



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DEL YODO MOLECULAR EN CÉLULAS CANCEROSAS MAMARIAS PARENTALES Y  
TRONCALES**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

GABRIEL MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ

TUTORA: Dra. Carmen Yolanda Aceves Velasco, INB  
COMITÉ TUTOR: Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas, INB  
Dr. Jorge Tonatiuh Ayala Sumuano, INB

UNAM Campus Juriquilla, Junio 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## EFFECTO DEL YODO MOLECULAR EN CÉLULAS CANCEROSAS MAMARIAS PARENTALES Y TRONCALES

En la actualidad se postula que el desarrollo y progresión del cáncer se basa en la evolución patológica de células troncales (teoría troncal) o en la transformación de células diferenciadas hacia un fenotipo mesenquimal que adquiere atributos de troncalidad (teoría de transición epitelio-mesénquima). Las líneas celulares de cáncer mamario parentales cultivadas bajo condiciones no adherentes y libres de suero, conduce al enriquecimiento de células troncales cancerosas (CTC), formando aglomerados conocidos como mamosferas. El yodo en su forma química molecular ( $I_2$ ) ejerce acciones apoptóticas y de re-diferenciación en diversos cánceres captadores de yodo. En este trabajo se analizaron los efectos del  $I_2$  en la sobrevivencia (mamosferas) y potencialidad invasiva *in vitro* (modelos de Herida y Transwell) así como la capacidad tumorigénica *in vivo* (xenotransplantes), de líneas celulares poco invasivas (MCF-7) e invasivas (MDA-MB-231). Los resultados muestran que el  $I_2$  independientemente de la línea celular, disminuye la proliferación y potencial invasivo de las CTC de manera dependiente de la dosis. En los animales inmunodeprimidos, el suplemento dietario de  $I_2$  disminuye la capacidad tumorigénica de las células MDA-MB-231, tanto en su condición parental como de CTC. Los análisis de identidad celular (citometría de flujo) muestran que el  $I_2$  induce una selección diferencial hacia un fenotipo más diferenciado asociado a disminuciones significativas en genes de troncalidad como CD44, CD24 y vimentina. En conclusión estos datos indican que el  $I_2$  ejerce efectos antiproliferativos en las CTC forzando su re-diferenciación y por lo tanto inhibiendo su capacidad tumorigénica.



## EFFECT OF MOLECULAR IODINE IN STEM AND PARENTAL MAMMARY CANCER CELLS

Currently, it is postulated that development and progression of cancer are based on the pathological evolution of stem cells (stem theory) or in the transformation of the differentiated cell toward a mesenchymal phenotype which acquires stem attributes (epithelial-mesenchymal transition theory). Parental breast cancer cell lines culture under non-adherent and serum-free conditions, leads to enrichment of cancer stem cells (CSC), forming clusters known as mammospheres. Iodine in his molecular form ( $I_2$ ) exert apoptotic and re-differentiation actions on several  $I_2$ -uptake cancer cells. On this work is analyzed the effects of  $I_2$  supplement in the surviving (mammosphere) and invasive potential (Wound-healing and Transwell models) as well as tumorigenic capacity *in vivo* (xenografts) of breast cancer cell lines noninvasive (MFC-7) and invasive (MDA-MB-231). Results show that independent of the cell line,  $I_2$  decreases cell proliferation and invasive potential of CSC in a dose-dependent way. In immunosuppressed mice,  $I_2$  supplement decreases the tumorigenic capacity of MDA-MB-231 cells, both parental and CSC conditions. Cell identity analyze (flow cytometry) showed that  $I_2$  induce a differential selection toward a less differentiated phenotype associated with significant decreases on stem genes like CD44, CD24 and vimentin. On conclusion, these data suggest that  $I_2$  maintains its antiproliferative effects in CSC and parental cancer cells by forcing their differentiation into a less invasive phenotype and thereby inhibiting their tumorigenic capacities.



## AGRADECIMIENTOS A:

Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Becario No: 700558

Donativos: (PAPIIT 201516, CONACyT235961,)

A la unidad de enseñanza y Posgrado del instituto de Neurobiología: M. en C. Leonor Casanova Rico y Carmen Mendoza López

A la unidad de videoconferencia del Instituto de Neurobiología: Lic. Lourdes Lara Ayala

A la unidad Unidad de Cómputo del Instituto de Neurobiología: Ing. Ramón Martínez Olvera, M. en C. Alberto Lara Ruvalcaba, Ing. Omar González Hernández e Ing. Sandra Hernández García

Al personal de la Biblioteca Central de la UNAM Campus Juriquilla: Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y a la Lic. Soledad Medina Malagón.

A la unidad de Bioterio del Instituto de Neurobiología: MVZ. Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla León

A Alexander Bontempo, Evangelina Delgado, Diana Organista y María Juana Cárdenas por su apoyo técnico

A la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita por su ayuda en los análisis de citometría de flujo

A Juanjo Nuñez Tavera por su ayuda en los análisis *in vivo*

A la Dra. Carmen Y. Aceves Velasco

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas y Dr. Jorge Tonatiuh Ayala Sumuano

A la Dra. Brenda Anguiano y a mis compañeros del Laboratorio de Metabolismo Energético

A mi familia y amigos



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>1.1 Células troncales</b> .....	2
<b>1.2 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria</b> .....	3
<b>1.3 Carcinogénesis de la glándula mamaria</b> .....	5
<b>1.4 Factores de riesgo y prevención del cáncer mamario</b> .....	7
<b>1.5 Teorías sobre el surgimiento de las células cancerosas</b> .....	9
<b>1.5.1 Modelo estocástico o tradicional</b> .....	9
<b>1.5.2 Modelo jerárquico o modelo de las células troncales cancerosas</b> .....	10
<b>1.6 Células troncales cancerosas en cáncer mamario</b> .....	11
<b>1.7 Efecto del yodo molecular (I<sub>2</sub>) en cáncer mamario</b> .....	12
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	16
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	16
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
<b>5.1 Material biológico</b> .....	17
<b>5.2 Cultivos en mono-capa</b> .....	17
<b>5.3 Cultivos en mamosferas</b> .....	17
<b>5.4 Curva de proliferación y viabilidad celular</b> .....	17
<b>5.5 Extracción de RNA y síntesis de DNAc</b> .....	18
<b>5.6 PCR tiempo real</b> .....	18
<b>5.7 Ensayo de Herida (Wound-healing)</b> .....	19
<b>5.8 Ensayo de invasión celular Transwell</b> .....	19
<b>5.9 Citometría de flujo</b> .....	20
<b>5.10 Xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos (nu/nu)</b> .....	21
<b>5.11 Extracción tumoral</b> .....	21
<b>5.12 Análisis estadísticos</b> .....	21



<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Análisis de marcadores de troncalidad en cultivos de mamosferas .....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Invasión y migración <i>In vitro</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Análisis del efecto del I<sub>2</sub> sobre las poblaciones celulares .....</b>	<b>29</b>
<b>4.6 Xenotransplantes de mamosferas .....</b>	<b>33</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>VII. REFERENCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>VIII. ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>50</b>
<b>IX. ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>51</b>
<b>X. LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS.....</b>	<b>52</b>



## INTRODUCCIÓN

El cáncer mamario es la neoplasia maligna con mayor incidencia a nivel mundial y es la primera causa de muerte en mujeres en edad reproductiva debido a su gran capacidad de invasión y quimiorresistencia. La evolución de una célula normal a una célula cancerosa requiere de la desregulación de múltiples procesos celulares. De acuerdo a los modelos clásicos de la carcinogénesis, estos eventos pueden ocurrir en cualquier célula, lo cual se le conoce como la hipótesis estocástica e involucra trans-diferenciaciones epitelio-mesénquima que les permiten adquirir un fenotipo diferencial e-cadherina<sup>-</sup>/vimentina<sup>+</sup>. Sin embargo en las últimas décadas ha surgido la hipótesis jerárquica que sostiene que solo las células troncales, presentes en todos los tejidos, al volverse cancerosas son las responsables del crecimiento y evolución de los tumores. Estas células troncales cancerosas mantienen su capacidad de auto-renovación y desarrollan una alta resistencia a fármacos y a la inducción de apoptosis. Por otro lado, en los últimos años se ha reportado que el yodo molecular (I<sub>2</sub>) tiene efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos en una variedad de células cancerosas captadoras de yodo. Recientemente, en nuestro laboratorio se mostró que el suplemento de I<sub>2</sub> en tejidos y células mamarias tumorales, conlleva la formación de un lípido yodado conocido como 6-yodolactona, el cual tiene una gran afinidad por los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR $\gamma$ ). Estos receptores están estrechamente relacionados a procesos de diferenciación y apoptosis en una gran variedad de cánceres humanos. En este trabajo se evaluó el efecto que tiene el suplemento de I<sub>2</sub> en la proliferación y formación de mamosferas en células troncales de cáncer mamario. También se evaluó el efecto del suplemento dietético de I<sub>2</sub>, en la instalación y progresión de xenotransplantes de mamosferas en ratones hembra inmunosuprimidos (nu/nu).



## I. ANTECEDENTES

### 1.1 Células troncales

Muchos de los tejidos que forman un organismo están en un estado de recambio, en el cual un número de células diferenciadas son constantemente eliminadas y remplazadas. A pesar de esto, los tejidos mantienen su tamaño y estructura durante el tiempo a través de un regulado proceso de proliferación y diferenciación. En cada tejido, este proceso es orquestado por una población de células de larga vida llamadas células troncales (Rajendran y Dalerba, 2014). Las células troncales, son células no diferenciadas que cuando se dividen tienen la capacidad de auto-renovarse y al mismo tiempo diferenciarse en células más especializadas (Watt and Hogan., 2000; Weissman *et al.*, 2000). Las células troncales se pueden clasificar según su potencial de división o su origen:

Según su potencial de división:

- Totipotencial: son células que pueden formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo) como los extraembrionarios (placenta).
- Pluripotenciales: son células provenientes del blastocisto que pueden formar cualquier célula o tejido del cuerpo, pero a diferencia de las totipotenciales no pueden formar por sí solas un organismo.
- Multipotenciales: son células que solo pueden dar lugar a células de la capa embrionaria a la que pertenecen.
- Unipotenciales: son células comprometidas que solo pueden dar lugar a un tipo determinado de célula.
- Diferenciadas: son células que han alcanzado su plena madurez y una actividad funcional específica.

Según su origen:

- Embrionarias: son células pluripotenciales provenientes del blastocisto, que pueden dar lugar a cualquiera de las tres capas embrionarias.



- Adultas: son células troncales presentes en los tejidos adultos, que solo pueden dar lugar a células del tejido al que pertenecen.

Una característica distintiva de las células troncales es su capacidad de auto-renovarse en forma simétrica o asimétrica. La división mitótica simétrica da lugar a dos células troncales y la división asimétrica genera una célula troncal y una célula con el potencial de diferenciarse. La división asimétrica se logra por dos mecanismos: asimetría divisional y asimetría ambiental. En la división asimétrica el material celular, como el mRNA y proteínas, son segregados asimétricamente entre las células hijas (Wilson and Trumpp, 2006). Por otro lado, en la asimetría ambiental una de las células hijas permanece en contacto con los nichos de células troncales, los cuales son microambientes que suministran factores de crecimiento y proteínas de adhesión específicas a las células troncales, manteniendo su fenotipo de célula troncal mientras que la otra célula hija pierde el contacto con los factores de crecimiento y proteínas provenientes de los nichos adoptando un fenotipo diferenciado (Lutolf *et al.*, 2009; Scaden, 2006).

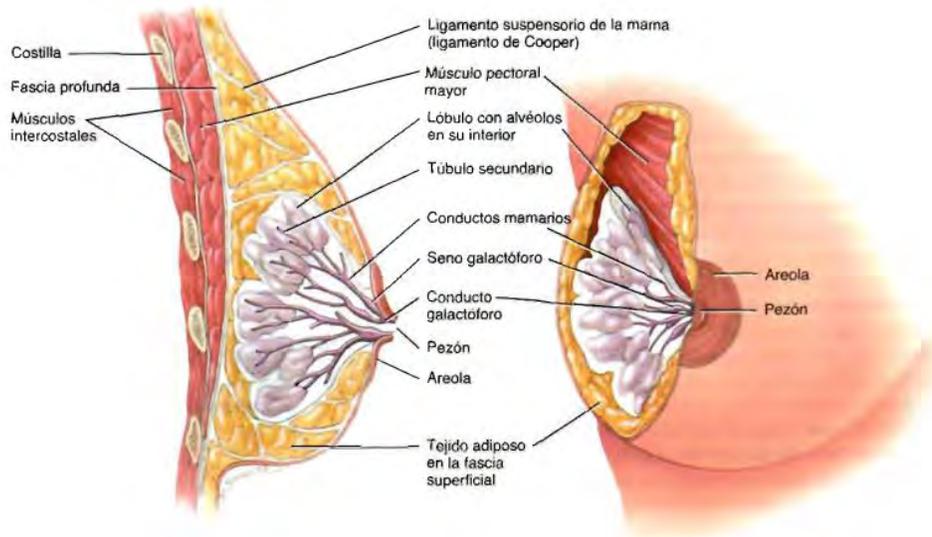
El destino de las células troncales es gobernado por señales intrínsecas y extrínsecas. Las señales intrínsecas incluyen la expresión de factores de transcripción necesarios para el mantenimiento y la división asimétrica, mientras que las señales extrínsecas incluyen factores e interacciones célula-célula dentro del microambiente de células troncales (Watt and Hogan, 2000). Las células troncales diferenciadas van perdiendo gradualmente su capacidad para auto-renovarse y posteriormente dan lugar a células progenitoras, las cuales se desarrollan en células especializadas con funciones específicas (Van Roy and Berx, 2012).

## 1.2 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

La glándula mamaria (figura 1) es una glándula exocrina de estructura túbulo-alveolar que se presenta en todos los mamíferos y define la característica más conspicua de la clase mamífera. Esta glándula está formada por entre 15 a 20 unidades independientes conocidas como lóbulos. Cada lóbulo a su vez está formado por subunidades que se conocen como lobulillos, los cuales están compuestos de numerosas unidades llamadas acinos. Cada lóbulo está asociado a un conducto excretor conocido como conducto galactóforo, que desemboca en el pezón y a nivel de la areola este conducto forma una pequeña dilatación sacular que se conoce como seno lactífero, el cual

sirve como reservorio de leche. El conducto galactóforo se ramifica entre los lóbulos formando los conductos interlobulares, los cuales ingresan a cada uno de los lóbulos y se ramifican entre los lobulillos formando los conductos interlobulillares. Estos últimos se vuelven a ramificar y forman los conductos terminales, cada uno de los cuales se unen a un único lobulillo. La unidad conducto terminal-lobulillo representa la estructura funcional de la glándula mamaria y se conoce como unidad ducto lobulillo terminal (TDLU por sus siglas en inglés). Dentro del lobulillo el conducto terminal se ramifica formando los conductos intralobulillares, los cuales se asocian a un acino. Los acinos son estructura saculares de forma esférica rodeadas por una capa de epitelio cúbico simple y que están formados por las células acinares, las cuales son las que producen los nutrientes que forman la leche materna durante la lactancia (Geneser, 2000; Lanigan *et al.*, 2007; Mendieta-Trejo, 2011).

