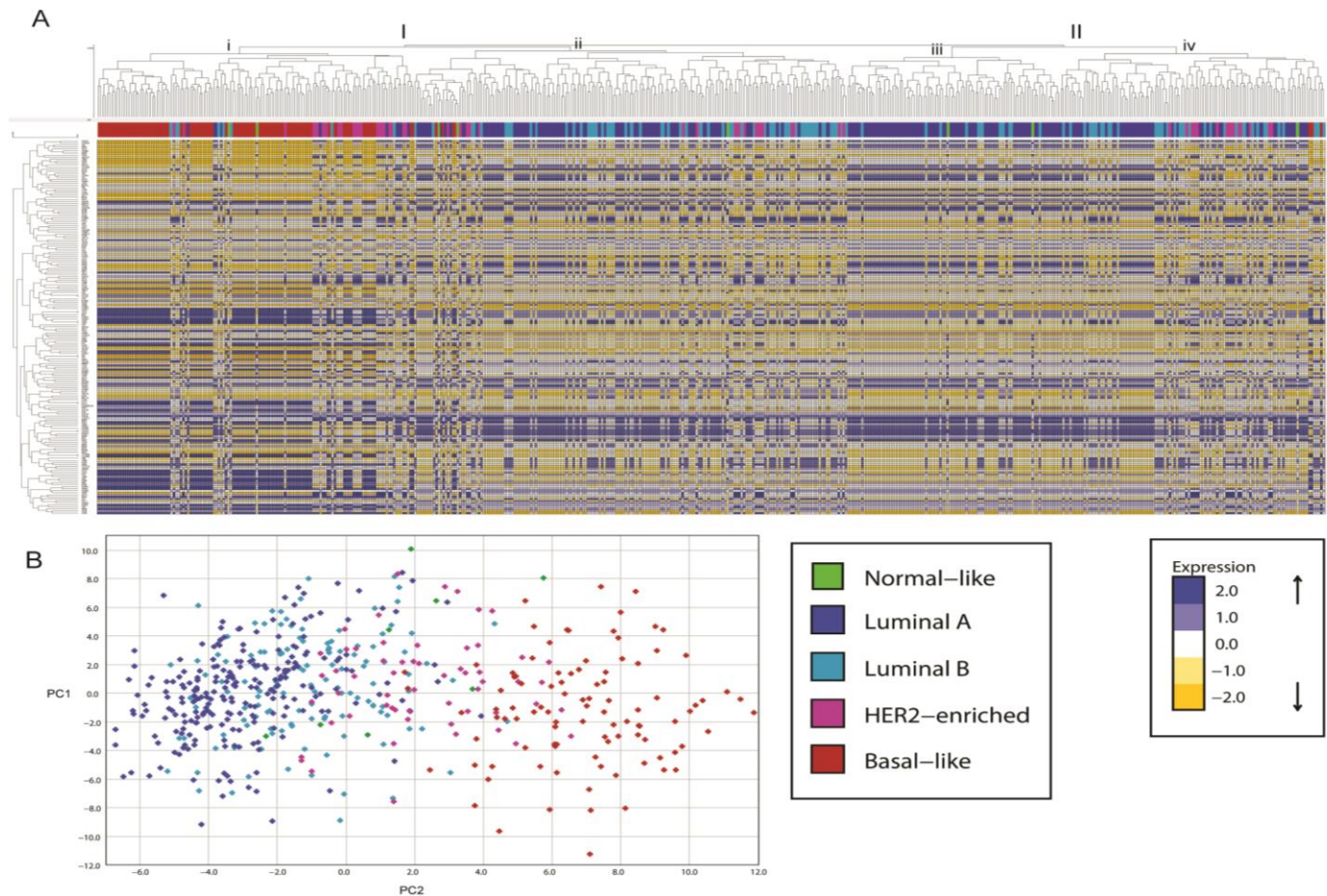


Figura 5. Una firma génica relacionada con las mitocondrias reveló que existen diferencias importantes en la biología mitocondrial de los subtipos de cáncer de mama. Se analizó una firma génica de genes relacionados con la biología mitocondrial, mediante un análisis de agrupación jerárquica no supervisada, que reveló grupos de muestras enriquecidas en subtipos celulares. Se encontraron dos grupos principales (I y II), el grupo I se enriqueció de muestras luminales, mientras el grupo II era más heterogéneo, ya que se encontró un subgrupo enriquecido con muestras basales y muestras positivas al receptor HER2 y un segundo subgrupo que contenía muestras luminales B y muestras enriquecidas para HER2.

2.2 Las líneas celulares carcinogénicas muestran una mayor fragmentación mitocondrial en comparación con una línea celular no tumorigénica.

Del mismo modo se evaluó la morfología mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama, ya que esto se ha relacionado con la función de este organelo. Es importante destacar que la forma de una mitocondria depende de un proceso altamente regulado que se conoce como dinámica mitocondrial, que se refiere a los procesos de fisión y de fusión mitocondrial, procesos que en condiciones normales se encuentran en equilibrio. En ocasiones, este equilibrio se interrumpe, lo que se traduce en una dinámica mitocondrial alterada y que se a su vez se ha relacionado con múltiples enfermedades humanas, incluido el cáncer ¹⁶³. En el contexto del cáncer, estudios recientes han demostrado que la fisión mitocondrial se asocia con características protumorigénicas en modelos de cáncer colorrectal y pulmonar ^{164, 165}.

Por lo tanto, se evaluó la morfología mitocondrial en las líneas celulares de cáncer de mama, representativas a cada subtipo, usando las líneas celulares MCF10A (no tumorigénica), MCF7 (ER+), T47D (ER+), MDAMB231 (TN), MDAMB468 (TN) y BT549 (TN), con una tinción con MitoTracker Red y se clasificaron como completamente tubular (I), tubular con pocos fragmentos (II), fragmentada con pocos túbulos (III) y completamente fragmentada (IV) (Figura 6B). De acuerdo con las imágenes representativas analizadas y graficadas (Figura 6A) se encontró una diferencia significativa entre la línea celular NT y las líneas celulares carcinogénicas, es decir, las mitocondrias de la línea NT eran más tubulares en comparación con las líneas positivas a receptores hormonales y triple negativo que tendían a mostrar más fragmentos y en algunos casos como la línea celular BT549, las mitocondrias se observaron completamente fragmentadas (Figura 6A y C). Por lo anterior, es importante destacar, que estos datos sugirieron que existían cambios en los mecanismos de control de calidad mitocondrial y diferencias importantes en la biología mitocondrial, en función del subtipo celular.

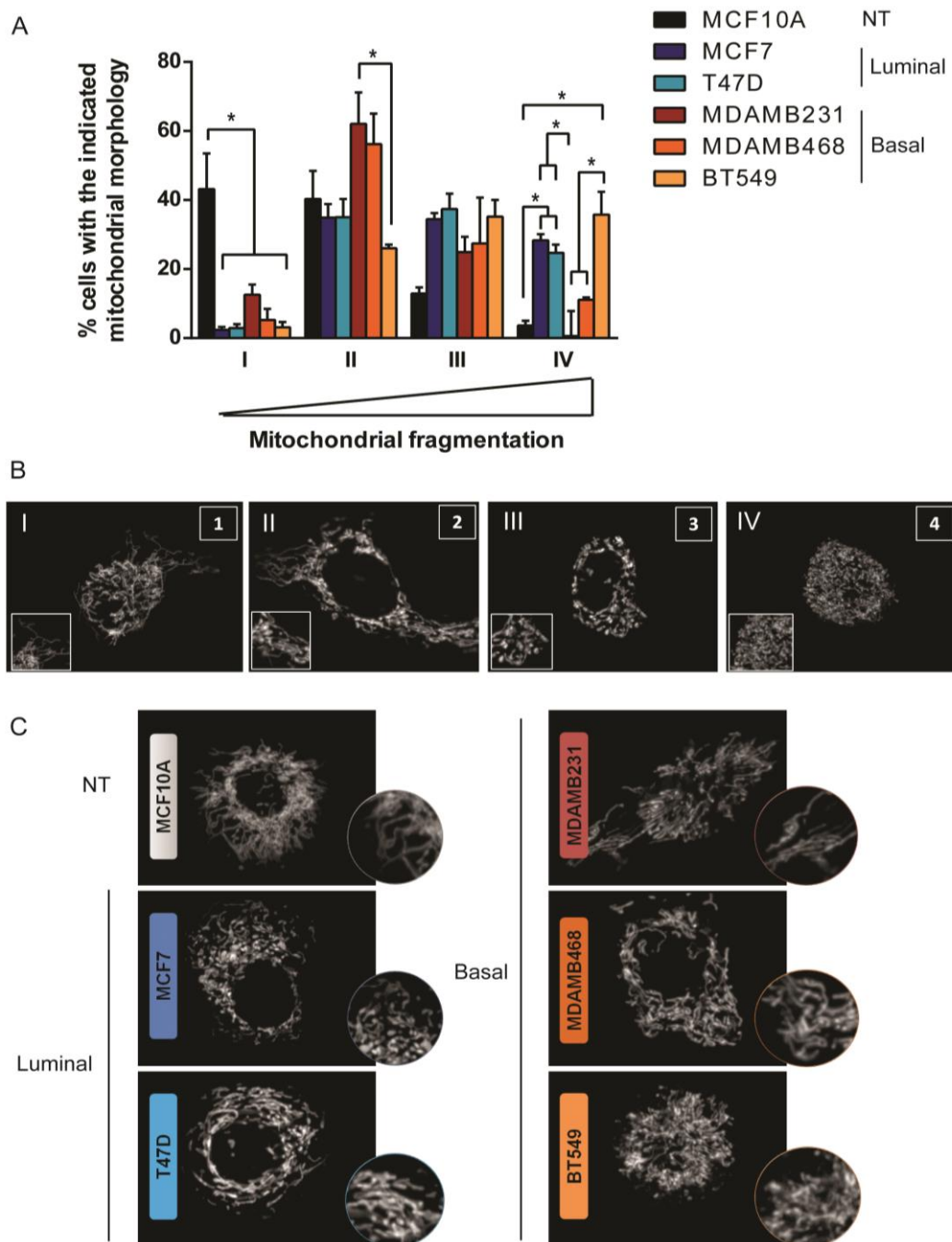


Figura 6. Las líneas celulares de cáncer de mama tumorigénicas muestran diferencias morfológicas con respecto a la línea no tumorigénica. Las mitocondrias se clasificaron como completamente tubulares (I), tubulares con algunos fragmentos (II), fragmentados con algunos túbulos (III) o completamente fragmentados (IV). El gráfico en (A) muestra el porcentaje de células con la morfología mitocondrial correspondiente, en función a la clasificación como se muestra en (B). En (C) se muestran imágenes representativas de la morfología característica de cada línea celular. El gráfico en (A) muestra la media \pm SEM de 3-5 experimentos independientes. Sesenta a cien células individuales fueron clasificadas por experimento por dos observadores independientes $*p < 0.05^{128}$.

2.3 El análisis de componentes principales de genes relacionados con el estrés oxidante separó claramente a los tumores basales de los otros subtipos de cáncer de mama.

Actualmente, se sabe que las mitocondrias tienen un papel crucial en la activación de la señalización redox a través de la producción de ERO en la cadena de transporte de electrones. Así mismo, se ha relacionado a la disfunción mitocondrial con el aumento de ERO y este incremento está relacionado con la activación de vías de señalización celular involucradas con la carcinogénesis y con la malignidad. Por esta razón, se realizó un análisis bioinformático usando firmas génicas relacionadas con el estrés oxidativo y con genes antioxidantes, en el cual el análisis de componentes principales separó claramente los tumores basales de los otros subtipos de cáncer de mama, lo que indica que la expresión de genes oxidantes y antioxidantes es similar entre muestras basales y diferente a otros subtipos de la enfermedad (Figura 7).

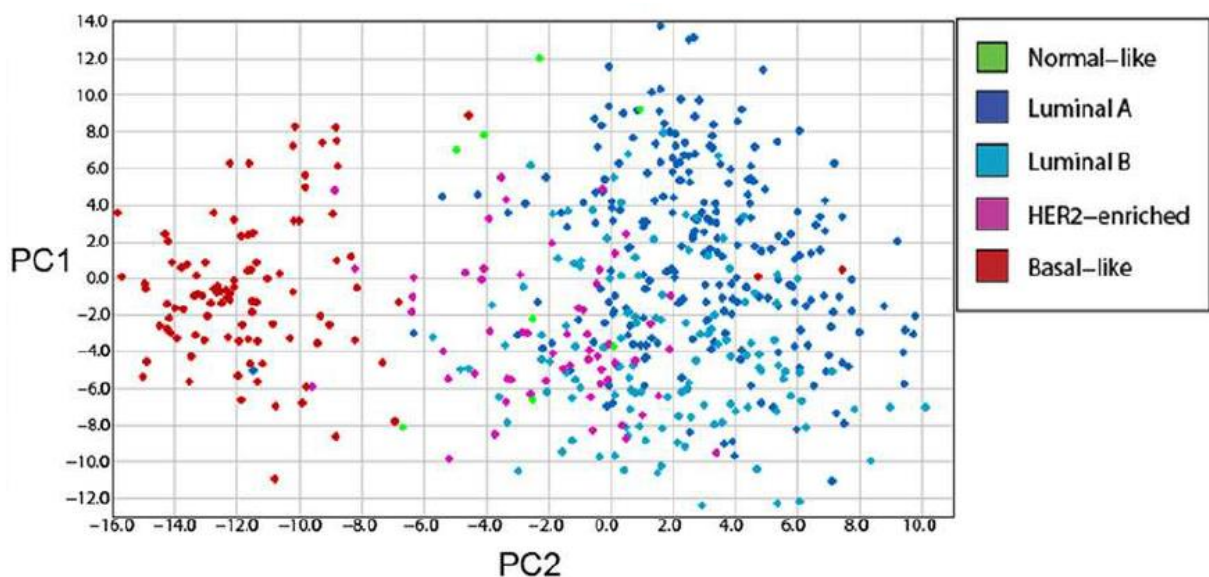


Figura 7. El sistema redox es diferente en función al subtipo de cáncer de mama. El análisis de componentes principales (PC) de genes relacionados con el estrés oxidante y antioxidantes, separa las muestras basales de los otros subtipos de cáncer mama.

3. Justificación

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres a nivel mundial, representando el 25% de todos los cánceres femeninos, por lo que, se considera un grave problema de salud pública. Por esta razón, existe la necesidad de mejorar y desarrollar pruebas que permitan su detección temprana y desarrollar mejores tratamientos dirigidos, con menos efectos secundarios y que en consecuencia eleven la tasa de supervivencia y mejoren la calidad de vida de las pacientes. Actualmente, se han establecido tres subtipos de cáncer de mama mediante inmunohistoquímica, dentro de los cuales están los tumores positivos a receptores hormonales (ER+) y los tumores positivos al receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2+), para los cuales ya existe un tratamiento dirigido. En contraste, el subtipo de cáncer triple negativo (TN) no cuenta aún con una terapia específica y dirigida, ni con un biomarcador de presencia, lo cual dificulta su tratamiento y disminuye la esperanza de vida de las pacientes. Hoy en día, la terapia dirigida ha tomado relevancia en el tratamiento de múltiples enfermedades como el cáncer, por lo cual una alternativa que pudiera tener un gran alcance es el estudio de las ERO en diferentes tipos de cáncer, debido a que éstas moléculas son capaces de inducir y/o modular la secreción de múltiples citocinas proinflamatorias e inducir la activación de vías de señalización asociadas al origen, progresión, resistencia a la terapia y metástasis en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, razón por la cual el estudio de las ERO es de gran importancia, ya que representan un potencial blanco terapéutico en la profilaxis del cáncer de mama.

4. Hipótesis

Hipótesis alternativa

Los altos niveles de ERO regulan las características asociadas a la malignidad, así como la secreción de citocinas de las células de cáncer de mama, por lo cual un tratamiento antioxidante podría ser benéfico

Hipótesis nula

5. Objetivo general

Estudiar el papel de las ERO en la sobrevivencia de líneas celulares de cáncer de mama y su relación con las citocinas secretadas por éstas, así como su posible papel como biomarcadores de pronóstico, diagnóstico o como blanco de terapia.

5.1 Objetivos específicos

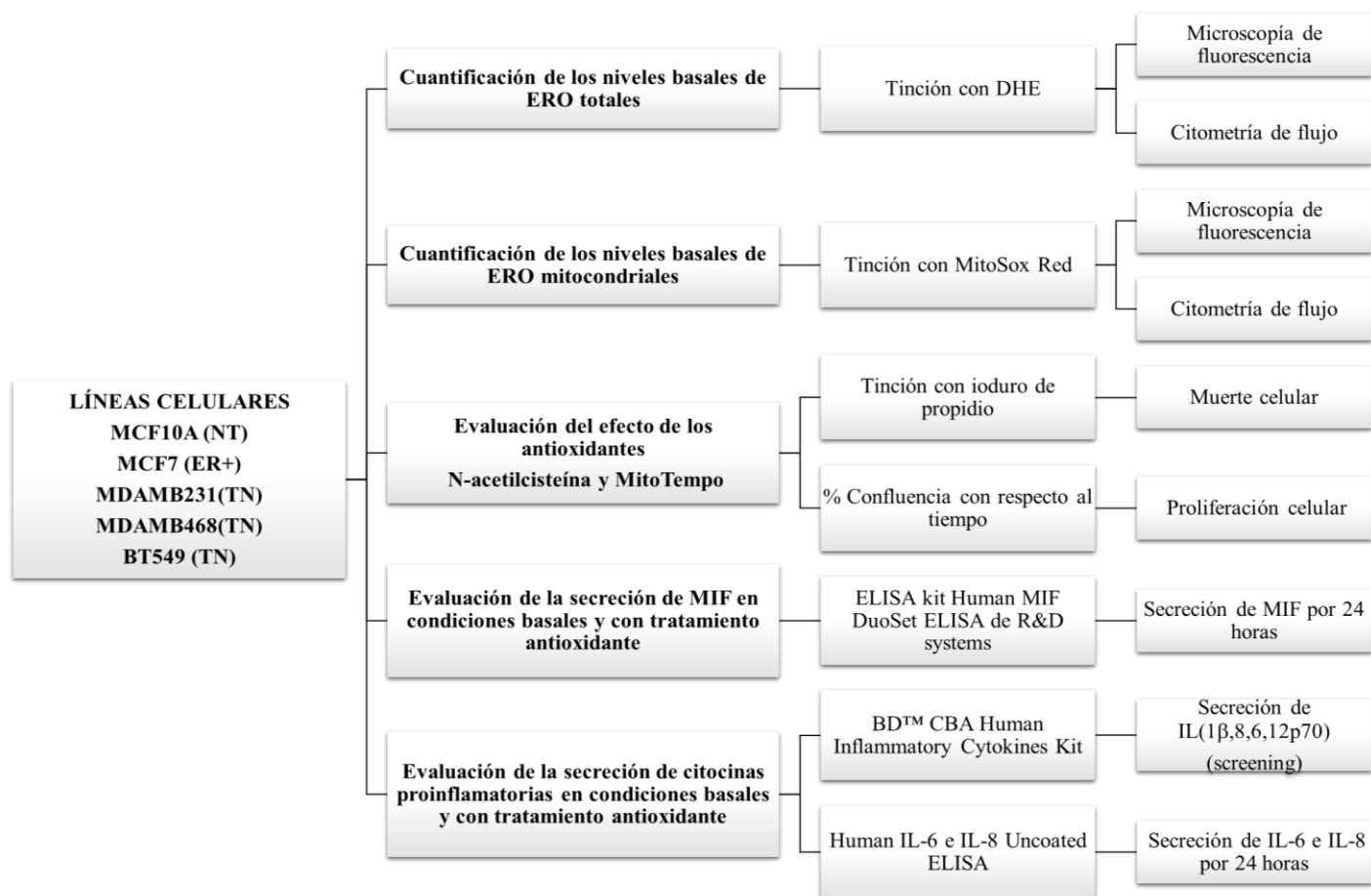
1. Determinar los niveles de ERO basales en líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diversos subtipos de la enfermedad. Evaluar una posible correlación entre estrés oxidante y subtipo de cáncer de mama.
2. Evaluar las ERO mitocondriales en diferentes líneas celulares.
3. Estudiar el papel de las ERO sobre la muerte y proliferación de líneas celulares de cáncer de mama empleando un antioxidante.
4. Determinar las citocinas secretadas al medio de cultivo de líneas celulares de cáncer de mama pertenecientes a diversos subtipos de la enfermedad. Evaluar una posible correlación del perfil de citocinas con el grado de estrés oxidante y su posible modulación con antioxidantes.

CAPITULO II.
METODOLOGIA

6. Metodología

6.1 Diseño experimental

La metodología general que se empleó para este proyecto se describe en el siguiente diagrama:



6.2 Cultivos celulares

Las líneas celulares que se emplearon en este trabajo fueron MCF10A (no tumorigénica), MCF7 (luminal), MDAMB231 (TN), MDAMB468 (TN) y BT549 (TN). Las líneas celulares de cáncer de mama se cultivaron en los siguientes medios: MCF10A (DMEM / F12, Caisson DFP18-1LT, suero de caballo al 5%, hidrocortisona 0.5 µg / mL, EGF 20 ng / mL, toxina colérica 100 ng / mL, 10 µg / mL de insulina); MCF7 (Eagle's MEM, Caisson MEP-10X1LT, 10 µg / mL de insulina, 10% de suero fetal bovino, SFB); MDAMB231 (DMEM / F12, 10% de FBS); MDAMB468 (DMEM / F12, 10% de FBS); BT549 (RPMI-1640, Caisson RPP10-10XLT, 7.5 µg / mL de insulina, 10% de FBS). En la tabla 7 se muestran las características de cada línea celular.

Línea celular	Patología	Subtipo	Clasificación molecular	Receptores que expresan	Mutaciones	Referencias
MCF10A	MF	NT	Basal B	N/A	N/A	166
MCF7	AC	ER+	Luminal	ER- α , PR, EGFR, HER2	CDKN2A, PIK3CA	167, 168
MDAMB231	AC	TN	Basal B	N/A	p53, K-RAS BRAF, CDKN2A.	166, 167
MDAMB468	AC	TN	Basal A	EGFR	p53, PTEN, BCRA1, MADH4	166, 167
BT549	CDI	TN	Basal B	N/A	p53, PTEN, RB1	166, 167

Tabla 7. Características de las líneas celulares provenientes de la mama. N/A: no aplica; MF: Mama Fibroquística; AC: Adenocarcinoma; CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante; NT: No Tumorigénico; ER: Receptor de Estrógenos; TN: Triple Negativo; PR: Receptor de Progesterona; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2; CDKN2A: Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina; PIK3CA: subunidad catalítica alfa de PI3K; PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; RB1: Gen retinoblastoma 1.

6.3 Cuantificación de ERO totales con dihidroetidio

El dihidroetidio (DHE) se conoce también como dihidroetidina, se emplea para medir especies reactivas de oxígeno mediante una tinción, que posteriormente se observará en un microscopio de fluorescencia o bien mediante citometría de flujo, su excitación y emisión se producen a longitudes de onda de 518-606 nm. El DHE reducido fluoresce en color azul, una vez oxidado a etidio, se intercala en el ADN celular y fluoresce en color rojo, de esta manera es posible detectar los niveles de ERO totales en las células.

6.3.1 Preparación y almacenamiento del dihidroetidio

El DHE (Sigma Aldrich, D7008-25MG) es un polvo de color rojo oscuro, para prepararlo se debe disolver en DMSO perfectamente seco, es decir sin trazas de agua o humedad, a una concentración stock de 5 mM y se guarda en el congelador a -20 °C, cubierto y muy bien protegido de la luz ya que es fotosensible. Es preferible alicuotarlo en pequeñas cantidades, ya que el descongelamiento repetido, puede ocasionar su degradación (descongelar máximo 2 veces).

6.3.2 Determinación de ERO totales por microscopia de fluorescencia

En placas de 12 pozos se sembraron alrededor 40-50 mil células de las líneas celulares MCF10A, MCF7 MDAMB231, MDAMB468 y BT549. Se requirió un pozo para el control o basal y dos pozos para dar tratamiento con peróxido de hidrógeno a 60 y 100 μ M para cada línea celular. Para realizar la tinción las células deben estar perfectamente adheridas y haber adquirido su morfología característica, por esta razón se esperó un lapso de 24 horas después de la siembra. Antes de la tinción, se prepara el DHE a una concentración 10 μ M en medio de cultivo completo correspondiente a cada línea celular, se precalienta a 37 °C y se protege de la luz. Se coloca el DHE 10 μ M en los pozos de cada línea celular y se incuba por 30 minutos a 37 °C, nuevamente protegido de la luz. Posterior a la incubación se retira el DHE y se lavó 2 veces con PBS 1X precalentando a 37 °C. Se fijan las células con 1 mililitro de formalina (Sigma HT501128-L)

por 10 minutos y se lavan nuevamente con PBS 1X. Tras la fijación, se realizó una cotinción con colorante de Hoechst (Sigma, H3570) 10 μ M por 15 minutos lavando nuevamente con PBS 1X. Se agrega 1 mL de PBS 1X en cada pozo, se protegen las células de la luz y se observan en un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer.Z1. Se analizan en el programa ZEN lite 2.3.

