



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

“EFECTO DE ERITROSA Y SULFORAFANO SOBRE
EL FENOTIPO TRONCAL DE CÉLULAS DE CÁNCER
DE MAMA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JORGE LUIS VARGAS NAVARRO

TUTOR:

DR. JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
 SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
 CARRERA DE BIOLÓGIA

No. reg.: BIO/0151/2019

Los Reyes Iztacala a 03 de diciembre de 2019

DRA. PATRICIA D. DAVILA ARANDA
DIRECTORA DE LA FES IZTACALA
Presente

Atención: Lic. Eloy González Fernández
 Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de: **TESIS DE INVESTIGACION**
 Titulado **"EFECTO DE ERITROSA Y SULFORAFANO SOBRE LA TRONCALIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA"**

Que presenta el (la) pasante de Biología **JORGE LUIS VARGAS NAVARRO** número de cuenta: **312287834** Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente.

| GRADO | NOMBRE | FIRMA | CARGO |
|-------|-------------------------------|-------|------------|
| DRA. | MARTHA OFELIA SALCEDO ALVAREZ | | Presidente |
| DRA. | SARA RODRIGUEZ ENRIQUEZ | | Vocal |
| DR. | JUAN CARLOS GALLARDO PEREZ | | Secretario |
| DR. | RICARDO MEJIA ZEPEDA | | Suplente |
| DR | FEDERICO AVILA MORENO | | Suplente |

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

JEFA DE CARRERA

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNANDEZ DELGADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
 DE MEXICO
 FES IZTACALA



IEFATURA DE
 BIOLÓGIA

Dra. Patricia D. Dávila Aranda
 Directora de FES Iztacala
 Vo. Bo.

Edificio de Estudios Superiores
 Los Reyes Iztacala, Iztacala, México
 C. P. 50500
 Tel. (52) 55 5344 1111
 Fax (52) 55 5344 1111
 E-mail: fesi@unam.mx



Agradecimientos

Todo este trabajo va especialmente dedicado a dos personas que siempre han estado conmigo en la buenas y en las malas, apoyándome y guiándome siempre hacia adelante: mi madre y mi abuela.

A mi madre, por siempre motivarme y apoyarme, por los regaños, por los consejos, por dar todo para que yo este ahora en este lugar y porque se que lo seguirás haciendo toda la vida, gracias por todo.

A mi abuela, porque siempre estuviste a mi lado, siempre confiaste en mi y me impulsaste a seguir adelante a pesar de los tropiezos, aunque hoy ya no estés aquí, sé que me acompañaras a cualquier lugar y me seguirás ayudando, te amo.

A mi padrino, por estar ahí y apoyarme en todo momento.

A mi hermana, porque siempre nos hemos acompañado y apoyado a pesar de no tener una excelente relación.

A mi sobrina, por llegar y darle risas y alegrías a mis días.

A mi familia por siempre apoyarme y animarme a seguir adelante.

Al Dr. Gallardo, por ser mi tutor, tenerme paciencia y dedicación durante todo el desarrollo del proyecto, por todas las enseñanzas con las cuales he podido crecer académicamente, muchas gracias.

A la Dra. Sara, por toda la confianza brindada, por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, por todas las enseñanzas y críticas que me han ayudado a crecer académicamente y mejorar este proyecto.

Al Dr. Moreno, porque en cada plática/seminario da muchas enseñanzas con las cuales uno puede seguir mejorando y creciendo en esto llamado ciencia.

A mis amigos con los cuales compartí prácticamente toda la carrera, esta demás decir sus nombres, solo me queda darles las gracias, sin ustedes nada hubiera sido lo mismo, los quiero.

A todas las personas que se han ido y las que se han quedado, porque con cada crítica, buena o mala, he podido crecer y llegar hasta aquí.

A todos los del departamento de bioquímica, en especial los del laboratorio de tumores, ya que a pesar de que cada uno siempre está muy ocupado en sus proyectos, tesis y/o papers, siempre se dan un espacio para ayudarte, de verdad muchas gracias.

GRACIAS.

Al CONACYT por los recursos asignados a los proyectos: 243249 (Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez), 283144 (Dr. Sara Rodríguez-Enríquez), 239930 (Dr. Rafael Moreno Sánchez, jefe del Departamento de Bioquímica) en Ciencia Básica.

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| 2-DG | 2 Desoxi-Glucosa |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ALDO | Aldolasa |
| ALDH1A3 | Aldehído Deshidrogenasa 1A 3 |
| ATP | Adenosín Tri Fosfato |
| CS | Citrato Sintasa |
| CSC | Cancer Stem Cells (células troncales de cáncer) |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| E4P | Eritrosa 4 Fosfato |
| EMT | Epithelial-Mesenchyme Transition (Transición Epitelio-Mesénquima) |
| ENO | Enolasa |
| ERY | Eritrosa |
| ERO | Especies Reactivas de Oxígeno |
| FAD ⁺ | Flavín Adenín Dinucleotido oxidado |
| FADH ₂ | Flavín Adenín Dinucleotido reducido |
| GAPDH | Gliceraldehido Fosfato Deshidrogenasa |
| GDH | Glutamato Deshidrogenasa |
| HK I y II | Hexocinasa isoforma I y II |
| HPI/AMF | Hexosa Fosfato Isomerasa / Factor de Motilidad Autócrino |
| IDH | Isocitrato Deshidrogenasa |
| LDH | Lactato Deshidrogenasa |
| MCT-4 | Transportador de Monocarboxilatos-4 |
| mTOR | mammalian Target Of Rapamycin |
| NAD ⁺ | Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidado |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido |
| NFκB | Factor Nuclear Kappa B |
| FO | Fosforilación Oxidativa |

| | |
|--------------|--|
| PDH | Piruvato Deshidrogenasa |
| PDHK | Piruvato Deshidrogenasa cinasa |
| PFK | Fosfofructocinasa |
| PGAM | Fosfoglicerato Mutasa |
| PGK | Fosfoglicerato Cinasa |
| PYK | Piruvato Cinasa |
| SFN | Sulforafano |
| TGF- β | Factor de Crecimiento transformante beta |
| TPI | Triosafosfato Isomerasa |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 1.1 CÁNCER A NIVEL MUNDIAL | 3 |
| 1.2 CÁNCER EN MÉXICO | 5 |
| 1.3 HALLMARKS DEL CÁNCER..... | 7 |
| 1.4 METABOLISMO ENERGÉTICO..... | 9 |
| 1.5 METABOLISMO ENERGÉTICO EN CÁNCER..... | 10 |
| 1.6 CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER (CANCER STEM CELLS)..... | 14 |
| 1.7 TERAPIAS CONTRA CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER..... | 15 |
| 1.8 COMPUESTOS NATURALES CONTRA CANCER STEM CELLS: ERITROSA Y SULFORAFANO | 19 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 23 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 23 |
| 4. OBJETIVO GENERAL..... | 24 |
| 4.1. OBJETIVOS PARTICULARES | 24 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 25 |
| 5.1 CULTIVO CELULAR Y REACTIVOS..... | 25 |
| 5.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MDA-MB-468 CON FENOTIPO TRONCAL | 25 |
| 5.2.1 FORMACIÓN DE MICROESFERAS | 26 |
| 5.2.2 MARCADORES DE TRONCALIDAD | 26 |
| 5.3. VIABILIDAD DE CÉLULAS CON FENOTIPO TRONCAL DE CÁNCER DE MAMA Y DETERMINACIÓN DE IC ₅₀ DE LOS COMPUESTOS NATURALES | 26 |
| 5.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS..... | 27 |
| 5.5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT | 27 |
| 5.6 METABOLISMO ENERGÉTICO..... | 28 |
| 5.6.1. FLUJO GLUCOLÍTICO | 28 |
| 5.6.2 FLUJO MITOCONDRIAL..... | 29 |
| 5.6.3 CONTRIBUCIÓN DE ATP | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 29 |
| 6. RESULTADOS | 30 |
| 6.1 CÉLULAS DE CANCER DE MAMA MDA-MB-468 CON FENOTIPO TRONCAL..... | 30 |
| 6.2 METABOLISMO ENERGÉTICO EN CSC | 34 |
| 6.2.1 PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CSC | 34 |
| 6.2.2 FLUJO GLUCOLÍTICO, MITOCONDRIAL Y APORTE DE ATP EN CSC..... | 35 |
| 6.3 IC ₅₀ DE VIABILIDAD DE COMPUESTOS NATURALES..... | 37 |
| 6.4 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ERY Y SFN SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN CSC | 42 |
| 6.4.1 FLUJO GLUCOLÍTICO | 42 |
| 6.4.2 FLUJO MITOCONDRIAL | 42 |
| 6.4.3 CONTRIBUCION DE ATP | 44 |
| 6.5 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRONCALIDAD, METÁSTASIS Y METABOLISMO ENERGÉTICO CON LA COMBINACIÓN SFN/ERY EN CSC | 45 |
| 6.6 FORMACIÓN DE MICROESFERAS EN PRESENCIA DE LA COMBINACIÓN (SFN/ERY) | 46 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 48 |
| 7.1.METABOLISMO ENERGÉTICO..... | 48 |
| 7.2.FENOTIPO TRONCAL | 50 |
| 8. CONCLUSIONES | 53 |
| 9. REFERENCIAS | 54 |
| 10. ANEXO 1 | 62 |

RESUMEN

En la actualidad, el cáncer de mama presenta la mayor tasa de incidencia y mortalidad en la población femenina. En particular, el subtipo triple negativo (TN) es de gran importancia clínica ya que es el que presenta la mayor agresividad, metástasis, recurrencia y mortalidad, comparado con aquellos que son dependientes de hormonas, además de que en la actualidad aún no se tiene una terapia dirigida, por lo cual se siguen buscando estrategias para su tratamiento.

Las células troncales de cáncer (CSC) son las responsables de: iniciación, progresión, resistencia a terapias antineoplásicas actuales, migración, invasión, metástasis y recurrencia en cáncer, esto debido a que presentan diferentes características, comparadas con células tumorales normales, como auto renovación, diferenciación a linajes heterogéneos y quiescencia cuando se presenta algún estrés (quimioterapias, etc). Es por esto que, en los últimos años, se han convertido en el blanco principal para erradicar al tumor en su totalidad, desafortunadamente, aún no existe una terapia efectiva para la eliminación de estas células. El cáncer de mama fue el primer tumor sólido al cual se le identificaron CSC (derivados de biopsias de pacientes), en el cual se propusieron varios “marcadores” que podrían funcionar como un blanco terapéutico (CD44, etc), pero aún no se ha logrado encontrar una terapia exitosa. Otro blanco terapéutico que se ha propuesto para estas células es el metabolismo energético, en específico el metabolismo mitocondrial, ya que se sabe que, en la mayoría de los tumores, la fosforilación oxidativa (FO) es la vía principal de suministro de ATP, y que esta energía es requerida por las CSC para funciones como EMT, metástasis y resistencia a fármacos antineoplásicos. En nuestro laboratorio, se ha determinado que CSC derivadas de MCF7 son más sensibles a fármacos antimitocondriales como paclitaxel, doxorubicina o cisplatino; sin embargo, estas drogas pueden tener efectos tóxicos en células sanas.

Los compuestos naturales eritrosa y sulforafano se ha visto que tienen un efecto sobre la troncalidad de células de cáncer de mama, así como sobre el

metabolismo de tumores heterogéneos de próstata y mama, es por eso que se han propuesto como una buena estrategia alternativa contra esta enfermedad.

En este trabajo se mimetizaron las condiciones en las cuales se encuentran presentes las CSC dentro del tumor, a través de un protocolo de selección ya estandarizado en nuestro laboratorio, para células en monocapa de la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468. Las células obtenidas por medio de este protocolo se les midió la expresión de marcadores de troncalidad (CD44+, ALDH1A3 y OCT 3/4), los cuales tuvieron un aumento de 3-7 veces, así como formación de microesferoides crecidos en ausencia de suero (hasta 400 micrómetros de diámetro), comparados con su línea parental las cuales alcanzaron un diámetro máximo de entre 60 y 80 micrómetros, lo que indicó la obtención de células con el fenotipo troncal. Se probaron diferentes concentraciones de eritrosa y sulforafano por separado y en combinación para obtener una IC₅₀. Se encontró que los compuestos por separado, hasta la concentración de 1 mM no afectaban la viabilidad (<40%), pero que la combinación 100nM SFN/100nM ERY, la cual presentó un efecto sinérgico, si lograba una inhibición de hasta el 60%. Además, se evaluó el efecto de esta combinación tanto en el fenotipo troncal como en el metabolismo energético, encontrando que marcadores como CD44⁺ y una de las proteínas controladoras de la glucólisis (GLUT 1) disminuían significativamente (3-8 veces), así como el flujo glucolítico (3 veces) y la formación de microesferas (5 veces), pero sin un efecto en el flujo de FO. Esta combinación no tuvo efecto significativo en la viabilidad de células no tumorales H9C2.

Con esto se concluyó que la combinación de SFN/ERY, a concentraciones nanomolares afecta la troncalidad, el metabolismo glucolítico y revierte el fenotipo de estas células a uno similar al que presenta la línea parental MDA-MB-468.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades las cuales son el reflejo de múltiples alteraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales, que transforman a las células normales del cuerpo en derivados malignos con características particulares como proliferación descontrolada, evasión al sistema inmune, evasión a muerte celular, invasión a otros tejidos en el organismo (*intravasación* hacia vasos sanguíneos y *extravasación* a sitios distantes del tumor primario), colonización, metástasis secundarias, entre otras [Tysnes y Bjerkvig, 2007; Nassar y Blanpain, 2016]. Estas alteraciones pueden ser ocasionadas por diversos factores extrínsecos como constante exposición a hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas, radiación ionizante, radiación UV, infecciones por virus, bacterias o parásitos, consumo de tabaco, alcohol, aflatoxinas, obesidad, o por factores intrínsecos como la edad, el estado hormonal y/o la predisposición genética [Global Cancer Observatory, 2018; Couch, 1996]. Existen más de 100 tipos de cáncer, los cuales reciben su nombre dependiendo del órgano o tejido en el cual se desarrollan, además, se clasifican basándose en su morfología y célula de origen (e.g. carcinoma: sarcoma originado de células de hueso o músculo; leucemia: originado de células de la médula ósea, linfoma originado de células T o B, tumores de cerebro, etc.) [Idikio, 2011; Instituto Nacional del Cáncer, 2018].