Rodeando la capa de epitelio cúbico se encuentra una capa de células mioepiteliales, las cuales durante el periodo de lactancia son estimuladas por la oxitocina y, al contraerse, favorecen la eyección del contenido de los acinos hacia los conductos excretores. Rodeando la capa de mioepitelio se encuentra una membrana basal formada por un conglomerado de fibras de colágena, la cual separa el epitelio glandular del estroma circundante (Geneser, 2000; Lanigan *et al.*, 2007; Mendieta-Trejo, 2011).



**Figura 1. Anatomía interna y externa de la glándula mamaria humana (tomada de Tortora & Derrickson, 2006)**

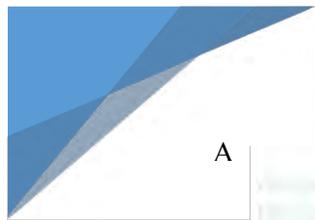


### 1.3 Carcinogénesis de la glándula mamaria

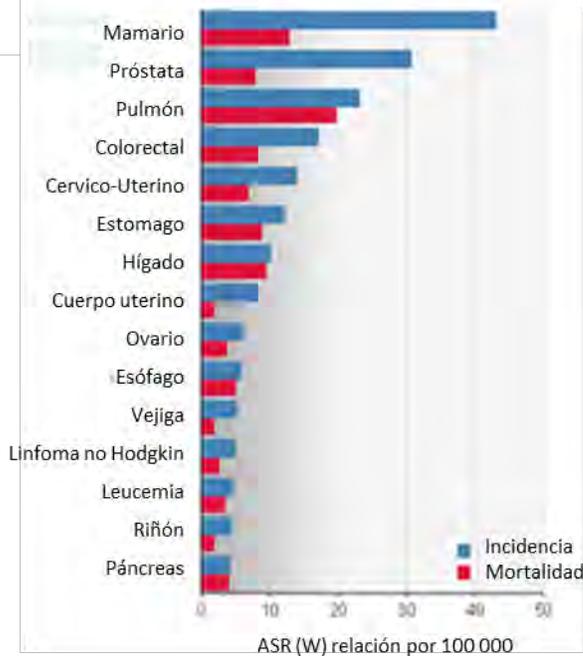
El cáncer mamario es una condición maligna de la glándula mamaria. Se ha planteado que el primer paso de la carcinogénesis de la glándula mamaria es la hiperplasia sin atipia, que es el aumento de la celularidad de las unidades ductal lobulillo terminal y/o de los conductos interlobulillares. La hiperplasia sin atipia se puede clasificar dependiendo del número de capas involucradas, siendo leve cuando hay de 3 a 4 capas, moderada cuando hay más de 5 capas y severa cuando las células han obstruido los ductos. Durante la hiperplasia sin atipia las células se caracterizan por variar de tamaño, tener forma ovoide o de huso, un patrón de cromatina normal y un nucléolo distinto (DeVita *et al.*, 2015; Mallon *et al.*, 2000; Mendieta-Trejo, 2011).

El segundo paso en la carcinogénesis es la hiperplasia atípica. La hiperplasia atípica puede desarrollarse tanto en los conductos como en los lóbulos y se caracteriza por poseer características anormales, lo que las hace difícil de distinguirlas de los carcinomas mamarios. El siguiente paso son los carcinomas *in situ* o no invasivo, que es cuando las células han alcanzado un estado tumoral, pero permanecen dentro de la membrana basal de la unidad ductal lobulillo terminal, y finalmente los carcinomas invasivos que ocurren cuando hay una diseminación a través de la membrana basal de las células cancerosas hacia los alrededores del tejido adyacente normal (DeVita *et al.*, 2015; Mallon *et al.*, 2000; Mendieta-Trejo, 2011).

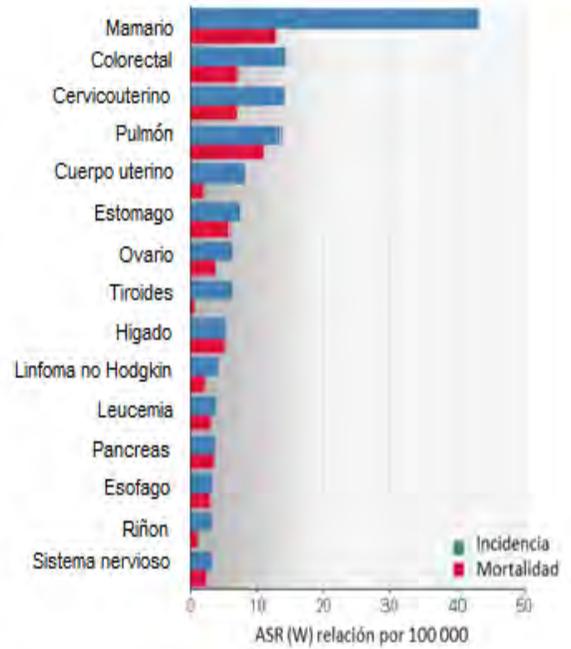
Estudios epidemiológicos publicados en el GLOBOCAN en el año del 2012, indican que el cáncer mamario es la neoplasia maligna de mayor incidencia a nivel mundial y el de mayor mortalidad en mujeres (figura 2). Esta premisa ha sido atribuida a la capacidad de estas células cancerosas para desarrollar metástasis y resistencia a tratamientos antineoplásicos. Se estima que el 95% del cáncer mamario tiene el potencial de generar metástasis y que entre el 40% y 60% de las pacientes tratadas con quimioterapia desarrollarán recidivas.



A



B



v

**Figura 2. Tasa de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial en (A) ambos sexos y (B) en mujeres. ASR Tasa estandarizada por edad por cada 100 000 personas por año (tomada de GLOBOCAN, 2012).**

Los carcinomas mamarios se pueden clasificar de acuerdo a su origen en carcinoma ductal y lobulillar. El carcinoma ductal se origina en las células que revisten los conductos galactóforos y es el tipo de cáncer mamario más frecuente, representando el 80% de los carcinomas mamarios invasivos. El carcinoma lobulillar se origina en las células de los lobulillos mamarios y su incidencia es del 10% de todos los casos (AAEC, 2013). Los carcinomas mamarios también se pueden clasificar de acuerdo a los patrones de genes expresados en:

- Luminal; Este grupo comprende la mayoría de los carcinomas mamarios y están caracterizados por la presencia de genes que normalmente son expresados en el epitelio mamario luminal. Comprende la mayoría de los carcinomas receptores a estrógenos (ER) y puede ser dividido en dos subtipos; luminal A y luminal B. Los tumores del tipo luminal A son comúnmente caracterizados por la alta expresión de genes relacionados a ER, baja expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y genes asociados a la proliferación celular. En contraste, los tumores de tipo luminal B están caracterizados por



una baja expresión de RE, variable expresión de HER2 y altos niveles de expresión de genes asociados a la proliferación celular (De Vita *et al.*, 2015).

- Enriquecidos en HER2: Este grupo comprende entre el 10% y 15% de todos los carcinomas mamarios. Estos carcinomas sobreexpresan tanto HER2 como genes asociados a la proliferación celular y tienen una baja expresión de ER (De Vita *et al.*, 2015).
- Basal o negativo a ER: Este grupo comprende un grupo heterogéneo de tumores que clínicamente son definidos como triple negativos debido a que típicamente carecen de ER, HER2 y de receptores a progesterona (PR). Sin embargo, no todos los tumores del tipo basal son triple negativos y viceversa. Los carcinomas basales fueron primeramente identificados por una alta expresión de citoqueratinas basales y de genes asociados a la proliferación y por una pérdida de genes asociados a la regulación del ciclo celular lo que les confiere un pobre pronóstico. Los carcinomas de tipo basal comprenden entre el 15% y 20% de todos los casos de cáncer mamario (De Vita *et al.*, 2015).

#### 1.4 Factores de riesgo y prevención del cáncer mamario

Se han descrito diversos factores de riesgo que están de forma continua o episódica influyendo en el daño celular que conduce al desarrollo del cáncer. Entre los más reconocidos están los traumatismos graves, la exposición a agentes físicos y/o químicos, los infecciosos y los ambientales (Wärri *et al.*, 2007). Sin embargo existen factores de riesgo específicos que contribuyen al desarrollo del cáncer mamario y que se pueden clasificar en dos categorías:

##### Factores genéticos

- Alteraciones genéticas heredadas por la línea germinal de los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *P53* y *PTEN* (Dixon, 2006). *BRCA1* y *BRCA2* son genes que funcionan como supresores de tumores ya que participan en la regulación del ciclo celular y evitan la proliferación celular incontrolada, además participan en los mecanismos de detección y reparación del DNA dañado (Wang *et al.*, 2000;). La proteína P53 es un factor de transcripción que también funciona como supresor de tumores, ya que participa en la detección de daño al DNA e induce al arresto celular a través de la inducción de la proteína P21, la cual tiene la capacidad de inhibir la fase G1 del ciclo celular. P53 también activa enzimas que reparan



el DNA dañado y, en caso de que no se pueda reparar, puede inducir a la apoptosis (Ryan *et al.*, 2001). PTEN es una fosfatasa cuya pérdida en su función promueve la tumorigénesis (Jiang and Liu, 2008).

- Susceptibilidad familiar. Aunque este factor no ha sido comprendido del todo, se ha demostrado que las mujeres con familiares directos (hermanas, hijas, madre) que han desarrollado cáncer mamario y que no está asociado a mutaciones en los genes mencionados anteriormente, tienen de 2 a 5 veces más riesgo que el resto de la población de desarrollar cáncer mamario (Dixon, 2006).

#### Factores de estilo de vida

- Factores reproductivos. Este factor incluye la menarca temprana y la menopausia tardía debido a que se aumenta el tiempo en que las mujeres están expuestas a hormonas sexuales (Russo *et al.*, 2006), También se incluye la nuliparidad y edades tardías del primer embarazo (después de los 30 años), en donde no se alcanza una diferenciación total de las células de la glándula mamaria (Dixon., 2006).
- Factores dietéticos. Estudios epidemiológicos han demostrado que las mujeres que tienen un alto consumo de alcohol y grasas, tienen un mayor riesgo a desarrollar cáncer mamario (Dixon, 2006).

Por otro lado, así como existen factores de riesgo, existen factores de protección que previenen el desarrollo del cáncer mamario:

- Edades tempranas del primer embarazo (antes de los 20 años) y lactancia mayor a tres meses. Debido a que se alcanza la diferenciación total de las células que forman la glándula mamaria (Dixon, 2006).
- Dieta oriental. Estudios epidemiológicos muestran que las mujeres de países asiáticos tienen una menor incidencia a desarrollar cáncer mamario. Lo cual ha sido correlacionado



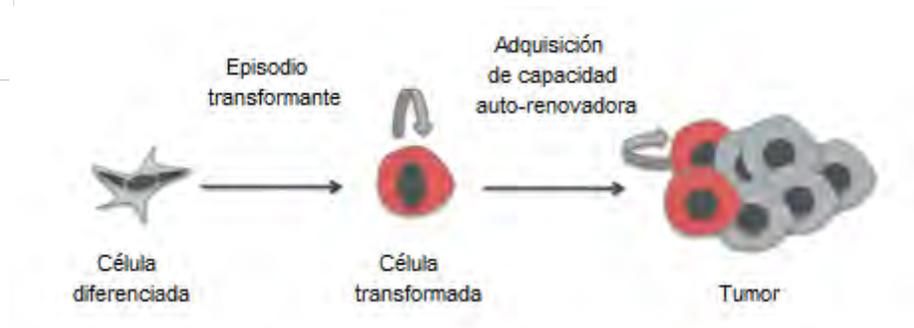
con el elevado consumo de fitoestrógenos (soya) y yodo (algas marinas) que forman parte de su dieta regular (Bilal *et al.*, 2014; Cann *et al.*, 2000).

## 1.5 Teorías sobre el surgimiento de las células cancerosas

Los tumores cancerosos se caracterizan por tener una amplia y extensa heterogeneidad celular que presentan distintas características fenotípicas y funcionales. Estas características incluyen marcadores de membrana, expresión de genes, capacidad invasiva y proliferativa y, respuesta terapéutica (Dick, 2008; Marusyk *et al.*, 2010; Pietras *et al.*, 2011). Actualmente se han propuesto dos modelos que explican tanto el surgimiento como la naturaleza heterogénea de las células cancerosas; el modelo estocástico y el modelo jerárquico. Aunque ambos modelos sostienen que la progresión tumoral es iniciada por una pequeña población de células dentro del tumor, se diferencian en los principios biológicos del surgimiento de estas poblaciones celulares (Dick, 2008; Marusyk *et al.*, 2010; Pietras *et al.*, 2011).

### 1.5.1 Modelo estocástico o tradicional

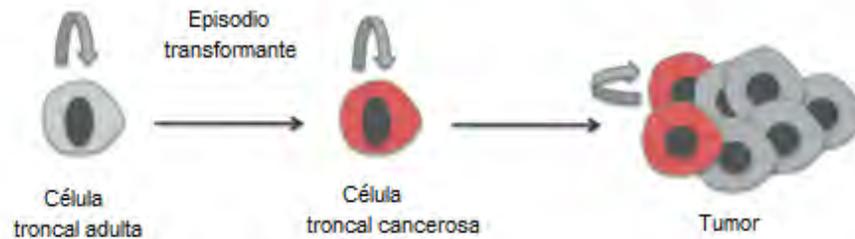
Este modelo (Figura 3) propone que una o más células diferenciadas presentes en el tejido adulto sufren mutaciones y a través de un proceso de división no controlada se van acumulando alteraciones genéticas hasta sufrir un episodio transformante de trans-diferenciación conocido como transición epitelio mesénquima (TEM; Strauss *et al.*, 2011). La TEM es caracterizada por un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina, trombospondina, N-cadherina y vitronectina), un incremento de los compuestos de matriz extracelular (colágeno IV y fibronectina), así como disminución en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina, ocludina, desmoplaquina y mucina), alteración en la localización de factores de transcripción ( $\beta$ -catenina, Snail, SLUG, TWIST, SOX10 y NF $\kappa$ B) y activación de cinasas (ERK1, ERK2 y PI3K/AKT) (Morel *et al.*, 2008). Además esta teoría propone que cualquier célula cancerosa presente en el tumor tiene la capacidad de mantener y expandir el tumor a otros tejidos (Eguiara *et al.*, 2012).