6.3.3 Determinación de ERO totales por Citometría de flujo

En placas de 6 pozos se sembraron 100000 a 200000 células de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, MCF10A, MDAMB231, MDAMB468 y BT549, se dejan en incubación durante 24 horas para permitir que se adhieran y tomen su morfología característica de cada línea celular. Posteriormente se añade el dihidroetidio a una concentración final 10 μ M en medio de cultivo completo correspondiente a cada línea celular y se incuba a 37 °C, protegiéndolo de la luz. Se lavan las células con PBS 1X dos veces durante 30 segundos, moviéndolo cuidadosamente. Para recuperar las células, se incuban con tripsina 1X por 5 minutos a 37°C para las líneas MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549; la línea celular MCF10A se tripsiniza con tripsina 0.5X, con incubación de 5-7 minutos; la tripsina se inactiva con medio completo. Las pastillas celulares obtenidas se resuspenden en 50 μ L de PBS 1X con 3% de SFB y se filtran con una malla con tamaño de poro de 100 micras. Las células se transfirieren a tubos adecuados para el citómetro de flujo. Finalmente las muestras se leyeron en un citómetro de flujo BD FACS Canto II, usando los voltajes que se muestran en la Tabla 8 para cada línea celular y el canal en el que se leyó fue PerCP-A (Exitación 488 nm –Emisión 675 nm). El análisis se realizó mediante el software FlowJo V10.

LÍNEA CELULAR / PARÁMETRO	FSC-A	FSC-H	SSC-A	SSC-H	PerCP-A
MCF10A	250	250	380	380	500
MCF7	300	300	380	380	500
MDAMB231	250	250	380	380	500
MDAMB468	250	250	400	400	500
BT549	230	230	360	360	500

Tabla 8. Voltajes utilizados en cada línea celular para las lecturas en el citómetro de flujo, para la determinación de ERO totales.

6.4 Cuantificación de ERO mitocondriales con MitoSox Red

Las ERO mitocondriales se evaluaron por microscopia de fluorescencia y por citometría de flujo. Para observar la tinción mitocondrial, fue necesario hacer una cotinción en células vivas con MitoSox Red (ThermoFisher Scientific, M36008)-Mitotracker Green (ThermoFisher Scientific, M7514), esto con la finalidad de corroborar que efectivamente estábamos detectando ERO únicamente de la mitocondria.

El MitoSox Red (Excitación 510- Emisión 580 nm) es un colorante, altamente selectivo, que se oxida en presencia del anión superóxido presente en las mitocondrias vivas y exhibe fluorescencia roja al unirse a los ácidos nucleicos. Cabe destacar que este colorante, se oxida fácilmente en presencia del anión superóxido, pero no por otras ERO o ERN, ya que la superóxido dismutasa evita la oxidación de la sonda.

Por otra parte, el Mitotracker Green (Excitación 490- Emisión 516) es un colorante que se acumula en las mitocondrias ya que puede difundirse de manera pasiva a través de la membrana plasmática, contiene un grupo clorometil ligeramente reactivo con los grupos tiol cuya finalidad es el etiquetado mitocondrial.

6.4.1 Preparación y almacenamiento del MitoSox Red

El MitoSox Red se prepara añadiendo 13 μL de DMSO sin trazas de agua o de humedad a un vial de 50 μg de liofilizado, para obtener una concentración stock de 5 mM y se almacena a -20°C , protegiéndolo de la luz. Es importante mencionar que es preferible usar todo el contenido del vial, ya que aun cuando se congele puede degradarse en menos de una semana y proporcionar resultados erróneos.

6.4.2 Preparación y almacenamiento Mitotracker Green

Cada vial de Mitotracker Green contiene 50 μg de liofilizado, que se resuspende en 74.4 μL de DMSO libre de trazas de agua o humedad, para obtener una concentración stock de 1 mM, este colorante se almacena a -20°C protegido de la luz.

6.4.3 Determinación de ERO mitocondriales por Microscopia de fluorescencia

Para esta tinción se requieren cubreobjetos previamente tratados con HCl 1M por 4 horas, posteriormente, se lavan con agua destilada para retirar el remanente de HCl, luego con alcohol isopropílico al 70% y se esterilizan, para su posterior uso. Para evaluar las ERO mitocondriales se realizó una cotinción MitoSox Red-Mitotracker Green de las líneas celulares MCF7, MCF10A, MDAMB231, MDAMB468 y BT549. Primeramente, se coloca un cubreobjetos previamente tratado, dentro de una caja Petri de 30 mm desechable de plástico y estéril, posteriormente, se coloca el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular. Se sembraron de 100000 a 150000 células descargando cuidadosamente la suspensión de células sobre el cubreobjetos, incubando durante 24 horas con la finalidad de que las células se adhieran y tomen su morfología celular característica.

Para la tinción se requirieron los medios de cultivo completos correspondientes a cada línea celular y PBS 1X, ambos precalentados a 37°C. El reactivo de trabajo se prepara con 2 mL de medio de cultivo completo, se precalienta a 37°C y se agregan MitoSox Red para obtener una concentración final de 2 µM y Mitotracker Green a una concentración final de 200 nM, ambos colorantes se añaden juntos para realizar la tinción de manera simultánea. Se coloca la combinación de ambos colorantes a la caja Petri con cubreobjetos al que previamente ya se adhirieron las células y se incuban por 15 minutos a 37°C protegiendo de la luz.

Después de la incubación las células se lavan 2 veces con PBS 1X precalentado a 37°C y el cubreobjetos se monta sobre un portaobjetos perfectamente limpio, colocando 10 µL de medio de cultivo completo para evitar que las células se sequen y mueran. Este es un paso vital para la tinción, ya que se debe realizar con extremo cuidado debido a que la fricción puede fragmentar las mitocondrias. Se fijó el cubreobjetos al portaobjetos empleando un barniz de consistencia espesa y se observó inmediatamente en un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer.Z1 equipado con una cámara AxioCam MRm y un sistema de iluminación Apotome. Las laminillas se observaron a 63X con aceite de inmersión. Finalmente, las imágenes se limpiaron y analizaron con el programa ZEN lite 2.3.

6.4.4 Determinación de ERO mitocondriales por citometría de flujo

En placas de 6 pozos se sembraron, 100 000 a 200 000 células de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, MCF10A, MDAMB231, MDAMB468 y BT549, posteriormente se tiñen con MitoSox Red (Excitación 510- Emisión 580 nm) a una concentración de 5µM en medio de cultivo completo y se incuban a 37 °C, por 15 minutos protegiendo de la luz. Se lavan las células con PBS 1x dos veces durante 30 segundos, agitando cuidadosamente. Para recuperar las células, se incubaron con tripsina 1X en las condiciones que corresponden a cada línea celular. Las pastillas celulares obtenidas se resuspenden en 50 µL de PBS con 3% de SFB para su posterior lectura y se filtran en una malla con tamaño de poro de 100 micras. Las células se transfirieron a tubos adecuados para el citómetro de flujo. Finalmente, se leyeron las muestras en un citómetro de flujo BD FACS Canto II usando los voltajes mostrados en la Tabla 9. Se analizaron en el programa FlowJo V10.

LÍNEA CELULAR / PARAMETRO	FSC-A	FSC-H	SSC-A	SSC-H	PerCP-A
MCF10A	250	250	380	380	580
MCF7	300	300	380	380	580
MDAMB231	250	250	380	380	580
MDAMB468	250	250	400	400	580
BT549	230	230	360	360	580

Tabla 9. Voltajes utilizados en cada línea celular para las lecturas en el citómetro de flujo para la cuantificación de ERO mitocondriales.

6.5 Manipulación y evaluación de los niveles de ERO con antioxidantes.

Los niveles intracelulares de ERO se modificaron *in vitro* utilizando los antioxidantes N-acetil cisteína (NAC) y MitoTEMPO a distintas concentraciones y tiempos. La disminución en ERO se evaluó por citometría de flujo utilizando DHE (dihidroetidio) para medir ERO totales y MitoSox Red para medir ERO mitocondriales, empleando la metodología descrita con anterioridad.

Las concentraciones de NAC para reducir ERO totales fueron 30 mM con una incubación de 2 horas, éstas condiciones se utilizaron para evaluar muerte y proliferación celular. También se utilizaron concentraciones 1, 3.5 y 7 mM con una incubación de 24 horas,

éstas condiciones se emplearon para evaluar la secreción de citocinas, así como muerte y proliferación celular a 24 y 48 horas.

La concentración de MitoTEMPO para reducir ERO mitocondriales fue de 100 μ M por 24 horas, misma que se empleó para evaluar la secreción de citocinas a 24 horas, así como muerte y proliferación celular a 24 y 48 horas.

6.5.1 Preparación y almacenamiento de la N-acetilcisteína.

El antioxidante N-acetil cisteína (Sigma-Aldrich A7250) se prepara a una concentración stock de 1M, disolviéndolo en PBS 1X mediante agitación, sin aplicar calor y se ajustó el pH a 7.0 con una solución de hidróxido de sodio 1M y se esteriliza por filtración. El NAC empleado en este trabajo se preparó el mismo día en que se usó y el sobrante se desechó, ya que el uso de NAC congelado no muestra un efecto eficiente para la disminución de ERO.

6.5.2 Preparación y almacenamiento del antioxidante MitoTempo

El antioxidante MitoTempo (Sigma-Aldrich SML0737) se prepara disolviendo el liofilizado en agua estéril a una concentración de 20 mM y se almacena a -20 °C, no es necesario ajustar el pH. Es importante mencionar que las alícuotas de MitoTempo no deben descongelarse repetidamente (soportan una sola descongelación), ya que esto provoca que se degrade y no funcione eficientemente, por lo cual se recomienda alicuotar en volúmenes pequeños.

6.6 Manipulación y evaluación de los niveles de ERO con prooxidantes

Los niveles intracelulares de ERO se modificarán *in vitro* utilizando los prooxidantes peróxido de hidrógeno (común, de venta libre en farmacias) y Antimicina A (Sigma- Aldrich A8674) a distintas concentraciones y tiempos. El peróxido de hidrógeno comercial tiene una concentración de 880 mM, se diluye en medio de cultivo hasta la concentración deseada el mismo día que se va a usar. La Antimicina A se prepara en DMSO a una concentración stock de 20 mM y se congeló en alícuotas pequeñas a -20 °C.

El incremento en ERO se evaluó por citometría de flujo utilizando DHE (dihidroetidio) para medir ERO totales y MitoSox Red para medir ERO mitocondriales, empleando la metodología descrita con anterioridad.

La concentración de H₂O₂ para incrementar la ERO totales fue de 100µM con una incubación de 2 horas, estas condiciones se utilizaron posteriormente para evaluar muerte y proliferación celular a 24 horas.

Las concentraciones de Antimicina A (inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria) para incrementar las ERO mitocondriales fueron de 1 y 5 µM, incubando por 24 horas.

6.7 Ensayos de proliferación

La proliferación celular se evaluó en el equipo Incucyte ZOOM durante 24 y 48 horas. Las células se sembraron en placas de 96 pozos con una densidad de 3 000–5 000 células por pozo y se incubaron por 24 horas para permitir que se adhirieran y adquirieran su morfología característica, posteriormente se trataron con peróxido de hidrógeno, N-acetilcisteína o MitoTempo a las concentraciones indicadas con anterioridad y se fotografiaron cada 4 h por 24 h y 48 horas. La proliferación se evaluó usando el software del equipo y se graficó como % de confluencia con respecto al tiempo. Se evaluó la muerte celular después de 24 h con tinción con yoduro de propidio (PI) 10 µM durante 10 min. Se tomaron imágenes de fluorescencia en el sistema Incucyte ZOOM y la muerte celular se expresó como % de confluencia rojo (PI +) /% confluencia total.

6.8 Ensayo de muerte celular

La muerte celular se evaluó en el equipo Incucyte ZOOM durante 24 y 48 horas. Las células se sembraron en placas de 96 pozos con una densidad de 3 000–5 000 células por pozo y se incubaron por 24 horas para permitir que se adhirieran y tomaran su morfología correcta, posteriormente se trataron con peróxido de hidrógeno, N-acetilcisteína o MitoTempo a las concentraciones indicadas con anterioridad. Se evaluó la muerte celular después de 24 h y 48 horas tiñendo con yoduro de propidio (IP) 10 µM durante 10 min. Se tomaron imágenes de

fluorescencia en el sistema Incucyte ZOOM y la muerte celular se expresó como % de confluencia roja (PI +) / % confluencia total.

6.9 Evaluación de la secreción del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) mediante ensayo de ELISA.

Para evaluar la secreción de MIF se utiliza un ensayo de ELISA con el kit Human MIF DuoSet ELISA de R&D systems (DY289). Este kit contiene un anticuerpo primario contra MIF que se emplea como anticuerpo de captura a una concentración de 2 µg/mL en PBS 1X, para ello se añaden 100 µL del anticuerpo de captura por pozo, empleando placas de 96 pozos de alta adherencia DY991 de R&D systems y se deja incubando durante toda la noche, sin la necesidad de protegerse de la luz a temperatura ambiente.

Al día siguiente se retira el sobrenadante y se lava 3 veces con 300 µL de PBS-Tween 0.01 % (buffer de lavado), después del último lavado, se eliminan los residuos del buffer secando la placa con toallas de papel. Posteriormente, se bloquea la placa añadiendo 300 µL de BSA al 3% (reactivo diluyente) y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente se realizan 3 lavados con PBS-Tween 0.01 % y se deja secar perfectamente.

Para el ensayo se añaden 100µL de los sobrenadantes procedentes de los cultivos de las líneas celulares MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549, en condiciones control y con los tratamientos antioxidantes, así mismo se añaden pozos para control negativo que consisten en medio de cultivo correspondiente a cada línea celular y como control positivo MIF recombinante; la placa se cubre completamente con papel parafilm y se deja incubar por 2 horas. Pasado el tiempo de incubación, se lava la placa con 300 µl de buffer de lavado y se seca la placa con toallas de papel. Se añaden 100 µL del conjugado de estreptavidina-HRP (solución de trabajo) en cada pozo, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz, se lavó nuevamente con buffer de lavado 3 veces. Luego se agregaron 100 µL de una mezcla 1:1 de la solución sustrato DY999 R&D Systems. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 50 µL de la solución de paro (H₂SO₄ 2N). La placa se leyó en el lector de ELISA a 450 nm restando el fondo a 575 nm.

6.10 Evaluación de la secreción de citocinas proinflamatorias

Los cambios en la concentración de citocinas secretadas al medio de cultivo se evaluaron en las líneas celulares en condiciones basales. Las citocinas en el medio se cuantificaron por citometría de flujo en un citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences) utilizando el BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (Catálogo 551811), que permite detectar y cuantificar simultáneamente a las siguientes citocinas: interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina-12p70 (IL-12p70).

Este kit cuenta con *perlas de captura* que corresponden a cada una de las citocinas, *perlas de compensación* que son útiles para configurar los voltajes y compensaciones iniciales del citómetro, *perlas de detección* para las citocinas proinflamatorias humanas conjugadas con PE, *estándares* para cada una de las citocinas proinflamatorias, un detector de control positivo de PE y otro para FITC, un *buffer de lavado* y un *buffer diluyente*.

Para cuantificar las citocinas se recolectan los sobrenadantes de los cultivos de las líneas celulares MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549 en condiciones basales (sin ningún tratamiento) y se centrifugan a 3500 rpm para retirar restos celulares, cabe destacar que para este ensayo es imprescindible usar sobrenadantes frescos, que no hayan estado congelados o expuestos a alguna condición que produzca la degradación de citocinas. Para el ensayo, se reconstituyen los estándares de citocinas proinflamatorias humanas con el buffer diluyente durante 15 minutos, se realizan diluciones en serie, las cuales se usan posteriormente para la curva estándar. Se pipetea 10 μ L de la suspensión de cada una de las perlas de captura y se mezclan con un vórtex, luego se colocan 50 μ L de la mezcla a cada tubo, con 50 μ L de cada dilución para la curva estándar o 50 μ L de cada sobrenadante y 50 μ L de reactivo de detección de PE, se incuba durante 3 horas a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Pasadas las 3 horas se lavan las muestras con 1 mL de Buffer de lavado y se centrifugan a 3500 rpm, se decanta el sobrenadante y se añaden 300 μ L de buffer de lavado y se analizan las muestras en un citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences).

6.11 Análisis de datos en el programa FlowJo V10.

El análisis de los datos obtenidos de los ensayos de citometría de flujo, se realizó en el programa FlowJo V10, en el cual se ingresan los datos crudos del citómetro de flujo. Para iniciar el análisis, se seleccionan los parámetros FSC-A y SSC-A, que son parámetros que indican el tamaño y la complejidad de una célula respectivamente, por lo cual este primer filtro es útil para identificar al tipo de células (A), posteriormente se posicionan los parámetros FSC-A y FSC-H, que corresponden a la selección de células individuales o singletes (B), luego se establece el umbral en el cual se considera positiva la tinción con DHE o MitoSox Red (C), lo siguiente es determinar las poblaciones ERO^{high} y ERO^{low} (D) y finalmente, se plasman estos datos en una gráfica de frecuencia relativa (E), (Figura 8).

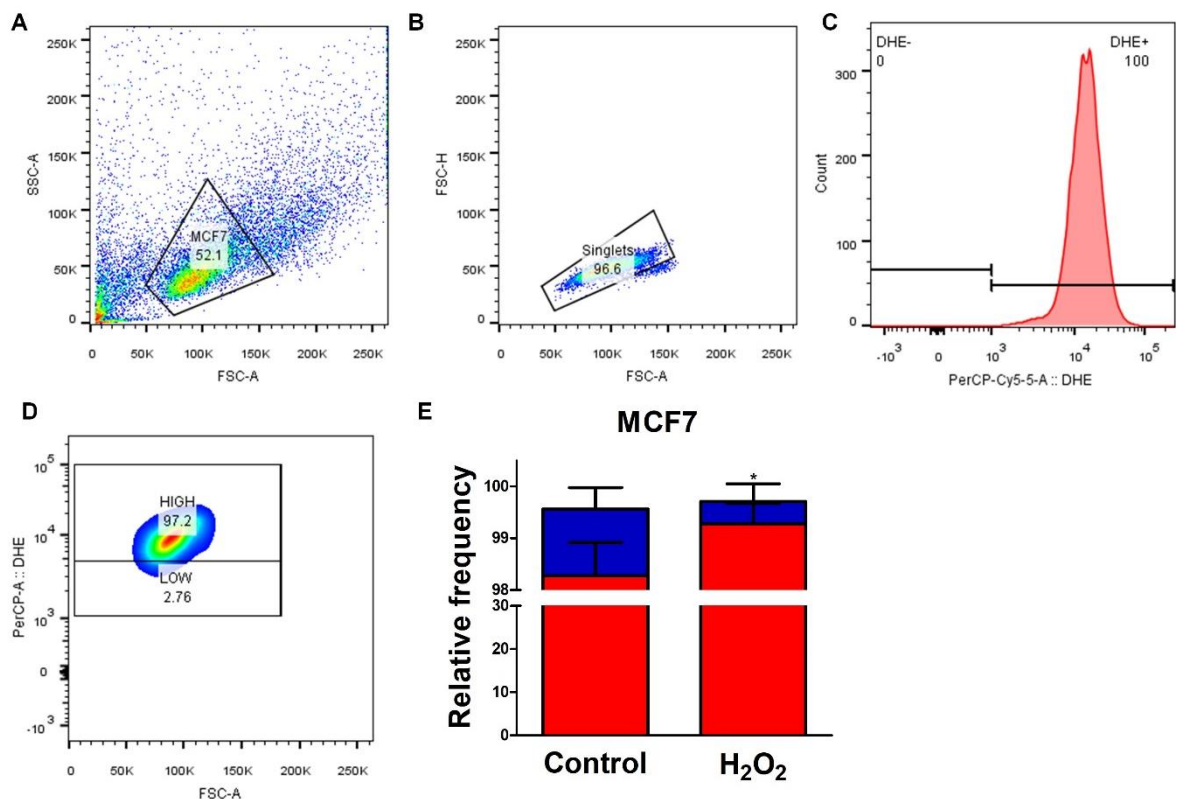


Figura 8. Análisis de datos obtenidos en el citómetro del flujo. Para el análisis de datos se utilizó el programa FlowJo V10, en A se muestra la selección para el tipo de células, en (B) se eligieron los singletes, en (C) se determinó el umbral positivo a la fluorescencia del colorante, en (D) se establecieron las poblaciones de células ERO^{high} y ERO^{low} y se plasmaron los datos en una gráfica de frecuencia relativa (E).

6.12 Análisis estadístico

Las gráficas muestran tres o más experimentos independientes y cada figura muestra la media \pm error estándar. Las pruebas t de student, ANOVA y pruebas post-hoc Tukey y Dunnett se realizaron con GraphPad Prism 5. Las pruebas post-hoc Tukey se realizaron para comparar las medias de la figura de ERO totales y ERO mitocondriales y se utilizó el post-hoc Dunnett para comparar condiciones control con tratamientos. Finalmente la t de student se utilizó para comparar los cambios en las poblaciones ERO^{high} y ERO^{low} en las gráficas de frecuencia relativa.

CAPITULO III.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. Resultados

5.1 Las líneas celulares triple negativo (TN) tienen niveles basales de ERO mayores que las líneas ER+ y la no tumorigénica.

El dihidroetidido es un colorante ampliamente usado para cuantificar ERO, ya que reacciona con el O_2^- formando 2-hidroetidido y forma etidio en presencia oxidantes de un electrón o de manera enzimática, el etidio en particular es un catión que tiene la capacidad de intercalarse con el ADN, ambos productos de oxidación fluorescen en color rojo y no se distinguen en células intactas con los métodos de cuantificación que se emplearon en este trabajo (microscopia de fluorescencia y citometría de flujo), por lo tanto, esta sonda fluorescente es indicativa de los niveles de ERO totales y las células positivas a este marcador se distinguen por tener núcleos teñidos en rojo ^{169, 170}.

Como se mencionó con anterioridad, se sabe que diferentes tipos de células tumorales producen niveles elevados de ERO en comparación con sus células homólogas normales, además de mostrar una mayor dependencia de sistemas antioxidantes ¹⁷¹, este incremento en ERO puede tener diversas funciones en las células cancerosas, por ejemplo, la activación de vías de señalización protumorigénicas, la activación de vías relacionadas con la proliferación y supervivencia celular, daños al ADN, inestabilidad genética, inactivación de genes supresores de tumores y la resistencia al tratamiento ⁹. Algunos de los tipos de cáncer en los que se ha observado una elevación de las ERO son la leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda y cáncer de mama ⁹.

Por esta razón, se analizaron los niveles de ERO realizando una tinción con dihidroetidido /Hoechst en las líneas celulares MCF10A, MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549 en condiciones basales y con tratamiento con un agente oxidante H_2O_2 a 60 y 100 μM (control positivo), por lo que se pudo observar que las líneas celulares que corresponden al subtipo de cáncer TN presentaban un mayor número de células positivas a dihidroetidido en condiciones basales, en comparación con la línea celular MCF7 y MCF10A que son ER+ y no tumorigénica respectivamente (Figura 9). Se observó, que el tratamiento con un agente antioxidante, incrementó visualmente el número de núcleos teñidos en rojo en las líneas celulares MCF10A y MCF7, pero no así en las líneas TN (Figura 9).