1.1 CÁNCER A NIVEL MUNDIAL

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Una de cada seis defunciones es ocasionada por esta enfermedad (OMS, 2018). En 2018, los dos tipos de cáncer con mayor incidencia (nuevos casos) en la población mundial (hombres y mujeres) fueron el de pulmón y el de mama (11.6% para ambos), siguiendo el colorrectal (10.2%), próstata (7.1%), estómago (5.7%) e hígado (4.7%) (Figura 1); mientras que el cáncer con mayor mortalidad fue el de pulmón (18.4%) siguiendo el colorrectal (9.2%), estómago e hígado (8.2% para ambos), mama (6.6%), esófago (5.3%) y páncreas (4.5%) (Figura 2) [Global Cancer Observatory, 2018].

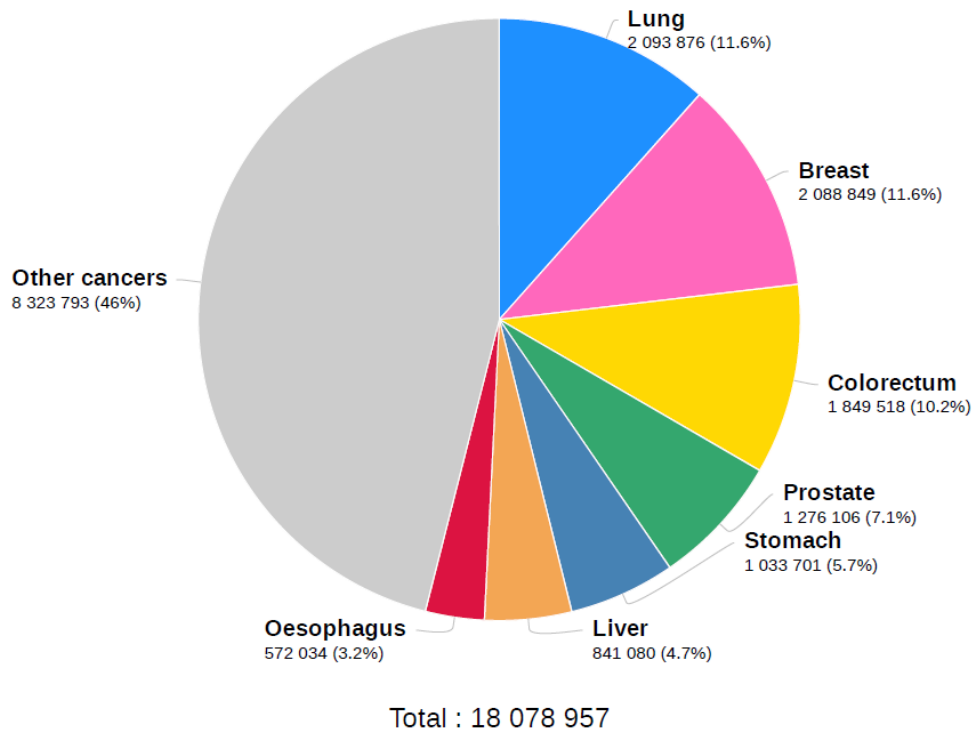


Figura 1: Porcentaje y número estimado de nuevos casos de cáncer a nivel mundial en 2018, ambos sexos, todas las edades. Fuente: Global Cancer Observatory; Cancer Today, 2018.

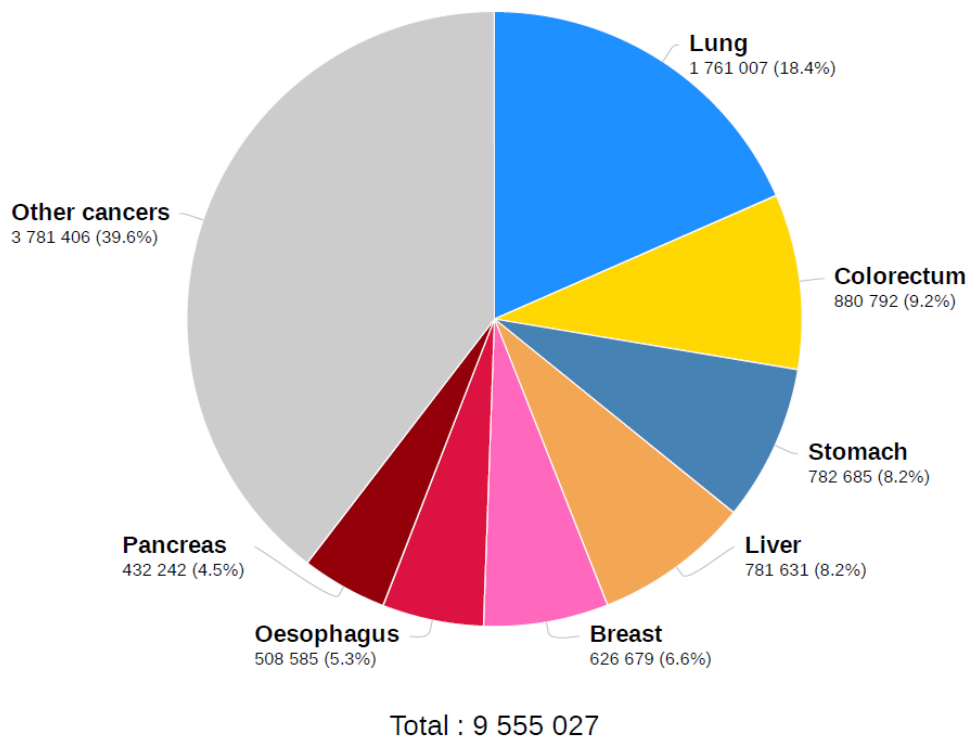


Figura 2: Porcentaje y número estimado de muertes por cáncer a nivel mundial en 2018, ambos sexos, todas las edades. Fuente: Global Cancer Observatory; Cancer Today, 2018.

El mayor porcentaje de mortalidad se encuentra en países subdesarrollados (70%), esto debido a que menos del 30% ofrece tratamientos para pacientes oncológicos, en comparación con países desarrollados donde más del 90% de estos, tiene la tecnología y sanidad necesaria para ofrecer estos tratamientos [OMS, 2018].

1.2 CÁNCER EN MÉXICO

Desde 1960, el cáncer en México se ha posicionado entre las 10 causas principales de muerte. Desde 2004, es la tercer causa de muerte (sólo por arriba de este se encuentran las enfermedades cardiacas y *diabetes mellitus*). A pesar

de esto, México presenta la tasa de mortalidad más baja del continente americano con respecto al cáncer (70 por cada 100 000 habitantes), aunque se estima que, con el tiempo, debido al estilo de vida, esta aumentará y llegará a ser mayor que la tasa de mortalidad europea (>200 por cada 100 000 habitantes) [Reynoso-Noverón & Torres-Domínguez, 2018].

En México, el cáncer con mayor incidencia tomando en cuenta hombres y mujeres, es el de mama (14.3%), siguiendo el de próstata (13.1%), colorrectal (7.8%), tiroides (6.4%), cervicouterino (4.1%), pulmón (4.1%) y estómago (4%) (Figura 3). Por otro lado, el que presenta mayor índice de mortalidad es colorrectal (8.5%) siguiendo el de próstata (8.3%), mama (8.2%), hígado (8.2%), pulmón (8.1%), estómago (7.2%) y páncreas (5.4%) (Figura 4).

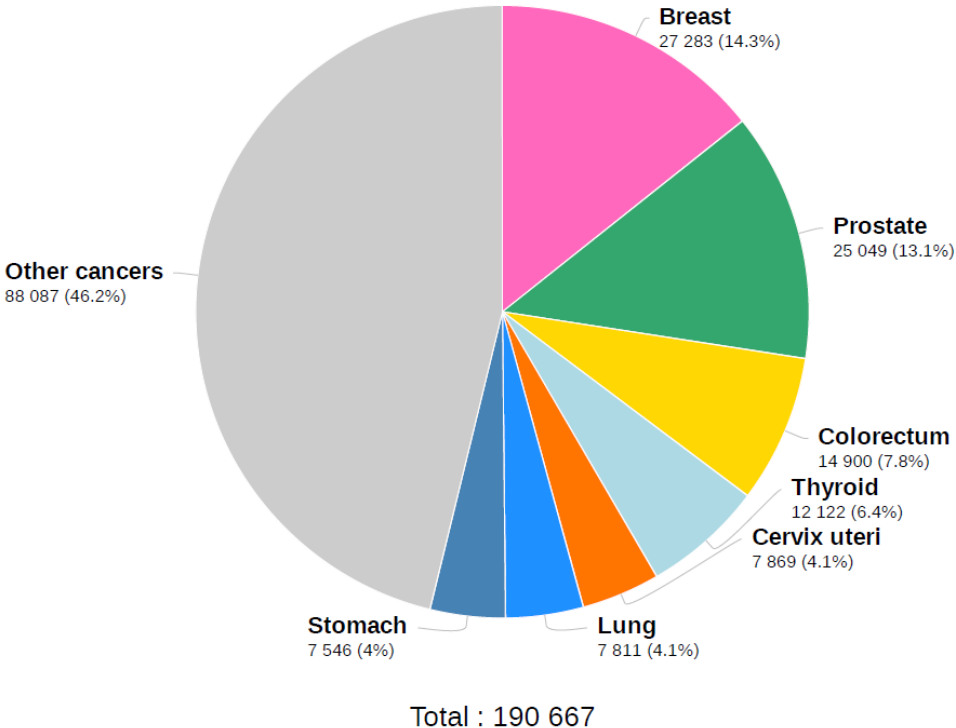


Figura 3: Porcentaje y número estimado de nuevos casos de cáncer en México en 2018, ambos sexos, todas las edades. Fuente: Global Cancer Observatory; Cancer Today, 2018.

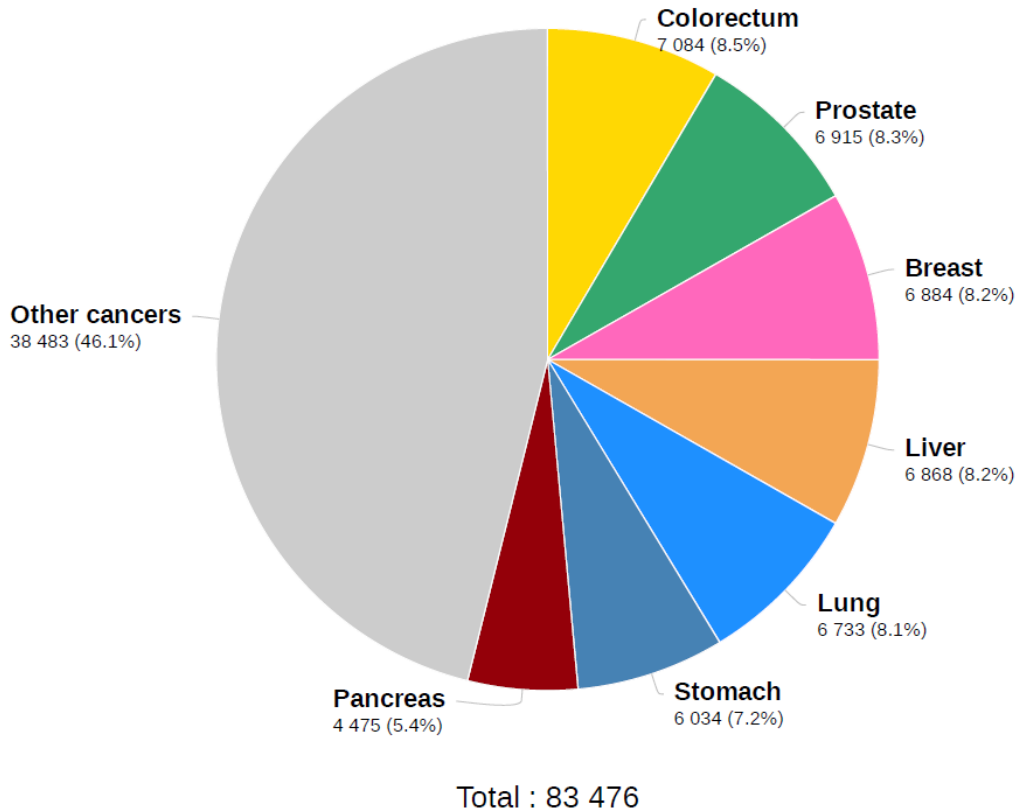


Figura 4: Porcentaje y número estimado de muertes por cáncer en México en 2018, ambos sexos, todas las edades. Fuente: Global Cancer Observatory; Cancer Today, 2018.

1.3 HALLMARKS DEL CÁNCER

En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert Weinberg describieron 6 características principales que poseían las células cancerígenas, estas son: 1) señales de proliferación sostenida (ocasionado por mutaciones o hipometilaciones en diferentes oncogenes, los cuales mantienen activas todo el tiempo diferentes vías de señalización); 2) evasión a supresores de crecimiento (debido a la pérdida por delección, baja expresión por modificaciones covalentes como metilación de secuencias promotoras o mutaciones puntuales de genes supresores); 3) potencial replicativo ilimitado (ya que la telomerasa en estas células regenera los telómeros que se van perdiendo en cada división y así evitan que la célula entre en senescencia o apoptosis); 4) evasión de la muerte celular (en donde las células

desarrollan diferentes mecanismos como la pérdida del gen supresor p53, o la sobre expresión de proteínas anti- apoptóticas como Bcl-2, XIAP o aquellas que dan señales de supervivencia como IL-3); 5) potencial angiogénico (una característica que se presenta durante el desarrollo embrionario y que las células cancerosas activan durante sus diferentes etapas); y, 6) potencial invasivo metastásico (la pérdida de genes supresores y ganancia de oncogenes le permiten a la célula desprenderse del tumor primario, degradar la matriz extracelular y migrar a diferentes tejidos u órganos como hueso, cerebro, etc., para establecerse) (Hanahan & Weinberg, 2000).