**Figura 3. Origen de las células cancerosas según el modelo estocástico. Este modelo propone que una célula diferenciada sufre un episodio transformante y adquiere propiedades de célula cancerosa (tomada de Eguiara *et al.*, 2012).**

### **1.5.2 Modelo jerárquico o modelo de las células troncales cancerosas**

Este modelo (figura 4) mantiene que la población de células cancerosas está organizada en una jerarquía funcional. En la parte más alta de esta jerarquía se encuentra una subpoblación de células troncales que poseen la capacidad de auto-renovación y diferenciación. Cuando estas células han adquirido mutaciones que causan una desregulación, alcanzan el estado de célula cancerosa (Clevers *et al.*, 2011; Dalerba *et al.*, 2007; Dick, 2008; Reya *et al.*, 2001). Según esta teoría solo las células troncales cancerosas (CTC) tienen la capacidad de mantener y expandir el tumor a otros tejidos (Eguiara *et al.*, 2012). Adicionalmente esta teoría propone que la masa tumoral está formada por una población fenotípicamente heterogénea, derivada de las CTC. Por otro lado el resto de la población de células cancerosas tiene un potencial de proliferación limitado y no contribuyen al crecimiento tumoral (Clevers *et al.*, 2011; Dalerba *et al.*, 2007; Dick, 2008; Reya *et al.*, 2001).

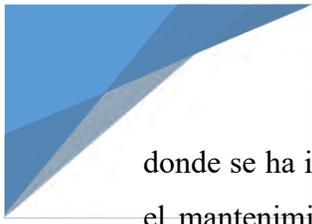


**Figura 4. Origen de las células cancerosas según el modelo jerárquico. Este modelo propone que una célula troncal presente en tejidos adultos sufre un episodio transformante alcanzando el estado de célula cancerosa (tomada de Eguiara *et al.*, 2012).**

### 1.6 Células troncales cancerosas en cáncer mamario

La existencia de CTC en cáncer mamario fue demostrada por primera vez por Al Hajj y colaboradores (2003). En este estudio, mediante citometría de flujo aislaron diferentes poblaciones de células a partir de efusiones pleurales y tumores extraídos a pacientes con cáncer mamario. Estas células fueron inyectadas en ratones inmunosuprimidos para inducirles tumores. De forma interesante ellos encontraron que había una población celular específica, que podía ser identificada por el fenotipo  $CD44^+/CD24^-$ , la cual al inyectarla en concentraciones muy bajas (aproximadamente 200 de estas células) eran capaces de desarrollar tumores en los ratones inmunosuprimidos. Además con el tiempo, estas células podían desarrollar toda la heterogeneidad celular presente en un tumor. En contraste las poblaciones celulares mezcladas requerían la presencia de cantidades 100 veces mayores para desarrollar dichos tumores (Al Hajj *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que esta población celular iniciadora de tumores mamaros puede identificarse por la presencia o ausencia de marcadores específicos como CD24, CD44, y ALDH1. CD24 es una proteína de membrana altamente expresada en diferentes tipos de cáncer (mamario, ovario, próstata). Esta proteína está involucrada en procesos de interacción célula - célula y se ha correlacionado con la formación de metástasis. Se ha sugerido que después de que las células cancerosas se diseminan del tumor primario y pasan al torrente sanguíneo, le permite adherirse al endotelio del órgano blanco a través de la interacción con la proteína P-selectina (Kristiansen *et al.*, 2003). CD44 es una proteína de membrana involucrada en la activación de linfocitos, adhesión a matriz extracelular, angiogénesis, proliferación celular, diferenciación y migración. Estudios en

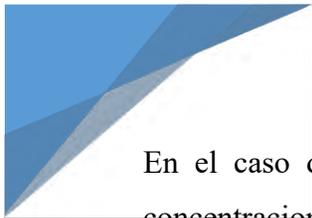


donde se ha inhibido la expresión de CD44 sugieren que esta proteína juega un rol importante en el mantenimiento de la troncalidad de las células troncales cancerosas mamarias (Pham *et al.*, 2009). Por otro lado, ALDH1 es una enzima responsable de la oxidación de aldehídos intracelulares en ácidos carboxílicos, y juega un rol importante en la diferenciación de las células troncales a través de la oxidación del retinol a ácido retinoico. Adicionalmente, se ha reportado que las células de cáncer mamario que presentan incremento en la actividad de ALDH1 tienen propiedades de CTC y son altamente tumorigénicas (Marcato *et al.*, 2011; Ginestier *et al.*, 2007).

### 1.7 Efecto del yodo molecular ( $I_2$ ) en cáncer mamario

El yodo es un elemento esencial para la vida, el cual es captado y metabolizado por todos los seres vivos. En la naturaleza el yodo puede encontrarse en forma de yoduros asociados a sales inorgánicas (NaI, KI), como yodo diatómico o molecular ( $I_2$ ) y en forma de yodatos y peryodato de sodio ( $NaIO_3$  y  $NaIO_4$ ). El yodo en los vertebrados, es obtenido por la dieta y absorbido a través del tracto gastrointestinal. Este elemento es un componente primordial para la formación de hormonas tiroideas en la glándula tiroidea, aunque también es captado por tejidos extra-tiroideos como estómago, intestino, glándulas salivales, plexos coroideos, próstata, ovarios y glándula mamaria (Aceves *et al.*, 2009). El yoduro ( $I^-$ ) es la forma química más abundante en el organismo y es internalizado en los diversos tejidos a través del co-transportador sodio-yodo conocido como NIS (Na-I symporter). Recientemente también se ha propuesto la presencia de un transportador de  $I_2$ , parecido al descrito en algas marinas que opera a través de difusión facilitada y, que permite la incorporación de esta forma química de yodo en la glándula mamaria normal y tumoral (Arrollo-Helguera *et al.*, 2006).

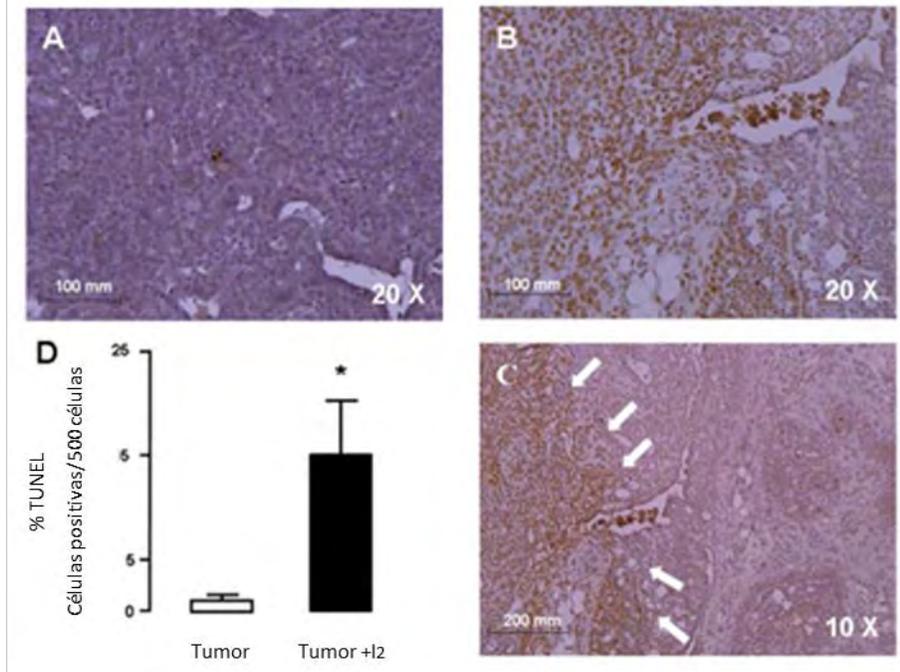
En los últimos años se ha reportado que el  $I_2$  ejerce efectos antiproliferativos, pro-apoptóticos y de re-diferenciación en modelos subclínicos y clínicos de patologías mamarias y prostáticas (Aceves *et al.*, 2013). Estudios moleculares han mostrado que el  $I_2$  ejerce estas acciones a través de dos mecanismos: uno directo que involucra las propiedades antioxidantes/oxidantes del  $I_2$  *per se*, y un mecanismo indirecto a través de la formación de yodo-lípidos (Alfaro *et al.*, 2013; Nava-Villalva *et al.*, 2015).



En el caso de los efectos antioxidante/oxidante se han obtenido datos que muestran que a concentraciones bajas de  $I_2$  se reduce significativamente la oxidación de lípidos por neutralización de especies reactivas de oxígeno; mientras que en altas concentraciones, puede actuar como un oxidante directo, disipando el potencial de membrana mitocondrial, lo cual permite la liberación del factor inductor de la apoptosis (AIF) e induce la apoptosis independiente de caspasas (Alfaro *et al.*, 2013; Shirvastava *et al.*, 2006).

Por otro lado, el  $I_2$  puede unirse con el ácido araquidónico, formando el lípido yodado 6-yodolactona (Aceves *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la 6-yodolactona (6IL) es un ligando de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR $\gamma$ ). Estos receptores son factores de transcripción que funcionan como reguladores del metabolismo de lípidos y que juegan un papel importante en la proliferación, diferenciación y apoptosis en muchas celulares cancerosas (mama, próstata y pulmón) (Nava-Villalva *et al.*, 2015)

Adicionalmente se ha reportado la existencia de poblaciones celulares con sensibilidad diferente al  $I_2$ . Estudios en modelos murinos en donde se evaluó el efecto de este elemento en la inducción de apoptosis en tumores inducidos con el cancerígeno N-metil-nitroso-urea (MNU) se encontró que la apoptosis ocurría en regiones determinadas, indicando una sensibilidad diferencial al  $I_2$  dentro de un mismo tumor (Figura 5; Aceves *et al.*, 2009).



**Figura 5. Apoptosis en tumores mamarios. Microfotografía (20X) del ensayo de TUNEL en tumores mamarios inducidos por el agente cancerígeno N-metil-nitroso-urea (MNU) en ratas control (A) y suplementadas con I<sub>2</sub> (B). Panel C detalle a 10X donde las flechas indican las regiones positivas para el ensayo de TUNEL y (D) análisis cuantitativo del ensayo de TUNEL (tomada de Aceves et al, 2009).**



## II. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han identificado células troncales tanto en tejido normal como canceroso, y se ha reportado que estas células están presentes incluso en las líneas celulares cancerosas inmortalizadas. Estas CTC, resultan de gran interés, ya que se les atribuye la capacidad de originar, mantener y expandir los tumores. Además, al ser más resistentes a tratamientos convencionales utilizados en oncología, como la quimioterapia o la radioterapia suponen un candidato clave para estudiar los mecanismos de metástasis y quimiorresistencia. Tratamientos dirigidos contra estas células podrían dar lugar a una eliminación completa del tumor y a la contención más efectiva de la enfermedad. Por otro lado, se ha reportado que el I<sub>2</sub> tiene efectos antiproliferativos y apoptóticos en diversos modelos de cáncer mamario, sin embargo no se ha estudiado su posible efecto sobre CTC mamarias. En este trabajo se analizó el efecto diferencial del I<sub>2</sub> en poblaciones troncales utilizando dos líneas celulares de cáncer que representa dos estadios de la patología mamaria: cáncer diferenciado, poco invasivo y responsivo a hormonas (Luminal; MCF-7) y el no diferenciado, no responsivo a hormonas y altamente invasivo (Basal; MDA-MB-231).



### **III. HIPÓTESIS**

El I<sub>2</sub> tiene efectos antineoplásicos en células troncales cancerosas a través de favorecer su diferenciación y por lo tanto inhibir su capacidad tumorigénica, independientemente de la agresividad tumoral.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del I<sub>2</sub> en células troncales cancerosas en dos modelos de cáncer mamario: diferenciado (MCF-7) y triple negativo (MDA-MB-231).

#### **4.2 Objetivos específicos**

Analizar el efecto del I<sub>2</sub> tanto en la formación de mamíferas como en la proliferación de CTC.

Analizar el efecto del I<sub>2</sub> en la instalación y progresión de xenotransplantes de mamíferas.

Analizar la participación de marcadores de troncalidad y diferenciación en la respuesta al I<sub>2</sub>.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

Se utilizaron células troncales cancerosas mamarias obtenidas a partir de las líneas celulares parentales MCF-7 y MDA-MB-231.

### 5.2 Cultivos en mono-capa

Las células (40000 células/mL) fueron cultivadas en placas Petri con medio de cultivo Dubelcco's modified Eagle's (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2% de penicilina/estreptomicina e incubados a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El tratamiento con I<sub>2</sub> fue realizado desde el inicio del cultivo y el medio fue renovado cada tercer día.

### 5.3 Cultivos en mamosferas

Las células (40000 células/mL) fueron cultivadas en platos de baja adherencia con medio de cultivo MammoCult (Human) suplementado con 4µg/mL de sal de heparina de sodio 2%, 0.48 µg/mL de hidrocortisona y 2% de penicilina/estreptomicina e incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El tratamiento con I<sub>2</sub> fue realizado desde el inicio del cultivo. El medio fue renovado cada tercer día transfiriendo las células a tubos falcon y centrifugando a 2500 rpm durante 3 minutos para posteriormente resuspender las células en medio de cultivo.

### 5.4 Curva de proliferación y viabilidad celular

Para la disgregación de las células y/o mamosferas, se agregó tripsina/EDTA y se incubó durante 1 minuto a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se estabilizó con medio DMEM y se transfirieron a tubos falcon. Se



utilizó azul de tripano 0.4% para verificar viabilidad celular y posteriormente las células viables fueron cuantificadas por el método de Neubauer.

## 5.5 Extracción de RNA y síntesis de DNAc

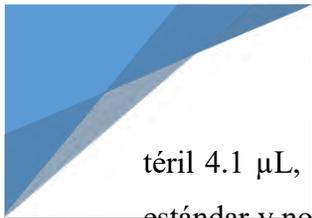
La extracción de RNA se realizó con el reactivo de TRIzol de acuerdo al protocolo del proveedor. Posteriormente se sintetizó DNAc mediante transcripción reversa utilizando los reactivos que se muestran en la tabla 1. La mezcla final se colocó en un termociclador a 40°C por 1 hora y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Tabla1. Reactivos utilizados para la síntesis de DNAc

Mix 1		Mix 2	
Oligo dt	1 µL	H <sub>2</sub> O	2.05 µL
RNA	2 µg	RNAasa OUT	0.7 µL
Aforar con H <sub>2</sub> O		Buffer 5x	5 µL
Volumen Final	15 µL	DNTP's	1.25 µL
		Superscript transcriptasa	1 µL
		Volumen Final	10 µL

## 5.6 PCR tiempo real

La reacción de PCR en tiempo real se realizó en un termociclador Rotor Gene RG-300 bajo las condiciones de 30 ciclos con una temperatura de 95 °C de fusión, 55-60 °C de alineamiento y 72 °C de extensión y se preparó como se indica a continuación: SYBR Green (FERMENTAS) 5 µL, oligonucleótido (sentido + antisentido; 10 nM), 0.4 µL, agua es.



téril 4.1  $\mu\text{L}$ , cDNA (muestra) 0.5  $\mu\text{L}$ . La expresión génica relativa se calculó usando una curva estándar y normalizada con la expresión de  $\beta$ -actina. Los marcadores evaluados se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Marcadores evaluados mediante PCR en tiempo real**

Gen	Marcador	Oligonucleótido	Tamaño (pb)
<b>CD44</b>	Troncalidad	S 5'-AGAAGGTGTGGCAGAAGAA-3' AS 5'-AAATGCACCATTTCCTGAGA-3'	116
<b>CD24</b>	Troncalidad	S 5'-CCCACGCAGATTTATTCCAG-3' AS 5'-GACTTCCAGACGCCATTG-3'	255
<b>E- Cadherina</b>	Troncalidad e invasión celular	S 5'-TGCCCAGAAAATGAAAAGG-3' AS 5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'	200
<b>Vimentina</b>	Troncalidad e invasión celular	S 5'-CCCTCAAATCCAAAACTCA-3' AS 5'-GAGCAGAAGGGCTTGAACAG-3'	600
<b>SOX2</b>	Troncalidad	S 5'-CACCTACAGCATGTCTACTC-3' AS 3'-CATGCTGTTTCTACTCTCCTC-5'	386

### 5.7 Ensayo de Herida (Wound-healing)

El ensayo de Herida se realizó siguiendo el protocolo descrito por Nava Villalva *et al.*, (2015). Se sembraron las células en placas de 60 mm a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL en 5 mL de DMEM suplementado con 10% SFB, y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  durante 12 horas, posteriormente las células adheridas fueron rasgadas dos veces en paralelo utilizando una punta de pipeta de 200  $\mu\text{L}$  y tratadas con  $\text{I}_2$  200  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Se determinó el número de células que migraron utilizando la aplicación Leica Suite versión 2.8.1 y las imágenes fueron capturadas con un objetivo 10X usando un microscopio DM 2500 y una cámara DFC 420.