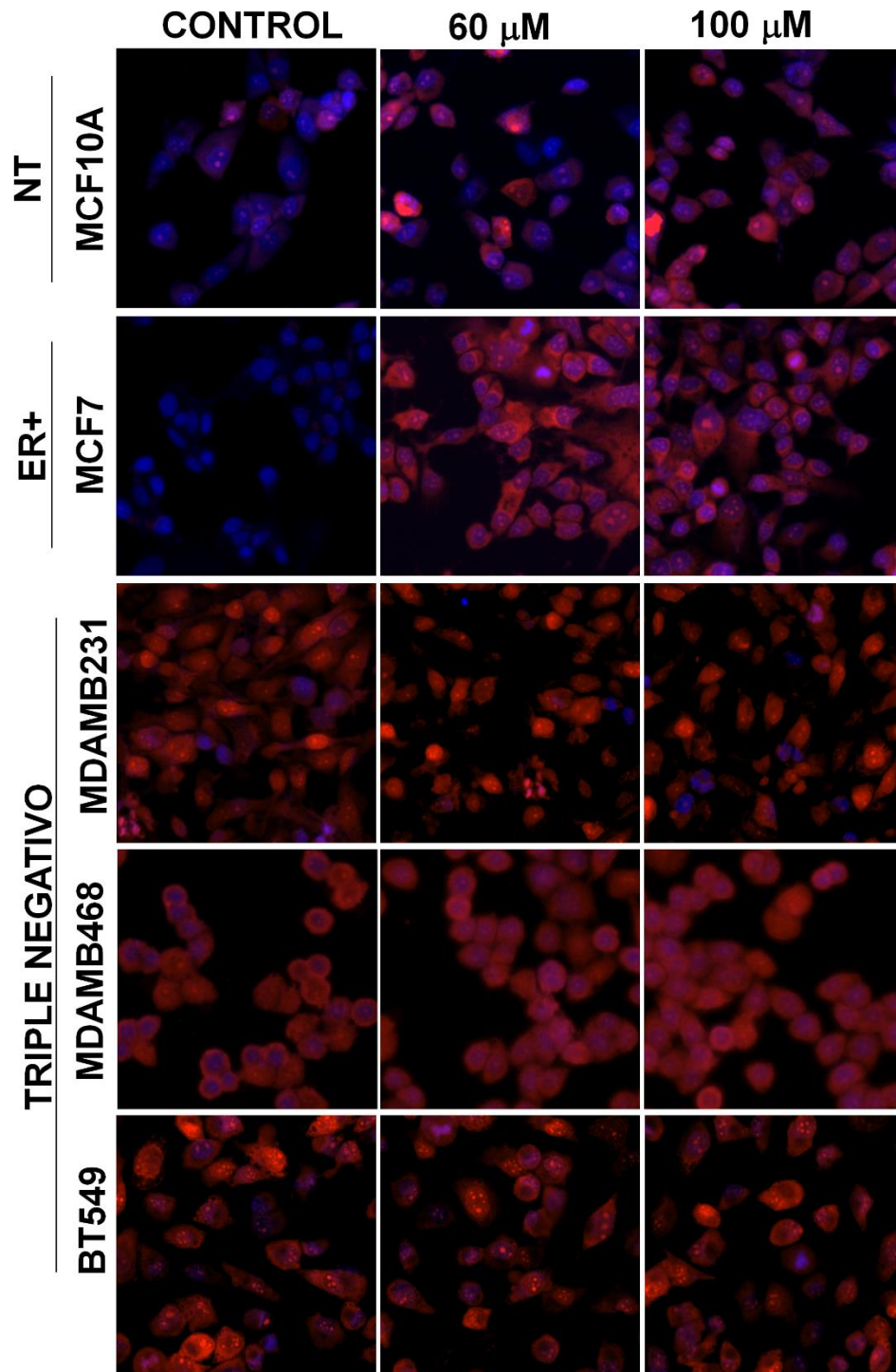
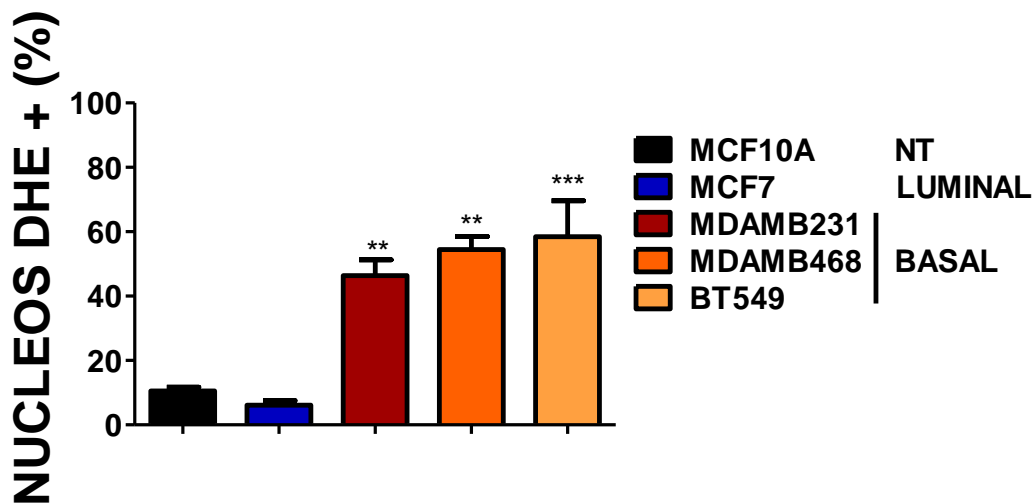


Figura 9. Las líneas celulares TN, mostraron un mayor número de núcleos teñidos con DHE (núcleos rojos) en comparación con las líneas celulares ER+ y no tumorigénica. Se realizó una cotinción con dihidroetidio /Hoechst en líneas representativas a cada subtipo de cáncer de mama, observando que las líneas TN mostraron mayor número de núcleos positivos a DHE, adicionalmente se dió un tratamiento con H₂O₂ a 60 y 100 μ M que mostró una mayor sensibilidad al tratamiento en las líneas no tumorigénica y MCF7. Imágenes representativas de 3-5 experimentos independientes.

Posteriormente, se realizó un conteo manual de cada uno de los núcleos teñidos con DHE (color rojo) y núcleos teñidos con Hoechst (color azul) en fotografías representativas de cada línea celular de 3-5 experimentos independientes, esto con la finalidad de cuantificar el porcentaje de núcleos positivos a DHE. Este conteo se realizó usando el programa ZEN lite 2.3 para facilitar el conteo manual, el porcentaje de núcleos positivos a DHE se obtuvo dividiendo el número total de núcleos rojos, entre el número total de núcleos azules.

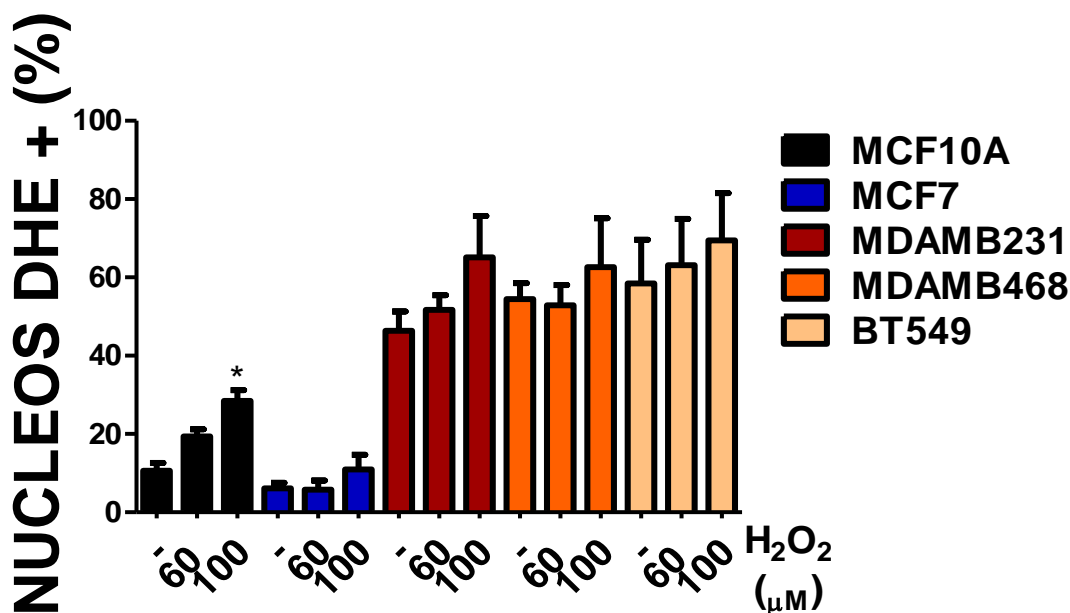
En la Gráfica 1, se muestran los resultados de este análisis, lo que nos permite observar claramente las diferencias en los porcentajes de células positivas a DHE entre una línea no tumorigénica, una ER+ y TN, evidenciando que las líneas triple negativo tienen más del 45% de sus células positivas a DHE, este hallazgo podría indicar que las ERO pueden estar asociadas a la malignidad y al subtipo de cáncer de mama, ya que actualmente se sabe que el subtipo de cáncer TN sugiere un mal pronóstico para las pacientes, por tener mayor riesgo de diseminarse y que además no existe una terapia específica. Además de que las ERO están asociadas a la activación de vías de señalización relacionadas con la oncogénesis, la resistencia a la quimioterapia y con un mal pronóstico en diferentes neoplasias incluido el cáncer de mama ⁹.



Gráfica 1. Las líneas celulares TN tienen un alto porcentaje de células positivas a DHE. El conteo manual de células mostró que las líneas TN captan más DHE en comparación con las líneas no tumorigénica y luminal, lo cual podría estar asociado a la malignidad del subtipo TN. La Gráfica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Tukey. *Diferente a MCF10A y MCF7 con *p <0.05; **p <0.01, y ***p <0.001

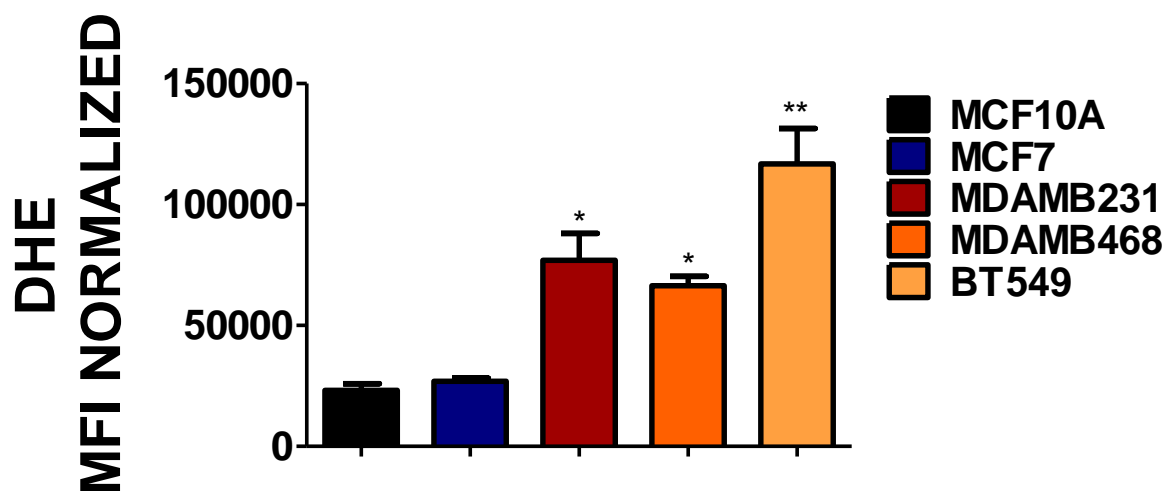
Así mismo, se empleó un tratamiento con peróxido de H₂O₂ a concentraciones de 60 y 100 μM durante 2 horas, inicialmente como control positivo (Gráfica 2). Con base a esto podemos notar que las líneas celulares no tumorigénica y ER+, parecen tener mayor sensibilidad a los tratamientos oxidantes y no así las TN, con respecto a esto, se ha documentado que los tumores que tienen mayor grado de malignidad tienden a tener sobreactivadas vías de resistencia a fármacos o vías que favorecen la desintoxicación de xenobióticos, como es la vía de NRF2, que regula la transcripción de enzimas antioxidantes y de enzimas desintoxicantes y se ha encontrado una alta tasa de expresión de esta proteína en distintas neoplasias como el cáncer gástrico ¹⁷² y el cáncer de mama ¹⁷³.

Por todo lo anterior, los datos obtenidos sugieren que las líneas celulares tumorigénicas, pueden tener un mejor sistema antioxidante y desintoxicantes, el cual le permite soportar altos niveles de ERO, e inclusive tolerar estímulos oxidantes y así mismo esta característica podría estar asociada a su malignidad.



Gráfica 2. Las líneas celulares tumorigénicas muestran baja sensibilidad al tratamiento oxidante. El tratamiento con H₂O₂ mostró un efecto significativo solo en la línea celular MCF10A y no en las líneas tumorigénicas MCF7, MDAMB231, MDA468 y BT549, lo que sugiere que las líneas carcinogénicas tienen una mejor tolerancia al tratamiento oxidante. La gráfica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Dunnett. *Diferente a MCF10A control contra tratamiento con *p <0.05.

Para verificar los datos obtenidos por microscopía de fluorescencia, se evaluaron los niveles de ERO mediante citometría de flujo empleando nuevamente DHE como marcador de fluorescencia, se graficó la intensidad media de fluorescencia normalizada con la autofluorescencia correspondiente a cada línea celular, se analizaron y compararon los niveles basales de las líneas TN con respecto a la línea ER+ y no tumorigénica y se realizó un análisis mediante pruebas estadísticas (* $p < 0.05$, One-Way-Anova, Post Hoc Tukey) (Gráfica 3). Observamos de manera clara y contundente que las líneas celulares TN muestran niveles de ERO superiores a las MCF7 y MCF10A en condiciones basales.

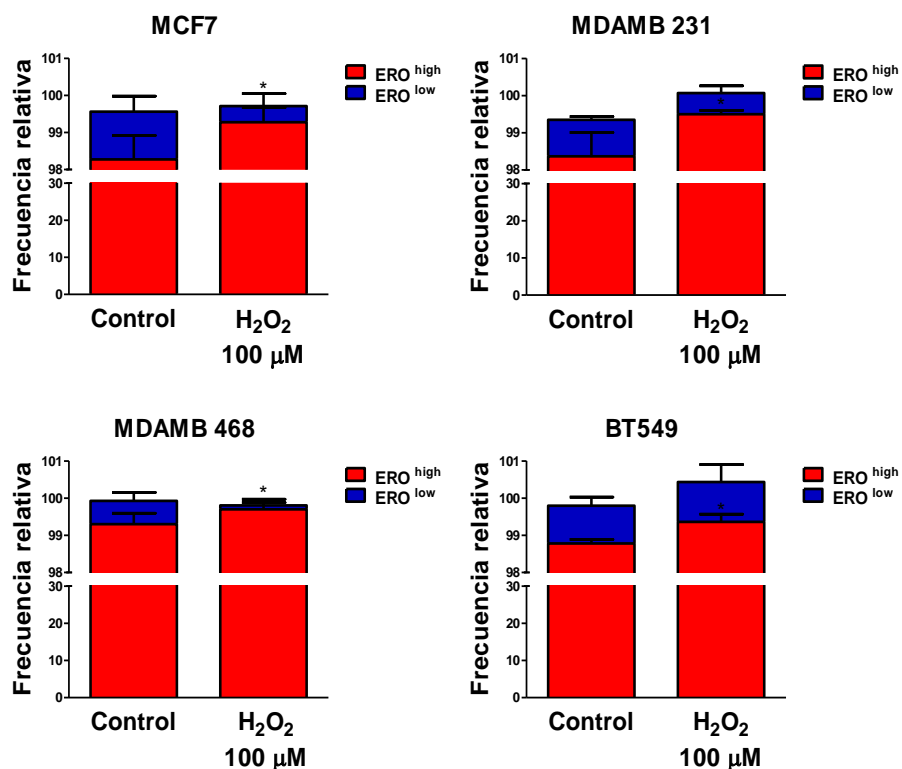


Gráfica 3. Las líneas celulares TN tienen mayores niveles basales de ERO totales que las líneas celulares no tumorigénica y luminal. Se cuantificaron las ERO totales en condiciones control en las líneas MCF10A (no tumorigénica), MCF7 (luminal), MDAMB231 (TN), MDAMB468 (TN) y BT549 (TN), mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Tukey. *Diferente a MCF10A y MCF7 con * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

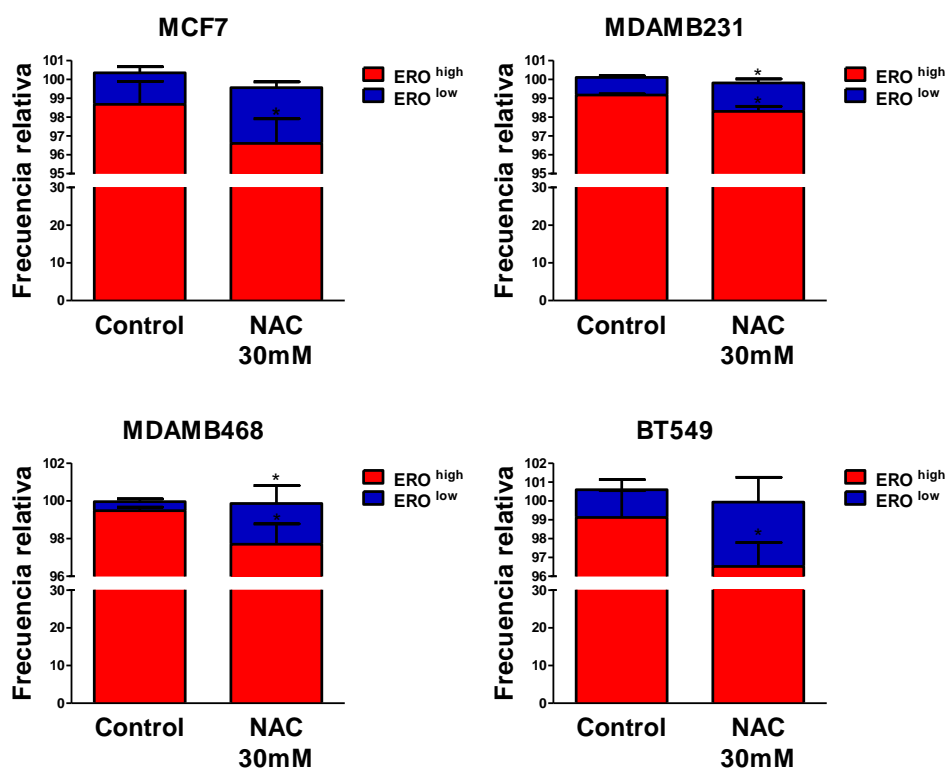
5.2 Los niveles basales de ERO de las líneas celulares de cáncer de mama pueden modificarse con el uso de oxidantes y antioxidantes.

Para demostrar si los niveles elevados de ERO tenían una función importante en el mantenimiento de la señalización oncogénica y en la supervivencia celular, se utilizó un agente oxidante (H_2O_2) para incrementar los niveles de ERO y un agente antioxidante (N-acetilcisteína) para disminuir ERO en las líneas celulares. Se analizaron los niveles de ERO con DHE de manera independiente en cada línea celular para identificar poblaciones con distintos niveles de

ERO. Para el análisis dividimos la población en dos, una población con niveles altos de ERO (ERO^{high}) y una con niveles bajos (ERO^{low}), tal y como se explica en el apartado 6.11 y Figura 8. Posteriormente, las células fueron expuestas a dos tratamientos, uno con H_2O_2 100 μM (prooxidante) y otro con N-acetilcisteína (NAC) 30 mM (antioxidante), durante dos horas (Gráficas 4 y 5). De manera similar a lo observado en la gráfica 2, no se encontraron cambios en la intensidad de fluorescencia media de las poblaciones con los tratamientos (datos no mostrados), pero dado que la citometría nos permite evaluar cambios en poblaciones celulares, hicimos un análisis de las poblaciones ERO^{high} y ERO^{low} . Con el tratamiento oxidante observamos que la población alta en ERO (ERO^{high}) aumentó, mientras que la población baja (ERO^{low}), disminuyó. Por el contrario, con el tratamiento antioxidante la población alta en ERO se ve disminuida mientras que la población baja aumentó. Por lo tanto, concluimos que las ERO basales pueden modificarse ya sea elevándolas con un agente oxidante o disminuyéndolas con un antioxidante (Gráfica 4).



Gráfica 4. El tratamiento oxidante incrementa la población alta en ERO (ERO^{high}). El tratamiento con 60 y 100 μM de H_2O_2 por 2 horas, incrementa la población ERO^{high} y disminuye la población ERO^{low} en las cuatro líneas celulares. La grafica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. T de student. *El tratamiento oxidante es diferente al control, con *p < 0.05.



Gráfica 5. El tratamiento antioxidante disminuye la población alta en ERO (ERO^{high}). El tratamiento con NAC 30mM por 2 horas, disminuye la población ERO^{high} e incrementa la población ERO^{low} en las cuatro líneas celulares. La gráfica muestra la media de 3-5 experimentos independientes de student.*El tratamiento oxidante es diferente al control, con $*p < 0.05$.

5.3 Las líneas celulares TN muestran una mayor susceptibilidad al tratamiento antioxidante.

Para estudiar el impacto que podría tener el uso de un oxidante o un antioxidante se realizaron los ensayos de muerte y proliferación celular empleando 60 y 100 μM de H_2O_2 y 15 y 30 mM de NAC (Figura 10 y Gráfica 6). Para evaluar la muerte celular, se realizó una tinción con yoduro de propidio (IP). El IP es un colorante impermeable a la membrana plasmática de las células vivas, pero aquellas células que tienen una membrana plasmática comprometida son permeables a este colorante, por lo tanto, aquellas células que se tiñen en rojo corresponden a células muertas.

El panel de imágenes (Figura 10) tomadas después de 24 horas de tratamiento, muestra que las líneas celulares TN presentan un mayor número de células teñidas con yoduro de propidio (IP), así como un cambio drástico en su morfología tras el tratamiento con NAC a 15 y 30 mM, lo cual no se observa en las imágenes que corresponden a la línea ER+.

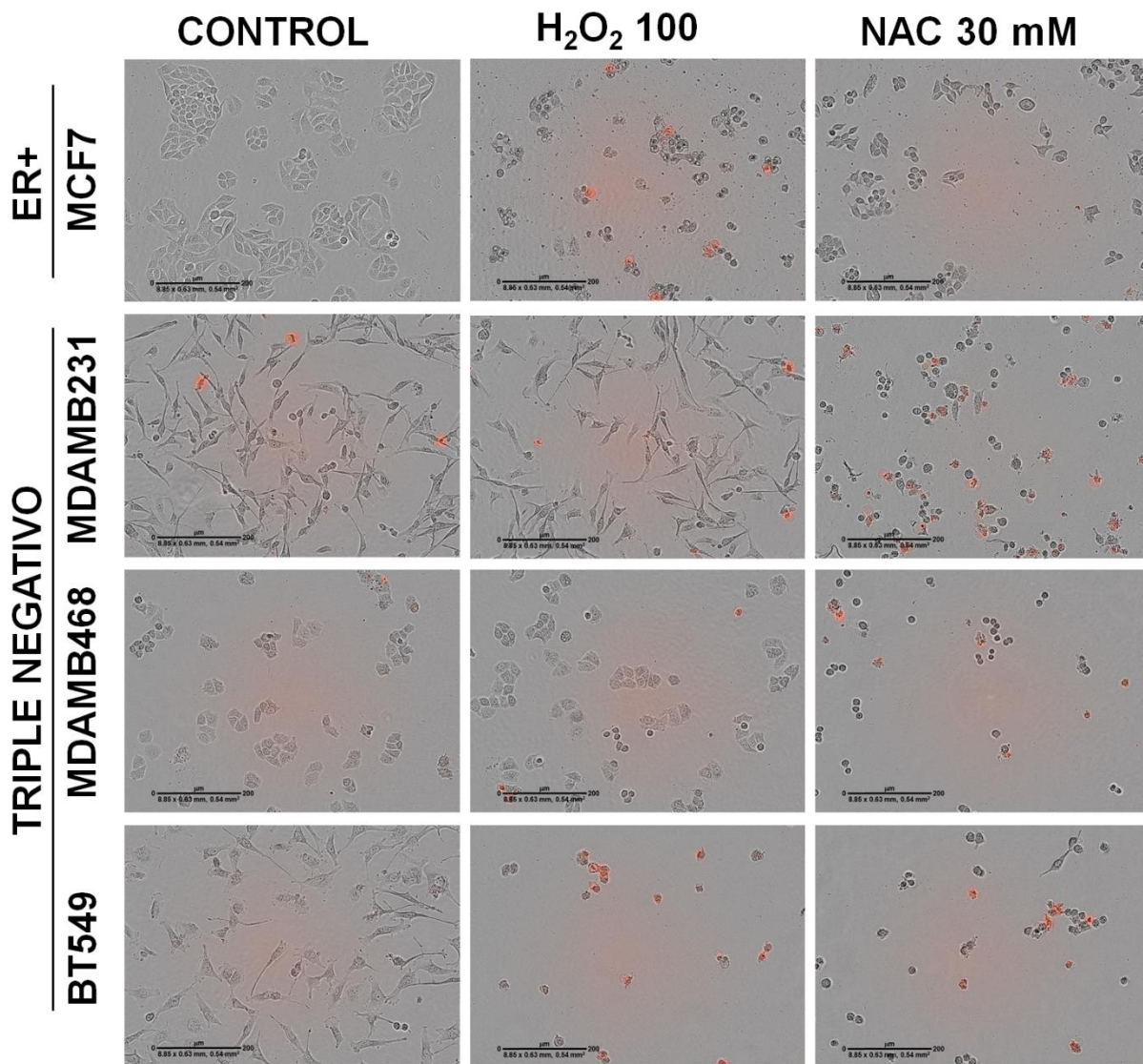
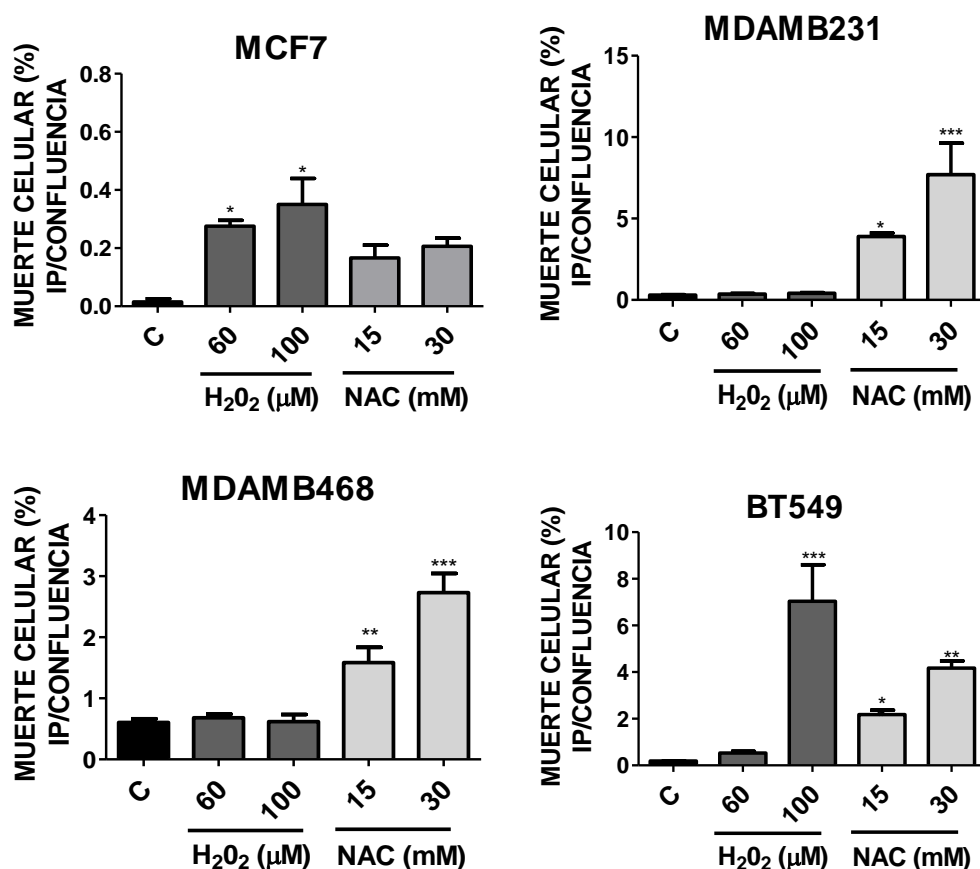