Algunos años después del escrito original, Hanahan y Weinberg lo reformularon e incluyeron 4 características más (Figura 5): 7) promoción de inflamación (en el cual diferentes células del cuerpo le proporcionan proteínas o quimiocinas, señales extracelulares estimuladoras de crecimiento, proteasas, etc.); 8) inestabilidad genómica (que indica la pérdida de genes supresores y ganancia de oncogenes); 9) evasión a la destrucción por parte del sistema inmune (impidiendo activación de linfocitos B y T); y, 10) desregulación del metabolismo energético, los cuales a la fecha son considerados como blancos terapéuticos para la identificación de nuevas terapias contra esta enfermedad [Hanahan y Weinberg, 2011].

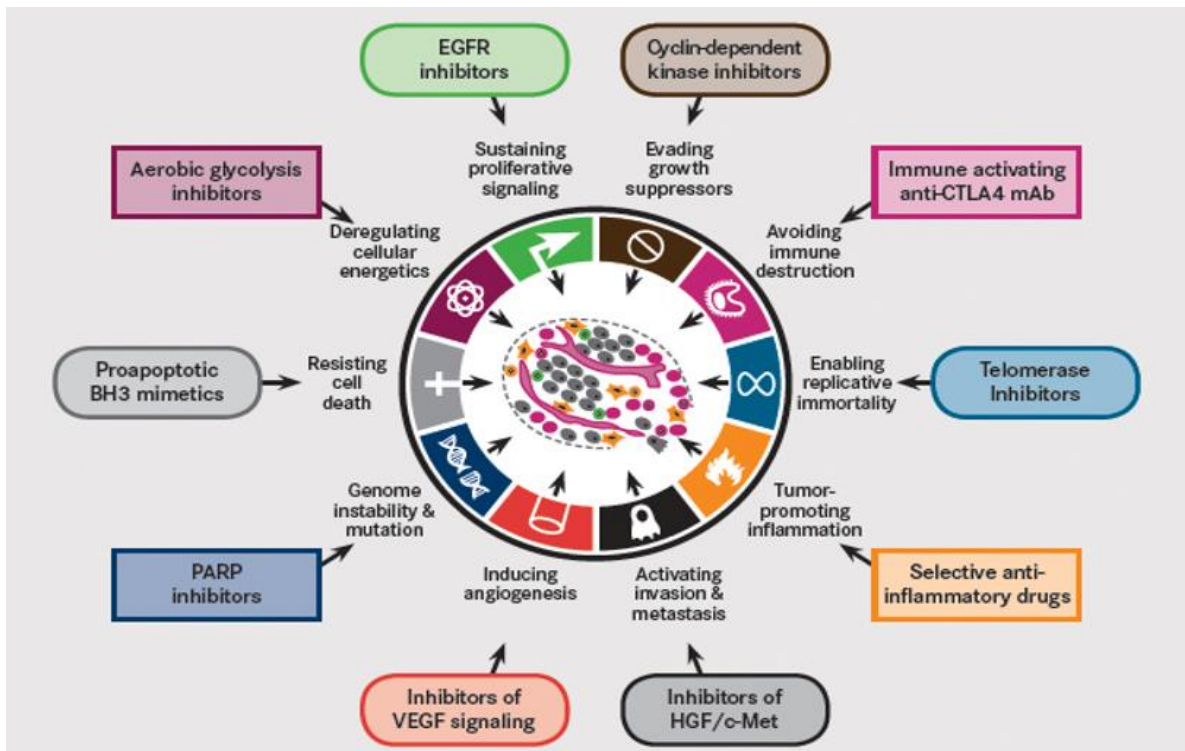


Figura 5: Hallmarks del Cáncer descritos por Hanahan y Weinberg, 2011. Tomado de Hanahan & Weinberg, *Cell*. 2011; 144(5): 646-674.

1.4 METABOLISMO ENERGÉTICO

El metabolismo energético es el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que toman lugar dentro de la célula. Estas reacciones son catalizadas por enzimas que constituyen las rutas metabólicas. El catabolismo se encarga de oxidar macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas para transformarlas en productos más pequeños y simples, además de generar energía (ATP), la cual es utilizada por la célula para realizar sus funciones [Lehninger *et al.*, 2015]. Esta energía se obtiene a través de dos vías metabólicas, la glucólisis y la fosforilación oxidativa (FO) [Lehninger *et al.* 2015; Valle-Mendiola & Soto-Cruz, 2014]. La glucólisis oxida la glucosa en dos moléculas de 3 carbonos (piruvato), y, a través de diferentes pasos de oxidación, se genera ATP y NADH. En

condiciones de normoxia (21% de oxígeno), el piruvato continúa su oxidación dentro de la mitocondria pasando por el ciclo de Krebs, en donde el NAD^+ y el FAD^+ se reducen en NADH y FADH_2 los cuales cederán sus electrones en la cadena transportadora, generando un gradiente de protones que dan fuerza motriz para que la ATP-S (ATP synthase) genere ATP (FO), mientras que en condiciones de hipoxia (1 - 0.1% de oxígeno) el piruvato genera lactato y en algunos microorganismos también genera etanol [Lehninger *et al.*, 2000].

1.5 METABOLISMO ENERGÉTICO EN CÁNCER

En las células cancerígenas el metabolismo energético se ve alterado [Hanahan & Weinberg, 2011]. Otto Warburg (1956), observó y demostró que, en células cancerosas de ascitis de ratón, la glucólisis se encontraba aumentada (hasta 60 veces más comparada con su tejido de origen), concluyendo que esto se debía a que la mitocondria se encontraba dañada, aunque en la actualidad se sabe que esto no es así. Existe una gran cantidad de evidencia [Osthus *et al.*, 2000; Atsumi *et al.*, 2002; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; Zu & Guppy, 2004] que demuestra que todas las enzimas que participan en la vía glucolítica se encuentran sobre expresadas (eg. en hepatoma AS30D, HPI, ALD, TPI, GAPDH, PGK, PGAM, ENO y LDH se encuentran sobre expresadas de 2-4 veces; PYK 8-10 veces; HK y PFK-I de 17 a 300 veces, todas comparadas con hepatocitos normales) (Figura 6), y que incluso algunas de estas enzimas presentan un incremento en su actividad (e.g. en cáncer de mama se ha reportado un incremento de 3.7-7 veces sólo en la actividad de HK, PFK, PYK y LDH en comparación con su tejido normal) [Moreno-Sánchez *et al.*, 2007]. Además, en células tumorales, el control de flujo se modifica ya que las enzimas que principalmente controlan la vía son GluT-HK (71%) y HPI (40%), mientras que en células no tumorales este control es principalmente por HK (60-80%) y PFK-I (20-30%) [Marín-Hernández *et al.*, 2006; Marín-Hernández *et al.*, 2011].

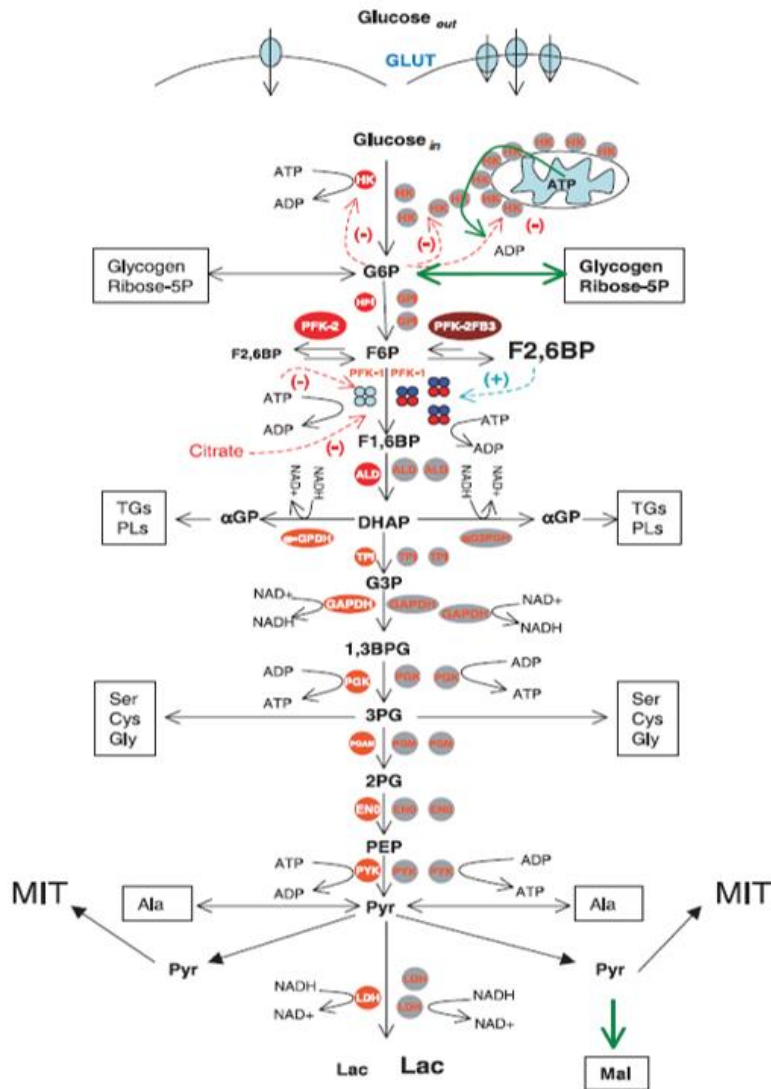


Figura 6: Glucólisis en células normales (izquierda) y en células tumorales (derecha). En las células tumorales existe un incremento de todas las enzimas y transportadores, en comparación con las células normales. GLUT, transportador de glucosa; G6P, glucosa 6 fosfato; F6P, Fructosa 6 fosfato; F1,6BP, fructosa1-6 bifosfato; F2,6BP, fructosa 2,6 bifosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, gliceraldehído 3 fosfato; 1,3BPG, 1,3 bifosfoglicerato; 3PG, 3 fosfoglicerato; 2PG 2 fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato, Pyr, piruvato; Lac, lactato; HK, hexocinasa; HPI, hexosa fosfato isomerasa; PFK-1, fosfofructocinasa 1; PFK-2, fosfofructocinasa 2; ALD, aldolasa; TPI, triosa fosfato isomerasa; GAPDH, gliceraldehido fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfoglicerato cinasa; PGM, fosfoglicerato mutasa; ENO, enolasa; PYK, piruvato cinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; Ser, serina; Cys, cisteína; Gly, glicina; Ala, alanina; Mal, malato; α GP, α glicerol 3 fosfato; α GPDH, α -glicerol 3 fosfato deshidrogenasa. Tomado de: Moreno-Sánchez *et al.* FEBS J. 2007; 274: 1393-1418.

Asimismo, existe evidencia de que algunas neoplasias presentan un número inalterado o incluso mayor de mitocondrias teniendo una biogénesis activa y que, además, estas funcionan de manera normal oxidando diferentes sustratos como piruvato, glutamina, prolina, cuerpos cetónicos, ácidos grasos y/o propionato, así como un ciclo de Krebs completo (generando potenciales reductores los cuales van a transferir sus electrones a la cadena transportadora) (Figura 7) y una actividad del citocromo oxidasa (complejo IV) normal aún en condiciones de hipoxia severa [Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2011]. Para corroborar esto, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama (MDA MB 231, MDA MB 468 y MCF 7) se evaluó el porcentaje de contribución de ATP por parte de ambas vías (glucólisis y fosforilación oxidativa) y se determinó que la mitocondria (en normoxia) contribuye con el 62%, 75% y 55% respectivamente, demostrando que en efecto, la mitocondria funciona y aporta la mayor cantidad de energía al tumor [Pacheco-Velázquez, 2018]. Además, existe vasta literatura en el campo la cual reporta una alta dependencia para el suministro de ATP por parte de la fosforilación oxidativa, así como del metabolismo mitocondrial [Zu & Guppy, 2004; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2008; Mandujano-Tinoco *et al.*, 2013; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2015; Marín-Hernández *et al.*, 2017]. Es por esto que el metabolismo energético mitocondrial puede funcionar como un buen blanco terapéutico ya que en diferentes líneas celulares tumorales como MCF7 o HeLa, el crecimiento se ve afectado en presencia de inhibidores mitocondriales (casiopéina II-gly, oligomicina, etc), solos o en combinación con algún inhibidor glucolítico (2 DG, yodoacetato, gosipol) o fármaco antineoplásico utilizado en clínica (doxorubicina, cisplatino, paclitaxel) a concentraciones en las cuales no se ha visto un efecto significativo en la viabilidad de células no tumorales [Adán-Ladrón de Guevara, 2019; Robledo-Cadena, 2016], aunque algunos de ellos (yodoacetato) sí han presentado efectos laterales en pacientes [Schmidt & Dringen, 2009].