### 5.8 Ensayo de invasión celular Transwell

El análisis de invasión celular fue realizado mediante ensayo de migración Transwell, donde cámaras Transwell fueron recubiertas con 40  $\mu\text{L}$  de matriz extracelular Matrigel, mezclado con 20



$\mu\text{L}$  de DMEM. Las células fueron sembradas en la parte superior de las cámaras a una densidad de  $1 \times 10^5$  células /pozo en 200  $\mu\text{L}$  de DMEM no suplementado. En la parte inferior de las cámaras se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado con 10% SFB. Las células fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Las células fueron fijadas con metanol al 100% y teñidas con azul de toluidina en borano al 1 %. Se determinó el número de células que migraron a la cámara inferior del filtro utilizando la aplicación Leica Suite versión 2.8.1 y las imágenes fueron capturadas con un objetivo 20X usando un microscopio DM 2500 y una cámara DFC 420.

## 5.9 Citometría de flujo

Los ensayos de citometría de flujo de CD44/CD24 se realizaron mediante el protocolo descrito por Sheridan *et al.*, 2006. Las células fueron lavadas con PBS y colectadas con VERSENO en tubos eppendorf, posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se añadió a las células combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos obtenidos de BD Biosciences contra CD44 (FITC; 1:50) y CD24 (PE; 1:50) y fueron incubadas a  $4^\circ\text{C}$  en la oscuridad durante 60 minutos. Las células etiquetadas fueron lavadas y fijadas con PBS conteniendo 2% de formaldehído y re suspendidas en 1mL de PBS.

Debido a la posición del epítipo, la citometría de flujo de E-cadherina/vimentina se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bontempo et al. 2016. Las células fueron colectadas con 0.05% EDTA/tripsina y lavadas con 0.05% EDTA/PBS en tubos eppendorf y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Las células fueron fijadas con PBS conteniendo 2% de formaldehído durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y permeabilizadas usando una solución de metanol/acetona (1:1) a  $-20^\circ\text{C}$  durante 1 minuto. Posteriormente se añadió a las células combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos obtenidos de BD Biosciences contra E-cadherina (Alexa 647; 1:50) y vimentina (PE; 1:50) y fueron incubadas a  $4^\circ\text{C}$  en la oscuridad durante 60 minutos. Las células fueron lavadas con PBS y re suspendidas en 1 mL de PBS. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo BD Biosciences Accuri C6. Los cálculos de las poblaciones se realizaron mediante el programa BD Biosciences Accuri C6.



## 5.10 Xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos (nu/nu)

Se utilizaron ratones hembra atímicos Nude-Foxn1 homocigotos (nu/nu) de seis a siete semanas de edad. Los ratones fueron mantenidos y reproducidos en condiciones óptimas de esterilidad, con ciclos de luz / oscuridad 12:12, temperatura de 18-22°C y con una dieta *ad-libitum* de agua y comida en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los ratones fueron manipulados y sacrificados de acuerdo a las normas descritas en el protocolo #35 aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Se inocularon con una jeringa (aguja de 22m)  $2 \times 10^6$  células, resuspendidas en 50  $\mu\text{L}$  de medio y 50  $\mu\text{L}$  de matrigel de forma subcutánea a ratonas de 7 semanas de edad. Se realizó un seguimiento del estado general del animal y de la progresión tumoral. Se generaron los siguientes grupos: 1) monocapa control 2) monocapa + I<sub>2</sub>, 3) mamosfera control 4) mamosfera + I<sub>2</sub>. El suplemento de I<sub>2</sub> (0.025%) fue administrado en una solución de I<sub>2</sub> en el agua para beber, iniciando el día de la inyección de las células y mantenido hasta el día en que se extrajo el tumor.

## 5.11 Extracción tumoral

Los tumores fueron extraídos antes de alcanzar un volumen de 2 cm<sup>3</sup> (según la norma de bioética internacional del NIH) o a las tres semanas de inoculación. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina (70/6 mg/kg), se extrajeron los tumores y se tomaron medidas del volumen y peso del tumor. Las muestras fueron inmediatamente almacenadas a -70°C ó en formalina.

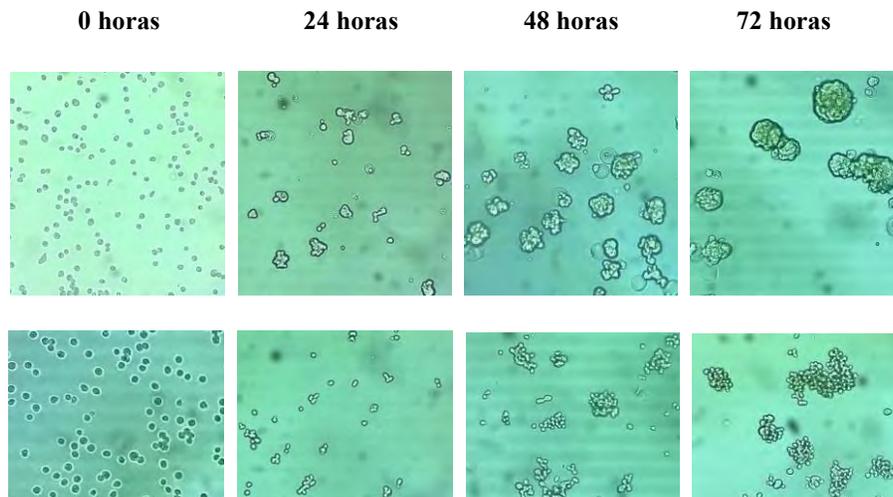
## 5.12 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante los métodos t-student y ANOVA de una y dos vías seguido de pruebas *post hoc* de Tukey para determinar diferencias significativas entre grupos experimentales, haciendo uso del software R (disponible en <http://www.r-project.org/>) y considerando un  $\alpha = 0.05$ .

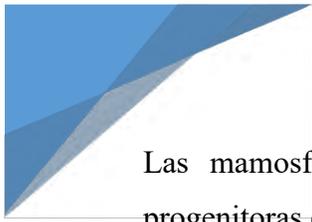
## IV. RESULTADOS

### 4.1 Análisis de marcadores de troncalidad en cultivos de mamosferas

Para la obtención de células troncales de cáncer mamario se realizaron cultivos de baja adherencia en mamosferas de las líneas celulares MCF-7 (mMCF-7) y MDA-MB-231 (mMDA-231). Estos cultivos están basados en la premisa de que únicamente las células troncales pueden sobrevivir en cultivos no adherentes formando pequeñas colonias esféricas suspendidas, mientras que el resto de las células mueren por anoikis, que es la apoptosis inducida por la pérdida de la adherencia con la matriz extracelular (Iglesias *et al.*, 2013). En la figura 6 se puede observar cómo se van formando las mamosferas en los diferentes tiempos de cultivo, observando que es hasta las 72 horas de cultivo que las mamosferas comienzan a tener una forma más definida.

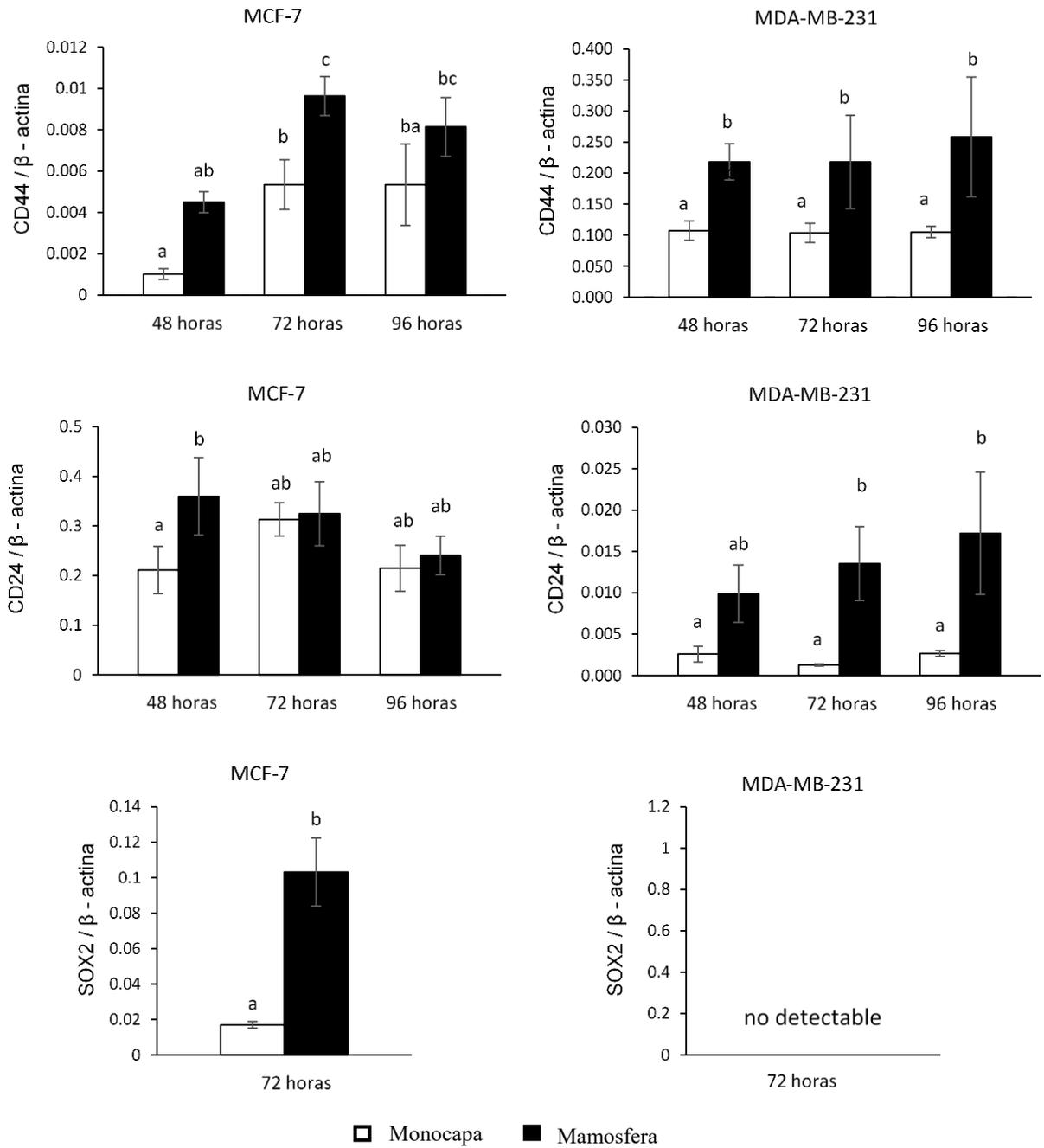


**Figura 6. Micrografías (10X) de cultivos de mamosferas de las líneas celulares de cáncer mamario MCF-7 (mMCF-7) y MDA-MB-231 (mMDA-231) en los diferentes tiempos de cultivo.**



Las mamíferas además de contener células troncales, también pueden contener células progenitoras en varios estados de diferenciación (Dontu *et al.*, 2003). Para identificar el momento en que las mamíferas estuvieran mayormente enriquecidas con CTC, se evaluaron los marcadores de troncalidad CD44, CD24 y SOX2 durante los diferentes tiempos de cultivos, tanto en los cultivos en mamíferas (mMCF-7) como en los cultivos en monocapa de células parentales (pMCF-7). Como se puede observar en la figura 7, se encontró un aumento significativo del marcador CD44 en los cultivos de mamíferas MCF-7 (mMCF-7) con respecto a los cultivos de células parentales MCF-7 (pMCF-7) a las 72 h de cultivo. Por su parte, al analizar la línea MDA-MB-231 se encontró un aumento significativo de CD44 a las 48, 72 y 96 horas entre los cultivos de mamíferas (mMDA-231) con respecto a los cultivos de células parentales (pMDA-231). Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos para CD24 encontramos un aumento significativo de mMCF-7 con respecto a pMCF-7 a las 48 horas de cultivo y en mMDA-231 con respecto a pMDA-231 a las 72 y 96 horas.