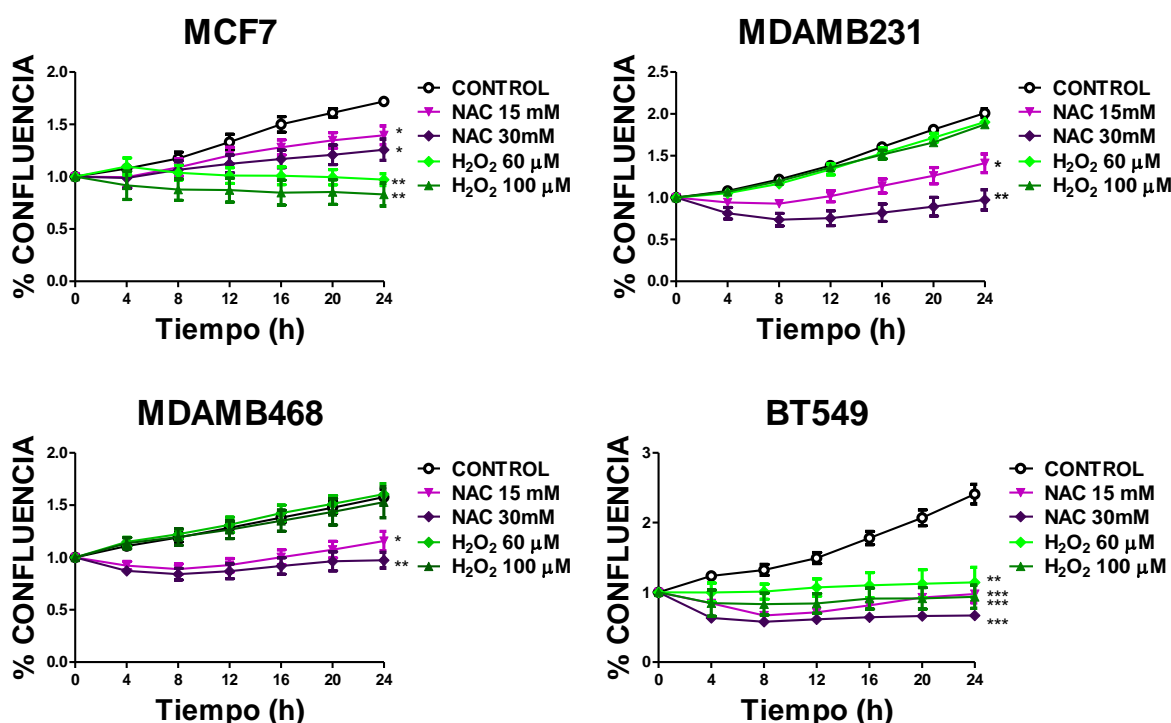
Figura 10. Las líneas TN muestran un mayor número de células positivas a IP con el tratamiento antioxidante. Se trataron a las células MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549 con 60 y 100 μ M de H₂O₂ y con NAC a 15 y 30 mM, los ensayos de muerte celular mostraron que las líneas TN, presenta un mayor número de células teñidas con IP, lo que se traduce en una mayor tasa de muerte celular. Imágenes representativas de 3-5 experimentos independientes.

Al cuantificar estos datos (Gráfica 6), es evidente que el porcentaje de muerte celular con el tratamiento antioxidante es superior en las líneas TN en comparación con la línea ER+, esto pone de manifiesto que las ERO juegan un papel importante en la sobrevivencia de las mismas y que su inhibición con antioxidantes podría estar modificando o inhibiendo alguna función biológica de importancia para este subtipo celular. Por otro lado, el tratamiento con H₂O₂ muestra que las líneas celulares MCF7 y BT549 son más susceptibles a los prooxidantes, en contraste con las líneas celulares MDAMB468 y MDAMB231 (Figura 10 y Gráfica 6), las cuales parecen tolerar mejor este tratamiento, este hallazgo podría sugerir que estas líneas TN tienen una mejor respuesta ante estímulos oxidantes.



Gráfica 6. Las líneas TN muestran una mayor tasa de muerte celular con el tratamiento antioxidante. Se trataron a las células MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549 con H₂O₂ 60, 100 μM o NAC 15, 30 mM, los ensayos de muerte celular mostraron que las líneas TN, presentan un mayor porcentaje de células teñidas con IP, es decir una mayor tasa de muerte celular. La gráfica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Dunnett. **El tratamiento oxidante o antioxidante es diferente al control con *p <0.05, **p <0.01 y ***p <0.001.

La proliferación celular también se vió afectada con el tratamiento de NAC siendo más evidente la diferencia entre las líneas TN y la ER+, es decir que en la línea celular MCF7 se observó una disminución en la proliferación a las concentraciones de 15 y 30 mM con respecto al control sin tratamiento y la disminución fue mucho más evidente en las líneas TN, con lo que podemos concluir que las líneas TN son más sensibles al tratamiento antioxidante que la línea luminal (Gráfica 7). Interesantemente, el tratamiento prooxidante afectó en mayor proporción la proliferación de la línea MCF7 y no así en líneas celulares TN como las MDAMB231 y MDAMB468 (Gráfica 7). De acuerdo con los datos anteriores, la línea celular BT549 a pesar de ser del subtipo TN, también fue sensible al tratamiento oxidante en ambas concentraciones (Gráfica 7), sugiriendo diferencias importantes dentro del subtipo TN con respecto a la respuesta al tratamiento con H₂O₂.



Gráfica 7. Las líneas TN muestran una mayor disminución en la proliferación con el tratamiento antioxidante. Se trataron a las células MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549 con H₂O₂ 60, 100 μM o NAC 15, 30 mM, los ensayos de proliferación celular mostraron que las líneas TN tienen una mayor sensibilidad al tratamiento antioxidante, ya que el NAC disminuye dramáticamente el porcentaje de confluencia con respecto al tiempo en las TN y en menor proporción en las MCF7. La grafica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Dunnett. *El tratamiento muestra diferencias con respecto al control con *p <0.05, **p <0.01 y ***p <0.001.

5.4 Las líneas celulares triple negativo muestran niveles elevados de ERO mitocondriales

Se ha documentado que las ERO tienen un papel importante en el origen y la progresión del cáncer y que pueden ser utilizadas como una posible diana terapéutica. Sin embargo, es fundamental conocer la fuente de estas ERO, ya que actualmente se sabe que ERO de fuentes distintas pueden tener funciones distintas. Al respecto, existe evidencia de que las ERO mitocondriales pueden inducir la activación de HIF1- α ¹⁷⁴. Por otro lado, las ERO provenientes de las NOX, se han asociado a diferentes neoplasias, por la activación de vías relacionadas con la carcinogénesis y se ha encontrado una elevada expresión de éstas en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama⁹. Por esta razón, conocer la fuente de las ERO en las líneas celulares correspondientes a cada subtipo de cáncer de mama, fue importante, ya que actualmente se cuenta con la posibilidad de inhibir específicamente una fuente u otra y esto representaría una manera más específica de dirigir un tratamiento con antioxidantes.

En función a esto, se utilizó una sonda fluorescente útil para detectar ERO mitocondriales (MitoSox Red) en cotinción con una sonda que se emplea habitualmente para marcar mitocondrias (MitoTracker Green). El MitoSox Red es un derivado del DHE, al cual se le ha añadido un grupo trifenilfosfonio cargado positivamente (TPP+), lo que permite la acumulación en la mitocondria y posteriormente al reaccionar con el anión superóxido, se oxida y se intercala en el ADN mitocondrial dando una fluorescencia roja¹⁷⁰. Por otra parte, el Mitotracker Green es un marcador fluorescente que se acumula selectivamente a la matriz mitocondrial por contener también un grupo TPP+, y que se une de manera covalente a las proteínas de la mitocondria al reaccionar con los grupos tiol libres, que están presentes en los residuos de cisteína¹⁷⁵.

La cotinción con estos dos colorantes se realizó en células vivas correspondientes a los diferentes subtipos de cáncer de mama, primeramente, con la finalidad de corroborar que el MitoSox Red en efecto estaba detectando ERO mitocondriales, lo que se comprobó al observar la localización de ambos colorantes. De manera interesante, se observó que las mitocondrias de las líneas TN mostraban mayor fluorescencia para el MitoSox Red y una mayor colocalización con el MitoTracker Green y además se observó que las condiciones en las que se llevó a cabo la tinción permitieron mantener perfectamente la morfología mitocondrial característica de cada línea celular (Figura 11).

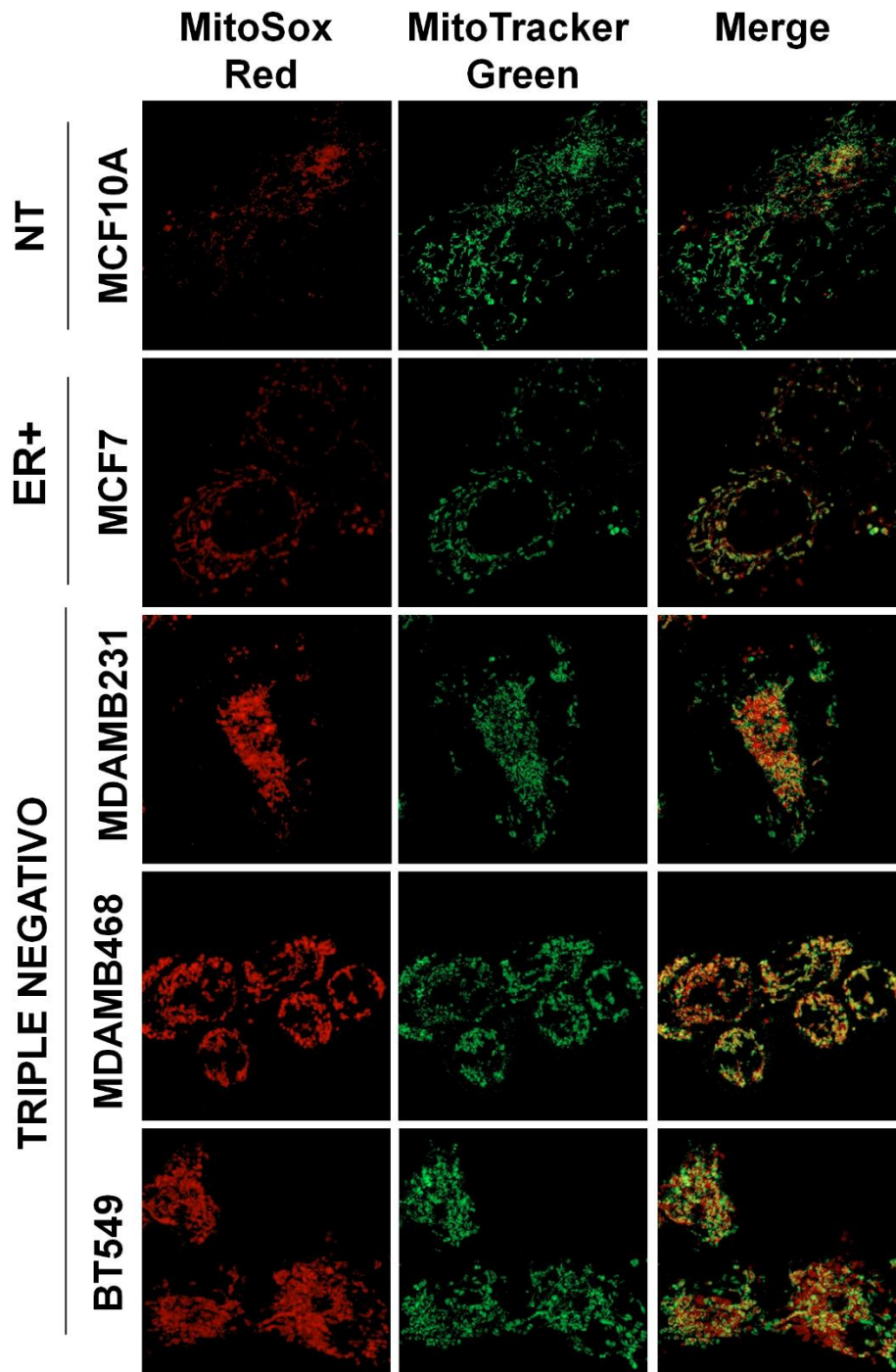
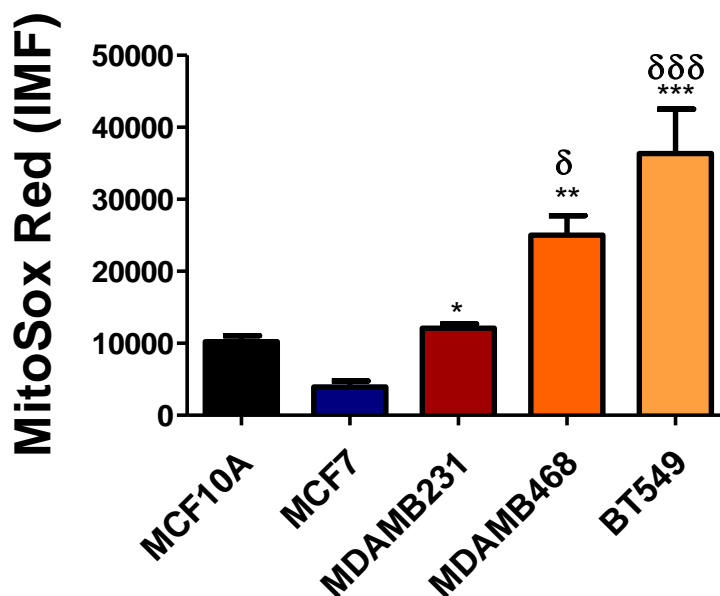


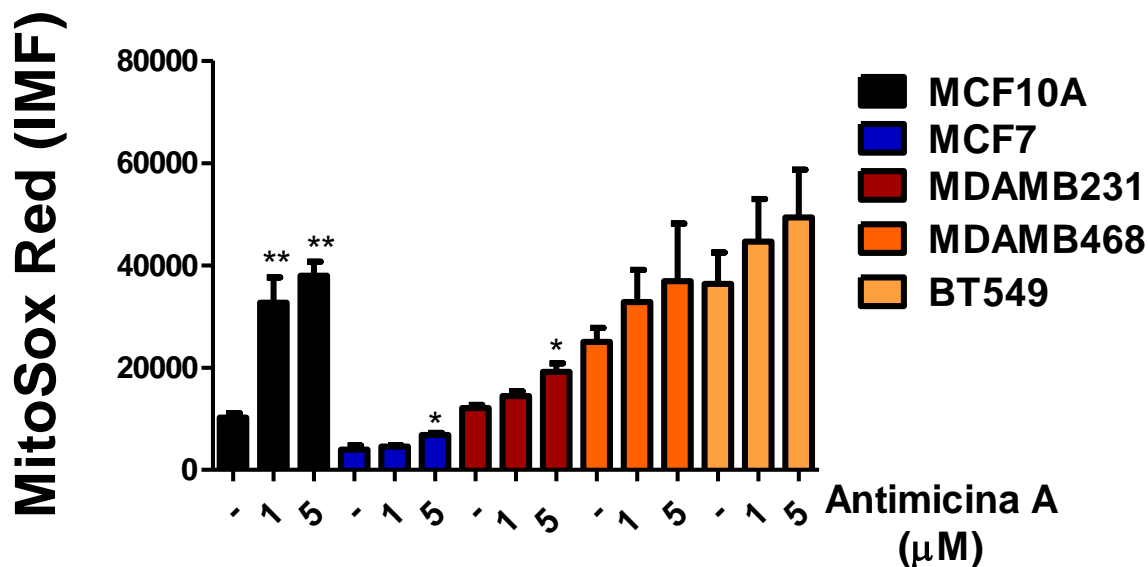
Figura 11. Las líneas celulares TN muestran mayor fluorescencia con el colorante MitoSox Red. La tinción con la sonda específica para la detección de ERO mitocondriales (MitoSox Red), mostró una mayor fluorescencia en las líneas TN, en comparación con la línea ER+ y NT. Adicionalmente, se demostró que las condiciones de tinción conservan perfectamente la morfología mitocondrial característica de cada línea celular. Imágenes representativas de 3-5 experimentos independientes.

Así mismo, se cuantificaron los niveles de ERO mitocondriales por citometría de flujo, en lo que demostramos que las líneas TN tenían mayores niveles basales de ERO mitocondriales en comparación con la línea ER+. Al comparar con la línea no tumorigénica, las líneas MDAMB468 y BT549 mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que la fuente principal de ERO en estas líneas TN, es la mitocondria y no así en la línea celular MDAMB231 donde podría haber otra fuente adicional (Gráfica 8).



Gráfica 8. La mitocondria es la principal fuente de ERO en las líneas TN. La tinción con el marcador de fluorescencia MitoSox Red mostró una mayor fluorescencia en las líneas TN en comparación con la línea ER+. La gráfica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Tukey. *Es diferente de MCF7 y δ es diferente de MCF10A, en donde *δ p < 0.05; **δδ p < 0.01; ***δδδ p < 0.001.

Es importante destacar que al tratar a las células con un bloqueador del complejo III de la cadena de transporte de electrones (Antimicina A), se observó un incremento significativo en ERO mitocondriales en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDAMB231 y no en las líneas MDAMB468 y MDAMB549. Estos datos sugieren que estas últimas líneas celulares probablemente ya estaban produciendo altos niveles de ERO mitocondriales de manera basal y por lo tanto, ya no incrementan con el tratamiento prooxidante (Gráfica 9).



Gráfica 9. El tratamiento con Antimicina A incrementa las ERO en las líneas celulares con menores niveles de ERO mitocondriales. El tratamiento con Antimicina A incrementó las ERO mitocondriales en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDAMB231 y no en las MDAMB468 y BT549, que son las líneas con altos niveles de ERO mitocondriales. La gráfica muestra la media de 3-5 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Dunnett. *El tratamiento oxidante es diferente al control con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Es importante mencionar que, aunque la línea celular MDAMB231 mostró mayores niveles de ERO mitocondriales con respecto a la línea MCF7, ésta no mostró una intensidad media de fluorescencia para el MitoSox Red, similar a las otras líneas TN (Gráfica 8), aun cuando su fluorescencia para DHE fue similar a la línea TN MDAMB468. Además, la frecuencia relativa de las células MitoSox^{high} fue menor que la población DHE^{high} tanto en la línea MDAMB231 como en la MDAMB468, pero no en la línea celular BT549 (Figura 12). Los datos anteriores indican que las líneas celulares MDAMB231, en mayor medida, y MDAMB468, en menor medida, tienen fuentes de ERO adicionales a las mitocondrias que contribuyen al mantenimiento de su alto estado de oxidación.

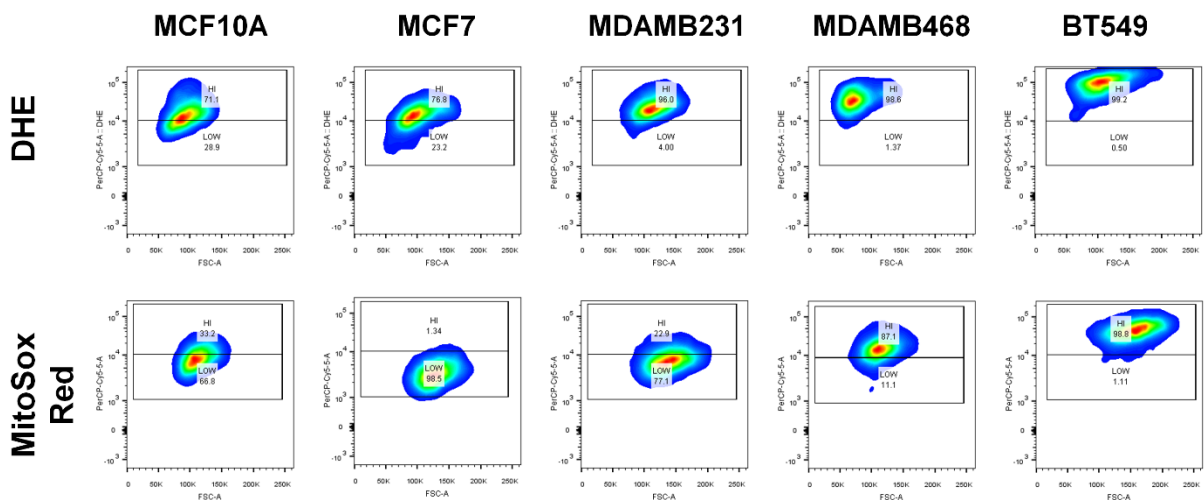


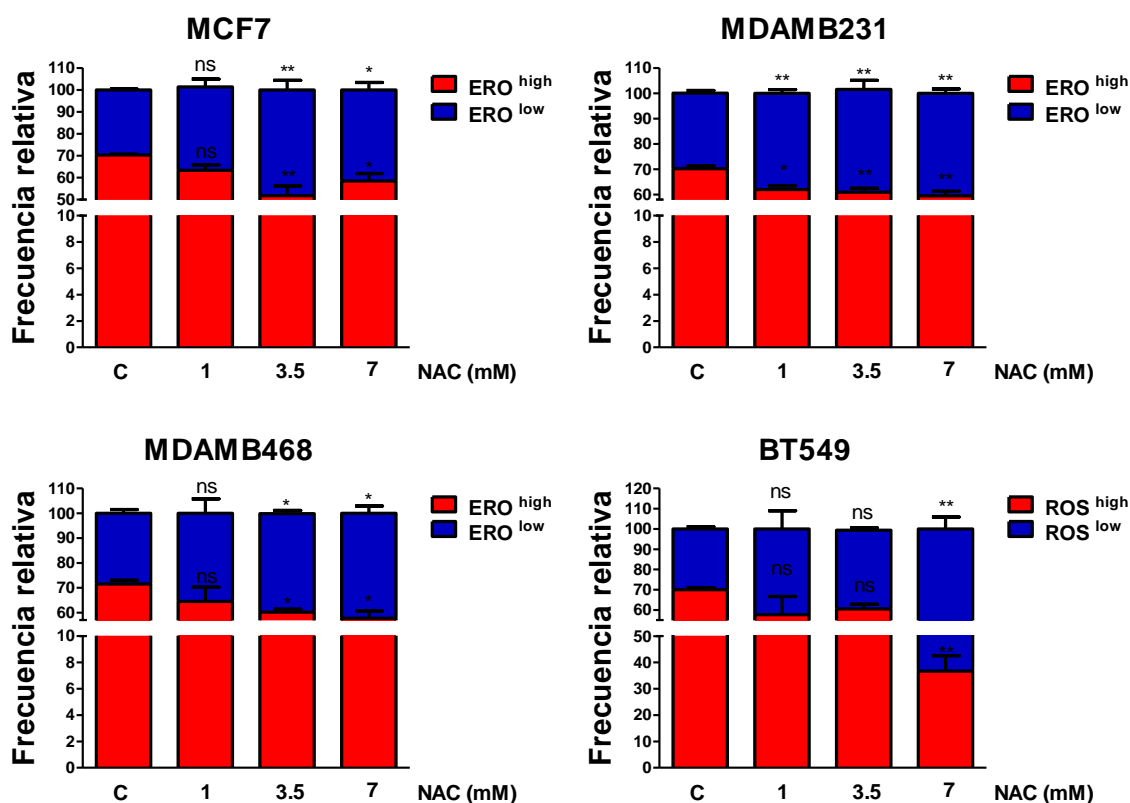
Figura 12. Las líneas celulares MDAMB468 y MDAMB231 tienen fuentes de ERO adicionales a la mitocondria. Al comparar la frecuencia relativa de las poblaciones DHE^{High} y MitoSox^{High} se observa que la línea celular BT549 tiene porcentajes similares, lo que sugiere que su principal fuente de ERO es la mitocondria, a diferencia de las líneas MDAMB231 y MDAMB468 cuyos porcentajes de frecuencia relativa son menores en la fluorescencia para el MitoSox Red, lo que sugiere fuentes de ERO adicionales a la mitocondria. Imágenes representativas de 3-5 experimentos independientes.