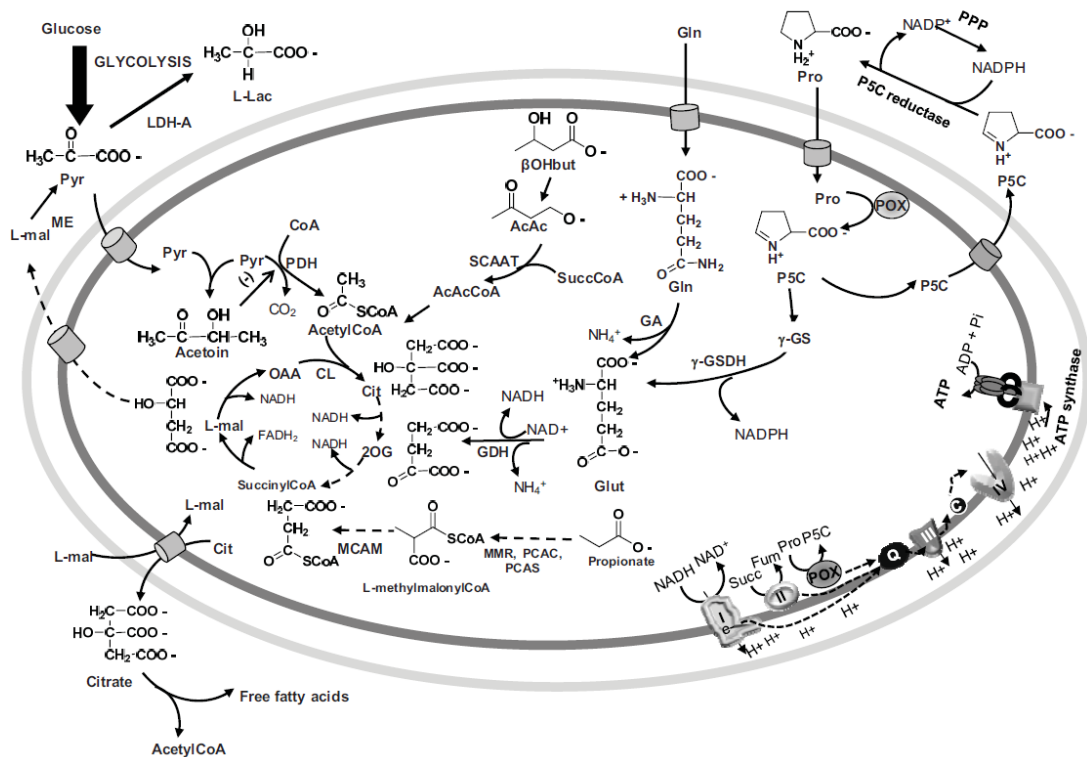


Figura 7: Metabolismo energético mitocondrial. AcAc, acetoacetyl; AcAcCoA, acetoacetyl-CoA; CL, citrato liase; Fum, fumarato; GA, glutaminasa; GDH, glutamato deshidrogenasa; Gln, glutamina; Glut, glutamato; L-Lac, L-lactato; L-mal, L-malato; MCAM, methylmalonyl-CoAmutasa; MMCR, methylmalonylCoAracemasa; ME, enzima málica; OAA, oxaloacetato; PDH, pyruvato deshidrogenasa; PCAC, propionyl-CoAcarboxylasa; PCAS, propionyl-CoAsynthetasa; POX, proline oxidasa; PPP, via de pentosas fosfato; Pro, prolina; pyr, pyruvato;P5C, pyrroline-5 carboxylato; Q, pool de quinona; SCAAT, succinyl-CoAcetoacetyltransferasa; succCoA, succinyl-CoA; Succ, succinato; 2OG, 2-oxoglutarato; β-OHbut, β-hidroxybutirato; γ-GS, γ-glutamatosemialdehido; γ-GSDH, γ-glutamatosemialdehido-deshidrogenasa. Tomado de: Rodríguez-Enríquez *et al.*, *Curr Med Chem.* 2011. 18: 3156-3167.

1.6 CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER (CANCER STEM CELLS)

El cáncer inicia a partir de una sola célula mutada, la cual comienza a proliferar y generar una heterogeneidad dentro del mismo tumor. Esta heterogeneidad se da por la expresión de diferentes marcadores y características particulares entre las células cancerosas y es la responsable de la progresión, metástasis y resistencia a cambios micro ambientales y terapias [Nassar y Blanpain, 2016].

Las cancer stem cells (CSC's por sus siglas en inglés) son una subpoblación dentro de los tumores las cuales presentan propiedades de auto regeneración, baja tasa de proliferación, presencia de marcadores particulares, transición epitelio – mesénquima (EMT), gran capacidad de invasión, diferenciación, resistencia a quimioterapias y radioterapias, tienen la capacidad para realizar y promover metástasis mediante la regulación de diferentes factores transcripcionales, y son las responsables de la recurrencia de la enfermedad [Visvader & Lindeman, 2012; Mimeault & Batra, 2014; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2019 (artículo de revisión en el cual participé, Anexo 1)]. En 1963, Tim y McCulloch experimentaron con células cancerosas y observaron que algunas tenían la capacidad de auto regenerarse y formar colonias en el pulmón. Doce años más tarde, en 1975, Brunschwig, Southam y Levin determinaron que solo unas pocas células de los tumores malignos podían formar nuevos tumores cuando se inyectaban en ratones. Después de varios años de investigación Bonnet y Dick trabajaron con leucemia aguda humana y demostraron que aproximadamente solo 1 de cada 250,000 células podía generar nuevos tumores en ratones inmunosuprimidos [Pham, 2015]. En 2001, Weissman *et al.*, introdujeron el término de *Cancer Stem Cells* y vieron que estas son una rara subpoblación que mantenían el crecimiento tumoral, además de que solo se encuentran presentes en algunos tipos de cáncer como el de mama o la leucemia [Pham, 2015].

El origen de las CSC's aún no es claro, pero se han dado diferentes hipótesis de cómo pudieron originarse. La primera es por la desregulación de las StemCells (a través de la inestabilización de diferentes vías como WNT/ β -catenina, Hedghog y/o Notch); la segunda es a partir de células diferenciadas, las cuales pueden

generar CSC's por transferencia horizontal de genes, inestabilidad genómica o presión microambiental; y la tercera es por una fusión entre Stem Cells y células diferenciadas [Pham, 2015].

A pesar de que se han establecido diferentes marcadores para identificar y aislar CSC's ninguno es universal ni se encuentra expresado en todos los tipos de cáncer, ya que las células cambian su fenotipo dependiendo de su microambiente. El primer tipo de cáncer al cual se le identificó que tenía CSC's fue la leucemia, observando que el fenotipo expresado es CD34+, CD38- e IL3Ra. Por otro lado, el primer tumor sólido al cual se le identificó CSC's es el cáncer de mama observando la expresión del fenotipo CD44⁺ CD24⁻ [Al-Hajj *et al.*, 2003; Visvader & Lindeman, 2012; Pham, 2015]. La expresión de este fenotipo (CD44⁺ CD24⁻) se ha visto relacionado con el aumento en la capacidad invasiva y metástasis, además de ser requerido para la formación de nuevos tumores al implantar estas células en ratones inmunosuprimidos [Li *et al.*, 2017; Rabinovich *et al.*, 2018]. La enzima ALDH1 también ha sido designada como marcador en este tipo de cáncer, ya que el contenido de proteína, así como su actividad se ven ampliamente aumentadas, ayudando a las células a destoxificarse de aldehídos, dando propiedades de troncalidad y aumentando la metástasis [Li *et al.* 2017]. Toda la expresión de estos marcadores y otras proteínas involucradas en la malignidad de estas células está ampliamente regulada por el factor de transcripción OCT 4, el cual es el regulador maestro de pluripotencia, el cual incrementa la progresión, metástasis y resistencia a terapias [Kim & Nam, 2011]. Asimismo, una característica que es evaluada para la troncalidad es la formación de mamoesferas (microesferas) en medio sin suero, lo cual es un indicativo de supervivencia de estas células cuando se ponen en medios sin factores de crecimiento [Schmidt & Dringen, 2009].

1.7 TERAPIAS CONTRA CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER

Diversas estrategias se han propuesto para atacar y eliminar esta subpoblación en los tumores. En general, todos los tratamientos anti – cáncer stem cells van

dirigidos a bloquear alguna vía de señalización importante para mantener la troncalidad como WNT/ β -catenina, Hedghog, Notch, mTOR o TGF- β , algunas de las moléculas que activan estas vías (IL-3, 8, 17), algunos marcadores de superficie (CD44, CD133), receptores que expulsan los fármacos de la célula (receptores ABC) o incluso con inmunoterapia (células dendríticas) (Figura 8) [Annett & Robson, 2018; Ghasemi *et al.*, 2019]. Sin embargo, se han observado diversos efectos secundarios (hipertrigliceridemia, urticaria, hipersensibilidad a anticuerpos monoclonales, etc.) ya que marcadores de superficie como CD44, receptores ABC o las vías de señalización, cumplen un rol fisiológico muy importante en células sanas y los fármacos utilizados para inhibir o bloquear alguno de estos blancos, son administrados en concentraciones muy elevadas (milimolares) afectando todo el organismo y siendo muy inespecíficos [Nassar & Blanpain, 2016; Visvader & Lindeman, 2012; Annett & Robson, 2018].

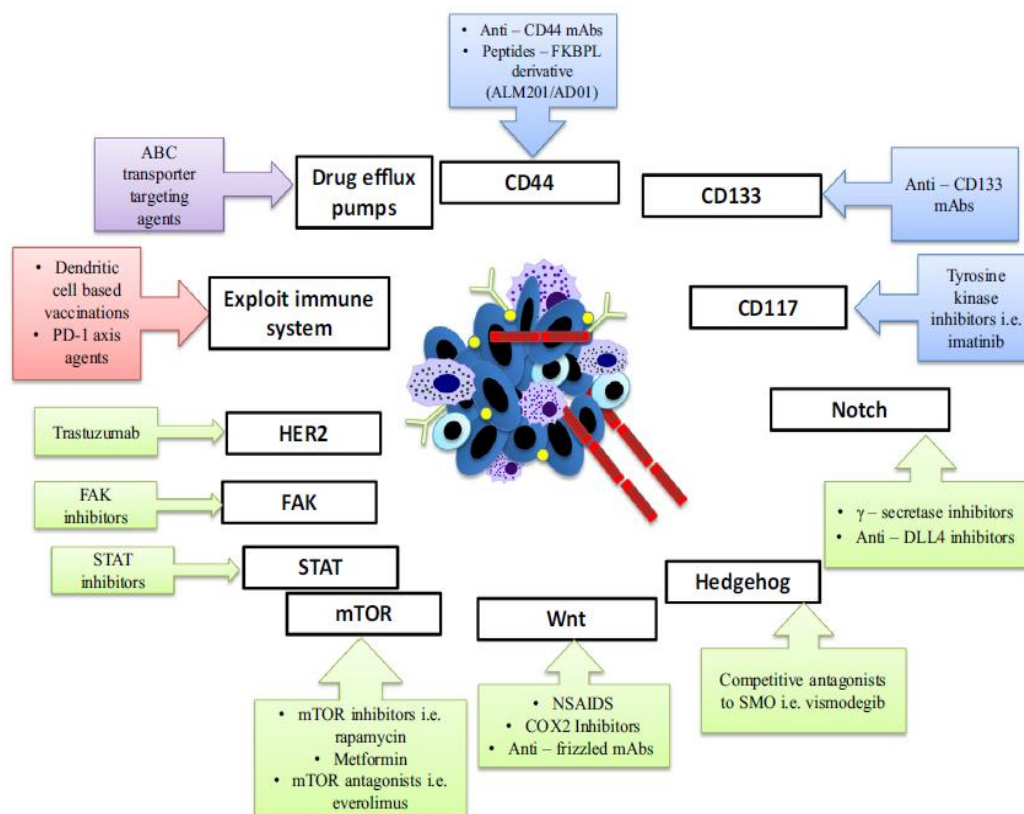


Figura 8: Blancos terapéuticos contra las cancer stem cells. Diferentes fármacos o inhibidores se han utilizado para tratar de eliminar CSC's basándose en marcadores de

superficie (recuadros azules), vías de señalización (recuadros verdes), inmunoterapia (recuadro rosa) o inhibiendo algunos receptores (recuadro morado). Tomado de: Annett & Robson, *et al.*, *Pharmacol Ther.* 2018; 187: 13-30.

Es por eso que en los últimos años se ha propuesto una nueva terapia contra las CSC's teniendo como blanco el metabolismo energético, en específico el metabolismo mitocondrial, esto debido a que diversos autores [Chae & Kim, 2018; Wong *et al.*, 2017] mencionan que a pesar de existir un incremento en ciertas enzimas (GLUT, HK-I, HK-II, PYK y PDHK) que benefician al flujo glucolítico, la FO continúa siendo la principal fuente de energía (aunque existen algunas excepciones), lo cual es crucial para funciones como migración, invasión, metástasis, troncalidad, radio y quimio resistencia. Además, se sabe que la mitocondria controla múltiples vías como la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la apoptosis intrínseca (a través de la liberación del citocromo c), la traslocación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) a núcleo para la acetilación de histonas, y la producción de metabolitos como acetyl-CoA el cual regula la acetilación de proteínas, o citrato el cual participa en la síntesis de ácidos grasos y colesterol [Sutendra *et al.*, 2014; Sancho *et al.*, 2016].

Pasto *et al.*, [2014], en células troncales provenientes de epitelio de pacientes con cáncer de ovario, observaron que el fenotipo CD44⁺ CD133⁺ presentaba una alta expresión de diferentes genes relacionados con la troncalidad (NANOG, SOX, OCT 4), transición epitelio mesénquima (ZEB-2, TWIST-1, SNAIL), resistencia a fármacos (MRP-1,2, ABCG-2, ALDH1A) y metabolismo mitocondrial (CS, IDH-2, ATP5B, etc.), así como una disminución de PDHK-1 (inhibidor de PDH) y MCT-4, todos comparados con las células con fenotipo CD44⁺ CD133⁻, concluyendo que la mitocondria mantenían un metabolismo incrementado. Para comprobar esto midieron la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), el potencial de membrana y la sensibilidad a inhibidores mitocondriales, obteniendo que estas células (comparadas con aquellas que presentaban el fenotipo CD44⁺ CD133⁻) presentaban un incremento en el contenido de ERO, un decremento significativo en el potencial de membrana cuando se le añadía oligomicina (inhibidor de la ATP

synthase) y una disminución en la viabilidad cuando se adicionaba oligomicina, antimicina, rotenona y metformina durante 6, 12 y 24 horas.

Por otro lado, Fiorillo *et al.*, [2019] caracterizaron el metabolismo de CSC provenientes de la línea celular MCF7, tanto en monocapa como en esferoides. Ellos observaron que había células con un “alto metabolismo” (ya que mantenían una gran cantidad de flavinas) y, al medir el consumo de oxígeno sensible a oligomicina, así como la tasa de acidificación del medio, concluyeron que la glucólisis no tenía un gran cambio, pero que el consumo de oxígeno era alto (>2 veces) y que además se producía una gran cantidad de ATP por parte de la mitocondria (2-4 veces más), esto comparándolo con las células con “bajo metabolismo” (bajo contenido de flavinas). Posterior a eso, hicieron un análisis proteómico y determinaron que 225 proteínas se encontraban sobre expresadas (>1.5 veces) de las cuales cerca del 20% pertenecían o cumplían alguna función en la mitocondria. Con esto propusieron al DPI (inhibidor de flavinas, complejo I y II) como un buen fármaco contra estas células, ya que se sabe que inhibir la función mitocondrial, así como la biogénesis en CSC, disminuye la FO y la capacidad de formación de microesferas [De Luca *et al.*, 2015], pero al añadir diferentes concentraciones de DPI (10, 25, 50 y 100 nM) durante 5 días, se observó un incremento en la masa mitocondrial pero solo en los cultivos en monocapa.