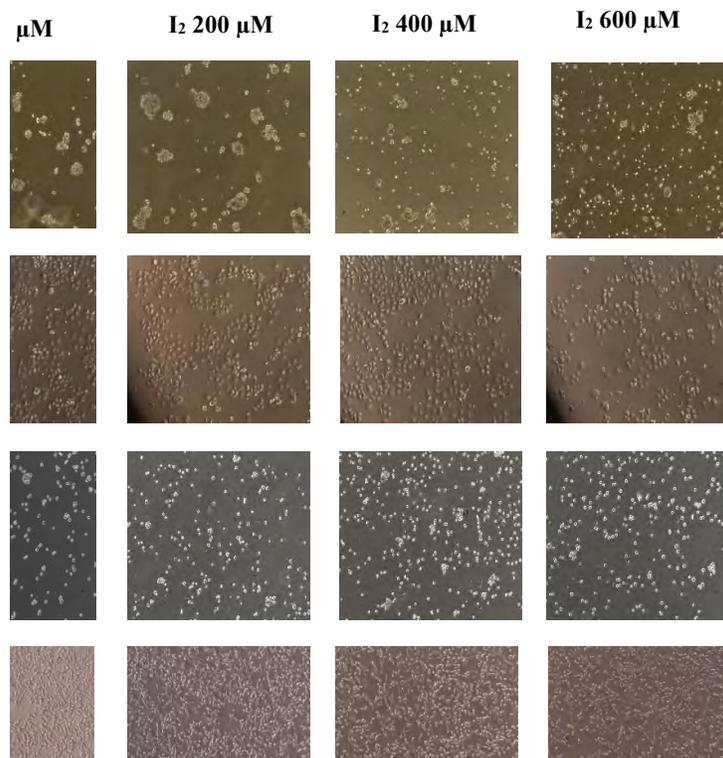
Al analizar el marcador de troncalidad SOX2 a las 72 horas de cultivo, encontramos un aumento significativo de hasta 10 veces en los cultivos mMCF-7 con respecto a los de pMCF-7. Mientras que las células MDA-MB-231 no expresaron este marcador en ninguna de las sub-poblaciones



**Figura 7. Expresión del RNAm cuantificado por RT qPCR de los marcadores de troncalidad en células parentales (monocapa) y troncales (mamosfera) de los tipos celulares mamarios MCF-7 y MDA-MB-231. Los resultados fueron normalizados usando como gen estructural a la  $\beta$ -actina. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ )**

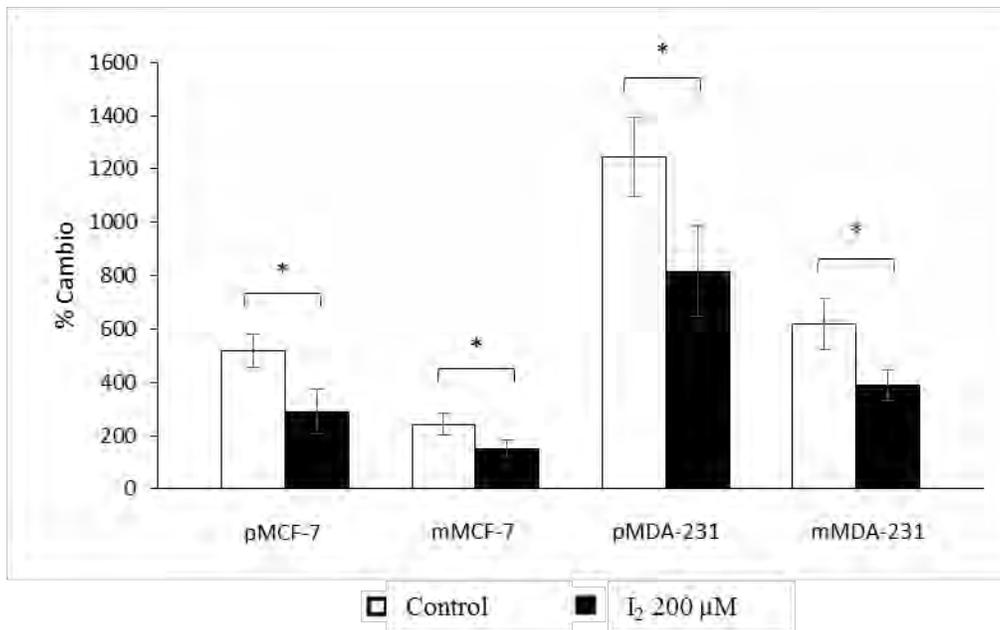
## 4.2 Efectos antiproliferativos del I<sub>2</sub> en cultivos en mamosferas

Previamente se ha reportado que el I<sub>2</sub> a una concentración 200  $\mu$ M tiene efectos antiproliferativos en células de cáncer mamario MCF-7 y MDA-MB-231. Nosotros evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de I<sub>2</sub> en los cultivos de pMCF-7, mMCF-7, pMDA-231 y mMDA-231 (figura 8). Lo que se encontró fue que la proliferación aparente de los cultivos de pMCF-7 y pMDA-231 disminuía con el I<sub>2</sub> de una manera dependiente de la dosis y que en los cultivos de mMCF-7 y mMDA-231, cuando se usaban concentraciones mayores a 200  $\mu$ M se inhibía también la formación de mamosferas.



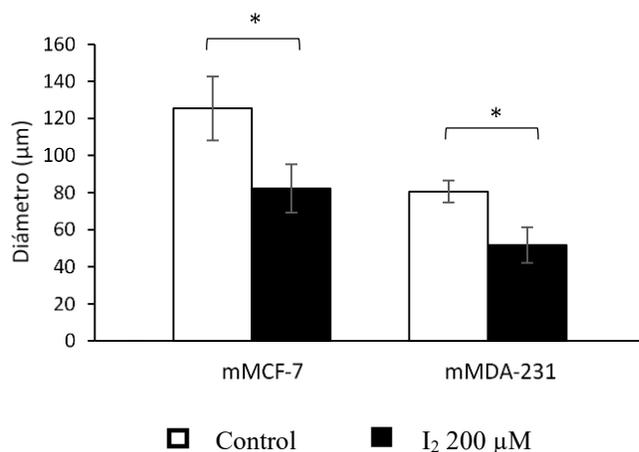
**Figura 8.** Efecto de diferentes concentraciones de I<sub>2</sub> en cultivos de células parentales (p) y troncales (m) de cáncer mamario. Micrografías (8X) a las 72horas de cultivo.

Por lo cual se decidió analizar el efecto de 200  $\mu\text{M}$   $\text{I}_2$  en la proliferación celular de todos los tipos celulares a las 72 horas. Lo primero que llama la atención es que las células pMDA-231 tienen un tiempo de duplicación significativamente mayor que las células pMCF-7 corroborando su mayor capacidad invasiva. En segundo lugar, se observa que los cultivos de células troncales disminuyen su proliferación, en comparación con las parentales, independientemente del tipo celular, lo cual concuerda con la descripción de que estas células tienden a entrar en quiescencia. Finalmente, se corrobora que el suplemento de  $\text{I}_2$  a 200  $\mu\text{M}$  disminuye significativamente el número celular en una proporción cercana al 50% en todos los tipos y subtipos celulares.



**Figura 9.** Efecto del  $\text{I}_2$  (200 $\mu\text{M}$ ) en la proliferación celular de cultivos parentales (p) y troncales (m) de células MCF-7 y MDA-MB-231. Se ilustra el % de cambio en la proliferación celular de los cultivos pMCF-7, mMCF-7, pMDA-231 y mMDA-231 a las 72 horas.\* denota diferencias significativas con respecto a su control (T-student;  $p < 0.05$ )

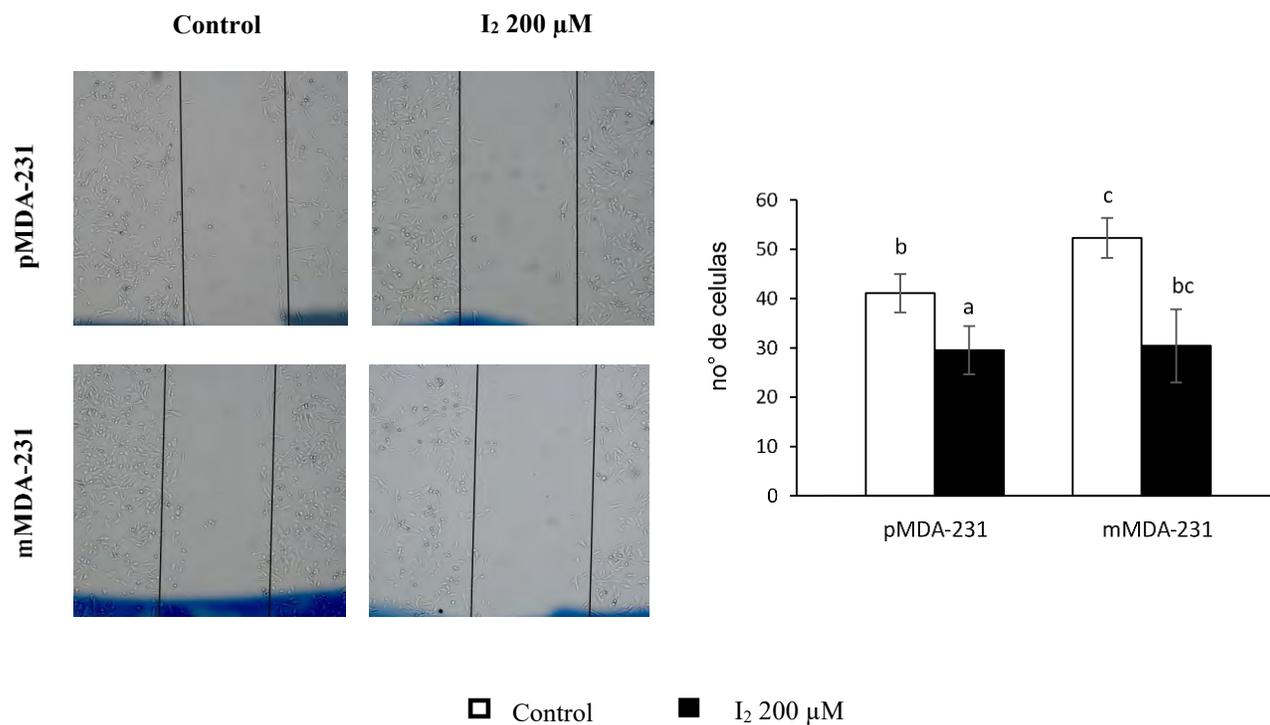
También se evaluó en las mismas condiciones, el tamaño de las mamosferas, encontrando una disminución significativa en el diámetro de las mamosferas en ambas líneas celulares (figura 10).



**Figura 10. Efecto del I<sub>2</sub> en el diámetro de mamosferas de ambas líneas celulares. \* denota diferencias significativas con respecto a su control (t-student; p < 0.05)**

#### **4.3 Invasión y migración *in vitro***

Para evaluar el efecto del suplemento de I<sub>2</sub> sobre la capacidad invasiva de las mamosferas en un modelo *in vitro* se realizaron ensayos de migración y Transwell en ambos tipos celulares. Encontramos una muy baja capacidad migratoria en la línea celular MCF-7 (datos no mostrados). En contraste, la línea celular las mamosferas (mMDA-231) mostraron una mayor capacidad migratoria con respecto a las células pMDA-231. La presencia de I<sub>2</sub> en los cultivo se acompañó de una disminución en la capacidad migratoria en ambos tipos celulares (Figura 11).

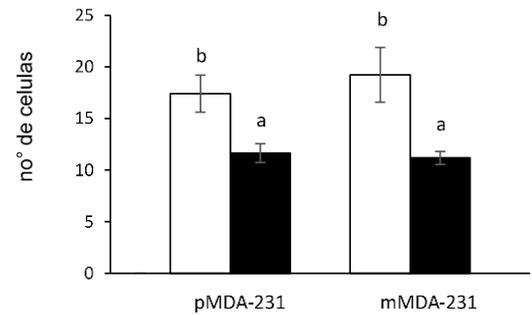


**Figura 11. Efecto del suplemento de I<sub>2</sub> sobre la capacidad de migración de células pMDA-231 y mMDA-231 a las 24 horas mediante el ensayo de herida. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ )**

La capacidad de movilidad se analizó mediante el ensayo de Transwell en las células MDA-MB-231, no se encontraron diferencias en la entre los cultivos en mMDA-231 y pMDA-231. Al suplementar los cultivos con I<sub>2</sub> encontramos una disminución en la capacidad invasiva en ambos tipos celulares (Figura 12).



I<sub>2</sub> 200 μM



**Figura 12. Efecto del I<sub>2</sub> sobre la capacidad invasiva de células pMDA-231 y mMDA-231 mediante la cámara Transwell. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ )**

#### 4.4 Análisis del efecto del I<sub>2</sub> sobre las poblaciones celulares

Una característica importante de los tumores y de las líneas inmortalizadas de cáncer es que están formadas por diferentes poblaciones celulares con fenotipos distintos. Por lo cual, se evaluó el efecto del I<sub>2</sub> sobre la población de CTC mediante citometría de flujo de las poblaciones troncales (CD44/CD24) y/o trans-diferenciadas por TEM (E-cadherina/vimentina; E-cad/vim) en los cultivos parentales y troncales.

En la figura 13 A se muestran los resultados de los perfiles para la línea celular MCF-7. El cultivo de mamíferas mostró un aumento significativo de la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> con respecto a las parentales y una disminución de la población CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> en las mamíferas con respecto a las parentales. Al suplementar los cultivos con I<sub>2</sub> durante 72 horas, encontramos una disminución



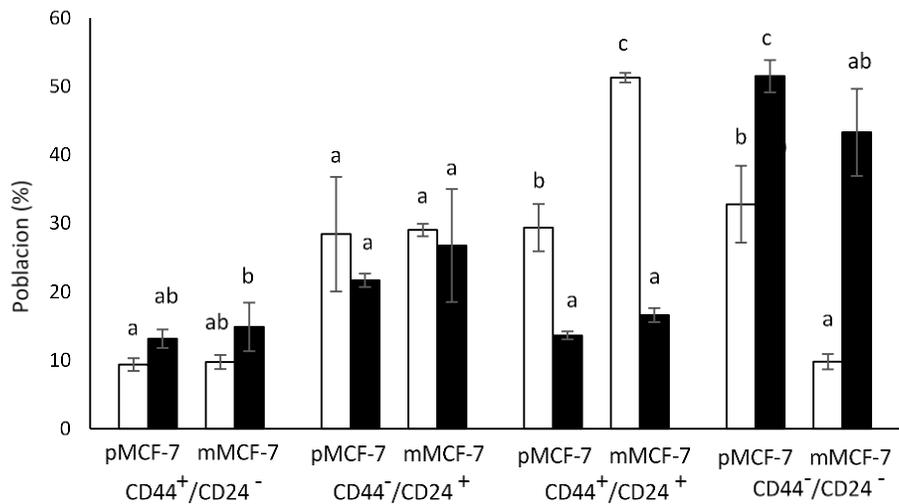
significativa de las poblaciones CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> y un enriquecimiento en la población CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> en ambos cultivos.

Al analizar los resultados de los perfiles de la línea celular MDA-MB-231 (Figura 13 B), encontramos un enriquecimiento en la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> en ambos cultivos, sin embargo no encontramos diferencias significativas entre las mamósferas con respecto a las parentales. Al suplementar los cultivos con I<sub>2</sub> durante 72 horas, encontramos una disminución significativa de las poblaciones CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> y un aumento en la población CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> en los cultivos de mamósferas.

Por otro lado, al analizar las poblaciones de transformación TEM usando los marcadores E-cad/vim se encontró un efecto similar al ocurrido con las poblaciones troncales. En la figura 14 podemos observar que los cultivos de mMCF-7 en condiciones control están enriquecidas con las poblaciones E-cad<sup>+</sup>/vim<sup>-</sup> y E-cad<sup>+</sup>/vim<sup>+</sup>, pero cuando las células son suplementadas con I<sub>2</sub> por 48 horas hay una disminución significativa de la población E-cad<sup>+</sup>/vim<sup>+</sup> y hay un aumento de la población E-cad<sup>-</sup>/vim<sup>-</sup>.