5.5 Las poblaciones ERO^{high} y ERO^{low} de células positivas a DHE pueden modificarse con el tratamiento antioxidante con NAC y MitoTempo

Se evaluó mediante citometría de flujo el efecto de los antioxidantes NAC y MitoTEMPO sobre las poblaciones ERO^{high} y ERO^{low} a concentraciones de 1, 3.5 o 7 mM para el NAC y 100 μ M para el MitoTEMPO por 24 horas. Esto nos permitió observar que es posible modificar los niveles de ERO totales y mitocondriales en las líneas celulares, ya que el NAC es un precursor del glutatión y además elimina radicales libres, porque puede interactuar con las ERO como el OH \cdot y el H₂O₂¹⁷⁶.

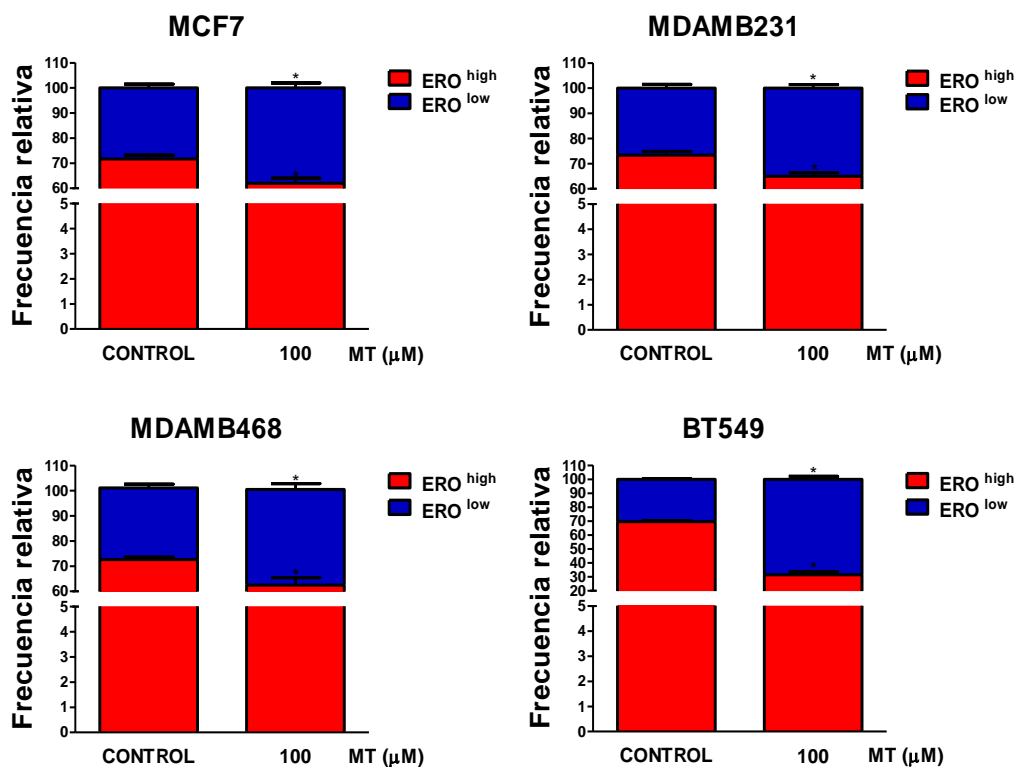
Por lo tanto, proponemos que el efecto observado con NAC corresponda a la inhibición de ERO totales. Por otro lado, el MitoTEMPO es un antioxidante dirigido a la mitocondria, que elimina al anión superóxido mitocondrial, debido a que es una combinación del antioxidante nitróxido de piperidina (TEMPO) con el catión lipofílico TPP⁺, lo que le da al MitoTEMPO la capacidad de acumularse en la mitocondria, imitando a la SOD mitocondrial¹⁷⁷.

Observamos de manera interesante que las concentraciones de NAC 3.5 y 7 mM reducen las poblaciones ERO^{high} e incrementan las poblaciones ERO^{low} de manera significativa en todas las líneas celulares estudiadas, tras la incubación por 24 horas (Gráfica10).



Gráfica 10. Las ERO totales pueden modificarse con el antioxidante NAC. En las gráficas se muestran los tratamientos con NAC 1, 3.5 y 7 mM por 24 horas. Se observó una reducción de la población ERO^{high} y un incremento de la población ERO^{low}, con los tratamientos 3.5 y 7 mM. La gráfica muestra la media de 3 experimentos independientes. T de student. *El tratamiento antioxidante es diferente al control respectivo, con *p < 0.05.

Del mismo modo, el antioxidante mitocondrial MitoTEMPO (MT), mostró un efecto similar a una concentración de 100 μ M por 24 horas. Se observó una disminución en la frecuencia relativa de la población ERO^{high} y un incremento en la frecuencia de la ERO^{low} (Gráfica 11), lo que demuestra que se pueden modificar los niveles basales de ERO totales y mitocondriales en estas líneas celulares. Es importante destacar, que estas concentraciones al ser más bajas se pueden emplear por periodos de tiempo más largos, lo que nos permitió realizar posteriormente distintos experimentos.

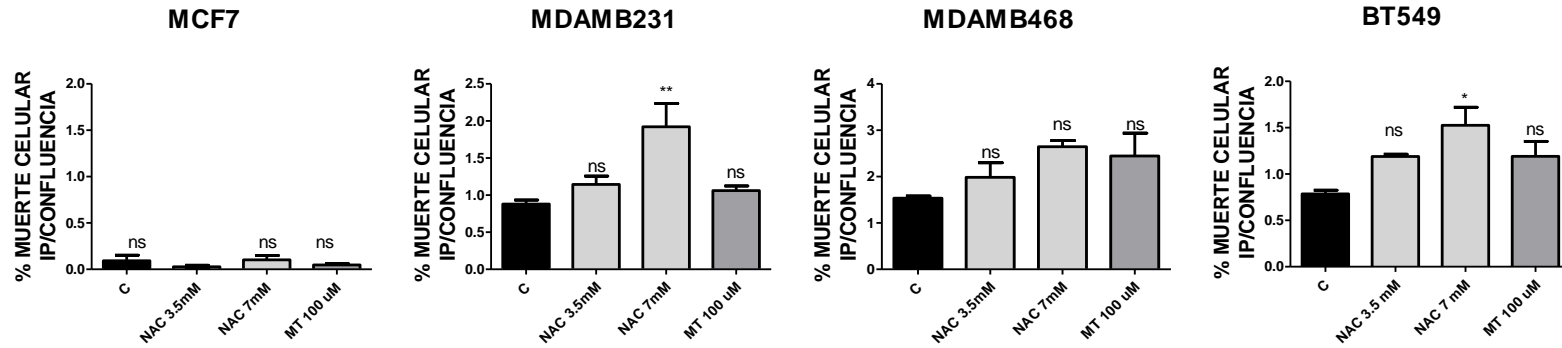


Gráfica 11. Los niveles basales de ERO mitocondriales pueden modificarse con el antioxidante MitoTEMPO. Se incubaron las células con MitoTEMPO 100 μM por 24 horas, lo que hizo posible reducir las poblaciones de ERO^{high} e incrementar las poblaciones de ERO^{low}. La gráfica muestra la media de 3 experimentos independientes. T de student.*El tratamiento oxidante es diferente al control, con *p < 0.05.

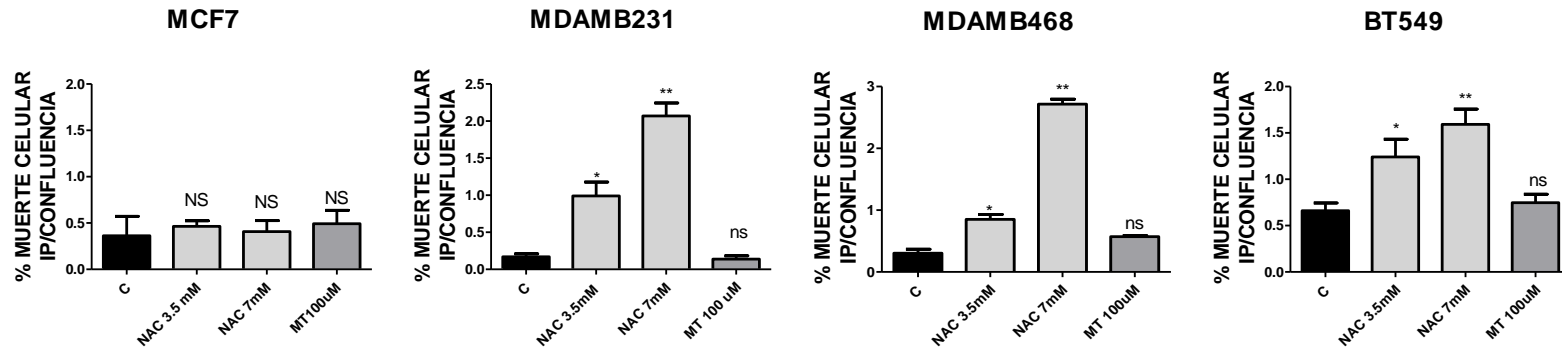
5.6 Las líneas celulares TN no muestran susceptibilidad al tratamiento con inhibidores de ERO mitocondriales.

Para evaluar el efecto que tiene el uso de inhibidores de ERO totales y mitocondriales, se evaluó la muerte celular a 24 y 48 horas, con los siguientes tratamientos: NAC 3.5 y 7 mM o con MitoTEMPO 100 μ M (Gráfica 12). Con ello observamos que el tratamiento con NAC 3.5 mM no indujo muerte celular a las 24 horas en ninguna de las líneas celulares estudiadas. A la concentración de 7 mM, se indujo muerte celular en las líneas TN MDAMB231 y BT549, pero no en las líneas MCF7 y MDAMB468. Sin embargo, los tratamientos por 48 horas para las concentraciones 3.5 y 7 mM se indujo una tasa de muerte celular significativa en las líneas TN y no en la línea ER+. Sorprendentemente, el MitoTEMPO no indujo muerte celular a 24 y 48 horas en ninguna línea celular, lo que sugiere que las ERO mitocondriales no tienen un papel fundamental en la sobrevivencia de estas células.

24 HORAS

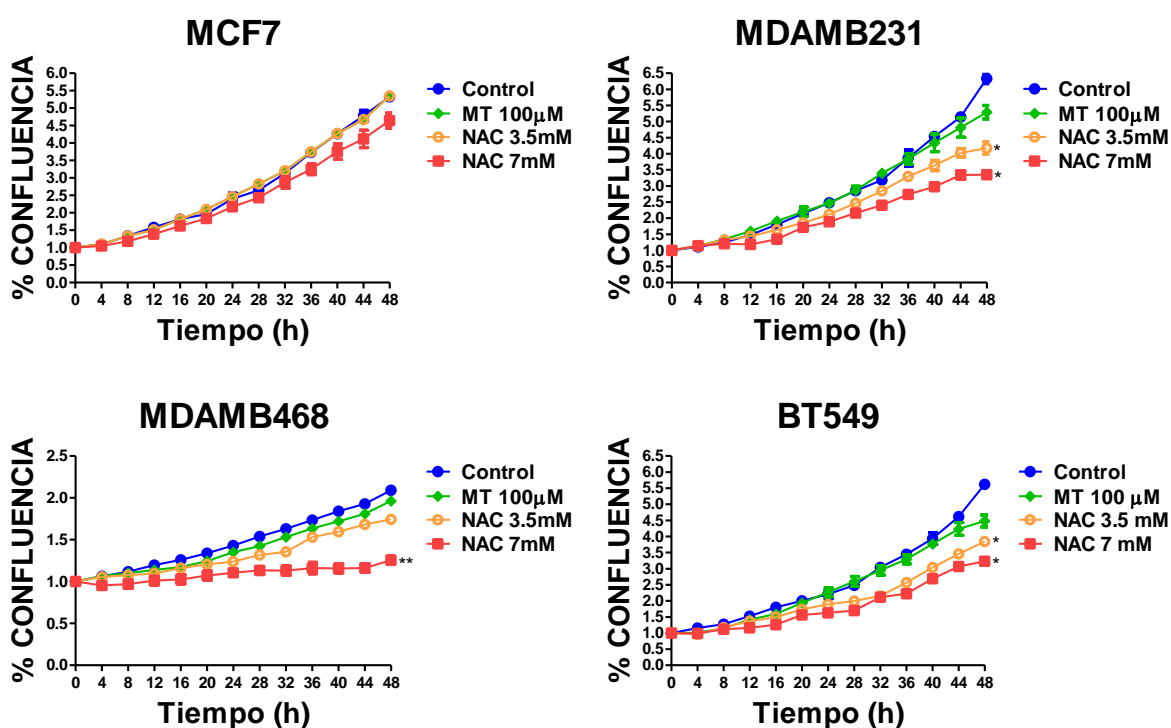


48 HORAS



Gráfica 12. La inhibición de ERO mitocondriales no tiene un efecto importante sobre la muerte celular. Se evaluó la muerte celular con tratamientos con NAC 3.5 y 7 mM y MitoTEMPO 100 µM por 24 y 48 horas. Se observó un incremento importante en la muerte celular en las líneas TN con el tratamiento con NAC a las 48 horas y no así en la línea ER+. Así mismo, es importante resaltar que el tratamiento con MitoTEMPO no tuvo ningún efecto sobre ninguna línea celular a 24 y 48 horas. La gráfica muestra la media de 3-4 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Dunnett. *El tratamiento antioxidante es diferente al control con *p <0.05, **p <0.01 y ***p <0.001.

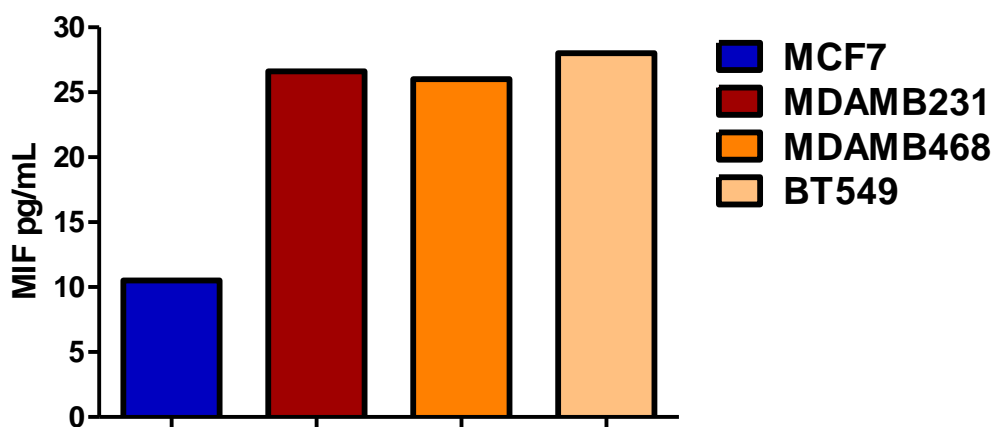
También se evaluó la proliferación celular a 24 y 48 horas, con tratamientos con NAC 3.5 y 7 mM o con MitoTEMPO 100 μ M (Gráfica 13). Observamos que el tratamiento con NAC 3.5 o 7.0 mM no afectó la proliferación celular a las 24 horas en ninguna línea celular. Sin embargo, los tratamientos por 48 horas para las concentraciones 3.5 y 7 mM indujeron una reducción en la proliferación celular significativa en las líneas TN y no en la ER+. Sorprendentemente, el MitoTEMPO, no tuvo ningún efecto a las 24 y 48 horas en ninguna línea celular, lo que sugiere que las ERO mitocondriales no tienen un papel fundamental en la proliferación de estas células.



Gráfica 13. La inhibición de las ERO mitocondriales no tiene un efecto importante sobre la proliferación celular. Se evaluó la muerte celular mediante tratamientos con NAC 3.5, 7 mM o MitoTEMPO 100 μ M por 24 y 48 horas. Se observó un incremento importante en la muerte celular en las líneas TN con el tratamiento con NAC a las 48 horas y no así en la línea ER+. Así mismo, es importante resaltar que el tratamiento con MitoTEMPO no tuvo ningún efecto sobre ninguna línea celular a 24 y 48 horas. La gráfica muestra la media de 3-4 experimentos independientes. One Way ANOVA Post Hoc Dunnett. *El tratamiento antioxidante es diferente al control con * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

5.7 Las líneas celulares de cáncer de mama TN muestran una mayor secreción del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) y ésta puede inhibirse con el antioxidante N-acetilcisteína.

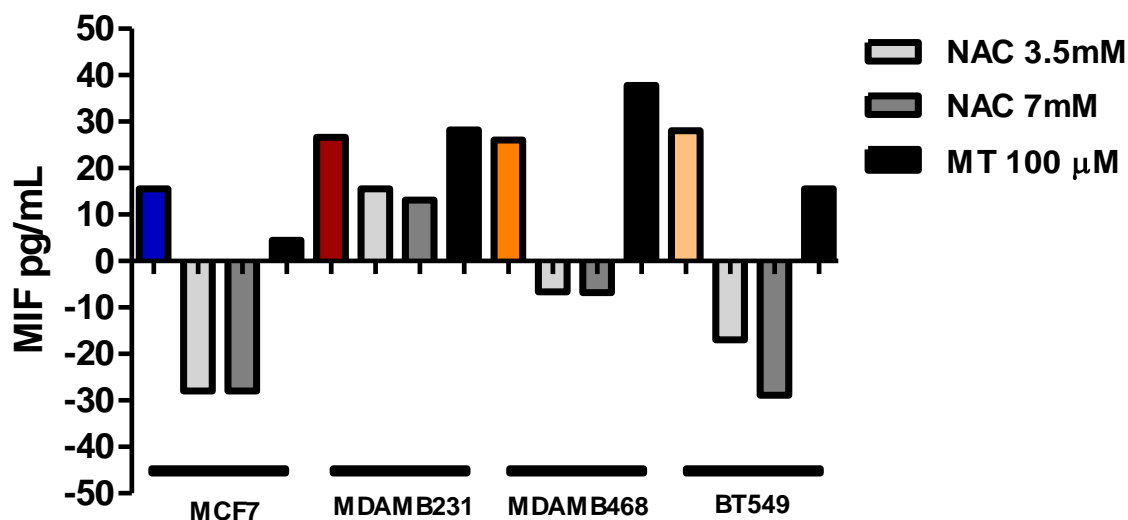
El factor inhibidor de la migración macrófagos (MIF) es una citocina proinflamatoria con un importante interés biológico en el campo de la medicina, ya que se ha encontrado elevada en diversas enfermedades autoinmunes y en cáncer. En el contexto del cáncer se ha documentado que esta citocina participa en la activación de distintas vías de señalización relacionadas con la oncogénesis y con la metástasis, así como en la secreción de otras citocinas proinflamatorias que resultan ser benéficas para las células cancerosas. Por tal motivo, se evaluaron los niveles de MIF secretados al medio de cultivo por las líneas celulares MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549 mediante la técnica de ELISA. Se encontró que las líneas celulares del subtipo TN presentaban una mayor secreción de esta citocina al medio en comparación con la línea ER+ (Gráfica 14).



Gráfica 14. Las líneas celulares de cáncer de mama TN muestran una mayor secreción del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF). La cuantificación de MIF mediante la técnica de ELISA en sobrenadantes de 24 horas sin tratamiento, correspondientes a las líneas celulares ER+ y TN, muestra una notable diferencia entre los niveles basales de las líneas TN y ER+. La gráfica corresponde al resultado de un solo experimento.

Resultados previos de nuestro grupo de investigación sugieren que la secreción de MIF y otras citocinas proinflamatorias, están reguladas por las ERO, lo que significa que la modulación de éstas mediante el uso de antioxidantes tendría un importante impacto en la secreción de estas citocinas. Por tal motivo, se evaluó el efecto de los antioxidantes NAC y

MitoTEMPO sobre la secreción de MIF al medio de cultivo de las líneas celulares acumulado durante 24 horas. Observamos que el NAC redujo la secreción de MIF a concentraciones de 3.5 y 7 mM en todas las líneas celulares estudiadas y no así el MitoTEMPO a 100 μ M, pues no mostró un efecto sobre la secreción de esta citocina (Gráfica 15). Lo anterior sugiere que las ERO totales tienen un rol fundamental en la secreción de MIF y no así las ERO mitocondriales. La Gráfica 15 muestra un experimento preliminar cuyo resultado deberá corroborarse en futuros experimentos.



Gráfica 15. El antioxidante NAC disminuyó la secreción de MIF en las líneas celulares de cáncer de mama. Se cuantificaron los niveles de la citocina MIF en condiciones control y con tratamiento antioxidante con NAC 3.5 y 7 mM, así como con MitoTEMPO 100 μ M por 24 horas, se observó que únicamente los tratamientos con NAC disminuyeron la secreción de MIF.

5.8 Las líneas TN secretan niveles elevados de IL-6 e IL-8.

La secreción de citocinas proinflamatorias tiene un papel importante en el origen y la progresión del cáncer, ya que muchas de ellas propician condiciones como la evasión al sistema inmune y los procesos inflamatorios que se relacionan con la carcinogénesis. Por ello, se cuantificó la secreción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-10, IL-8, IL-6, IL-12p70 y TNF- α al medio de cultivo de las líneas celulares MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549, en condiciones control por 24 horas, utilizando el BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, que permite detectar y cuantificar simultáneamente estas citocinas. En la figura 13 se muestran los citogramas correspondientes a cada línea celular.

Observamos que la línea celular MCF7 (ER+) parece no secretar citocinas proinflamatorias, a diferencia de las líneas TN, que muestran una alta secreción de IL-6 e IL-8. En el caso de la línea celular MDAMB468 únicamente se observó secreción de IL-8.