Además, en nuestro laboratorio, Adán-Ladrón de Guevara (*manuscrito en preparación*) y García-Amezcuca [2016] demostraron que en células troncales de cáncer de mama provenientes de la línea celular MCF7, se presentaba un incremento en proteínas glucolíticas (GLUT 1, HKII, HPI, PFK y LDH) y mitocondriales (ND1, COX-IV, ANT y CPT1), así como un incremento en la actividad de HK y LDH, y una disminución en la actividad de CS, GDH y COX, pero a pesar de esto, el principal aporte de ATP (87%) sigue siendo por parte de la FO (midiendo el consumo de oxígeno sensible a oligomicina), y el resto (13%) lo otorga la glucólisis (midiendo el consumo total de lactato y restando el lactado producido en presencia del inhibidor 2-DG) y que, además, estas células

presentan una mayor sensibilidad a fármacos anti-mitocondriales como casoiopeína II-gly y a-TEA [Adán-Ladrón de Guevara, 2019].

Por esto, se han propuesto diferentes fármacos y/o compuestos naturales que afecten o dañen a la mitocondria como una buena estrategia contra las CSC's para así disminuir las concentraciones utilizadas en terapias actuales y con ello disminuir sus efectos secundarios, además de permitir la erradicación del tumor en su totalidad [Sotgja *et al.*, 2018].

1.8 COMPUESTOS NATURALES CONTRA CANCER STEM CELLS: ERITROSA Y SULFORAFANO

La eritrosa (ERY) es un carbohidrato presente en raíces y tallo de ruibarbo (planta fanerógama perteneciente a la familia Polygonaceae), la cual se encuentra presente en la mayoría de los organismos en forma de eritrosa 4 fosfato (intermediario de la vía de pentosas fosfato) [Liu *et al.*, 2015]. Este compuesto natural (ERY) ha sido utilizado en modelos *in vivo* de rata contra el cáncer de colon, en donde la administración intraperitoneal (500 mg/kg) durante 15 días suprime significativamente el tamaño del tumor y disminuye la acumulación de ascitis en comparación con el grupo no tratado [Liu *et al.*, 2015]. Por otro lado, Gallardo-Pérez *et al.*, [2017], en un modelo *in vitro* de cancer stem cells de mama, al adicionar 24 nM de eritrosa 4 fosfato (E4P) durante 24 horas, observaron una disminución en la migración, invasión, expresión de marcadores de superficie y proteínas que participan en transición epitelio mesénquima y pluripotencia, esto debido a que la ERY se une a la citocina extracelular HPI/AMF evitando así, que se una a su receptor (gp78) y active vías de señalización (Figura 9). Al administrarse la misma concentración de E4P en células sanas (fibroblastos de ratón, 3T3 y células de cordón umbilical HUVEC) no se observó un efecto significativo en la viabilidad de estas células en estas concentraciones (24 nM) y hasta 10 μ M [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017]. Recientemente se ha evaluado el efecto de ERY en CSC de mama con resultados similares.

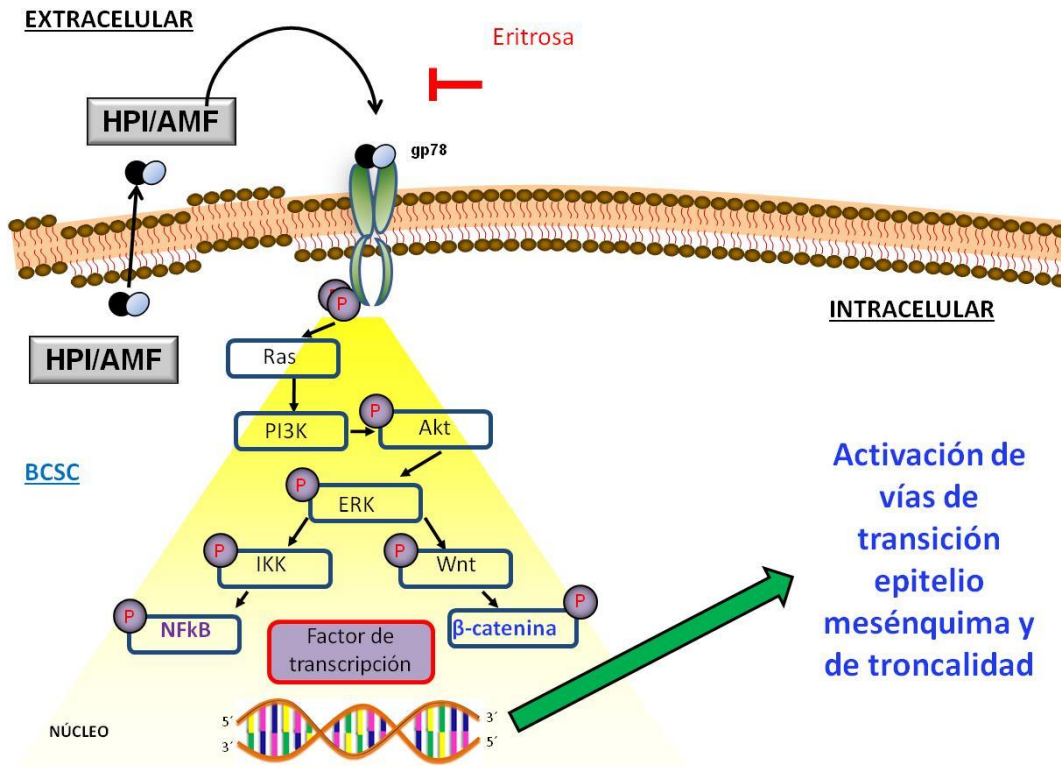


Figura 9: Cascada de señalización intracelular una vez que la citocina HPI/AMF se une a su receptor y por medio de la vía Wnt/ β -catenina o NF- κ B induce la expresión de vías de EMT y troncalidad. La eritrosa es capaz de bloquear la interacción de la citocina HPI/AMF con su receptor (gp78) en células de cáncer de mama troncales que sobre expresan el receptor y sobre secretan la citocina.

Además, se tiene la hipótesis que la administración de eritrosa en tejidos tumorales, puede ingresar a la célula y ser oxidada hasta dióxido de carbono en la mitocondria (afectando su función debido a la acidosis) para posteriormente, por la catálisis de la anhidrasa carbónica, ser convertido en ácido carbónico favoreciendo y provocando muerte celular [Liu *et al.*, 2015]. Sin embargo, el efecto de la ERY sobre el metabolismo energético mitocondrial no ha sido evaluado.

El sulforafano (SFN) es un isotiocianato presente en plantas crucíferas como brócoli y col. Se ha visto que funciona como un agente anti cancerígeno al aumentar enzimas de la fase II de detoxificación e inhibir enzimas de la fase I (la

cual genera compuestos altamente reactivos); además, bloquea la proliferación celular e induce apoptosis modulando mecanismos epigenéticos como metilación del ADN y disminuyendo la respuesta de MAPK, la actividad de NFκB, ocasionando cambios conformacionales y funcionales de la tubulina, ruptura de microtúbulos y degradación de α y β tubulina [Sestilli & Fimognari, 2015]. En modelos *in vitro* de cáncer de próstata (PC3) la adición de 10, 20 ó 40 μ M de este compuesto por 3 horas inhibe la síntesis de proteínas al defosforilar S6K1 (intermediario de mTOR), y, en la concentración de 40 μ M a 15, 30 y 60 minutos no se ve afectada la producción total de lactato, aunque se observa una tendencia a disminuir [Wiczak *et al.*, 2012]. Además, en las líneas celulares PC3 y LNCaP (ambas cáncer de próstata), utilizando concentraciones de 20, 40, 80 y 100 μ M por 6 horas, se inhibe la actividad de los complejos I, II y III de la cadena transportadora de electrones, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, la apoptosis y autofagia e induce arresto de ciclo celular, aunque los flujos y el aporte de ATP por parte de la glucólisis y FO no fueron evaluados [Xiao *et al.*, 2009].

El SFN también ha sido utilizado para el tratamiento de CSC. En células troncales de cáncer de mama inhibe la formación mamoesferas (microesferas) y el crecimiento tumoral después de la reimplantación en ratones secundarios debido a que regula negativamente la vía de señalización WNT/ β -catenina, la cual es esencial para la auto renovación y la resistencia de estas células. Además, presenta efectos sinérgicos (en concentraciones de entre 5 y 10 μ M) cuando se combina con otros fármacos como sorafenib, imatinib, cisplatino, doxorubicina y 5 fluorouracil en la eliminación de células troncales en cáncer pancreático, próstata y leucemia en modelos *in vitro*, así como inhibición en el crecimiento de cáncer pancreático en ratones, todo esto sin ningún efecto aparente en células y/o tejidos sanos debido a la disminución de las concentraciones utilizadas de estos compuestos químicos [Naujokat & Laufer, 2013].

En los últimos años, la combinación de fármacos ha buscado mejorar la eficacia de las terapias aplicadas en clínica, reducir la toxicidad de estas y reducir la

resistencia que desarrollan los tumores [Foucquier & Guedj, 2015]. Sin embargo, en muchas de estas combinaciones, los fármacos utilizados tienen el mismo blanco o proceso biológico (alguna vía de señalización, pero en diferentes partes) [Pectasides *et al.*, 2004; Cadrón *et al.*, 2007], por lo que se debe priorizar el uso de drogas en combinación que posean blancos distintos (migración, proliferación, troncalidad, metabolismo). Es por esto, por lo que la combinación de dos o más compuestos naturales (terpenos, carotenoides, isotiocinatos, etc.), se ha propuesto como terapia simultánea para el tratamiento de la enfermedad, ya que, al actuar en diferentes procesos celulares pueden reducir el desarrollo de resistencia del cáncer y sensibilizar las células al efecto de las terapias convencionales [Rejhova *et al.*, 2018].

Es así, que la propuesta del uso de la eritrosa y el sulforafano en combinación, puede potenciar su efecto para la eliminación de CSC's, a concentraciones muy bajas (incluso menores que las que se obtienen mediante la dieta) y sin un efecto significativo en células y tejidos sanos dando una mayor esperanza de vida a aquellas personas que presentan esta enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

Las células troncales de cáncer son las responsables de la iniciación, progresión, metástasis y resistencia de la enfermedad, por lo cual la búsqueda de estrategias para su eliminación continúa siendo de gran importancia. El metabolismo energético, en específico el mitocondrial, es un blanco terapéutico novedoso debido a que el principal aporte de energía la mayoría de las CSC es la FO, además de que está contribuye en diferentes procesos como apoptosis, resistencia a drogas, recurrencia, metástasis y progresión a la malignidad. Previamente se ha demostrado que la eritrosa y el sulforafano en combinación poseen actividad antitumoral a concentraciones incluso nanomolares, afectando, vías relacionadas con la troncalidad, así como posiblemente el metabolismo energético sin efecto aparente en células sanas.

Es por esto, que la combinación de eritrosa y sulforafano puede funcionar como una buena estrategia terapéutica afectando viabilidad, troncalidad y metabolismo energético a concentraciones más bajas que las administradas por separado (potenciación) y disminuyendo un posible efecto secundario en células sanas.

3. HIPÓTESIS

La eritrosa y el sulforafano en combinación disminuirán el fenotipo troncal y el metabolismo energético en células troncales de cáncer de la línea celular MDA MB 468.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la combinación de compuestos naturales (eritrosa y sulforafano) sobre el fenotipo troncal y el metabolismo energético de células troncales de cáncer de mama.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener células con fenotipo troncal de la línea celular MDA-MB-468.
- Evaluar el fenotipo troncal y el metabolismo energético de CSC derivadas de MDA-MB-468.
- Obtener la IC50 de los compuestos eritrosa y sulforafano en combinación en CSC de MDA-MB-468.
- Evaluar el efecto de la combinación de eritrosa y sulforafano sobre el contenido de proteínas marcadoras de troncalidad, metástasis, glucolíticas y mitocondriales.
- Determinar el efecto de la combinación de eritrosa y sulforafano sobre la capacidad de formación de microesferas y los flujos de glucólisis y fosforilación oxidativa.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 CULTIVO CELULAR Y REACTIVOS

La línea celular MDA-MB-468 se descongeló y fue sembrada en cajas Petri de 150 X 20 mm con medio DMEM 25 mM glucosa, 10% suero fetal bovino suplementado con 10,000 U de penicilina /estreptomicina a 37° C en normoxia (5% de CO₂ / 21% de O₂) hasta alcanzar una confluencia de 80 - 90 %. La línea celular fue genotipificada en el laboratorio de diagnóstico genómico del Instituto Nacional de Medicina Genómica y tiene una concordancia de 10 alelos (100%) con la línea celular humana MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™).

Los compuestos eritrosa y sulforafano fueron obtenidos por Sigma (Sigma-Aldrich; Steinheim, Germany).

5.2 OBTENCION DE CÉLULAS MDA-MB-468 CON FENOTIPO TRONCAL

Las células fueron sometidas a un protocolo de estrés microambiental estandarizado en el departamento de bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017]. Primero, al cultivo celular al 80% de confluencia se le adicionó medio DMEM 2.5 mM, 10% suero fetal bovino y suplementado con 10,000 U de penicilina /estreptomicina con 100nM de paclitaxel y en normoxia durante 12 horas. Después de transcurrido el tiempo, se le retiró el medio y se adicionó medio nuevo DMEM 25 mM glucosa 10% suero fetal bovino y suplementado con 10,000 U de penicilina /estreptomicina con 100nM de doxorubicina y en hipoxia (0.1% de O₂) durante otras 12 horas. Después de ese tiempo se cambió el medio a un DMEM 25 mM de glucosa sin suero durante 24 h en normoxia a 37°C.