A



B

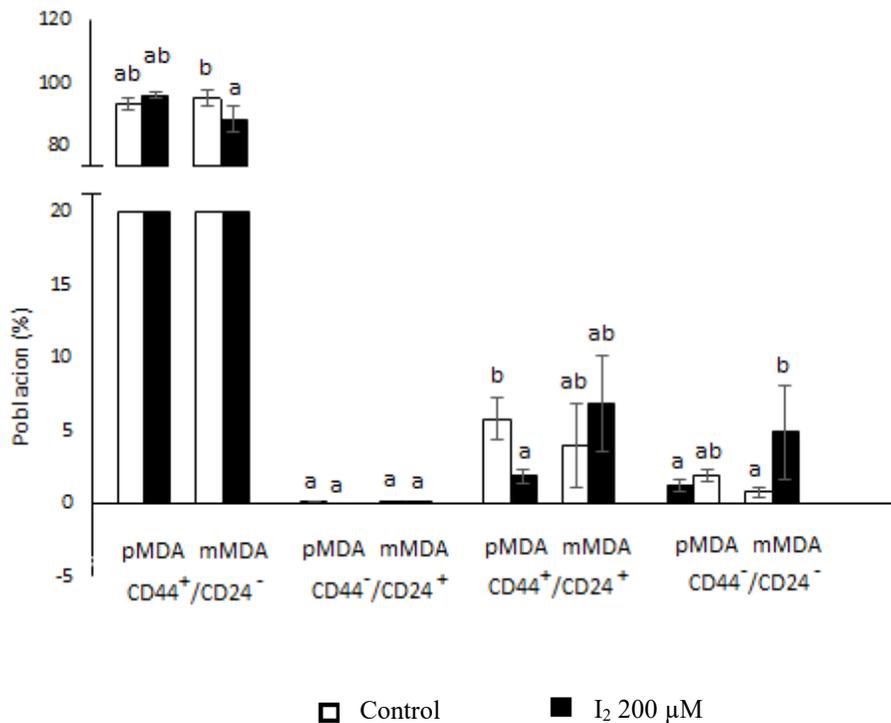
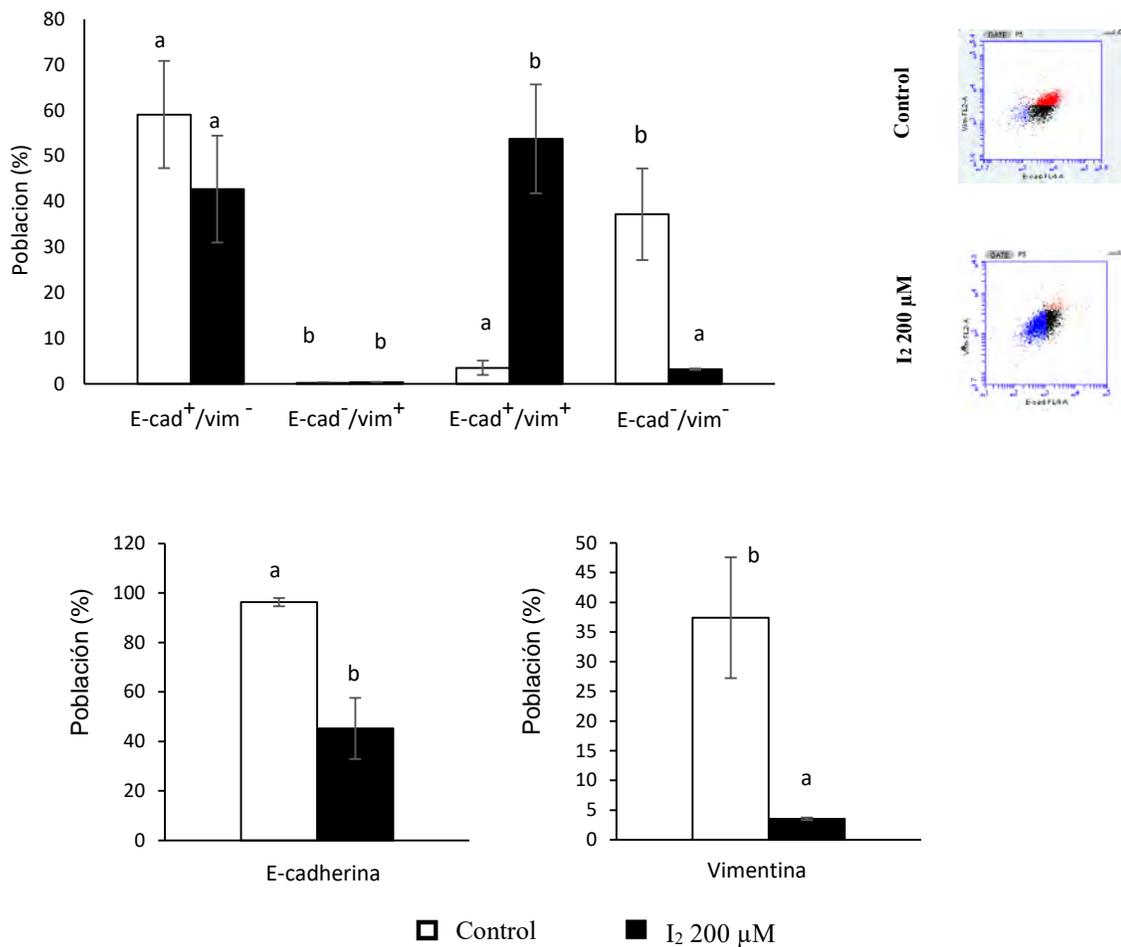


Figura 13. Análisis del suplemento del I<sub>2</sub> sobre las poblaciones CD44/CD24 mediante citometría de flujo en cultivos de monocapa y mamófera. (A) Porcentaje de las diferentes sub-poblaciones CD44/CD24 en pMCF-7 y mMCF-7. (B) Porcentaje de las diferentes sub-poblaciones CD44/CD24 en pMDA-231 (pMDA) y mMDA-231 (mMDA). Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ )



**Figura 14. Análisis del suplemento del I<sub>2</sub> por 48 horas sobre las poblaciones E-cad/vim mediante citometría de flujo en cultivos de mMCF-7. (A) Porcentaje de sub-poblaciones E-cad/vim. (B) Grafica de puntos de las poblaciones E-cad<sup>+</sup>/vim<sup>+</sup> (rojo) y E-cad<sup>-</sup>/vim<sup>-</sup> (azul). (C) porcentaje de las subpoblaciones E-cadherina<sup>+</sup> y (D) vimentina<sup>+</sup>. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey; p<0.05)**



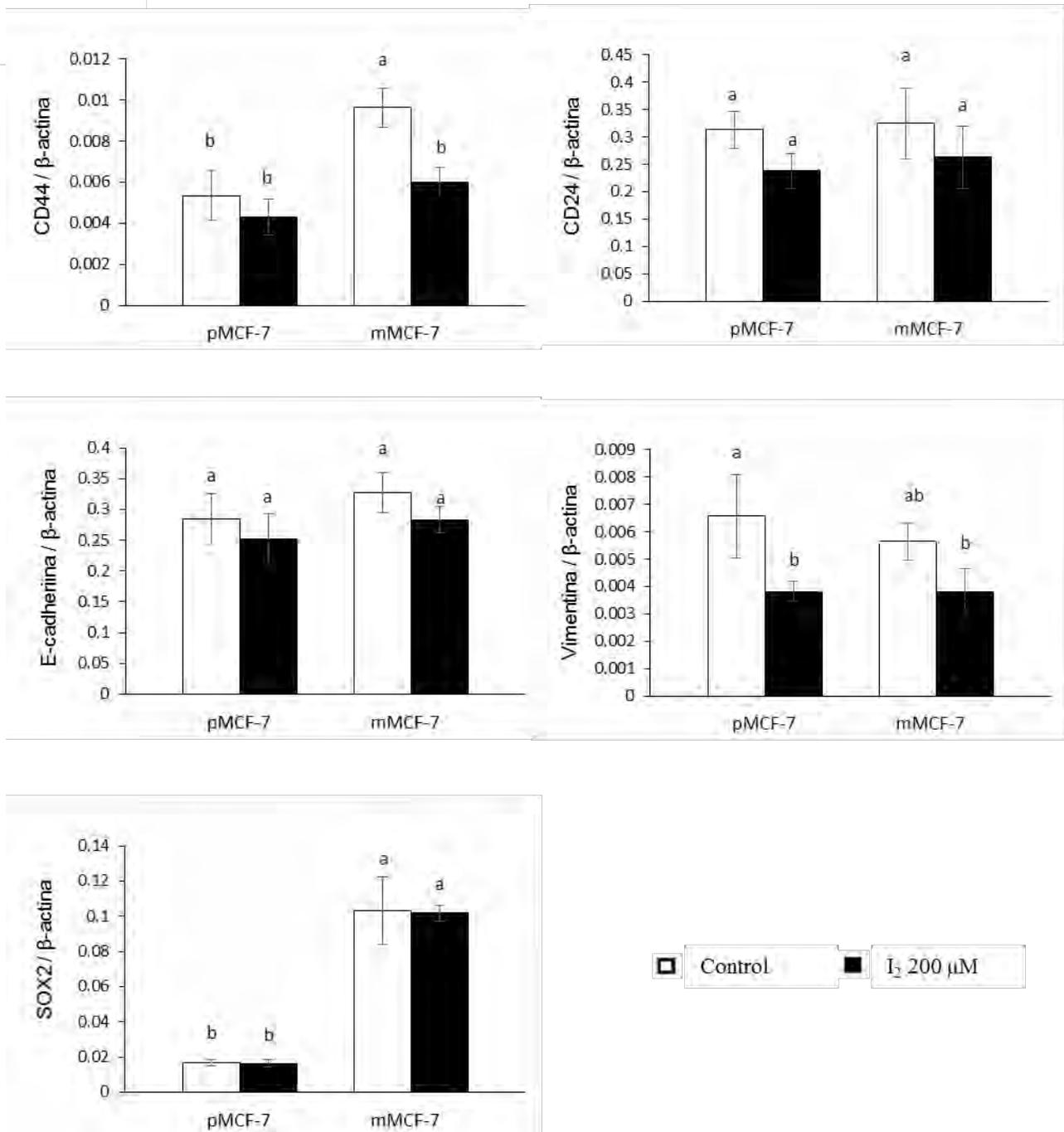
#### **4.5 Análisis del efecto del I<sub>2</sub> sobre la expresión de CD44, CD24, E-cadherina, Vimentina y SOX2**

Posteriormente se hicieron análisis de RT qPCR para evaluar el efecto del I<sub>2</sub> sobre la expresión de mRNA de CD44, CD24, E-cadherina, vimentina y SOX2 de la línea MCF-7 (figura 15). Los resultados mostraron que el yodo disminuye significativamente los transcritos de CD44 en las células troncales y vimentina en las células parentales. Al analizar la expresión del gen de troncalidad SOX2, se corroboró el incremento significativo en las mamosferas, pero no se observan cambios con el suplemento de I<sub>2</sub>.

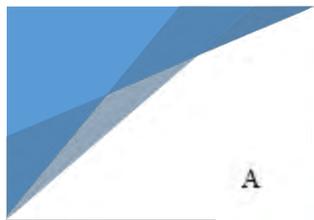
#### **4.6 Xenotransplantes de mamosferas**

Para evaluar el efecto del suplemento de I<sub>2</sub> sobre la capacidad tumorigénica de las mamosferas en un modelo *in vivo* se generaron xenotransplantes de células pMCF-7 y mMCF-7, en ratones inmunosuprimidos (Fox1 nu/nu). En la figura 16 se muestra un nulo crecimiento de los xenotransplantes con esta línea celular.

Por su parte, en La figura 17 se muestran las imágenes y el crecimiento tumoral de la línea MDA-MB-231. Los xenotransplantes de mamosferas mMDA-231 crecieron significativamente más que los xenotransplantes de células parentales pMDA-231. Mientras que el suplemento de I<sub>2</sub> en el agua de beber disminuye significativamente el crecimiento de ambos xenotransplantes



**Figura 15. Efecto del I<sub>2</sub> sobre la expresión del RNAm de marcadores de CTC y TEM mediante RT qPCR en pMCF-7 y mMCF-7. Los resultados fueron normalizados usando como gen estructural a la β-actina. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey; p < 0.05)**



A

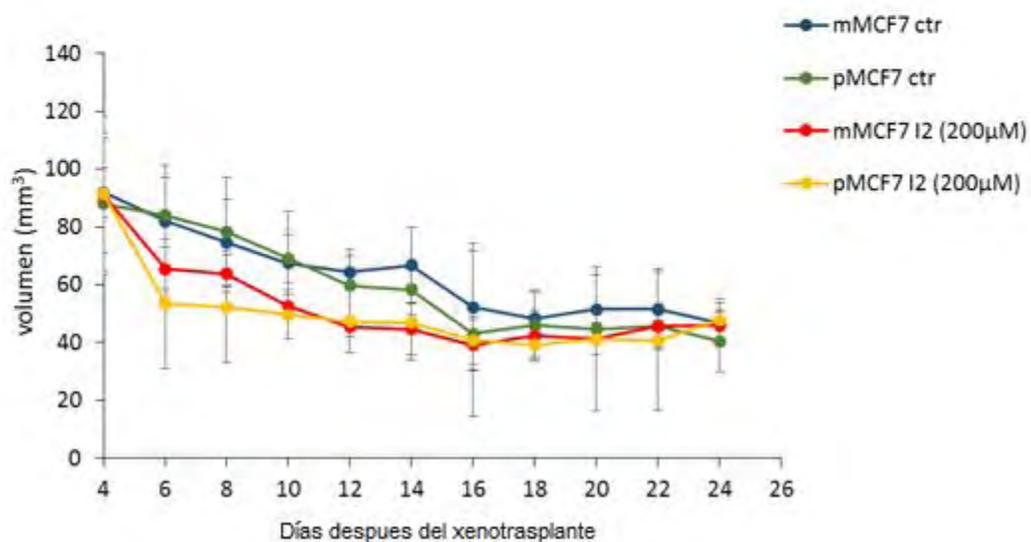


Control



I<sub>2</sub> 200µM

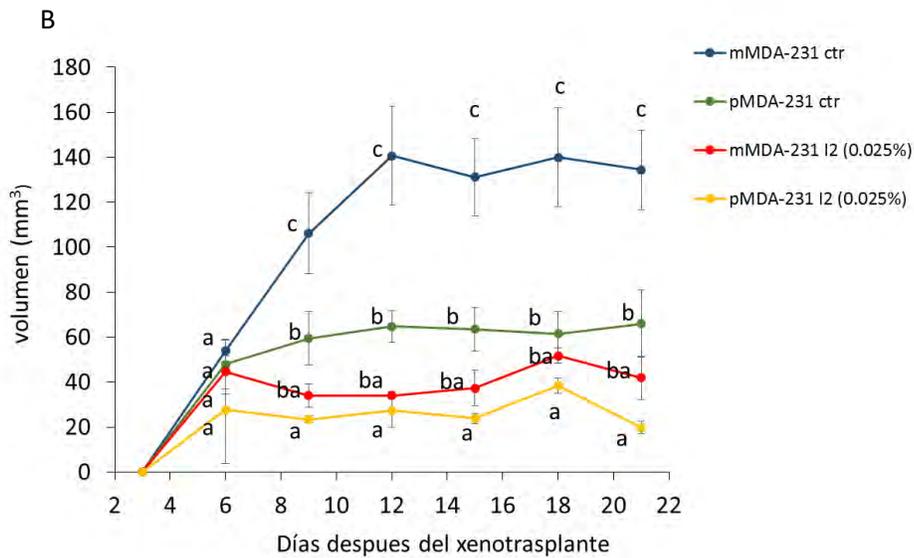
B



**Figura 16. Efecto del I<sub>2</sub> sobre la capacidad tumorigénica de xenotransplantes pMCF-7 y mMCF-7. Los animales fueron inoculados con células parentales (pMCF-7) en el flanco izquierdo y con mamóferas (mMCF-7) en el flanco derecho. El día de la inoculación, un grupo de animales se suplementó con agua destilada y otro con I<sub>2</sub> (0.025%) en el agua para beber. (A) Imágenes de los xenotransplantes tomadas el día 22 post-injerto. (B) Registro del crecimiento tumoral.**



A



**Figura 17. Efecto del I<sub>2</sub> sobre la capacidad tumorigénica de xenotransplantes pMDA-231 y mMDA-231. Los animales fueron inoculados con células parentales (pMDA-231) en el flanco izquierdo y con mamíferas (mMDA-231) en el flanco derecho. El día de la inoculación, un grupo de animales se suplemento con agua destilada y otro con I<sub>2</sub> (0.025%) en el agua para beber. (A) Imágenes de los xenotransplantes tomadas el día 22 pos injerto. (B) Registro del crecimiento tumoral. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ )**



## V. DISCUSIÓN

Las líneas celulares de cáncer mamario son modelos accesibles que permiten el estudio de los mecanismos moleculares de la carcinogénesis. La mayoría de estas líneas celulares han mostrado contener una sub-población de células que muestran características funcionales de células troncales con capacidad tumorigénica (Comasa *et al.*, 2015; Fillmore *et al.*, 2008; Iglesias *et al.*, 2013). Las CTC pueden ser purificadas por diferentes métodos basados en las diferencias en morfología, resistencia a drogas, marcadores de membrana, expresión de genes y comportamiento. Entre estos métodos, los cultivos en mamosferas han sido ampliamente usados para el enriquecimiento de células troncales de cáncer mamario.