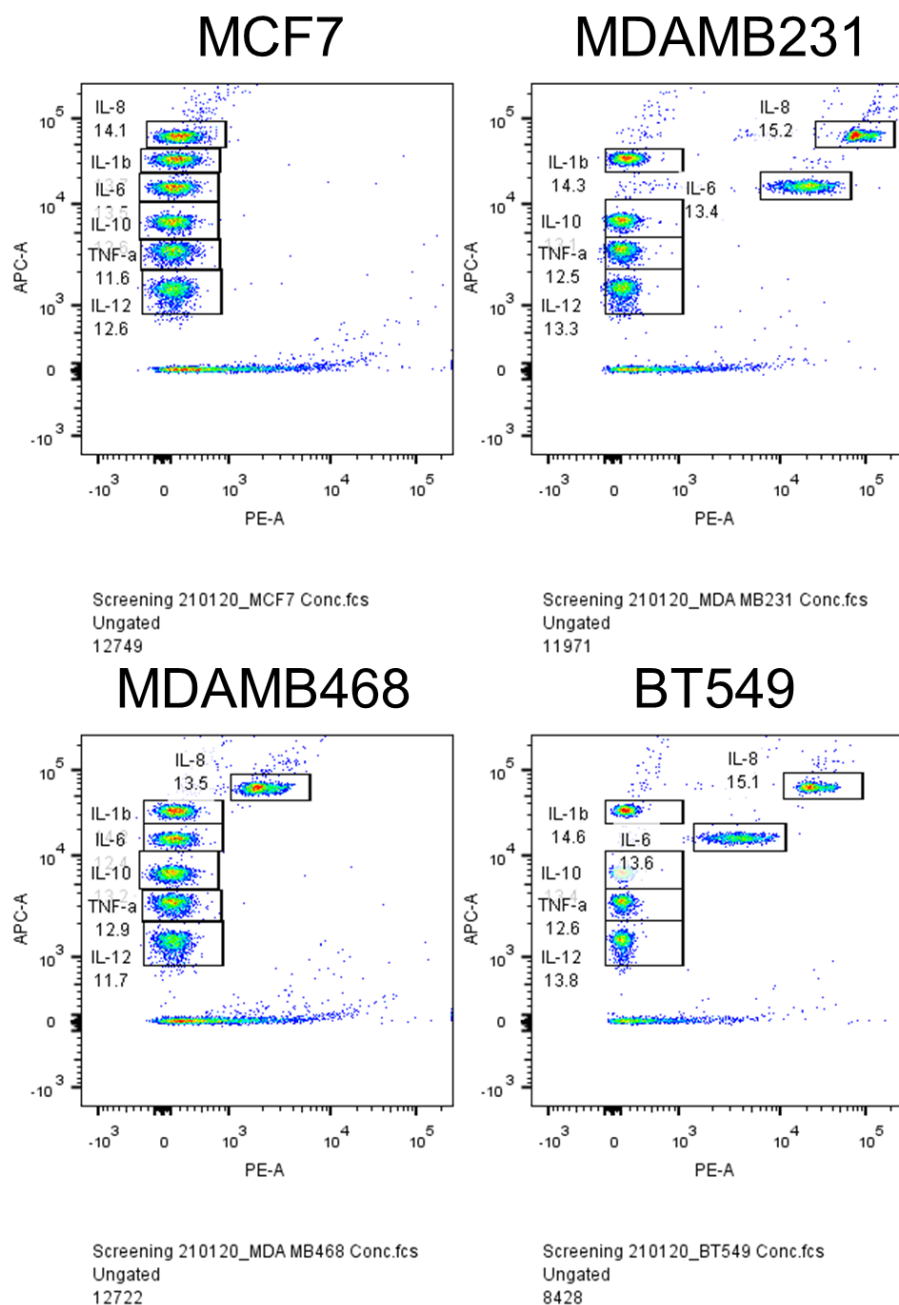
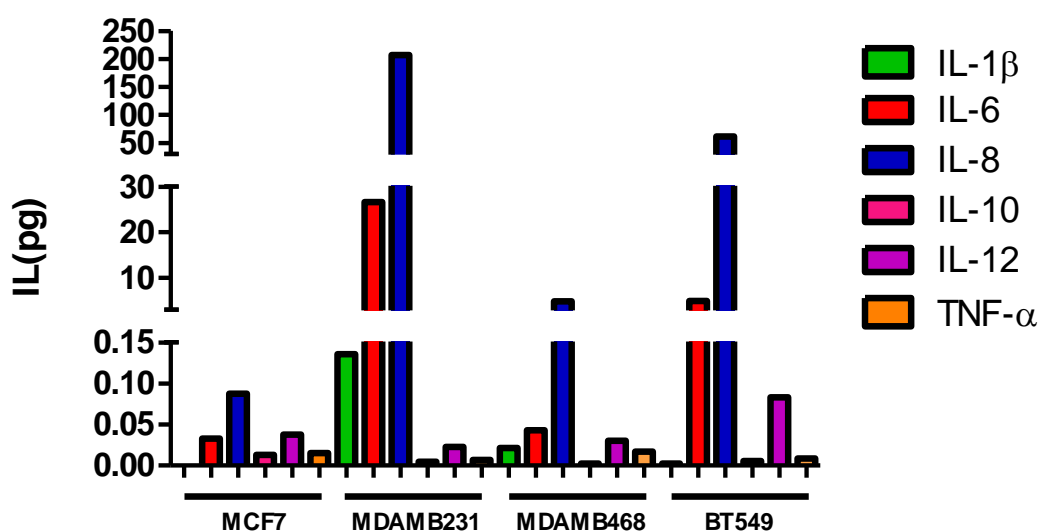


Figura 13. Las líneas celulares TN secretan interleucinas proinflamatorias de manera basal al medio de cultivo. La cuantificación de interleucinas proinflamatorias, mostró que las líneas TN secretan altos niveles de IL-6 e IL-8 y no así la línea ER+ (MCF7). La figura es representativa de un solo ensayo, en condiciones control.

La cuantificación de los datos en la figura 13 se muestra en la gráfica 16. Observamos un incremento de la secreción de IL-8 en las tres líneas celulares del subtipo TN al compararlas con la línea celular MCF7 (ER+). La IL-6 se encontró elevada únicamente en las líneas celulares MDAMB231 y BT549, sugiriendo heterogeneidad en el perfil inflamatorio entre las líneas celulares TN. Del mismo modo, la IL-1 β , se encontró elevada en el medio de cultivo de la línea celular MDAMB231 y no en las demás líneas celulares. La gráfica 16 muestra los datos de un sólo experimento que tendrán que corroborarse en futuros experimentos.



Gráfica 16. Las líneas TN secretan altos niveles de IL-6 e IL-8. La gráfica muestra que las líneas ER+ tienen un perfil bajo de interleucinas proinflamatorias, por otro lado, las TN muestran perfiles heterogéneos, ya que todas tienen altos niveles de IL-8 y solo la línea MDAMB231 y BT549 muestran altas tasas de IL-6. La gráfica representa los datos obtenidos de un solo experimento.

6. Discusión de resultados

Los niveles de ERO se han encontrado elevados en diferentes tipos de cáncer y éstos se han asociado al inicio del proceso carcinogénico, a la progresión tumoral, al proceso inflamatorio, al mantenimiento de las células cancerosas, la radio resistencia y la recurrencia de la enfermedad^{16, 178}. Se ha demostrado que los niveles elevados de ERO contribuyen a estos procesos facilitando la activación de vías de señalización involucradas en la supervivencia y la proliferación celular, y que pueden provocar daño oxidante a componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN, contribuyendo a la inestabilidad genómica y favoreciendo la carcinogénesis^{9, 179}. En este trabajo se encontró una notable diferencia entre los niveles basales de ERO totales de las líneas TN al compararlas con las líneas ER+ y NT (Figura 9, Gráficas 1 y 3), sugiriendo, que el estrés oxidante elevado que encontramos en las líneas celulares estudiadas podría estar asociado a la malignidad del subtipo TN de cáncer de mama. Además, las líneas celulares mostraron un efecto diferencial al tratamiento con agentes oxidantes ya que el tratamiento con H₂O₂ únicamente mostró efecto en la línea celular no tumorigénica y no en las líneas carcinogénicas (Gráfica 2). Al respecto, se ha propuesto que las células cancerosas pueden modular o amplificar su capacidad antioxidante para lograr un equilibrio redox diferente al de las células normales¹¹⁹.

En este contexto, se ha demostrado que la sobreproducción de ERO debido a la señalización oncogénica o alteraciones metabólicas dan como resultado una mayor capacidad antioxidante que puede mantener la señalización oncogénica mediada por ERO, permitiendo la progresión de la enfermedad y evitando la muerte celular⁹. Las rutas de señalización oncogénicas que se sabe que son activadas por ERO incluyen las rutas de señalización NF- κ B¹⁸⁰, NRF2, Wnt¹⁸¹ y EGFR¹⁸². Por otro lado, se ha demostrado que el incremento en ERO puede activar al gen supresor de tumores p53, el cual induce arresto en el ciclo celular, senescencia o apoptosis. De manera importante, las mutaciones en p53 son mutaciones prevalentes en cáncer de mama TN y se ha demostrado una pérdida de su función en la mayoría de los tumores del subtipo TN. Lo anterior permitiría a las células de este subtipo de cáncer sobrevivir a los altos niveles de ERO y mantener su señalización oncogénica.

La regulación positiva de los sistemas antioxidantes como respuesta adaptativa al estrés oxidante intrínseco de las células cancerosas, podría también contribuir a sus

características de malignidad y conferirles resistencia a los medicamentos cuya acción citotóxica se debe en parte a la inducción del estrés oxidante. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de factores de transcripción como NRF2 mediada por el incremento en ERO, conduce a la expresión aumentada de moléculas antioxidantes como SOD, CAT y TRX, así como mayor capacidad de desintoxicación de xenobióticos ^{183, 184}. En este trabajo no evaluamos la capacidad antioxidante de las células cancerosas con altos niveles de ERO, pero es una perspectiva interesante dado que la abrogación de estos mecanismos de adaptación podría ser una buena estrategia para atacar preferencialmente a las células neoplásicas. En la literatura, existe evidencia sobre el papel dual de las ERO en procesos neoplásicos y sobre el uso de antioxidantes durante la progresión y el tratamiento del cáncer. En las células normales o lesiones precancerosas, se ha propuesto que las ERO pueden inducir daño al ADN e incrementar el número de mutaciones oncogénicas, lo que sugiere que la suplementación dietética con antioxidantes podría suprimir el inicio o la progresión de algunos tipos de cáncer. Sin embargo, la evidencia sugiere que si bien el uso de antioxidantes puede suprimir el inicio del cáncer en algunos contextos, su uso puede incrementar la progresión del cáncer en otros ¹⁸⁵. Además, no se ha demostrado que el uso de antioxidantes en la dieta reduzca la incidencia de cáncer, de hecho la suplementación con antioxidantes en realidad ha aumentado la incidencia y la muerte por algunos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón ¹⁸⁶. En modelos de progresión de cáncer, también existe evidencia contradictoria con respecto al uso de antioxidantes para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, en un modelo murino de melanoma se encontró una población de células metastásicas con niveles de ERO citoplasmáticos y mitocondriales elevados y menor masa mitocondrial. En este trabajo se propuso que los altos niveles de oxidación son limitantes para el establecimiento de la metástasis, ya que el tratamiento con antioxidantes aumentó el número de células tumorales circulantes y el número de metástasis sin afectar el crecimiento del tumor ¹⁸⁷.

También, en un modelo de cáncer de pulmón en ratones, se demostró que el uso de antioxidantes como el NAC y la vitamina E, incrementaban el tamaño del tumor y disminuían el tiempo de supervivencia de los animales que tenían el tratamiento antioxidante con respecto a los que no se trataban ¹³⁰. Por otro lado, también existen evidencias que justifican el uso de antioxidantes para el tratamiento del cáncer. Al respecto, en otro estudio, se

descubrió que las células altamente metastásicas aumentaron la actividad mitocondrial y la producción de superóxido, por lo cual, en este caso, el tratamiento antioxidante disminuyó la migración y la invasividad, hecho que se atribuyó a la activación de Scr mediada por ERO en las células tumorales ¹⁸⁸. Así mismo, existen diversos trabajos en los cuales los tratamientos con antioxidantes de origen natural muestran propiedades antiproliferativas y proapoptóticas en líneas celulares de cáncer de mama humanas ¹⁸⁹. En el modelo de cáncer de ratón PyMT, los ratones con niveles disminuidos de glutatión provocado por una deficiencia en GCLM (subunidad catalítica de la glutamato cisteín ligasa) necesaria para la síntesis de glutatión o aquellos ratones tratados con BSO (L-butionina-S, R-sulfoxamida) para inhibir químicamente la síntesis de glutatión, mostraron una disminución en la carga tumoral. Así mismo, cuando se formaron los tumores en ratones PyMT Gclm-/- estos mostraron una menor proliferación y progresión tumoral ¹⁹⁰. Por lo tanto, en este modelo específico, las lesiones precancerosas necesitan el efecto antioxidante del glutatión para progresar a cáncer de seno, lo que argumentaría en contra del uso de antioxidantes para el tratamiento del cáncer mamario. Por otro lado, también en cáncer de mama, el tratamiento antioxidante disminuyó las lesiones de ADN y la tumorigénesis en un modelo murino de cáncer de mama p53 +/- deficiente en BRCA1, donde el metabolismo excesivo de estrógenos aumentó la producción de ERO en las células cancerosas y el daño en el ADN ¹⁹¹. Además, la eliminación de ERO por sobreexpresión de EcSOD exógena (superóxido dismutasa extracelular), disminuyó la invasión de células de cáncer de mama *in vitro* ¹⁹² y disminuyó la metástasis *in vivo* en modelos de ratones TNBC ¹⁹³. Además, el aumento de los niveles de ROS se ha asociado con mutaciones BRCA1 en este tipo de cáncer de mama ¹⁹⁴.

Cabe destacar que no únicamente encontramos niveles basales de ERO elevados en líneas celulares de cáncer de mama, sino también niveles diferentes entre ellas, que pueden asociarse al subtipo, lo que marca la pauta para pensar que las ERO pudieran emplearse a futuro como un biomarcador y podrían ser un blanco potencial en la terapia contra esta neoplasia, particularmente en el subtipo TN, que hasta hoy en día carece de un marcador de diagnóstico específico y de terapia dirigida. Nuestros datos demuestran niveles aumentados de ERO en las líneas TN en comparación con las líneas ER+ y no tumorigénica. Por esta razón, se evaluó el efecto de un oxidante (Gráfica 4) y un antioxidante (Gráfica 5) sobre estas líneas celulares, observando que las líneas TN muestran una alta susceptibilidad al

tratamiento antioxidante (Figura 10), contrario a lo observado en la línea ER+. Lo anterior sugiere que las células del subtipo TN, requieren de las ERO para mantener su estado protumorigénico, favoreciendo su sobrevivencia (Gráfica 6) y manteniendo la proliferación celular (Gráfica 7).

Para identificar la fuente de producción de ERO, se cuantificaron las ERO mitocondriales en las 5 líneas celulares, MCF10A, MCF7, MDAMB468, MDAMB231 y BT549, donde las ERO mitocondriales se encontraron elevadas en las líneas celulares TN al compararlas con la línea celular MCF7 (ER+), sugiriendo que éstas son la fuente principal de ERO en las líneas celulares de TN y no así en la línea ER+ (Figura 11, Gráfica 8). Interesantemente, al comparar los datos de ERO totales contra ERO mitocondriales, los resultados de las líneas celulares MDAMB231 y MDAMB468 evidenciaron la presencia de fuentes de ERO adicionales (Figura 12), que podrían estar contribuyendo al mantenimiento de las condiciones oxidativas y la señalización. Lo anterior pone de manifiesto la heterogeneidad de esta enfermedad, ya que las ERO en un mismo subtipo de cáncer de mama pueden tener diferente procedencia, ya sea de la mitocondria, como en el caso de la línea BT549 o de una fuente diferente, como podrían ser las proteínas NOX (NADPH oxidasas), las cuales se sabe están sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer incluido el cáncer de mama, específicamente las NOX1 y NOX5. Con base en esto, es importante remarcar que si las ERO tienen un papel importante para la sobrevivencia de estas células, conocer la fuente específica de cada una de ellas, ofrecerá la posibilidad de identificar un potencial blanco de terapia y proporcionar un tratamiento más dirigido. Con respecto a lo anterior, se ha asociado el incremento de ERO mitocondriales con la disfunción o daño mitocondrial, que a su vez se ha relacionado con un aumento en la proliferación, migración e invasión celular, contribuyendo a la carcinogénesis. Lo anterior se asocia a que las ERO mitocondriales regulan positivamente vías como la de PI3K y negativamente a su regulador negativo PTEN, lo cual incrementa la proliferación celular y disminuye la apoptosis. Las ERO también regulan positivamente a HIF-1 α ¹⁹⁵, así como la activación del inflammasoma NLRP3, que beneficiaría la secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β e IL-18.

Cabe destacar, que se proporcionó un tratamiento con Antimicina A, un inhibidor del complejo III de la cadena de transporte de electrones, con lo que se observó un incremento significativo en ERO mitocondriales en las líneas MCF10A, MCF7 y MDAMB231, pero no

en las líneas MDAMB468 y BT549 (Gráfica 9). Lo anterior evidencia aún más, la procedencia de las ERO en las líneas TN y sugiere distintas respuestas ante estímulos oxidantes mitocondriales además de un posible daño en el complejo III de las líneas celulares MDAMB468 y BT549 que impide observar respuesta al tratamiento con Antimicina A y que es probablemente el responsable de la producción de ERO mitocondriales en estas dos líneas celulares. En función a este hallazgo, es importante mencionar que al igual que para ERO totales, existen reportes en distintas neoplasias que sugieren que los altos niveles de ERO producidos en la mitocondria se equilibran por un incremento en antioxidantes mitocondriales, lo que les permite sobrevivir a estos niveles de ERO y evadir la muerte celular, incluso si se proporcionan estímulos oxidantes adicionales. Por ejemplo, en un modelo en el que se emplearon líneas celulares de cáncer de colon y pulmón, se demostró que la SOD mitocondrial (Mn-SOD) se incrementó como mecanismo de defensa en respuesta a la elevación de ERO mitocondriales inducida por la irradiación γ y que esta sobreexpresión de Mn-SOD era esencial para la invasión y metástasis de células cancerosas ¹⁹⁶. De hecho, se ha documentado que la sobreexpresión de la Mn-SOD, parece ser una característica en diferentes tipos de cáncer, especialmente en etapas avanzadas con características metastásicas, que incluyen el cáncer de pulmón, colón, gástrico, tiroides y mama ¹⁹⁷. Por otro lado, se sabe que muchos tumores que muestran mutaciones en el ADN mitocondrial (mtADN) que inhiben parcialmente la fosforilación oxidativa, incrementan los niveles de ERO mitocondriales contribuyendo a la tumorigenicidad. Por ejemplo, en un modelo murino de cáncer de próstata, en el que se introdujo una mutación que bloqueaba parcialmente la cadena de transporte de electrones y otras mutaciones que bloqueaban la citocromo oxidasa, se observó una tasa de crecimiento tumoral aumentada, que los autores asociaron a un incremento en ERO mitocondriales ¹⁹⁸. Por lo cual podríamos pensar, que las líneas celulares TN que utilizamos, podrían tener alguna mutación a nivel del complejo III de la cadena de transporte de electrones o bien una alta expresión de Mn-SOD, lo que explicaría sus altos niveles de ERO mitocondriales y la pobre respuesta ante el estímulo con Antimicina A. Las hipótesis anteriores deberán demostrarse en experimentos posteriores.

Debido a que se demostró que las líneas TN tienen como fuente principal de ERO a la mitocondria, se utilizó NAC como antioxidante general y un inhibidor específico de ERO mitocondriales (MitoTEMPO), con los cuales fue posible disminuir los niveles basales de

ERO totales (Gráfica 10) y mitocondriales (Gráfica 11). Posteriormente, se estudió el efecto sobre la muerte y proliferación celular con ambos tratamientos. El tratamiento con MitoTEMPO, no indujo muerte celular (Gráfica 12) y no disminuyó la proliferación celular (Gráfica 13) a 24 y 48 horas, contrario a los tratamientos con el antioxidante general (NAC), el cual incrementó la muerte celular y disminuyó la proliferación con diferencias significativas a 48 horas. Con respecto a esto, se ha reportado que las ERO mitocondriales son importantes para la regulación de la proliferación celular tanto en condiciones normales y de carcinogénesis ¹⁹⁹, lo cual se ha asociado a la acumulación de mutaciones originadas por el daño a mtADN oxidado²⁰⁰. Así mismo se han asociado las altas tasas de ERO mitocondriales a la resistencia a fármacos antineoplásicos ²⁰¹ y al incremento en la invasión y metástasis en diferentes tipos de cáncer ¹⁸⁸.

Sin embargo, es importante destacar que se ha documentado que el incremento en ERO mitocondriales, tiene un papel dual en el cáncer, ya que pueden ser tanto benéficas como dañinas en distintas neoplasias ²⁰⁰. Por ejemplo, en un modelo de carcinoma epidermoide humano, en el cual se probó el fotosensibilizador ftalocianina Pc4, que es un fármaco que se une preferentemente a orgánulos como las mitocondrias y que contribuye a fotosensibilizar a las células, los autores describen que la combinación de Pc4 con la terapia fotodinámica, indujo un incremento en ERO mitocondriales, conduciendo a la despolarización mitocondrial, permeabilización de la membrana interna e hinchazón mitocondrial, desencadenando la liberación del citocromo C y la escisión de la PARP, dando como resultado muerte celular por apoptosis. Además, los autores demostraron que al usar un inhibidor de radicales libres (desferrioxamina), se evitaron todos estos eventos, demostrando que la generación de ERO mitocondriales inducida por la terapia fotodinámica, activaba la vía mitocondrial o intrínseca de la apoptosis ²⁰².

Contrariamente, se demostró que las ERO mitocondriales elevadas, favorecieron la migración, invasión, clonogenicidad y metástasis en distintas líneas celulares de cáncer. En este trabajo, se demostró que aquellas células que presentaban una inhibición parcial de la cadena de transporte de electrones, mostraban una mayor producción de superóxido mitocondrial y esto incrementó la metástasis. En consecuencia, la eliminación del superóxido mitocondrial con el antioxidante MitoTEMPO bloqueó la migración de células tumorales y evitó la metástasis en modelos de cáncer murinos y humanos ¹⁸⁸. Lo anterior, sugiere que el

efecto que las ERO mitocondriales pueden tener, depende del tipo de célula, de las mutaciones presentes y que probablemente tengan un papel importante en un proceso en concreto, por ejemplo en la migración y metástasis. Nuestros datos no muestran cambios significativos en la muerte y proliferación celular, sin embargo, sería importante evaluar otras características asociadas al cáncer como la migración, la invasión o metástasis.

En este trabajo también se evaluó el efecto de los antioxidantes sobre la secreción del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). MIF es una citocina proinflamatoria y protumorigénica cuya secreción se encontró incrementada en células del subtipo TN (Gráfica 14), lo que podría conferirle a este subtipo de cáncer por lo menos algunas de sus características de malignidad. Al respecto, un incremento en MIF se ha asociado a la tumorigénesis, angiogénesis y metástasis. Además, se han encontrado tasas elevadas de esta citocina en diferentes neoplasias como el cáncer de colon, gástrico, cérvix, pulmón y mama¹⁶⁰. En este sentido, observamos que el tratamiento antioxidante con NAC 3.5 y 7 mM disminuyó los niveles de secreción de esta citocina en todas las líneas celulares estudiadas (Gráfica 15). Lo anterior, sugiere un mecanismo general de regulación de la secreción de MIF mediada por ERO independientemente del subtipo celular. De manera importante, estas mismas concentraciones de NAC indujeron muerte celular y una disminución en la proliferación celular en las líneas celulares del subtipo TN (Gráficas 12 y 13), sugiriendo una posible relación entre la secreción de MIF y el mantenimiento de la sobrevivencia en estas líneas celulares.

En relación a esto, se sabe que las ERO, pueden regular o modular la secreción de citocinas, principalmente inflamatorias, y también se sabe que una de las funciones proinflamatorias de MIF involucra un aumento en la secreción de otras citocinas proinflamatorias. Lo anterior nos llevó a evaluar también los niveles de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α y IL-12p70, ya que se ha observado que varias de éstas tienen un papel importante en la progresión tumoral en diversos tipos de cáncer. De hecho, existe una correlación entre la inflamación crónica y el inicio del cáncer, en la cual, la secreción de este tipo de citocinas tiene un papel crucial²⁰³⁻²⁰⁵.

Nuestros datos muestran claramente que el subtipo TN tiene una tendencia a secretar citocinas proinflamatorias, ya que además de MIF, encontramos una elevada secreción de IL-6 e IL-8, lo que también correlaciona con sus altos niveles de ERO (Gráfica 16).

Con respecto a lo anterior, se ha demostrado en modelos de cáncer de mama que la secreción de MIF tiene un importante papel en la proliferación celular, de hecho, en estudios en los cuales se inhibe a MIF o a sus receptores, se demostró que se puede bloquear la proliferación celular de manera importante. Además, se mostró que la migración y la invasión de células de cáncer de mama mejoran notablemente cuando se añade MIF recombinante, y también se ha encontrado que niveles séricos elevados de MIF en las pacientes con cáncer mamario es de mal pronóstico ¹⁵⁵.

Otras citocinas que sin duda, juegan un papel importante en el cáncer de mama son la IL-6 e IL-8, ambas se han encontrado en niveles elevados en sueros de pacientes con cáncer de mama y han encontrado una correlación con un mal diagnóstico para las pacientes ²⁰⁶. La desregulación de IL-6 se ha asociado con la activación de diferentes vías de señalización, en las que destacan las vías de JAK/STAT, MAPKs, PI3K y NF-kB que son vías que al sobreactivarse, favorecen la tumorigénesis ¹⁴⁴. Además, se ha observado que al suprimir la secreción de la misma o tras bloquear a su receptor, se produce una notable reducción en la proliferación, la migración, la angiogénesis y metástasis, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* ¹⁴⁵. También se ha descrito que las células TN requieren de la expresión autocrina simultánea de IL-6 e IL-8 debido a que su coexpresión es necesaria para el crecimiento de tumores de xenoinjerto ¹⁴⁶ y que su inhibición ya sea por métodos farmacológicos o genéticos reduce la supervivencia celular, la formación de colonias *in vitro*, así como el crecimiento de tumores xenoinjertados en modelos *in vivo* ¹⁴⁷. También se le ha atribuido a la IL-6 un incremento a la resistencia a fármacos en modelos de cáncer de mama, en este trabajo los autores discuten que la IL-6 es producida de manera autocrina por las células cancerosas, lo que le confiere resistencia al tratamiento farmacológico. En este trabajo utilizaron la línea celular MCF7, y no encontraron secreción de IL-6, contrariamente en una línea celular MCF7ADR resistente a múltiples fármacos, se hallaron tasas elevadas de IL-6 y demostraron que la secreción de la misma induce la expresión génica de MDR1, una proteína asociada con la resistencia a distintos quimioterapéuticos ²⁰⁷. Otro aspecto importante en el que la IL-6 se encuentra involucrada, en la transición epitelio mesenquimal, ya que en modelos de cáncer de mama se ha establecido una correlación entre el incremento de esta citocina con la pérdida de marcadores epiteliales como e-cadherina y el incremento de marcadores mesenquimales como vimentina, en líneas celulares positivas a receptores

hormonales como las MCF7 y T47D. En este trabajo, se demostró que la señalización sostenida de IL-6 activó de manera constitutiva la vía de señalización STAT3, que es un factor de transcripción que puede transactivar a genes relacionados con la transición epitelio mesenquimal como TWIST, lo cual establece una correlación entre las altas tasas de IL-6 y un incremento en la migración e invasión de células cancerosas ²⁰⁸.