5.2.1 FORMACIÓN DE MICROESFERAS

La caracterización del fenotipo troncal incluyó la capacidad de generación de microesferas. Estas se formaron utilizando el ensayo de formación de esfera flotante modificado por diferentes autores [Carlsson & Yuhas *et al.*, 1984; Manuel-Iglesias *et al.*, 2013; Gallardo-Pérez *et al.*, 2017]. Las células (1×10^5) BCSC y MDA-MB-468 se cultivaron en una superficie antiadherente (agarosa al 2%) con medio Dulbecco-MEM sin suero y se colocaron inmediatamente bajo agitación lenta (20-50 rpm) orbital durante 10 días a 37°C en aire al 95% / CO₂ al 5%. El medio viejo se reemplazó con medio fresco cada 2 a 3 días para eliminar los restos celulares, las células muertas y detritus. El tamaño de la microesfera se midió diariamente con una retícula graduada (1/10 mm, Zeiss, NY, EE. UU.) en un microscopio de contraste de fase invertida (Zeiss, NY, EE. UU.).

5.2.2 MARCADORES DE TRONCALIDAD

También se evaluó la expresión de diferentes proteínas asociadas con la troncalidad (CD44, CD24, ALDH1A3, Oct3/4, E-Cadherina, vimentina, SNAIL) a través de la técnica de western blot (descrita abajo).

5.3 VIABILIDAD DE CÉLULAS CON FENOTIPO TRONCAL DE CÁNCER DE MAMA Y DETERMINACION DE IC₅₀ DE LOS COMPUESTOS NATURALES

Las células con fenotipo troncal obtenidas del protocolo de selección se tripsinizaron con 3 mL de tripsina/EDTA 0.25% durante 3 minutos. La tripsina se inactivó con 3 mL de medio DMEM 25 mM y se centrifugó a 3,200 rpm por 3 minutos. El botón se re suspendió en 1mL de medio DMEM 25 mM y las células se sembraron en una placa de 96 pozos (20,000 células por pozo) durante 24 horas. Después de transcurrido el tiempo se adicionaron concentraciones crecientes de eritrosa y sulforafano por separado (0,0.1, 1, 10, 100, 250 y 500 nM y 1, 10 100, 250, 500 y 1000 µM) durante 24 horas. Posteriormente se midió la viabilidad con cristal violeta [Feoktistova *et al.*, 2016] en un lector de placas Bio-Rad iMark (Bio-

Rad; Hércules, CA, USA) a 590 nm. La IC₅₀ de los compuestos naturales se determinó a través del programa *OriginPro 8* (OriginLab Corp.; Northampton, MA, USA).

Para la combinación se utilizaron concentraciones inferiores a la IC₅₀ de ambos compuestos. Se determinó la viabilidad por cristal violeta y se obtuvo una nueva IC₅₀ (solo para eritrosa ya que el SFN se dejó a una concentración constante), con el programa *Origin Pro 8*.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células con fenotipo troncal obtenidas de la selección y la línea celular MDA MB 468 (tratadas y no tratadas) se les retiró el medio, se lavaron con PBS y posteriormente se tripsinizaron y centrifugaron a 3200 rpm por 3 minutos a 25°C. El botón se re suspendió en 1 mL de buffer RIPA (1x PBS pH 7.2, 1% IGEPAL NP40, 0.1% SDS y 0.05% deoxicolato de sodio) con 15 µL de inhibidor de proteasas PMSF (100 mM) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó para cuantificar el contenido de proteínas por la técnica de Lowry [Lowry *et al.*, 1951].

5.5 IDENTIFICACIÓN DE CONTENIDO DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

La proteína total de las células (50µg) se re suspendió con buffer de carga 5% de β- mercaptoetanol y se cargó en geles SDS PAGE (desnaturalizantes) 10 ó 12% de acrilamida, posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad; Hércules, CA, USA) las cuales se colocaron en 5 % de leche libre de grasa y 0.1% de TBS Tween 1x durante 1 hora para ser bloqueadas. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos monoclonales (GLUT-1, HKII, NDI, COX-IV, ATP sintasa, CD44, CD24, ALDH1A3, Oct 3/4, E-Cadherina, vimentina, fibronectina, MMP-9, SNAIL y α-tubulina (dilución 1:1,000) (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA). La hibridación de las bandas se reveló por

quimioluminiscencia usando el sistema de detección ECL-Plus (Amersham Bioscience; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) con su respectivo anticuerpo secundario (dilución 1:2,000). Las bandas obtenidas se cuantificaron por densitometría y fueron comparadas con el control de carga [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017].

5.6 METABOLISMO ENERGÉTICO

5.6.1 FLUJO GLUCOLÍTICO

Las cancer stem cells de mama tratadas 24 horas con eritrosa y sulforafano en combinación (100nM/100nM) (3 - 5mg/ml) se incubaron en medio Ringer Krebs a 37°C en agitación constante (150 rpm) durante 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 5 mM de glucosa y se tomaron muestras al tiempo 0, 5 y 10. Cada muestra se colocó en 10% de ácido perclórico, centrifugó y recuperó el sobrenadante el cual se neutralizó con KOH 3M y Tris 0.1 mM (Pacheco-Velázquez *et al.* 2018). La cuantificación de lactato producido se midió en el espectrofotómetro de diodos (Agilent Technologies, Inc.; Santa Clara, California, USA) a 340 nm con la aparición de NADH catalizado por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Para esto, en un volumen de 2mL de hidrazina (0.4M) glicina (0.5M) pH 9.0, se agregó 1 mM de NAD⁺ y 40 µl de LDH (dilución 1:4). Al obtener una línea basal se adicionaron 50 µl de la muestra neutralizada. Para obtener la velocidad de glucolisis, se consideraron las diferencias de absorbancias, el coeficiente de extinción molar del NADH, el volumen de la muestra y el tiempo de reacción [Marín-Hernández *et al.* 2006]. Para obtener la cantidad de lactato producido por la glutaminólisis, las células se incubaron con 2-desoxiglucosa antes de la adición de glucosa. El resultado se le restó al lactato total para obtener el lactato producido por la glucólisis.

5.6.2 FLUJO MITOCONDRIAL

Las células con fenotipo troncal de cáncer de mama tratadas 24 horas con eritrosa y sulforafano en combinación (100nM/100nM) se incubaron en medio Ringer Krebs saturado en oxígeno a 37°C y colocaron en un respirómetro de alta resolución del equipo Oroboros (Oroboros Instruments; Innsbruck, Austria), la cual está acoplada a un electrodo tipo Clark. En esta cámara se midió el consumo total de oxígeno. Para medir la fosforilación oxidativa se adicionó 5 μ M de oligomicina (potente inhibidor de la ATP synthase) donde se registró la pendiente generada, posteriormente se adicionó 10 mM de KCN para registrar la respiración no mitocondrial y se obtuvo el cero químico añadiendo ditionita [Pacheco-Velázquez *et al.*, 2018].

5.6.3 CONTRIBUCIÓN DE ATP

El aporte de ATP por parte de la glucólisis se calculó tomando en cuenta que 1 mol de lactato producido es igual a 1 mol de ATP. Por otro lado, el aporte por parte de la fosforilación oxidativa se calculó tomando en cuenta la respiración sensible a oligomicina multiplicado por 2.5 [Nakashima *et al.*, 1984].

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron al menos con tres preparaciones celulares independientes (n). Los datos mostrados representan la media \pm desviación estándar (S.D.). Para el análisis se utilizó la prueba t de student con valores de $p < 0.05$ o menores para determinar la significancia estadística.

6. RESULTADOS

6.1 CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB-468 CON FENOTIPO TRONCAL

El protocolo de selección estandarizado por Gallardo-Pérez *et al.*, [2017], mimetiza las condiciones microambientales presentes en un tumor sólido, permitiendo la obtención de una subpoblación con características de troncalidad. Después de aplicar este protocolo a la línea celular MDA-MB-468, gran parte de las células vivas (60-70%) disminuyeron, y las células "seleccionadas" (sobrevivientes del protocolo de selección) presentaron un cambio en su morfología, tomando una forma fibroblastoide, alargada (dejando su forma inicial polihédrica), así como una disminución en la confluencia. Asimismo, se observó un incremento en la granulación de las células (figura 10). Estas células fueron denominadas CSC.

Por otra parte, además de las características morfológicas, es necesario medir marcadores moleculares ya reportados para las CSC de mama. Las células presentaron un cambio en la expresión de marcadores como CD44, CD24, ALDH1A3 y Oct 3/4 (Figura 11) como ha sido reportado previamente [Annett & Robson, 2018; Ghasemi *et al.*, 2019]. El marcador de superficie CD44 presentó un incremento (4 veces) con respecto a su línea parental, tal como se ha reportado en células troncales de cáncer de mama provenientes de MCF7 obtenidas con el mismo protocolo [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017]; CD24 disminuye aproximadamente 4 veces (comparado con su línea parental) aunque en otras células troncales de cáncer de mama se ha reportado que casi no lo expresan [Adán-Ladrón de Guevara, 2016; Filmore & Kuperwasser, 2008]; ALDH1A3 y Oct 3/4 también incrementan, 9 y 2 veces respetivamente comparados con su línea parental, similar a lo reportado por Gallardo-Pérez *et al.*, [2017] y Adán-Ladrón de Guevara [2016] para CSC derivadas de MCF7.

Asimismo, otra característica de CSC es la capacidad de formación de mamoesferas (microesferoides) en ausencia de suero en el medio de cultivo. La figura 12 muestra que después de 10 días de cultivar las células en medio sin

suero y en agitación constante, estas fueron capaces de formar microesferoides de aproximadamente 400 μm de diámetro en comparación con el control (MDA-MB-468 parental) que sólo forma aglomerados de 60-80 μm de diámetro. Lo anterior indicó que la población troncal se incrementó en estas células luego del protocolo de selección ya que está establecido que en ausencia de suero (el cual contiene factores de crecimiento) las CSC pueden secretar diferentes factores de crecimiento y señales para su desarrollo, lo que sustenta su proliferación.

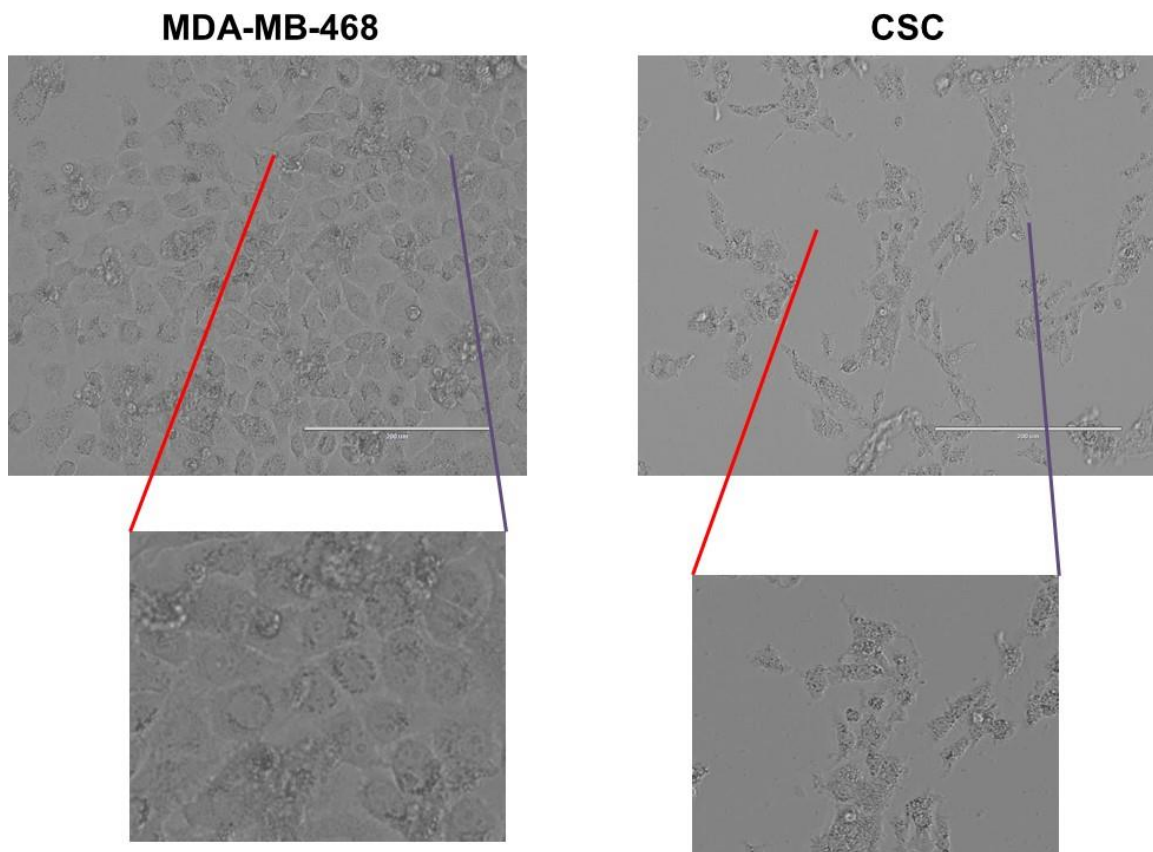


Figura 10: Morfología de células MDA-MB-468 y cancer stem cells después del protocolo de selección. Barra=200 μm .