Estos cultivos están basados en la premisa de que solo las células con propiedades de célula troncal pueden sobrevivir en un medio de baja adherencia y pobre en factores de diferenciación formando pequeñas colonias esféricas suspendidas, mientras que el resto de las células mueren por anoikis, que es la apoptosis inducida por pérdida de la adherencia con la matriz extracelular (Iglesias *et al.*, 2013). Para la formación de las mamosferas, las células troncales secretan y depositan diversas proteínas de matriz extracelular que contribuyen a su adhesión, donde la expresión de E-cadherina es esencial (Dontu *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2013). Estas mamosferas se pueden considerar como pequeñas matrices extracelulares suspendidas, lo cual permite que algunas células no troncales, con menor tiempo de duplicación, se adhieran también ellas y sobrevivan. La adhesión de diversos sub-tipos celulares provoca que con el tiempo disminuya la proporción de células troncales presentes en las mamosferas.

En este trabajo utilizamos dos líneas celulares de cáncer mamario: MCF-7 que representa un modelo de cáncer mamario de tipo luminal y MDA-MB-231 que representa un modelo de tipo basal. Nuestros resultados mostraron que a las 72 horas, cuando el cultivo celular mostraba la mayor formación de mamosferas, coincidía con la mayor expresión de los marcadores de troncalidad para glándula mamaria: CD44, CD24 y SOX2. CD44 es una proteína de membrana que es considerada como el marcador canónico para cáncer mamario y se sabe participa en el mantenimiento de las propiedades de pluripotencia y auto-renovación de las células troncales de cáncer mamario (Pham *et al.*, 2009). CD24 es otra proteína de membrana que se ha encontrado estar altamente expresada en diferentes tipos de cáncer (mamario, ovario, próstata, cáncer) y se ha



demostrado estar involucrada en procesos de interacción célula-célula con el tejido blanco durante la formación de metástasis, sin embargo, otros estudios han correlacionado la expresión de este marcador con un mejor pronóstico (Chen *et al.*, 2015; Kristiansen *et al.*, 2003; Mylona *et al.*, 2008). SOX2 es un factor de transcripción que participa en la regulación de las propiedades de auto-renovación y pluripotencia en células troncales (Jeter *et al.*, 2009) y se ha reportado estar mayormente enriquecido en células MCF-7 que en células MDA-MB-231 (Ling *et al.*, 2012).

Una vez establecido el tiempo de enriquecimiento de las mamosferas, se analizó su susceptibilidad al yodo. Nuestros datos corroboraron por un lado, que las células parentales MDA-MB-231 consideradas más invasivas, tienen una tasa de replicación mayor a la observada en las células parentales MCF-7. También observamos que las mamosferas disminuyen significativamente su tasa de replicación prácticamente a la mitad que su contraparte parental. Esta diferencia puede explicarse por el hecho de que las CTC comparten muchas características con las células troncales adultas, incluyendo su capacidad a entrar en quiescencia o arresto celular (Moore and Lyle, 2011). Con respecto al efecto del yodo encontramos que ambas poblaciones mantienen su susceptibilidad a este halógeno indicando que los mecanismos involucrados en dicho efecto parecen ser independiente de las vías relacionadas con los estrógenos y/o con el factor de crecimiento HER2. Las células MCF-7 son responsivas a estrógenos y progesterona (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>), mientras que las MDA-MB-231 son triple negativas (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>) (Holliday and Speirs, 2011).

La capacidad invasiva se analizó únicamente en las células MDA-MB-231, ya que como se ha descrito anteriormente las células MCF-7 son poco invasivas. Nuestros resultados mostraron que ambas subpoblaciones (parentales y troncales) tiene una gran capacidad de movilidad en los estudios *in vitro*, y que el suplemento de yodo, disminuye esta característica en igual magnitud. Se ha atribuido a proteínas como la vimentina y N-cadherina como las responsables de conferir la capacidad de movimiento a las células mesenquimales normales así como a las células tumorales invasoras o metastásicas (Morel *et al.*, 2008). Además, estos resultados concuerdan con un estudio previo de nuestro laboratorio utilizando un modelo de cáncer quimio-resistente a doxorubicina, donde se describió que el yodo inhibe la expresión de vimentina asociado a la recuperación de la sensibilidad al fármaco (Bontempo *et al.*, 2016).

Una característica importante de los tumores y de las líneas inmortalizadas de cáncer es que están formadas por diferentes poblaciones celulares con fenotipos distintos. El fenotipo canónico

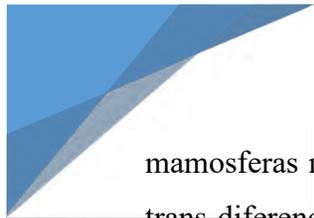


CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ha sido utilizado para la identificación de células troncales de cáncer mamario (Al-Hajj *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios recientes han reportado que las mamosferas de diferentes líneas celulares de cáncer mamario no presentan el fenotipo canónico como el más abundante (Smart *et al.*, 2013). Nosotros corroboramos este reporte en nuestros cultivos encontrando que el fenotipo predominante de las mamosferas de células MCF-7 es el doble positivo (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>).

Este fenotipo también ha sido reportado en CTC de otros tipos de cáncer como de colorrectal y pancreático (Yeung *et al.*, 2010; Rao and Mohammed, 2015). Además, se ha reportado que en células MCF-7 la inducción de la transición epitelio-mesénquima (TEM) a través de la sobre-expresión de SLUG se asocia a células con un fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>. En contraste, la sobre-expresión de SLUG en células mamarias de tipo basal como las MCF-10, se asocia a células con el fenotipo canónico CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, sugiriendo que solo las células de tipo basal son susceptibles de la adquisición de este fenotipo canónico (Bath- Nakshatri *et al.*, 2010). En congruencia con lo anterior, nosotros encontramos que las mamosferas de la línea MDA-MB-231 de tipo basal, están enriquecidas con células que presentan este fenotipo canónico CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Sin embargo este enriquecimiento también se presentó en las células parentales, lo cual probablemente fue debido a que como se ha reportado anteriormente, la línea celular MDA-MB231 contiene una alta proporción de CTC (Wang *et al.*, 2014).

De igual manera, al analizar los marcadores de TEM, encontramos que las poblaciones enriquecidas con células troncales (mMCF-7) contenían una mayoría de células doble positivas a estos marcadores (E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup>). Este dato concuerda con lo reportado en la literatura mostrando que la inducción del fenotipo TEM se asocia a la adquisición de características de tipo troncal (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>), incrementando su habilidad para formar mamosferas, así como en su capacidad tumorigénica (Manni *et al.*, 2008). Esta convergencia de ambos fenotipos apoya la noción de que ambas teorías parecen ser complementarias y permite proponer que la conversión hacia el tipo “troncal-TEM” parece ser la condición obligatoria para adquirir la capacidad de duplicación, resistencia e invasión necesaria para la tumorigénesis (Liu and Fan, 2015).

Nuestros resultados también muestran que el suplemento de I<sub>2</sub> disminuye las sub-poblaciones de tipo troncal (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) y TEM (E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup>) y aumenta la presencia de células doble negativas (CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> y E-Cad<sup>-</sup>/Vim<sup>-</sup>), siendo este efecto más exacerbado en las mamosferas. Estos resultados aunados a la lenta proliferación encontrada en los cultivos de



mamíferas nos permite sugerir que el  $I_2$  disminuye la población de CTC a través de inducir su trans-diferenciación a otros fenotipos menos agresivos, sin embargo, estudios específicos para comprobar esta hipótesis son necesarios. Datos previos han mostrado que el  $I_2$  ejerce sus efectos por al menos dos mecanismos. Uno directo, a través de las propiedades oxidativas/antioxidativas del  $I_2$  disipando el potencial de membrana mitocondrial e induciendo mecanismos de apoptosis dependientes o no de caspasas (Alfaro *et al.*, 2013; Shirvastava *et al.*, 2006). Mientras que el indirecto involucra la formación del lípido yodado conocido como la 6-yodolactona (6-IL; Nava-Villalva *et al.*, 2014).

Este lípido yodado ejerce sus funciones mediante la activación de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo gama (PPAR $\gamma$ ) (Nava-Villalva *et al.*, 2014). La activación de este receptor por la 6-IL involucra primordialmente la re-diferenciación celular ya que se acompaña de la acumulación de lípidos, cambios en la expresión de genes asociados con un estado más diferenciado, menor malignidad y una disminución en la velocidad de crecimiento y capacidad clonogénica (Mueller *et al.*, 1998; Núñez-Anita *et al.*, 2011). Estos datos concuerdan con estudios que muestran que la activación de PPAR $\gamma$  por agonistas sintéticos en CTC cerebrales inhibe su proliferación en asociación con disminuciones en la expresión de SOX2, Nanog y otros genes de troncalidad (Pestereva *et al.*, 2012). Igualmente concuerdan con un estudio previo de nuestro laboratorio donde el suplemento de  $I_2$  a células quimiorresistentes a doxorubicina, indujo un incremento en la expresión de PPAR $\gamma$  y se acompañó de la recuperación de la sensibilidad al fármaco (Bontempo *et al.*, 2016).

Para analizar la capacidad tumorigénica de los subtipos celulares y su respuesta al yodo se utilizaron ratones inmunosuprimidos. Los xenotransplantes con células pMCF-7 y mMCF-7 corroboraron la poca tumorigenicidad de esta línea celular, mostrando un nulo crecimiento tumoral. Estos datos contrastan con reportes en la literatura donde muestran que las células MCF-7 son capaces de generar xenotransplantes (Fleming *et al.*, 2010; Paruthiyil *et al.*, 2004). Desconocemos porque en nuestras manos no fue posible amplificarlos pero la calidad de los cultivos celulares (número de pases, integridad de la línea, etc) puede ser una posibilidad. Nuestros cultivos se generaron de una línea parental recién adquirida de la ATTC.

Los resultados obtenidos con las células MDA-MB-231 muestran claramente su capacidad invasiva. Además, al analizar el desarrollo de los xenotransplantes, encontramos que las mMDA-231



presentan una mayor capacidad tumorigénica que las células parentales. El suplemento de  $I_2$  en el agua para beber fue capaz de disminuir la capacidad tumorigénica tanto de las mamíferas como de las células parentales. Este hallazgo corrobora los resultados *in vitro* y sustenta la hipótesis de que el yodo mantiene su capacidad antitumoral en un ambiente *in vivo* convirtiéndolo en un agente promisorio coadyuvante en tratamientos contra el cáncer mamario.



## VI. CONCLUSIONES

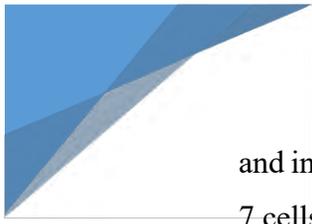
Los efectos del yodo molecular se enuncian a continuación:

- Ejerce efectos antitumorales en células cancerosas mamarias independientemente de su respuesta hormonal y/o su fenotipo parental o troncal.
- Inhibe la formación de mamosferas de una manera dependiente de la dosis.
- Disminuye la población de células troncal-EMT a través de inducir su re-diferenciación hacia fenotipos con menor capacidad invasiva y tumorigénica.



## VII. REFERENCIAS

- Aceves C, Anguiano B & Delgado G (2013). The Extrathyronine Actions of Iodine as Antioxidant, Apoptotic, and Differentiation Factor in various Tissues. *Thyroid*, 23(8), 938-946.
- Aceves C, García-Solís P, Arrollo-Helguera O, Vega-Riveroll L, Delgado G & Anguiano B. (2009). Antineoplastic effect of iodine in mammary cancer: participation of 6-iodolactone (6-IL) and peroxisome proliferato-activated receptors (PPAR). *Mol Cancer*, 33(8), 1-9.
- AAEC Asociación Española Contra el Cancer . (Septiembre de 2013). Recuperado el Febrero de 2017, de Contra el cáncer:  
<https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/tipos.aspx>
- Alfaro Y, Delgado G, Cárabez A, Anguiano B & Aceves C (2013). Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol Cancer*, 12(45).
- Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, Morrison S & Clarke M (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(7), 3983-3988.
- Arrollo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G & Aceves C (2006). Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer*, (13), 1147-1158.
- Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, Pick-Franke P, Goulet Jr R, Badve S, Srour EF & Nakshatri H (2010). SLUG/SNAI2 and Tumor Necrosis Factor Generate Breast Cells With CD44+/CD24- Phenotype. *BMC Cancer*, 10(411), 1-16.
- Bilal I, Chowdhury A, Davidson J & Whitehead S (2014). Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. *World J Clin Oncol*, 5(4), 705-712
- Bontempo A, Ugalde-Villanueva B, Delgado-Gonzalez E, Rodríguez AL & Aceves C (2016). Molecular iodine impairs chemoresistance mechanism, enhances Doxorubicin retention



and induces down regulation of CD44+/CD24+ and E-Cad+/Vim+ subpopulations in MCF-7 cells resistant to low dose of Doxorubicin. *J Oncol (en revisión)*.