Con respecto a la IL-8, existe evidencia de que se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de endometrio, vejiga y colon. También, se ha establecido que los niveles séricos de IL-8 pueden ser útiles como biomarcador en etapas tempranas y para monitorear la progresión del cáncer de colon y melanoma. En cáncer de mama la sobreexpresión de IL-8 está asociada a una mayor invasividad y angiogénesis ¹⁴⁸, en específico en cáncer de mama triple negativo se ha encontrado una elevada expresión de esta citocina y se correlaciona con un mal pronóstico, ya que favorece la proliferación, la supervivencia y la migración de células neoplásicas. Cabe destacar que la secreción constante de la IL-8 está regulada por la vía de señalización NF- κ B, misma que se encuentra expresada constitutivamente en células y tejidos TN ¹⁴⁹. El mecanismo por el cual la IL-8 favorece la carcinogénesis, responde a la activación de sus receptores CXCR1 y CXCR2, posteriormente favorecen la activación de vías de señalización relacionadas con la tumorigénesis como la vía de PI3K, MAPKs y STAT3 ¹⁵¹. En cáncer de mama TN el incremento de esta interleucina se ha relacionado con la adquisición de características mesenquimales, a la agresividad, a la resistencia a las terapias y al reclutamiento de células inmunosupresoras en el sitio del tumor. De hecho, se ha demostrado que el bloqueo de la IL-8 con anticuerpos Hu-Max-IL8 revierte las características mesenquimales, disminuye el reclutamiento de células inmunosupresoras y sensibiliza a las células neoplásicas a la lisis mediada por células asesinas naturales, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* ²⁰⁹. Cabe destacar que nuestros datos muestran que las líneas TN, secretan altos niveles de las citocinas proinflamatorias MIF, IL-6 e IL-8 y que esto puede estar regulado por la alta tasa de ERO encontradas particularmente en el subtipo TN, por lo cual se podría sugerir a las ERO como un posible biomarcador para este subtipo de cáncer que se diagnostica por ausencia de marcadores, o como un blanco de terapia para el subtipo TN, que carece de terapia dirigida.

Por todo lo anterior, podemos decir que nuestros datos explican controversias en la literatura sobre el uso de antioxidantes para la terapia contra el cáncer y proponemos que los tratamientos con antioxidantes sólo deberán utilizarse en aquellas células cancerosas con altos niveles basales de ERO, que probablemente usen estas condiciones prooxidantes para mantener su señalización oncogénica. Nuestros resultados también sugieren que se podría usar un enfoque similar en aquellos tipos de cáncer que han demostrado tener niveles de oxidación aumentados o mecanismos de transformación similares al TN (por ejemplo, la inactivación BRCA1, pérdida de RB1, la inactivación de TP53 o amplificaciones en la vía MAPK)²¹⁰. Con respecto a esto, se ha demostrado que los carcinomas de ovario seroso tienen un perfil de mutación y expresión similar al cáncer de mama TN²¹⁰ y también se ha manifestado un estado prooxidante para este tipo de cáncer²¹¹, lo que indicaría un uso potencial para el tratamiento antioxidante. Otros tipos de cáncer que también se han caracterizado por el aumento de los niveles de oxidación y en los que se ha propuesto un papel de ERO en la promoción de malignidad incluyen el cáncer de próstata²¹², gástrico²¹³,²¹⁴ y pancreático²¹⁵.

CAPITULO IV.
CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- Los niveles altos de ERO parecen ser necesarios para el mantenimiento y la supervivencia del subtipo de cáncer TN.
- Las ERO o productos de oxidación en células cancerosas podrían tener un alto potencial como biomarcadores de malignidad en el cáncer de mama TN.
- Los datos obtenidos explican las controversias en la literatura con respecto al uso de antioxidantes para la terapia del cáncer y proponemos que los tratamientos con antioxidantes sólo se utilicen en aquellas células con altos niveles de ERO basales, condición que probablemente utilicen para mantener su señalización oncogénica.
- Los datos sugieren que es posible inhibir o modular la secreción de citocinas proinflamatorias mediante el uso de antioxidantes y que esto podría afectar las características de malignidad en el subtipo TN.
- Nuestros resultados indican que las ERO pueden ser un atractivo blanco de terapia para el cáncer de mama TN, que actualmente tiene el peor pronóstico entre todos los cánceres de mama y sigue siendo el único subtipo de cáncer de mama que carece de una terapia dirigida.
- Los antioxidantes generales como el NAC, inhiben las ERO y la secreción de citocinas como MIF y esto tiene un papel importante en la supervivencia y la proliferación celular.
- Las ERO mitocondriales, parecen no tener un papel importante en el modelo de cáncer de mama TN, por lo cual será importante evaluar a futuro, un inhibidor de NOX y/o el papel de las ERO mitocondriales en algunas otras características relacionadas con el cáncer como la migración e invasión.

7. Perspectivas

- Evaluar el efecto de los antioxidantes N-acetilcisteína y MitoTEMPO sobre la secreción proinflamatorias en las líneas celulares MCF7, MDAMB231, MDAMB468 y BT549, es decir completar aquellos experimentos que quedaron inconclusos, lo que nos permitiría corroborar la totalidad de nuestros datos y comprobar las hipótesis propuestas.
- Evaluar mediante inmunohistoquímica el marcador de estrés oxidante 8-Oxo-dG, en muestras de pacientes con cáncer de mama y establecer si existe una correlación entre los niveles de este marcador y el subtipo celular, para proponer el incremento en ERO como un biomarcador para el subtipo TN.
- Evaluar con los antioxidantes NAC y MitoTEMPO otras características relacionadas con el cáncer, como la migración e invasión, con la finalidad de determinar si las ERO totales y/o mitocondriales tienen efecto sobre una característica específica del cáncer.

Referencias

1. OMS, IARC. Globocan 2018. 2019.
2. Barnard, M. E.; Boeke, C. E.; Tamimi, R. M., Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **2015**, *1856* (1), 73-85.
3. Coughlin, S. S., Social determinants of breast cancer risk, stage, and survival. *Breast cancer research and treatment* **2019**, 1-12.
4. Waks, A. G.; Winer, E. P., Breast cancer treatment: a review. *Jama* **2019**, *321* (3), 288-300.
5. Dai, X.; Li, T.; Bai, Z.; Yang, Y.; Liu, X.; Zhan, J.; Shi, B., Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research* **2015**, *5* (10), 2929.
6. Zorov, D. B.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J., Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews* **2014**, *94* (3), 909-950.
7. Mateen, S.; Moin, S.; Khan, A. Q.; Zafar, A.; Fatima, N., Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PloS one* **2016**, *11* (4), e0152925.
8. Hung, C. H.-L.; Cheng, S. S.-Y.; Cheung, Y.-T.; Wuwongse, S.; Zhang, N. Q.; Ho, Y.-S.; Lee, S. M.-Y.; Chang, R. C.-C., A reciprocal relationship between reactive oxygen species and mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Redox biology* **2018**, *14*, 7-19.
9. Moloney, J. N.; Cotter, T. G. In *ROS signalling in the biology of cancer*, Seminars in cell & developmental biology, Elsevier: 2018; pp 50-64.
10. Prasad, S.; Gupta, S. C.; Tyagi, A. K., Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett* **2017**, *387*, 95-105.
11. Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; Wu, D.; Liu, Y.; Dong, W., ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2016**, *2016*.
12. Li, G.; Lee, L. S.; Li, M.; Tsao, S. W.; Chiu, J. F., Molecular changes during arsenic-induced cell transformation. *Journal of cellular physiology* **2011**, *226* (12), 3225-3232.
13. Mohapatra, P.; Preet, R.; Das, D.; Satapathy, S. R.; Siddharth, S.; Choudhuri, T.; Wyatt, M. D.; Kundu, C. N., The contribution of heavy metals in cigarette smoke condensate to malignant transformation of breast epithelial cells and in vivo initiation of neoplasia through induction of a PI3K–AKT–NFκB cascade. *Toxicology and applied pharmacology* **2014**, *274* (1), 168-179.
14. Nguyen, P. M.; Putoczki, T. L., Could the inhibition of IL-17 or IL-18 be a potential therapeutic opportunity for gastric cancer? *Cytokine* **2019**, *118*, 8-18.
15. Tulotta, C.; Ottewill, P., The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocrine-related cancer* **2018**, *25* (7), R421-R434.
16. Gu, H.; Huang, T.; Shen, Y.; Liu, Y.; Zhou, F.; Jin, Y.; Sattar, H.; Wei, Y., Reactive oxygen species-mediated tumor microenvironment transformation: the mechanism of radioresistant gastric cancer. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2018**, *2018*.
17. Polyak, K., Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of clinical investigation* **2011**, *121* (10), 3786-3788.
18. Jiang, G.; Zhang, S.; Yazdanparast, A.; Li, M.; Pawar, A. V.; Liu, Y.; Inavolu, S. M.; Cheng, L., Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. *BMC genomics* **2016**, *17* (7), 525.

19. Tsang, J.; Tse, G. M., Molecular classification of breast cancer. *Advances in Anatomic Pathology* **2020**, *27* (1), 27-35.
20. Lambertini, M.; Santoro, L.; Del Mastro, L.; Nguyen, B.; Livraghi, L.; Ugolini, D.; Peccatori, F. A.; Azim Jr, H. A., Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer treatment reviews* **2016**, *49*, 65-76.
21. Rousset-Jablonski, C.; Gompel, A., Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer. *Maturitas* **2017**, *105*, 69-77.
22. Torres-Mejía, G.; Ángeles-Llerenas, A., Factores reproductivos y cáncer de mama: principales hallazgos en América Latina y el mundo. *salud pública de méxico* **2009**, *51*, s165-s171.
23. Sun, Y.-S.; Zhao, Z.; Yang, Z.-N.; Xu, F.; Lu, H.-J.; Zhu, Z.-Y.; Shi, W.; Jiang, J.; Yao, P.-P.; Zhu, H.-P., Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences* **2017**, *13* (11), 1387.
24. Engin, A., Obesity-associated breast cancer: analysis of risk factors. In *Obesity and lipotoxicity*, Springer: 2017; pp 571-606.
25. Hecht, S. S., Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and molecular mutagenesis* **2002**, *39* (2-3), 119-126.
26. Gankhuyag, N.; Lee, K.-H.; Cho, J.-Y., The role of Nitrosamine (NNK) in breast cancer carcinogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **2017**, *22* (3), 159-170.
27. Senkus, E.; Kyriakides, S.; Ohno, S.; Penault-Llorca, F.; Poortmans, P.; Rutgers, E.; Zackrisson, S.; Cardoso, F., Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology* **2015**, *26* (suppl_5), v8-v30.
28. Murray, S.; Briasoulis, E.; Linardou, H.; Bafaloukos, D.; Papadimitriou, C., Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer treatment reviews* **2012**, *38* (7), 890-903.
29. Szulawska, A.; Czyz, M., Molecular mechanisms of anthracyclines action. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej (Online)* **2006**, *60*, 78-100.
30. Isakoff, S. J., Triple negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* **2010**, *16* (1), 53.
31. Zhou, J.; Zhong, Y., Breast cancer immunotherapy. *Cell Mol Immunol* **2004**, *1* (4), 247-55.
32. Pohlmann, P. R.; Mayer, I. A.; Mernaugh, R., Resistance to trastuzumab in breast cancer. *Clinical cancer research* **2009**, *15* (24), 7479-7491.
33. Showalter, A.; Limaye, A.; Oyer, J. L.; Igarashi, R.; Kittipatarin, C.; Copik, A. J.; Khaled, A. R., Cytokines in immunogenic cell death: applications for cancer immunotherapy. *Cytokine* **2017**, *97*, 123-132.
34. Ahmad, G.; Almasry, M.; Dhillon, A. S.; Abuayyash, M. M.; Kothandaraman, N.; Cakar, Z., Overview and Sources of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Reproductive System. In *Oxidative Stress in Human Reproduction*, Springer: 2017; pp 1-16.
35. Ray, P. D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* **2012**, *24* (5), 981-990.
36. Breitenbach, M.; Rinnerthaler, M.; Weber, M.; Breitenbach-Koller, H.; Karl, T.; Cullen, P.; Basu, S.; Haskova, D.; Hasek, J., The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **2018**, *168* (11-12), 286-299.

37. Ding, S.; Li, C.; Cheng, N.; Cui, X.; Xu, X.; Zhou, G., Redox regulation in cancer stem cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2015**, 2015.
38. Halliwell, B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* **2006**, 141 (2), 312-322.
39. Pedraza Chaverri, J.; Cárdenas Rodríguez, N., Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educacion química* **2006**, 17 (2), 164-173.
40. Rodríguez Cardenas, N., Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. **2019**.
41. Maier, C. M.; Chan, P. H., Book review: role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist* **2002**, 8 (4), 323-334.
42. Sohal, R. S.; Dubey, A., Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* **1994**, 16 (5), 621-626.
43. Lushchak, V. I., Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI journal* **2014**, 13, 922.
44. Halliwell, B.; Cross, C. E., Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives* **1994**, 102 (suppl 10), 5-12.
45. Block, K.; Gorin, Y., Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. *Nature Reviews Cancer* **2012**, 12 (9), 627.
46. Dikalov, S., Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, 51 (7), 1289-1301.
47. Galluzzi, L.; Morselli, E.; Kepp, O.; Vitale, I.; Rigoni, A.; Vacchelli, E.; Michaud, M.; Zischka, H.; Castedo, M.; Kroemer, G., Mitochondrial gateways to cancer. *Molecular aspects of medicine* **2010**, 31 (1), 1-20.
48. Tahara, E. B.; Navarete, F. D.; Kowaltowski, A. J., Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, 46 (9), 1283-1297.
49. Bigarella, C. L.; Liang, R.; Ghaffari, S., Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* **2014**, 141 (22), 4206-4218.
50. Liu, Z.; Celotto, A. M.; Romero, G.; Wipf, P.; Palladino, M. J., Genetically encoded redox sensor identifies the role of ROS in degenerative and mitochondrial disease pathogenesis. *Neurobiology of disease* **2012**, 45 (1), 362-368.
51. Jitschin, R.; Hofmann, A. D.; Bruns, H.; Gießl, A.; Bricks, J.; Berger, J.; Saul, D.; Eckart, M. J.; Mackensen, A.; Mougiakakos, D., Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **2014**, 123 (17), 2663-2672.
52. Dakubo, G.; Parr, R.; Costello, L.; Franklin, R.; Thayer, R., Altered metabolism and mitochondrial genome in prostate cancer. *Journal of clinical pathology* **2006**, 59 (1), 10-16.
53. Hart, P. C.; Mao, M.; De Abreu, A. L. P.; Ansenberger-Fricano, K.; Ekoue, D. N.; Ganini, D.; Kajdacsy-Balla, A.; Diamond, A. M.; Minshall, R. D.; Consolaro, M. E., MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nature communications* **2015**, 6 (1), 1-14.
54. Wind, S.; Beuerlein, K.; Eucker, T.; Mueller, H.; Scheurer, P.; Armitage, M. E.; Ho, H.; Schmidt, H.; Wingler, K., Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *British journal of pharmacology* **2010**, 161 (4), 885-898.
55. Skonieczna, M.; Hejmo, T.; Poterala-Hejmo, A.; Cieslar-Pobuda, A.; Buldak, R. J., NADPH oxidases: insights into selected functions and mechanisms of action in cancer and stem cells. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2017**, 2017.

56. Battelli, M. G.; Polito, L.; Bortolotti, M.; Bolognesi, A., Xanthine oxidoreductase in cancer: more than a differentiation marker. *Cancer medicine* **2016**, *5* (3), 546-557.
57. Banskota, S.; Regmi, S. C.; Kim, J.-A., NOX1 to NOX2 switch deactivates AMPK and induces invasive phenotype in colon cancer cells through overexpression of MMP-7. *Molecular cancer* **2015**, *14* (1), 123.
58. Liu, X.; Pei, C.; Yan, S.; Liu, G.; Liu, G.; Chen, W.; Cui, Y.; Liu, Y., NADPH oxidase 1-dependent ROS is crucial for TLR4 signaling to promote tumor metastasis of non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* **2015**, *36* (3), 1493-502.
59. Holmström, K. M.; Finkel, T., Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* **2014**, *15* (6), 411-421.
60. Gisbert, J. P.; Pajares, J. M., Ciclooxigenasa 2 (COX-2), Helicobacter pylori y cáncer gástrico. *Medicina Clínica* **2003**, *120* (5), 189-193.
61. Castells, A.; Balaguer, F.; Gonzalo, V.; Castellví-Bel, S., Ciclooxigenasa 2 y cáncer colorrectal: implicaciones terapéuticas. *Gastroenterología y hepatología* **2007**, *30* (5), 280-284.
62. Roca-Ferrer, J.; Pujols, L.; Agusti, C.; Xaubet, A.; Mullol, J.; Gimferrer, J. M.; Picado, C., La ciclooxigenasa-2 está regulada al alza en el pulmón y en los tumores bronquiales de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Archivos de Bronconeumología* **2011**, *47* (12), 584-589.
63. Trujillo, M. C. B.; Tovar, A. P., Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Revista Colombiana de Anestesiología* **2008**, *36* (1), 45-52.
64. Zangar, R. C.; Davydov, D. R.; Verma, S., Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology* **2004**, *199* (3), 316-331.
65. Danielson, P., The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current drug metabolism* **2002**, *3* (6), 561-597.
66. Bae, Y. S.; Oh, H.; Rhee, S. G.; Do Yoo, Y., Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells* **2011**, *32* (6), 491-509.
67. Cárdenas-Rodríguez, N.; Coballase-Urrutia, E.; Pérez-Cruz, C.; Montesinos-Correa, H.; Rivera-Espinosa, L.; Sampieri, A.; Carmona-Aparicio, L., Relevance of the glutathione system in temporal lobe epilepsy: evidence in human and experimental models. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2014**, *2014*.
68. Sies, H., Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox biology* **2017**, *11*, 613-619.
69. Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller Jr, F. J.; Krause, K.-H., Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly* **2012**, *142*, w13659.
70. Miao, L.; Clair, D. K. S., Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, *47* (4), 344-356.
71. Glorieux, C.; Calderon, P. B., Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological chemistry* **2017**, *398* (10), 1095-1108.
72. Chakravarti, R.; Gupta, K.; Majors, A.; Ruple, L.; Aronica, M.; Stuehr, D. J., Novel insights in mammalian catalase heme maturation: effect of NO and thioredoxin-1. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *82*, 105-113.
73. Zhang, J.; Li, X.; Han, X.; Liu, R.; Fang, J., Targeting the thioredoxin system for cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences* **2017**, *38* (9), 794-808.

74. Lu, J.; Holmgren, A., The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine* **2014**, *66*, 75-87.
75. Kurutas, E. B., The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal* **2015**, *15* (1), 71.
76. Nowicka, B.; Kruk, J., Vitamin E-occurrence, biosynthesis by plants and functions in human nutrition. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2017**, *17* (12), 1039-1052.
77. Páramo, A. J.; Orbe, M. J.; Rodríguez, J. A., Papel de los antioxidantes en la prevención de la enfermedad cardiovascular. *Medicina Clínica* **2001**, *116* (16), 629-635.
78. Singh, A.; Kukreti, R.; Saso, L.; Kukreti, S., Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* **2019**, *24* (8), 1583.
79. Jena, N., DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *Journal of biosciences* **2012**, *37* (3), 503-517.
80. Nissanka, N.; Moraes, C. T., Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS letters* **2018**, *592* (5), 728-742.
81. Lood, C.; Blanco, L. P.; Purmalek, M. M.; Carmona-Rivera, C.; De Ravin, S. S.; Smith, C. K.; Malech, H. L.; Ledbetter, J. A.; Elkon, K. B.; Kaplan, M. J., Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature medicine* **2016**, *22* (2), 146.
82. Mitchell, S.; Vargas, J.; Hoffmann, A., Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **2016**, *8* (3), 227-241.
83. Oeckinghaus, A.; Ghosh, S., The NF-κB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2009**, *1* (4), a000034.
84. Häcker, H.; Karin, M., Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. Stoke* **2006**, *2006* (357), re13-re13.
85. Dolcet, X.; Llobet, D.; Pallares, J.; Matias-Guiu, X., NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows archiv* **2005**, *446* (5), 475-482.
86. Li, F.; Zhang, J.; Arfuso, F.; Chinnathambi, A.; Zayed, M.; Alharbi, S. A.; Kumar, A. P.; Ahn, K. S.; Sethi, G., NF-κB in cancer therapy. *Archives of toxicology* **2015**, *89* (5), 711-731.
87. Tilborghs, S.; Corthouts, J.; Verhoeven, Y.; Arias, D.; Rolfo, C.; Trinh, X. B.; Van Dam, P. A., The role of nuclear factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* **2017**, *120*, 141-150.
88. Bennett, L.; Quinn, J.; McCall, P.; Mallon, E. A.; Horgan, P. G.; McMillan, D. C.; Paul, A.; Edwards, J., High IKKα expression is associated with reduced time to recurrence and cancer specific survival in oestrogen receptor (ER)-positive breast cancer. *International journal of cancer* **2017**, *140* (7), 1633-1644.
89. Ling, J.; Kumar, R., Crosstalk between NFκB and glucocorticoid signaling: a potential target of breast cancer therapy. *Cancer letters* **2012**, *322* (2), 119-126.
90. Jana, A.; Krett, N. L.; Guzman, G.; Khalid, A.; Ozden, O.; Staudacher, J. J.; Bauer, J.; Baik, S. H.; Carroll, T.; Yazici, C., NFκB is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget* **2017**, *8* (23), 37377.
91. Wei, T.-Y. W.; Wu, P.-Y.; Wu, T.-J.; Hou, H.-A.; Chou, W.-C.; Teng, C.-L. J.; Lin, C.-R.; Chen, J.-M. M.; Lin, T.-Y.; Su, H.-C., Aurora A and NF-κB survival pathway drive chemoresistance in acute myeloid leukemia via the TRAF-interacting protein TIFA. *Cancer research* **2017**, *77* (2), 494-508.
92. Schoonbroodt, S.; Ferreira, V.; Best-Belpomme, M.; Boelaert, J. R.; Legrand-Poels, S.; Korner, M.; Piette, J., Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the

carboxyl-terminal PEST domain of I κ B α in NF- κ B activation by an oxidative stress. *The Journal of Immunology* **2000**, *164* (8), 4292-4300.

93. Chen, C.-H.; Cheng, T.-H.; Lin, H.; Shih, N.-L.; Chen, Y.-L.; Chen, Y.-S.; Cheng, C.-F.; Lian, W.-S.; Meng, T.-C.; Chiu, W.-T.; Chen, J.-J., Reactive oxygen species generation is involved in epidermal growth factor receptor transactivation through the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase in endothelin-1 signaling pathway in rat cardiac fibroblasts. *Mol Pharmacol* **2006**, *69* (4), 1347-1355.

94. Sun, Y.; Liu, W.-Z.; Liu, T.; Feng, X.; Yang, N.; Zhou, H.-F., Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **2015**, *35* (6), 600-604.

95. Wu, Y.; Yun, D.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Sun, R.; Yan, Q.; Zhang, S.; Lu, M.; Zhang, Z.; Lu, D., 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* **2017**, *8* (1), 1262.

96. Movafagh, S.; Crook, S.; Vo, K., Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1a by Reactive Oxygen Species : New Developments in an Old Debate. *Journal of Cellular Biochemistry* **2015**, *116* (5), 696-703.

97. Zapatero, A.; Morente, M.; de Vidales, C. M.; Agrados, M.; Lopez, C.; Nieto, S.; González, M. J. A.; Arellano, R.; Conde, A. C.; Vicente, F. G., HIF1A expression in localized prostate cancer treated with dose escalation radiation therapy. *Cancer Biomarkers* **2015**, *15* (1), 41-46.