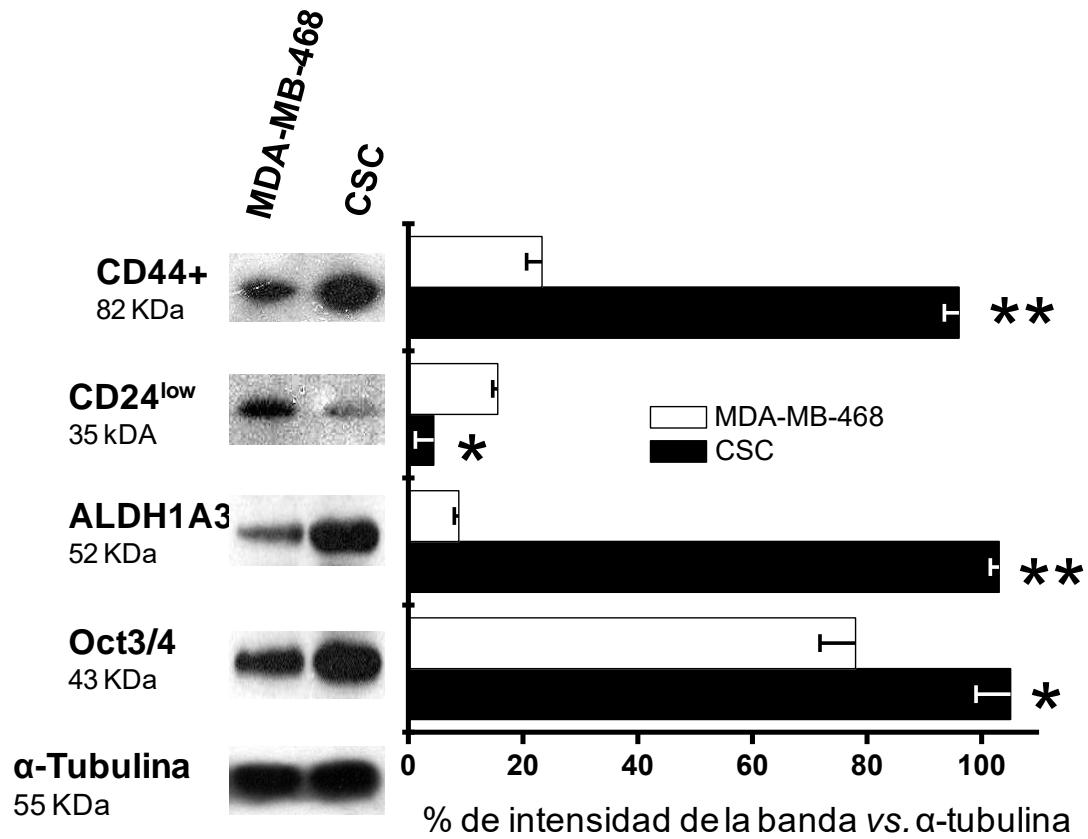


Figura 11. Marcadores de troncalidad de células MDA-MB-468 y CSC. n=3; *P<0.05; **P<0.01 vs. MDA-MB-468.

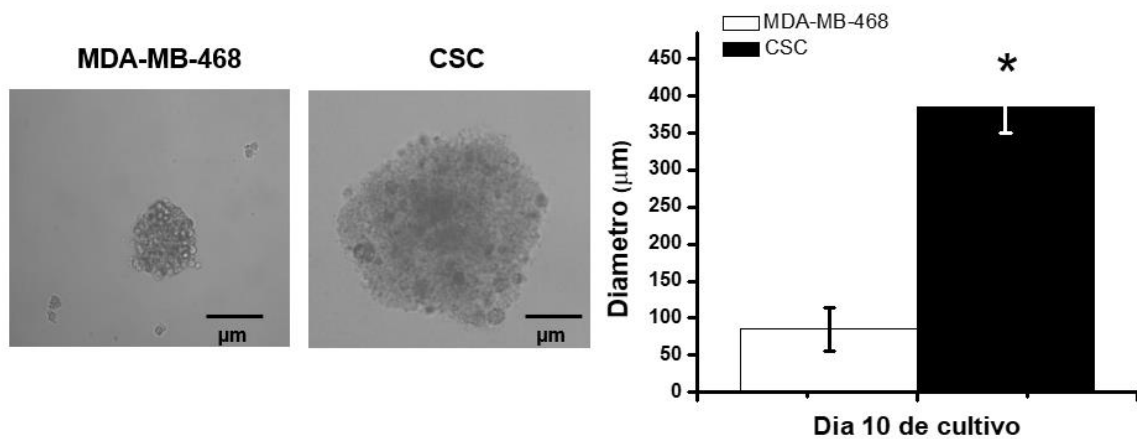


Figura 12: Formación de microsferas al día 10 en medio sin suero. Barra= 100μm. n=100 esferoides; *P<0.01 vs. MDA-MB-468.

Asimismo, las CSC presentan otras características como la expresión de proteínas asociadas a los procesos de transición epitelio mesénquima, invasión y metástasis. En las CSC seleccionadas por el protocolo, observamos que el factor transcripcional SNAIL (regulador maestro de EMT), se encuentra sobre expresado (más de 40 veces) en BCSC, lo que coincide con una severa disminución (más del 80%) del contenido de E-cadherina (la disminución en su expresión es ocasionada por el aumento de SNAIL). Otras proteínas relacionadas a estos procesos, como vimentina, fibronectina (ambas blanco de SNAIL) y MMP-9 también aumentaron de 3-7 veces, todas comparadas con la línea parental MDA-MB-468 (Figura 13).

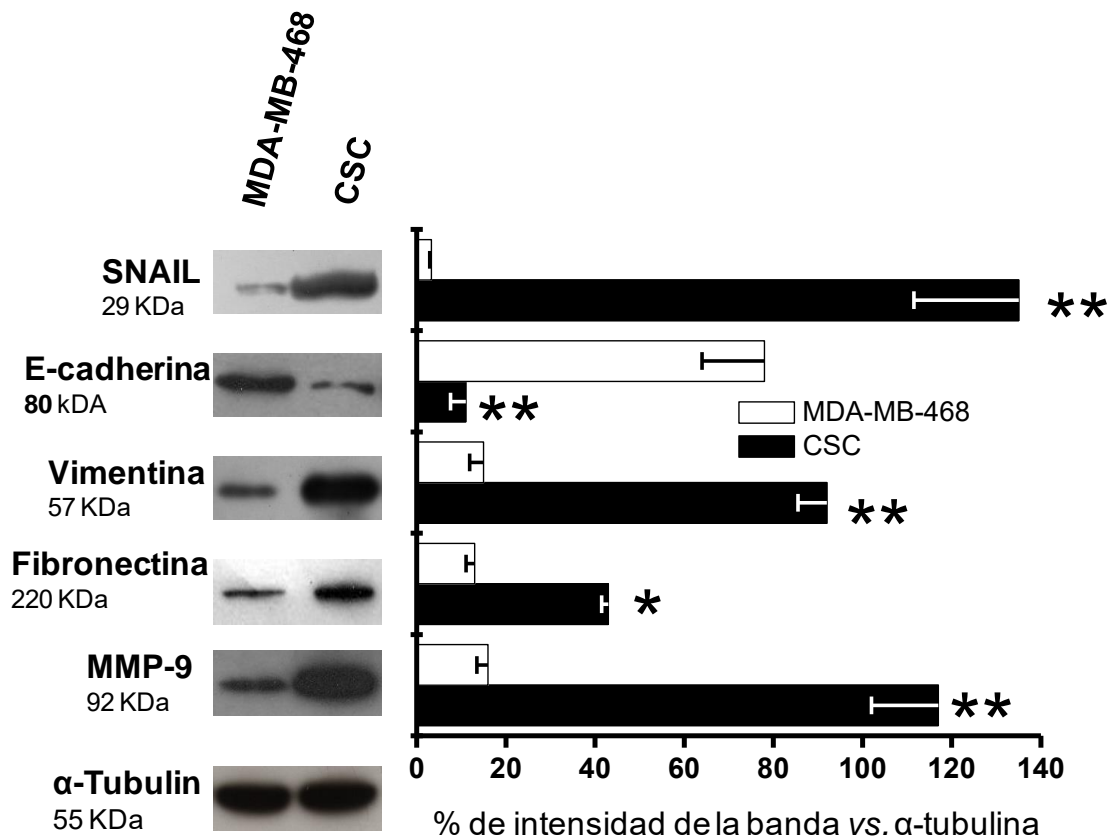


Figura 13. Marcadores de transición epitelio mesénquima en MDA-MB-468 y CSC. n=3; *P<0.05; **P<0.01 vs. MDA-MB-468.

Con lo anterior, se concluyó que las células obtenidas a través del protocolo de selección poseían un fenotipo troncal.

6.2 METABOLISMO ENERGÉTICO EN CSC

6.2.1 PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CSC

Se evaluó el contenido de algunas proteínas del metabolismo energético (glucólisis y FO) en CSC. Las proteínas controladoras de la glucólisis en células tumorales GLUT-1 y HKII presentaron un incremento de 2-3 veces con respecto a su línea parental (Figura 14). Asimismo, las proteínas de FO: ND1, COXIV y ATP synthase presentaron un aumento de 1.5-3.5 veces con respecto a MDA-MB-468 (figura 14). Con este incremento es posible que el metabolismo energético en CSC presente cambios con respecto a MDA-MB-468, pero es necesario medir los flujos.

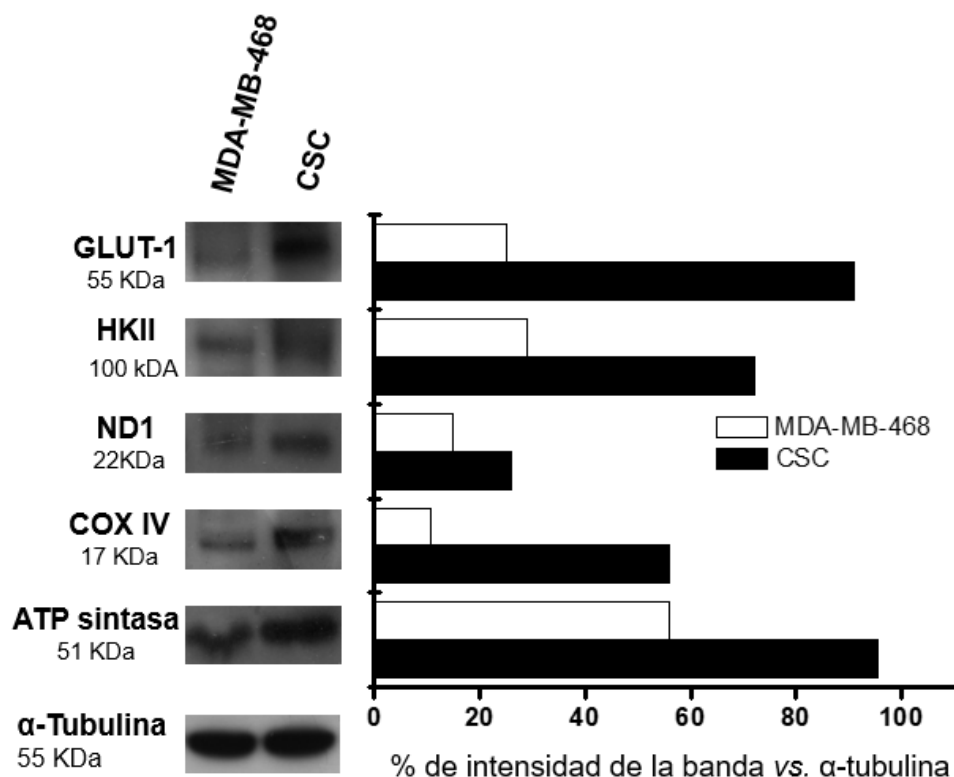
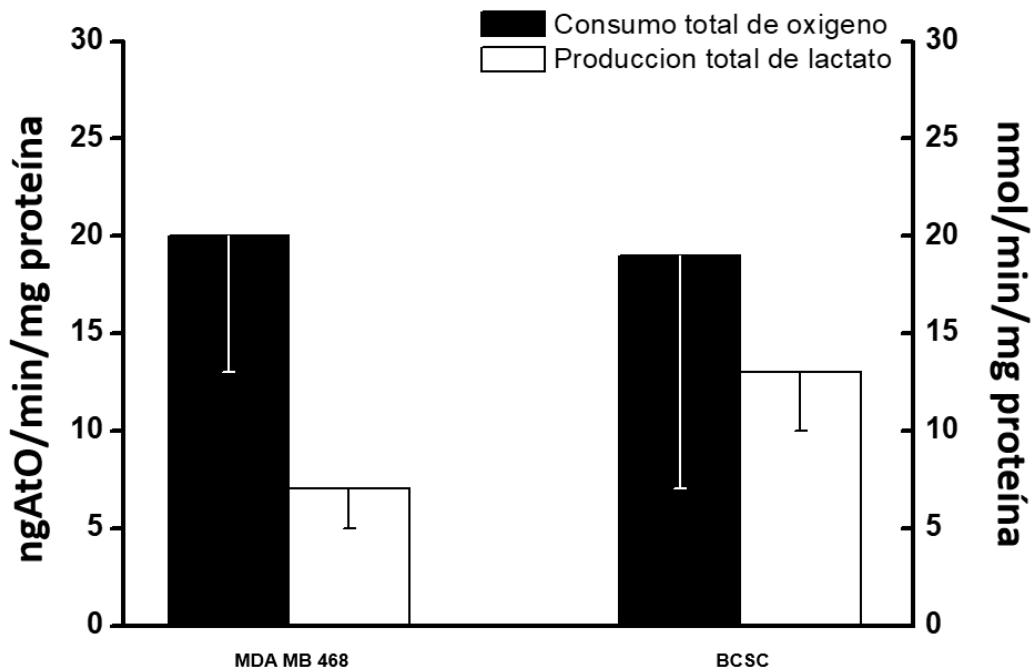


Figura 14. Proteínas del metabolismo energético en MDA-MB-468 y CSC. n=2.

6.2.2 FLUJO GLUCOLÍTICO, MITOCONDRIAL Y APORTE DE ATP EN CSC

Posterior a la evaluación de proteínas del metabolismo energético, se procedió a medir los flujos de glucólisis y FO. En las CSC el consumo total de oxígeno fue similar que en MDA-MB-468 mientras que la producción total de lactato fue mayor (Figura 15A), aunque este aumento no fue significativo. Por otro lado, ambos flujos sí presentaron un cambio significativo. El flujo glucolítico en CSC fue mayor (0.5 veces) con respecto a MDA-MB-468 (aunque el resultado obtenido para esta línea celular fue menor al reportado por Pacheco-Velázquez *et al.*, 2018), mientras que el flujo de FO disminuyó significativamente en CSC con respecto a su parental (Figura 15B).