- Cann SA, van Netten J & van Netten C (2000). Hypothesis: Iodine, Selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes control*. (11), 121-127.
- Chen Y, Song J, Jiang Y, Yu C & Ma Z (2015). Predictive value of CD44 and CD24 for prognosis and chemotherapy response in invasive breast ductal carcinoma. *Int J Exp Clin Pathol*, 8(9), 1-9.
- Clevers H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*, 313-319.
- Comasa S, Cimpean AM & Raica M (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*, 35, 1-10.
- Dalerba P, Cho RW & Clarke MF (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med*, 58, 267-284.
- Devita, Hellman & Rosenberg. (2015). *Cancer Principles and Practice of Oncology* (10 ed.). Wolters Kluwer.
- Dick JE (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), 4793-4807.
- Dixon JM (2006). *ABC of breast diseases*. Oxford, Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Dontu G, Abadallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ & Wicha MS (2003). In vitro propagation and transcripcional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, 17, 1253-1270.
- Eguiara A, Elorriaga K, Rezola R & García Martín Á (2012). Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 25(3), 107-115.
- Fillmore CM & Kuperwasser C (2008). Human breast cancer cell lines contains stem-like that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 10(2), 1-13.



Fleming JM, Miller TC, Meyer MJ, Ginsburg E & Vonderhaar BK (2010). Local regulation of human breast xenograft models. *J Cell Physiol*, 224(3), 795-806.

Geneser, F. (2000). *Histología* (Tercera ed.). Bogota, Colombia: Panamericana.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wichas MS & Dontu G (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555-567.

GLOBOCAN. (2012). Recuperado en Noviembre de 2015, de Estimated Cancer incidence Mortality and Prevalence in 2012: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)

Holliday DL, & Speirs V (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13(215), 2-7.

Iglesias JM, Belouqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguiara A, Cufi S, Pavon A, Menendez JA, Dopazo J & Martin AG (2013). Mammosphere Formation in Breast Carcinoma Cell lines Depends upon Expression of E-cadherin. *PLoS One*, 8(10), 1-12.

Jeter CR, Badeaux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C, Calhoun-Davis T, Zaehres H & Tang DG (2009). Functional Evidence that the Self-Renewal Gene NANOG Regulates Human Tumor Development. *Stem Cells*, 27(5), 993-1005.

Jiang BH & Liu LZ (2008). PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 150-158.

Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevoqt P, Guski H & Dietel M. (2003). CD24 Expression Is a New Prognostic Marker in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 9, 4906-4913.

Lanigan F, O'Connor D, Martin F & Gallagher M. (2007). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell and Mol Life Sci*, 64, 3161-3184.

Ling GQ, Chen DB, Wang BQ & Zhang LS (2012). Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. *Oncol Lett*, 4, 1264-1268.



Liu X & Fan D (2015). The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Curr Pharm Des*, 21(10), 1279-1291.

Lutolf MP, Gilbert PM & Blau HM (2009). Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*, 462(7272), 433-441.

Mallon E, Pichas O, Nasiri N, Blain I, Howard B & Gusterson B (2000). The Basic Pathology of Human Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(2), 139-163.

Manni SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J & Weinberg RA (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715.

Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA & Lee PW (2011). Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells is Primarily Due to Isoform ALDH1A3 and its Expression is predictive of Metastasi. *Stem Cells*, 29, 32-45.

Marusyk A & Polyak K (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805(1), 105-117.

Mendieta Trejo, A. I. (2011). *El yodo como agente antimetastático de células de cáncer mamario*. Querétaro: Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico .

Moore N & Lyle S (2011). Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Population in Cancer: A review of the Evidence and Discussion of Significance. *J Oncol*, 1-11.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau G & Pulsieux A (2008). Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*, 3(8), 1-7.

Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S & Spiegelman BM (1998). Terminal Differentiation of Human Breast Cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*, 1, 465-470.



Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakos E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P & Nakopoulou L (2008). The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24-/LOW and CD44-/CD44+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol*, 39, 1096-1102.

Nava-Villalva M & Aceves C (2014). 6-Iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, (112), 27-32.

Nava-Villalva M, Nuñez-Anita R, Bontempo, A & Aceves C (2015). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Mol Cancer*, 14(168), 1-11.

Núñez-Anita RE, Cajero-Juárez M & Aceves C (2011). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Role of Isoform Gamma in the Antineoplastic Effect of Iodine in Mammary Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 11(7), 775-786.

Paruthiyil S, Parmanr H & Kerekatte V (2004). Estrogen Receptor beta Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing G2 Cell Cycle Arrest. *Cancer Res*, 423-428.

Pestereva E, Kanakasabai S & Brighth J (2012). PPAR gama agonists regulate the expression of stemness and differentiation genes in brain tumours stem cells. *B J Cancer*, 106 (10), 1702-1712.

Pham PV, Phan NL, Nguyen NT, Truong NH, Duong TT, Le DV, Truong KD & Phan NK (2009). Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promoting differentiation therapy. *J Transl Med*, 9(209), 1-13.

Pietras A (2011). Cancer stem cells in tumor heterogeneity. *Adv Cancer Res*, 112, 255-281

Rao CV & Mohammed A (2010). New insights into pancreatic cancer stem cells. *World J of Stem Cells*, 7(3), 547-555.

Rajendran P S & Dalerba P (2014). Theoretical and Experimental Foundations of the "Cancer Stem Cells". Editor: VK Rajasekhar, *Cancer Stem Cells*

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF & Weissman IL (2001). Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 65(23). 105-111.



Russo J & Russo IH (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102(1-5), 89-96.

Ryan KM, Philips AC & Vousden KH (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 332-337.

Scaden DT (2006). The stem-cell as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075-1079.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bath-Nakshtri P, Turner CH, Goulete RJr, Badve S & Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 8(5), 1-13.

Shirvastava A, Tiwari M, Sinha RA, Kumar A, Balapure AK, Bajpai VK, Sharma R, Miltra K, Tandon A & Godbole MM (2006). Molecular Iodine Induces Caspase-independent Apoptosis in Human Breast Carcinoma Cells Involving the Mitochondria-mediated Pathway. *J Biol Chem*, 281(28), 19762.

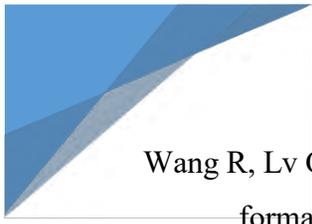
Smart CE, Morrison BJ, Saunus JM, Vargas AC, Keith P, Reid L, Wockner L, Askarian-Amid M, Sarkar D, Simpson PT, Clarke C, Schimdt CW, Reynolds BA, Lakhani SR & Lopez JA (2013). In Vitro Analysis of Breast Cancer Cell Line Tumourspheres Demonstrates Inter- and Intrasphere Heterogeneity. *PLoS One*, 8(6), 1-15.

Strauss R, Li ZY, Liu Y, Beyer I, Persson J, Sova P, Moller T, Pesonen S, Hemminki A, Hamerlik P, Drescher C, Urban N, Bartek J & Lieber A (2011). Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity. *PLoS One*, 6(1), 1-20.

Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2006). *Principios de anatomía y fisiología* (Onceava ed.). Buenos Aires: Panamericana.

Van Roy V & Berx G (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65(23).

Wang Q, Zhang H, Richard F & Greene MI (2000). BRCA1 and cell signaling. *Oncogene*, (19), 6152-6158.



Wang R, Lv Q, Meng W, Tan Q, Zhang S, Mo X & Yang X (2014). Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis*, 6(6), 829-837.

Warri AM, Saarinen NM & Makela SI (2007). Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention? *Horm Res* , 68(5), 248-260.

Watt FM & Hogan BL (2000). Out of Eden: Stem cells and Their Niches. *Science*, 287, 1427-1230.

Weissman IL (2000). Stem Cells: Units of Development, Units pf regeneration and Units in Evolution. *Cell*, 100, 157-168.

Wilson A, & Trumpp A (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6, 93-106.

Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R & Bodmer WF (2010). Cancer stem cells from colorectal cancer.derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(8), 3722-3727.



## VIII. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Anatomía interna y externa de la glándula mamaria humana (tomada de Tortora & Derrickson, 2006).....4.**
- Figura 2. Tasa de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial en (A) ambos sexos y (B) en mujeres. ASR Tasa estandarizada por edad por cada 100 000 personas por año (tomada de GLOBOCAN, 2012).....6.**
- Figura 3. Origen de las células cancerosas según el modelo estocástico. Este modelo propone que una célula diferenciada sufre un episodio transformante y adquiere propiedades de célula cancerosa (tomada de Eguiara *et al.*, 2012).....10.**
- Figura 4. Origen de las células cancerosas según el modelo jerárquico. Este modelo propone que una célula troncal presente en tejidos adultos sufre un episodio transformante alcanzando el estado de célula cancerosa. (tomada de Eguiara *et al.*, 2012).....11.**
- Figura 5. Apoptosis en tumores mamarios. Microfotografía (20X) del ensayo de TÚNEL en tumores mamarios inducidos por el agente cancerígeno N-metil Nitroso Urea (NMS) en ratas control (A) y suplementadas con I2. (B). Panel C detalle a 10X donde las flechas indican las regiones positivas para el ensayo de TUNEL y (D) análisis cuantitativo del ensayo de TUNEL (tomada de Aceves *et al.*, 2009).....14.**
- Figura 6. Micrografías (10X) de cultivos de mamografías de las líneas celulares de cáncer mamario MCF-7 (mMCF-7) y MDA-MB-231 (mMDA-231) en los diferentes tiempos de cultivo.....22.**
- Figura 7. Expresión (RT qPCR) de los marcadores de troncalidad en células parentales (monocapa) y troncales (mamografía) de los tipos celulares mamarios MCF-7 y MDA-MB-231. Los resultados fueron normalizados usando como gen estructural a la  $\beta$ -actina. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ).....24.**
- Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de I2 en cultivos de células parentales (p) y troncales (m) de cáncer mamario. Micrografías (8X) a las 72 horas de cultivo.....25.**
- Figura 9. Efecto del I2 (200 $\mu$ M) en la proliferación celular de cultivos parentales (p) y troncales (m) de células MCF-7 y MDA-MB-231. Se ilustra el % de cambio en la proliferación celular de los cultivos pMCF-7, mMCF-7, pMDA-231 y mMDA-231.\* denota diferencias significativas con respecto a su control (T-student;  $p < 0.05$ ). .....26.**
- Figura 10. Efecto del I2 en el diámetro de mamografías de ambas líneas celulares. \* denota diferencias significativas con respecto a su control (t-student;  $p < 0.05$ ).....27.**
- Figura 11. Efecto del suplemento de I2 sobre la capacidad de migración de células pMDA-231 y mMDA-231 a las 24 horas mediante el ensayo de herida. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ).....28.**
- Figura 12. Efecto del I2 sobre la capacidad invasiva de células pMDA-231 y mMDA-231 mediante la cámara Transwell. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ).....29.**



**Figura 13. Análisis del suplemento del I2 sobre las poblaciones CD44/CD24 mediante citometría de flujo en cultivos de monocapa y mamófera. (A) Porcentaje de las diferentes sub-poblaciones CD44/CD24 en pMCF-7 y mMCF-7. (B) Porcentaje de las diferentes sub-poblaciones CD44/CD24 en pMDA-231 y mMDA-231. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ).....31.**

**Figura 14. Análisis del suplemento del I2 por 48 horas sobre las poblaciones E-Cad/Vim mediante citometría de flujo en cultivos de pMCF-7 y mMCF-7. (A) Porcentaje de sub-poblaciones E-Cad/Vim. (B) Gráfica de puntos de las poblaciones E-Cad+/Vim+ (rojo) y E-Cad-/Vim- (azul). (C) porcentaje de las subpoblaciones E-cadherina+ y (D) Vimentina+. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ) ..... 32.**

**Figura 15. Efecto del I2 sobre la expresión de marcadores de CTC y TEM mediante RT qPCR en cultivos pMCF-7 y mMCF-7. Los resultados fueron normalizados usando como gen estructural a la  $\beta$ -actina. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ).....34.**

**Figura 16. Efecto del I2 sobre la capacidad tumorigénica de xenotransplantes pMCF-7 y mMCF-7. Los animales fueron inoculados con células parentales (pMCF-7) en el flanco izquierdo y con mamóferas (mMCF-7) en el flanco derecho. El día de la inoculación, un grupo de animales se suplemento con agua destilada y otro con I2 (0.025%) en el agua para beber. (A) Imágenes de los xenotransplantes tomadas el día 22 post-injerto. (B) Registro del crecimiento tumoral.....35.**

**Figura 17. Efecto del I2 sobre la capacidad tumorigénica de xenotransplantes pMDA-231 y mMDA-231. Los animales fueron inoculados con células parentales (pMDA-231) en el flanco izquierdo y con mamóferas (mMDA-231) en el flanco derecho. El día de la inoculación, un grupo de animales se suplemento con agua destilada y otro con I2 (0.025%) en el agua para beber. (A) Imágenes de los xenotransplantes tomadas el día 22 pos injerto. (B) Registro del crecimiento tumoral. Letras diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA y *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ).....36.**

## **IX. ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1. Reactivos utilizados para la síntesis de DNAC.....18.**

**Tabla 2. Marcadores evaluados mediante PCR en tiempo real.....19.**



## X. LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

°C	Grados Celsius
μg	Microgramos
μL	Microlitro
μM	Micromolar
6-IL	6-Yodolactona
AIF	Factor inductor de la apoptosis
ALDH1	Aldehído deshidrogenasa
ANOVA	Análisis de la varianza
ASR	Tasa estandarizada por edad
BRCA1	Cáncer de mama 1
BRCA2	Cáncer de mama 2
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	Célula troncal
CTC	Célula troncal cancerosa
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxiribonucleotido
DNAc	ADN complementario
E-cad	E cadherina
EDTA	Ácido etidildiaminotetraacético
ER	Receptor de estrógenos
ERK1	Quinasa regulada por señales extracelulares 1
ERK2	Quinasa regulada por señales extracelulares 2
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HER2	Receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2
I-	Yoduro
I <sub>2</sub>	Yodo molecular
KI	Yoduro de potasio
Mm	Milímetros
mMCF-7	Mamosferas MCF-7



mMDA-231	Mamosferas MDA-MB-231
MNU	N-metil-N-nitrosourea
Mrna	RNA mensajero
Na	Sodio
NaIO3	Yodato de sodio
NaIO4	Peryodato de sodio
	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
NFKB	activadas
NIH	Instituto nacional de la salud
NIS	Transportador simporte Na/I
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
pMCF-7	Células parentales MCF-7
pMDA-231	Células parentales MDA-MB-231
PPAR $\gamma$	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma
PR	Receptor de progesterona
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RNA	Ácido ribonucleotido
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SFB	Suero fetal bovino
TDLU	Unidad ducto lobulillo-terminal
TEM	Transición epitelio mesénquima
Vim	Vimentina