98. Martini, M.; De Santis, M. C.; Braccini, L.; Gulluni, F.; Hirsch, E., PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med* **2014**, *46* (6), 372-383.

99. Yang, J.; Nie, J.; Ma, X.; Wei, Y.; Peng, Y.; Wei, X., Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular cancer* **2019**, *18* (1), 26.

100. Brown, J. S.; Banerji, U., Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacology & therapeutics* **2017**, *172*, 101-115.

101. LoRusso, P. M., Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* **2016**, *34* (31), 3803.

102. Lee, S. R.; Yang, K. S.; Kwon, J.; Lee, C.; Jeong, W.; Rhee, S. G., Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* **2002**, *277* (23), 20336-42.

103. Kwon, J.; Lee, S. R.; Yang, K. S.; Ahn, Y.; Kim, Y. J.; Stadtman, E. R.; Rhee, S. G., Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (47), 16419-24.

104. Rhee, S. G.; Kang, S. W.; Jeong, W.; Chang, T.-S.; Yang, K.-S.; Woo, H. A., Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current opinion in cell biology* **2005**, *17* (2), 183-189.

105. Connor, K. M.; Subbaram, S.; Regan, K. J.; Nelson, K. K.; Mazurkiewicz, J. E.; Bartholomew, P. J.; Aplin, A. E.; Tai, Y. T.; Aguirre-Ghiso, J.; Flores, S. C.; Melendez, J. A., Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation. *J Biol Chem* **2005**, *280* (17), 16916-24.

106. Krajka-Kuźniak, V.; Paluszczak, J.; Baer-Dubowska, W., The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacological reports* **2017**, *69* (3), 393-402.

107. Kitamura, H.; Onodera, Y.; Murakami, S.; Suzuki, T.; Motohashi, H., IL-11 contribution to tumorigenesis in an NRF2 addiction cancer model. *Oncogene* **2017**, *36* (45), 6315.
108. Kansanen, E.; Kuosmanen, S. M.; Leinonen, H.; Levonen, A.-L., The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology* **2013**, *1* (1), 45-49.
109. Sporn, M. B.; Liby, K. T., NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12* (8), 564-571.
110. Shin, D.; Kim, E. H.; Lee, J.; Roh, J.-L., Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer. *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, *129*, 454-462.
111. Wu, Q.; Yao, B.; Li, N.; Ma, L.; Deng, Y.; Yang, Y.; Zeng, C.; Yang, Z.; Liu, B., Nrf2 mediates redox adaptation in NOX4-overexpressed non-small cell lung cancer cells. *Experimental cell research* **2017**, *352* (2), 245-254.
112. Bao, L.; Wu, J.; Dodson, M.; Rojo de la Vega, E. M.; Ning, Y.; Zhang, Z.; Yao, M.; Zhang, D. D.; Xu, C.; Yi, X., ABCF2, an Nrf2 target gene, contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Molecular carcinogenesis* **2017**, *56* (6), 1543-1553.
113. Lu, K.; Alcivar, A. L.; Ma, J.; Foo, T. K.; Zywea, S.; Mahdi, A.; Huo, Y.; Kensler, T. W.; Gatzka, M. L.; Xia, B., NRF2 Induction Supporting Breast Cancer Cell Survival Is Enabled by Oxidative Stress-Induced DPP3-KEAP1 Interaction. *Cancer research* **2017**, *77* (11), 2881-2892.
114. Liou, G.-Y.; Storz, P., Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research* **2010**, *44* (5), 479-496.
115. Gorrini, C.; Harris, I. S.; Mak, T. W., Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews Drug discovery* **2013**, *12* (12), 931.
116. Assi, M., The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2017**, *313* (6), R646-R653.
117. Shimada, K.; Crother, T. R.; Karlin, J.; Dagvadorj, J.; Chiba, N.; Chen, S.; Ramanujan, V. K.; Wolf, A. J.; Vergnes, L.; Ojcius, D. M., Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* **2012**, *36* (3), 401-414.
118. Buendia, I.; Michalska, P.; Navarro, E.; Gameiro, I.; Egea, J.; Leon, R., Nrf2-ARE pathway: an emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics* **2016**, *157*, 84-104.
119. Ryoo, I.-g.; Choi, B.-h.; Ku, S.-K.; Kwak, M.-K., High CD44 expression mediates p62-associated NFE2L2/NRF2 activation in breast cancer stem cell-like cells: Implications for cancer stem cell resistance. *Redox Biology* **2018**, *17*, 246-258.
120. Lee, H. Y.; Parkinson, E. I.; Granchi, C.; Paterni, I.; Panigrahy, D.; Seth, P.; Minutolo, F.; Hergenrother, P. J., Reactive oxygen species synergize to potently and selectively induce Cancer cell death. *ACS chemical biology* **2017**, *12* (5), 1416-1424.
121. Ciamporcerio, E.; Daga, M.; Pizzimenti, S.; Roetto, A.; Dianzani, C.; Compagnone, A.; Palmieri, A.; Ullio, C.; Cangemi, L.; Pili, R., Crosstalk between Nrf2 and YAP contributes to maintaining the antioxidant potential and chemoresistance in bladder cancer. *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, *115*, 447-457.
122. Haffo, L.; Lu, J.; Bykov, V. J.; Martin, S. S.; Ren, X.; Coppo, L.; Wiman, K. G.; Holmgren, A., Inhibition of the glutaredoxin and thioredoxin systems and ribonucleotide reductase by mutant p53-targeting compound APR-246. *Scientific reports* **2018**, *8* (1), 12671.

123. Brozovic, A.; Ambriović-Ristov, A.; Osmak, M., The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical reviews in toxicology* **2010**, *40* (4), 347-359.
124. Kurz, E. U.; Douglas, P.; Lees-Miller, S. P., Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (51), 53272-53281.
125. Huang, C.; Yang, M.; Deng, J.; Li, P.; Su, W.; Jiang, R., Upregulation and activation of p53 by erastin-induced reactive oxygen species contribute to cytotoxic and cytostatic effects in A549 lung cancer cells. *Oncology reports* **2018**, *40* (4), 2363-2370.
126. Scorrano, L.; Korsmeyer, S. J., Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and biophysical research communications* **2003**, *304* (3), 437-444.
127. Monti, D.; Sotgia, F.; Whitaker-Menezes, D.; Tuluc, M.; Birbe, R.; Berger, A.; Lazar, M.; Cotzia, P.; Draganova-Tacheva, R.; Lin, Z. In *Pilot study demonstrating metabolic and anti-proliferative effects of in vivo anti-oxidant supplementation with N-Acetylcysteine in Breast Cancer*, Seminars in oncology, Elsevier: 2017; pp 226-232.
128. Sarmiento-Salinas, F. L.; Delgado-Magallón, A.; Montes-Alvarado, J. B.; Ramírez-Ramírez, D.; Flores-Alonso, J. C.; Cortés-Hernández, P.; Reyes-Leyva, J.; Herrera-Camacho, I.; Anaya-Ruiz, M.; Pelayo, R., Breast cancer subtypes present a differential production of reactive oxygen species (ROS) and susceptibility to antioxidant treatment. *Frontiers in oncology* **2019**, *9*, 480.
129. Soderquist, R.; Pletnev, A. A.; Danilov, A. V.; Eastman, A., The putative BH3 mimetic S1 sensitizes leukemia to ABT-737 by increasing reactive oxygen species, inducing endoplasmic reticulum stress, and upregulating the BH3-only protein NOXA. *Apoptosis* **2014**, *19* (1), 201-209.
130. Sayin, V. I.; Ibrahim, M. X.; Larsson, E.; Nilsson, J. A.; Lindahl, P.; Bergo, M. O., Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Science translational medicine* **2014**, *6* (221), 221ra15-221ra15.
131. Wang, Y.; Ma, J.; Shen, H.; Wang, C.; Sun, Y.; Howell, S. B.; Lin, X., Reactive oxygen species promote ovarian cancer progression via the HIF-1 α /LOX/E-cadherin pathway. *Oncology reports* **2014**, *32* (5), 2150-2158.
132. Le Gal, K.; Ibrahim, M. X.; Wiel, C.; Sayin, V. I.; Akula, M. K.; Karlsson, C.; Dalin, M. G.; Akyürek, L. M.; Lindahl, P.; Nilsson, J., Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science translational medicine* **2015**, *7* (308), 308re8-308re8.
133. Kang, K. A.; Ryu, Y. S.; Piao, M. J.; Shilnikova, K.; Kang, H. K.; Yi, J. M.; Boulanger, M.; Paolillo, R.; Bossis, G.; Yoon, S. Y., DUOX2-mediated production of reactive oxygen species induces epithelial mesenchymal transition in 5-fluorouracil resistant human colon cancer cells. *Redox biology* **2018**, *17*, 224-235.
134. Feng, X.; Luo, Q.; Zhang, H.; Wang, H.; Chen, W.; Meng, G.; Chen, F., The role of NLRP3 inflammasome in 5-fluorouracil resistance of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2017**, *36* (1), 81.
135. Hempel, N.; Trebak, M., Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer. *Cell Calcium* **2017**, *63*, 70-96.
136. Zhong, Z.; Zhai, Y.; Liang, S.; Mori, Y.; Han, R.; Sutterwala, F. S.; Qiao, L., TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nature communications* **2013**, *4* (1), 1-11.

137. Nakajima, S.; Kitamura, M., Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radical Biology and Medicine* **2013**, *65*, 162-174.
138. Alam, A.; Taye, N.; Patel, S.; Thube, M.; Mullick, J.; Shah, V. K.; Pant, R.; Roychowdhury, T.; Banerjee, N.; Chatterjee, S., SMAR1 favors immunosurveillance of cancer cells by modulating calnexin and MHC I expression. *Neoplasia* **2019**, *21* (10), 945-962.
139. Cha, J.-H.; Chan, L.-C.; Li, C.-W.; Hsu, J. L.; Hung, M.-C., Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer. *Molecular cell* **2019**, *76* (3), 359-370.
140. Assal, A.; Kaner, J.; Pendurti, G.; Zang, X., Emerging targets in cancer immunotherapy: beyond CTLA-4 and PD-1. *Immunotherapy* **2015**, *7* (11), 1169-1186.
141. Kumari, N.; Dwarakanath, B.; Das, A.; Bhatt, A. N., Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biology* **2016**, *37* (9), 11553-11572.
142. Maycotte, P.; Jones, K. L.; Goodall, M. L.; Thorburn, J.; Thorburn, A., Autophagy supports breast cancer stem cell maintenance by regulating IL6 secretion. *Molecular cancer research* **2015**, *13* (4), 651-658.
143. Cho, Y. A.; Sung, M.-K.; Yeon, J.-Y.; Ro, J.; Kim, J., Prognostic role of interleukin-6, interleukin-8, and leptin levels according to breast cancer subtype. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association* **2013**, *45* (3), 210.
144. Masjedi, A.; Hashemi, V.; Hojjat-Farsangi, M.; Ghalamfarsa, G.; Azizi, G.; Yousefi, M.; Jadidi-Niaragh, F., The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *108*, 1415-1424.
145. Liang, S.; Chen, Z.; Jiang, G.; Zhou, Y.; Liu, Q.; Su, Q.; Wei, W.; Du, J.; Wang, H., Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF- κ B/IL-6 signals. *Cancer letters* **2017**, *386*, 12-23.
146. Hartman, Z. C.; Poage, G. M.; Den Hollander, P.; Tsimelzon, A.; Hill, J.; Panupinthu, N.; Zhang, Y.; Mazumdar, A.; Hilsenbeck, S. G.; Mills, G. B., Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer research* **2013**, *73* (11), 3470-3480.
147. Fu, S.; Lin, J., Blocking interleukin-6 and interleukin-8 signaling inhibits cell viability, colony-forming activity, and cell migration in human triple-negative breast cancer and pancreatic cancer cells. *Anticancer research* **2018**, *38* (11), 6271-6279.
148. Todorović-Raković, N.; Milovanović, J., Interleukin-8 in breast cancer progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **2013**, *33* (10), 563-570.
149. Uddin, M. M.; Zou, Y.; Sharma, T.; Gatla, H. R.; Vancurova, I., Proteasome inhibition induces IKK-dependent interleukin-8 expression in triple negative breast cancer cells: Opportunity for combination therapy. *PloS one* **2018**, *13* (8).
150. House, C. D.; Grajales, V.; Ozaki, M.; Jordan, E.; Wubneh, H.; Kimble, D. C.; James, J. M.; Kim, M. K.; Annunziata, C. M., IKK ϵ cooperates with either MEK or non-canonical NF- κ B driving growth of triple-negative breast cancer cells in different contexts. *BMC cancer* **2018**, *18* (1), 595.
151. Waugh, D. J.; Wilson, C., The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research* **2008**, *14* (21), 6735-6741.
152. Holen, I.; Lefley, D. V.; Francis, S. E.; Rennicks, S.; Bradbury, S.; Coleman, R. E.; Ottewill, P., IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. *Oncotarget* **2016**, *7* (46), 75571.

153. Park, I. H.; Yang, H. N.; Lee, K. J.; Kim, T.-S.; Lee, E. S.; Jung, S.-Y.; Kwon, Y.; Kong, S.-Y., Tumor-derived IL-18 induces PD-1 expression on immunosuppressive NK cells in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8* (20), 32722.
154. Harris, J.; VanPatten, S.; Deen, N. S.; Al-Abed, Y.; Morand, E. F., Rediscovering MIF: new tricks for an old cytokine. *Trends in immunology* **2019**.
155. Verjans, E.; Noetzel, E.; Bektas, N.; Schütz, A. K.; Lue, H.; Lennartz, B.; Hartmann, A.; Dahl, E.; Bernhagen, J., Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC cancer* **2009**, *9* (1), 230.
156. Xu, X.; Wang, B.; Ye, C.; Yao, C.; Lin, Y.; Huang, X.; Zhang, Y.; Wang, S., Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. *Cancer letters* **2008**, *261* (2), 147-157.
157. Jankauskas, S. S.; Wong, D. W.; Bucala, R.; Djurdjaj, S.; Boor, P., Evolving complexity of MIF signaling. *Cellular signalling* **2019**.
158. Shi, X.; Leng, L.; Wang, T.; Wang, W.; Du, X.; Li, J.; McDonald, C.; Chen, Z.; Murphy, J. W.; Lolis, E., CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* **2006**, *25* (4), 595-606.
159. Lue, H.; Thiele, M.; Franz, J.; Dahl, E.; Speckgens, S.; Leng, L.; Fingerle-Rowson, G.; Bucala, R.; Lüscher, B.; Bernhagen, J., Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* **2007**, *26* (35), 5046-5059.
160. O'Reilly, C.; Doroudian, M.; Mawhinney, L.; Donnelly, S. C., Targeting MIF in cancer: therapeutic strategies, current developments, and future opportunities. *Medicinal research reviews* **2016**, *36* (3), 440-460.
161. Nobre, C. C. G.; de Araújo, J. M. G.; de Medeiros Fernandes, T. A. A.; Cobucci, R. N. O.; Lanza, D. C. F.; Andrade, V. S.; Fernandes, J. V., Macrophage migration inhibitory factor (MIF): biological activities and relation with cancer. *Pathology & Oncology Research* **2017**, *23* (2), 235-244.
162. Kalvakolanu, D. V., Cytokine signaling in cancer: Novel players and pathways. Elsevier: 2017.
163. Srinivasan, S.; Guha, M.; Kashina, A.; Avadhani, N. G., Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2017**, *1858* (8), 602-614.
164. Rehman, J.; Zhang, H. J.; Toth, P. T.; Zhang, Y.; Marsboom, G.; Hong, Z.; Salgia, R.; Husain, A. N.; Wietholt, C.; Archer, S. L., Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *The FASEB Journal* **2012**, *26* (5), 2175-2186.
165. Inoue-Yamauchi, A.; Oda, H., Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **2012**, *421* (1), 81-85.
166. Chavez, K. J.; Garimella, S. V.; Lipkowitz, S., Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease* **2010**, *32* (1-2), 35.
167. Kenny, P. A.; Lee, G. Y.; Myers, C. A.; Neve, R. M.; Semeiks, J. R.; Spellman, P. T.; Lorenz, K.; Lee, E. H.; Barcellos-Hoff, M. H.; Petersen, O. W., The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular oncology* **2007**, *1* (1), 84-96.
168. Comşa, Ş.; Cimpean, A. M.; Raica, M., The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research* **2015**, *35* (6), 3147-3154.

169. Fernandes, D. C.; Gonçalves, R. C.; Laurindo, F. R., Measurement of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation. In *Hypertension*, Springer: 2017; pp 233-249.
170. Wang, X.; Fang, H.; Huang, Z.; Shang, W.; Hou, T.; Cheng, A.; Cheng, H., Imaging ROS signaling in cells and animals. *Journal of molecular medicine* **2013**, *91* (8), 917-927.
171. Prasad, S.; Gupta, S. C.; Tyagi, A. K., Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer letters* **2017**, *387*, 95-105.
172. Lister, A.; Nedjadi, T.; Kitteringham, N. R.; Campbell, F.; Costello, E.; Lloyd, B.; Copple, I. M.; Williams, S.; Owen, A.; Neoptolemos, J. P., Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Molecular cancer* **2011**, *10* (1), 1-13.
173. Kim, S. K.; Yang, J. W.; Kim, M. R.; Roh, S. H.; Kim, H. G.; Lee, K. Y.; Jeong, H. G.; Kang, K. W., Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *45* (4), 537-546.
174. Comito, G.; Calvani, M.; Giannoni, E.; Bianchini, F.; Calorini, L.; Torre, E.; Migliore, C.; Giordano, S.; Chiarugi, P., HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *51* (4), 893-904.
175. Presley, A. D.; Fuller, K. M.; Arriaga, E. A., MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **2003**, *793* (1), 141-150.
176. Bavarsad Shahripour, R.; Harrigan, M. R.; Alexandrov, A. V., N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and behavior* **2014**, *4* (2), 108-122.
177. 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., Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1), 1-10.
178. Barrera, G., Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* **2012**, *2012*, 137289.
179. Paulsen, C. E.; Carroll, K. S., Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical reviews* **2013**, *113* (7), 4633-4679.
180. Morgan, M. J.; Liu, Z. G., Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* **2011**, *21* (1), 103-15.
181. de Sá Junior, P. L.; Câmara, D. A. D.; Porcacchia, A. S.; Fonseca, P. M. M.; Jorge, S. D.; Araldi, R. P.; Ferreira, A. K., The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2017**, *2017*.
182. Liu, L.-Z.; Hu, X.-W.; Xia, C.; He, J.; Zhou, Q.; Shi, X.; Fang, J.; Jiang, B.-H., Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2006**, *41* (10), 1521-1533.
183. Suzuki, T.; Yamamoto, M., Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *88*, 93-100.
184. DeNicola, G. M.; Karreth, F. A.; Humpton, T. J.; Gopinathan, A.; Wei, C.; Frese, K.; Mangal, D.; Kenneth, H. Y.; Yeo, C. J.; Calhoun, E. S., Oncogene-induced Nrf2

- transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **2011**, 475 (7354), 106-109.
185. Chio, I. I. C.; Tuveson, D. A., ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol Med* **2017**, 23 (5), 411-429.
186. Fortmann, S. P.; Burda, B. U.; Senger, C. A.; Lin, J. S.; Whitlock, E. P., Vitamin and mineral supplements in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: an updated systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine* **2013**, 159 (12), 824-834.
187. Piskounova, E.; Agathocleous, M.; Murphy, M. M.; Hu, Z.; Huddlestun, S. E.; Zhao, Z.; Leitch, A. M.; Johnson, T. M.; DeBerardinis, R. J.; Morrison, S. J., Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* **2015**, 527 (7577), 186-191.
188. Porporato, P. E.; Payen, V. L.; Pérez-Escuredo, J.; De Saedeleer, C. J.; Danhier, P.; Copetti, T.; Dhup, S.; Tardy, M.; Vazeille, T.; Bouzin, C., A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell reports* **2014**, 8 (3), 754-766.
189. Dikmen, M.; Ozturk, N.; Ozturk, Y., The antioxidant potency of Punica granatum L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *Journal of Medicinal Food* **2011**, 14 (12), 1638-1646.
190. Harris, I. S.; Treloar, A. E.; Inoue, S.; Sasaki, M.; Gorrini, C.; Lee, K. C.; Yung, K. Y.; Brenner, D.; Knobbe-Thomsen, C. B.; Cox, M. A., Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer cell* **2015**, 27 (2), 211-222.
191. Li, M.; Chen, Q.; Yu, X., Chemopreventive effects of ROS targeting in a murine model of BRCA1-deficient breast cancer. *Cancer research* **2017**, 77 (2), 448-458.
192. Teoh, M. L.; Fitzgerald, M. P.; Oberley, L. W.; Domann, F. E., Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. *Cancer research* **2009**, 69 (15), 6355-6363.
193. Teoh-Fitzgerald, M.; Fitzgerald, M.; Zhong, W.; Askeland, R.; Domann, F., Epigenetic reprogramming governs EcSOD expression during human mammary epithelial cell differentiation, tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* **2014**, 33 (3), 358-368.
194. Kubli, S. P.; Bassi, C.; Roux, C.; Wakeham, A.; Göbl, C.; Zhou, W.; Jafari, S. M.; Snow, B.; Jones, L.; Palomero, L., AhR controls redox homeostasis and shapes the tumor microenvironment in BRCA1-associated breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, 116 (9), 3604-3613.
195. Sullivan, L. B.; Chandel, N. S., Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & metabolism* **2014**, 2 (1), 17.
196. Jung, C.-H.; Kim, E. M.; Song, J.-Y.; Park, J. K.; Um, H.-D., Mitochondrial superoxide dismutase 2 mediates γ -irradiation-induced cancer cell invasion. *Exp Mol Med* **2019**, 51 (2), 1-10.
197. Che, M.; Wang, R.; Li, X.; Wang, H.-Y.; Zheng, X. S., Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug discovery today* **2016**, 21 (1), 143-149.
198. Petros, J. A.; Baumann, A. K.; Ruiz-Pesini, E.; Amin, M. B.; Sun, C. Q.; Hall, J.; Lim, S.; Issa, M. M.; Flanders, W. D.; Hosseini, S. H., mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, 102 (3), 719-724.

199. Diebold, L.; Chandel, N. S., Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2016**, *100*, 86-93.
200. Payen, V. L.; Zampieri, L. X.; Porporato, P. E.; Sonveaux, P., Pro-and antitumor effects of mitochondrial reactive oxygen species. *Cancer and Metastasis Reviews* **2019**, *38* (1-2), 189-203.
201. Okon, I. S.; Zou, M.-H., Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacological research* **2015**, *100*, 170-174.
202. Lam, M.; Oleinick, N. L.; Nieminen, A.-L., Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (50), 47379-47386.
203. Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M., Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140* (6), 883-899.
204. Coussens, L. M.; Werb, Z., Inflammation and cancer. *Nature* **2002**, *420* (6917), 860-867.
205. Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B., Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology and medicine* **2010**, *49* (11), 1603-1616.
206. Kozłowski, L.; Zakrzewska, I.; Tokajuk, P.; Wojtukiewicz, M., Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)* **2003**, *48*, 82-84.
207. Conze, D.; Weiss, L.; Regen, P. S.; Bhushan, A.; Weaver, D.; Johnson, P.; Rincón, M., Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer research* **2001**, *61* (24), 8851-8858.
208. Sullivan, N.; Sasser, A.; Axel, A. E.; Vesuna, F.; Raman, V.; Ramirez, N.; Oberyzyń, T.; Hall, B., Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* **2009**, *28* (33), 2940-2947.
209. Dominguez, C.; McCampbell, K. K.; David, J. M.; Palena, C., Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer. *JCI insight* **2017**, *2* (21).
210. Network, C. G. A., Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2012**, *490* (7418), 61.
211. Saed, G. M.; Diamond, M. P.; Fletcher, N. M., Updates of the role of oxidative stress in the pathogenesis of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* **2017**, *145* (3), 595-602.
212. Lim, S. D.; Sun, C.; Lambeth, J. D.; Marshall, F.; Amin, M.; Chung, L.; Petros, J. A.; Arnold, R. S., Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *The Prostate* **2005**, *62* (2), 200-207.
213. Tamura, M.; Matsui, H.; Tomita, T.; Sadakata, H.; Indo, H. P.; Majima, H. J.; Kaneko, T.; Hyodo, I., Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **2013**, 13-36.
214. Du, S.; Miao, J.; Zhu, Z.; Xu, E.; Shi, L.; Ai, S.; Wang, F.; Kang, X.; Chen, H.; Lu, X., NADPH oxidase 4 regulates anoikis resistance of gastric cancer cells through the generation of reactive oxygen species and the induction of EGFR. *Cell death & disease* **2018**, *9* (10), 1-18.
215. Storz, P., KRas, ROS and the initiation of pancreatic cancer. *Small GTPases* **2017**, *8* (1), 38-42.