A)



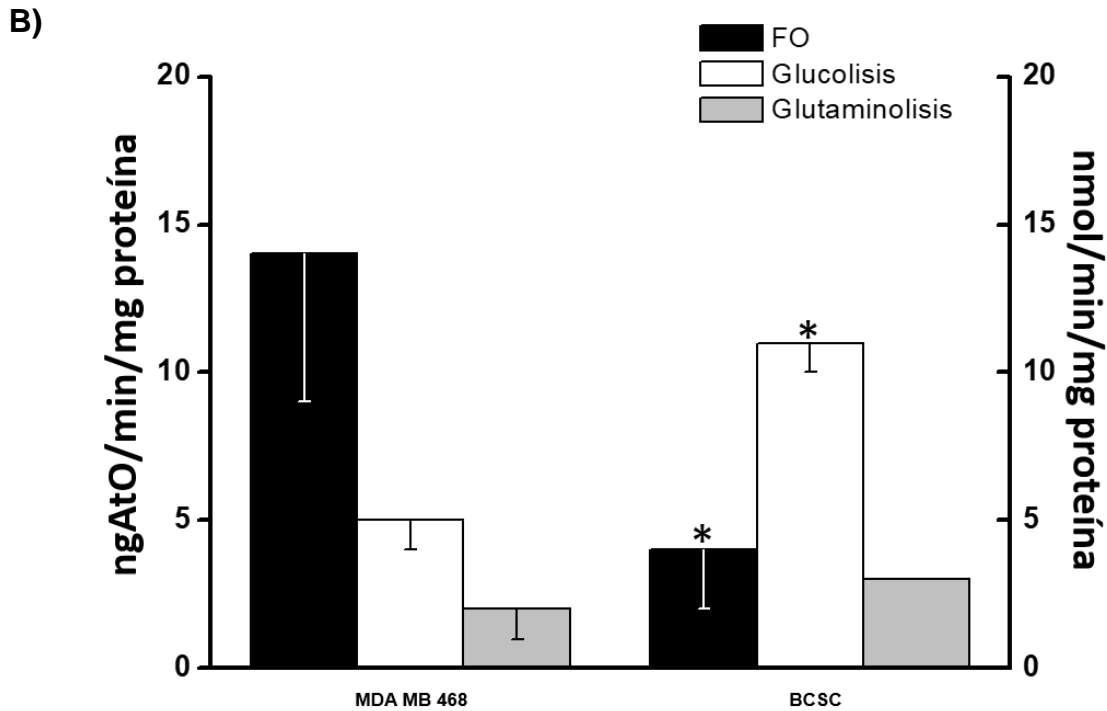


Figura 15: Metabolismo energético en CSC. A) Consumo total de oxígeno y producción total de lactato en MDA-MB-468 y CSC; B) Flujos de glucólisis, FO y glutaminólisis en MDA-MB-468 y CSC. n=3, *P<0.05 vs MDA-MB-468.

Con estos valores se calculó el aporte de ATP por parte de ambas vías y se observó un cambio significativo en CSC con respecto a MDA-MB-468 en cuanto a la vía que aporta mayor energía en estas células. En la línea parental el aporte es de aproximadamente 80% FO y 20% glucólisis (similar a lo reportado por Pacheco-Velázquez *et al.*, 2018), pero en CSC existe un switch y la distribución cambia a 49% FO, 51% glucólisis (Figura 16). Con esto se concluyó que en efecto el metabolismo energético en CSC presenta un gran cambio con respecto a su línea parental y que la glucólisis se está favoreciendo, caso contrario a lo que ocurre en CSC derivadas de MCF7 en la cual el principal aporte de ATP lo proporciona la mitocondria (87%) [Adán-Ladrón de Guevara *et al.*, manuscrito en preparación].

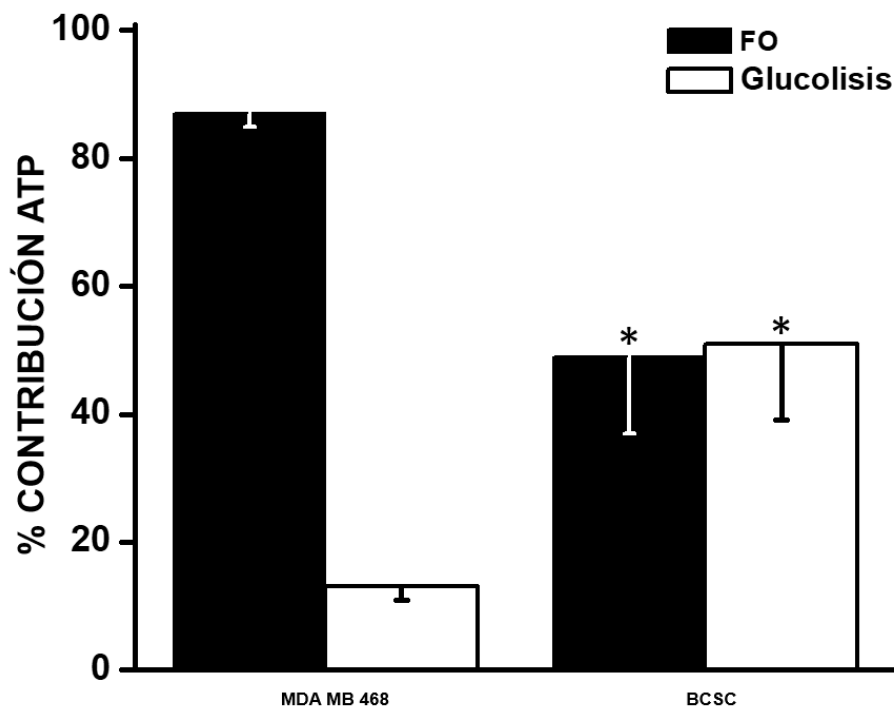


Figura 16: Aporte de ATP en CSC y MDA-MB-468. n=3, *P<0.05 vs MDA-MB-468.

6.3 IC₅₀ DE VIABILIDAD DE COMPUESTOS NATURALES

Las células troncales de cáncer (CSC), así como su línea parental MDA-MB-468 fueron colocadas en una placa de 96 pozos (20,000 células por pozo) donde fueron adicionadas concentraciones crecientes de ERY y SFN por separado durante 24 horas (0, 0.1, 1, 10, 100, 250 y 500 nM y 1, 10 100, 250, 500 y 1,000 µM). Se obtuvo la IC₅₀ de cada compuesto, ajustando la curva de calibración a un decaimiento exponencial en el programa *OriginPro 8* (Tabla 1).

| | Compuesto | IC₅₀ (μM) |
|-------------------|------------------|-----------------------------|
| MDA-MB-468 | ERITROSA | 5.3 ± 1.3 |
| CANCER STEM CELLS | ERITROSA | >1000 |
| MDA-MB-468 | SULFORAFANO | 3.3± 1.6 |
| CANCER STEM CELLS | SULFORAFANO | >1000 |

Tabla 1. IC₅₀ de ambos compuestos (ERY y SFN) por separado sobre la viabilidad de Cancer Stem Cells de mama y su línea parental MDA-MB-468. n=3.

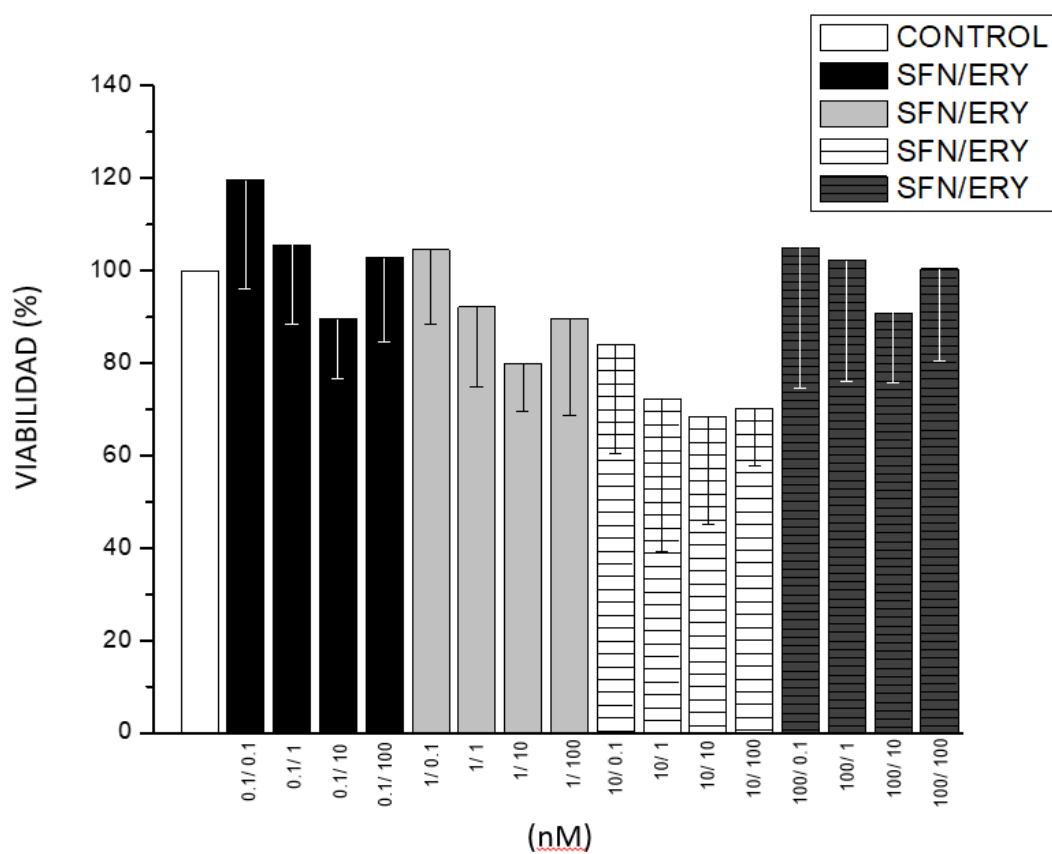
La tabla 1 indicó que MDA-MB-468 fue más sensible a los compuestos ERY y SFN, ya que se logró obtener una IC₅₀ en el rango de micromolar, pero para las CSC, incluso en la concentración de 1mM, no se pudo obtener esta IC₅₀ ya que la máxima inhibición fue del 45% (datos no mostrados). Para el caso de eritrosa, se ha reportado que en CSC derivadas de la línea celular de cáncer de mama MCF7, sí inhibe la viabilidad más del 50% en concentraciones nanomolares [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017], indicando que las CSC de MDA-MB-468 presentan una resistencia mucho mayor.

Posteriormente, se procedió a evaluar la combinación de estos compuestos para tratar de obtener una mayor inhibición en estas células. Se probaron diferentes combinaciones (a concentraciones inferiores a la IC₅₀ obtenidas para MDA-MB-468), para determinar si tenían algún efecto mayor tanto en las células troncales, como en la línea parental. Se observó que ahora, las CSC fueron más sensibles que su línea parental ya que con la combinación de 100nM SFN/100nM ERY se logró disminuir un 55% la viabilidad (Figura 17). Con estos datos, se calculó una nueva IC₅₀ para la eritrosa tanto para las CSC como para su línea parental (la concentración de SFN se mantuvo constante en 100 nM debido a que cuando se adicionaba una concentración mayor, la viabilidad aumentaba) (Tabla 2). En la figura 18 se puede ver el comportamiento del efecto de la combinación tanto en CSC como en MDA-MB-468, y cómo la inhibición aumenta cuando se adiciona

mayor concentración de ERY, aunque llega un punto en el que esta inhibición no sobrepasa más del 60%.

También se evaluó el efecto de los compuestos por separado y en combinación en células no tumorales H9C2 (cardiomiocitos de ratón) y no se observó un efecto significativo sobre la viabilidad (en combinación se presentó aproximadamente un 30% de inhibición) e incluso por separado, parece ser que ayudan a la proliferación celular (Tabla 3).

A)



B)

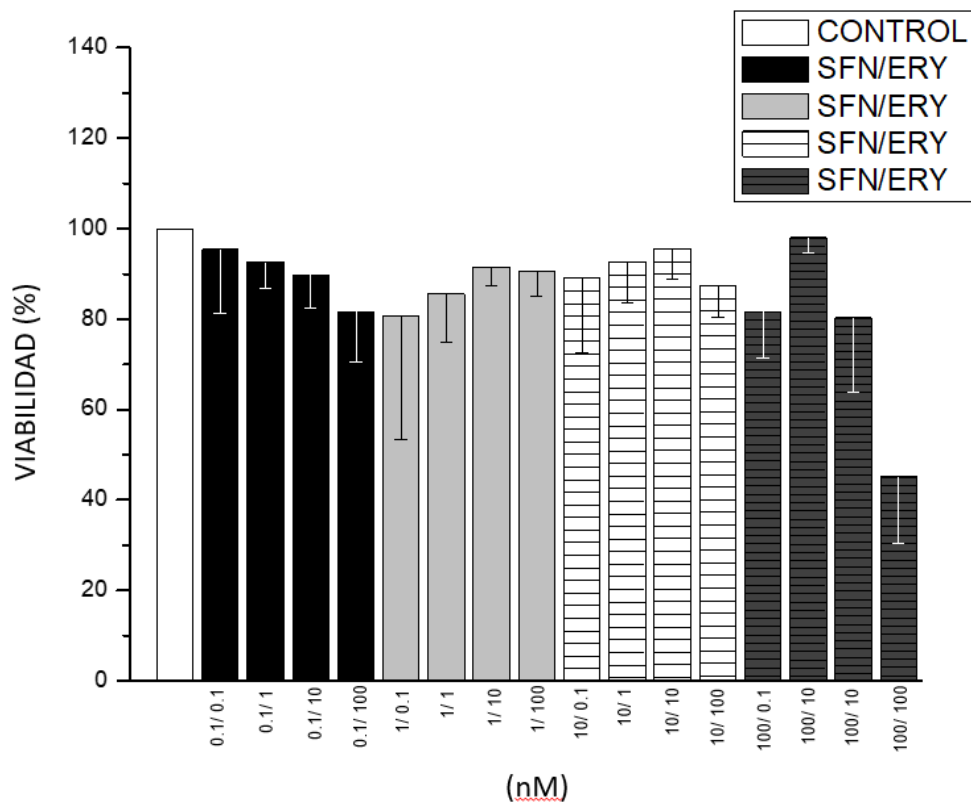


Figura 17: Efecto de la combinación de ERY y SFN sobre la viabilidad de A) células troncales de cáncer de mama y B) la línea parental MDA-MB-468. n=3.

| | Compuesto | IC ₅₀ (nM) |
|-------------------|-----------|-----------------------|
| MDA-MB-468 | ERITROSA | 495 ± 206 |
| CANCER STEM CELLS | ERITROSA | 112 ± 40 |

Tabla 2. Nueva IC₅₀ de eritrosa en combinación con 100nM de sulforafano, sobre viabilidad en células troncales de cáncer de mama y su línea parental MDA-MB-468. n=3

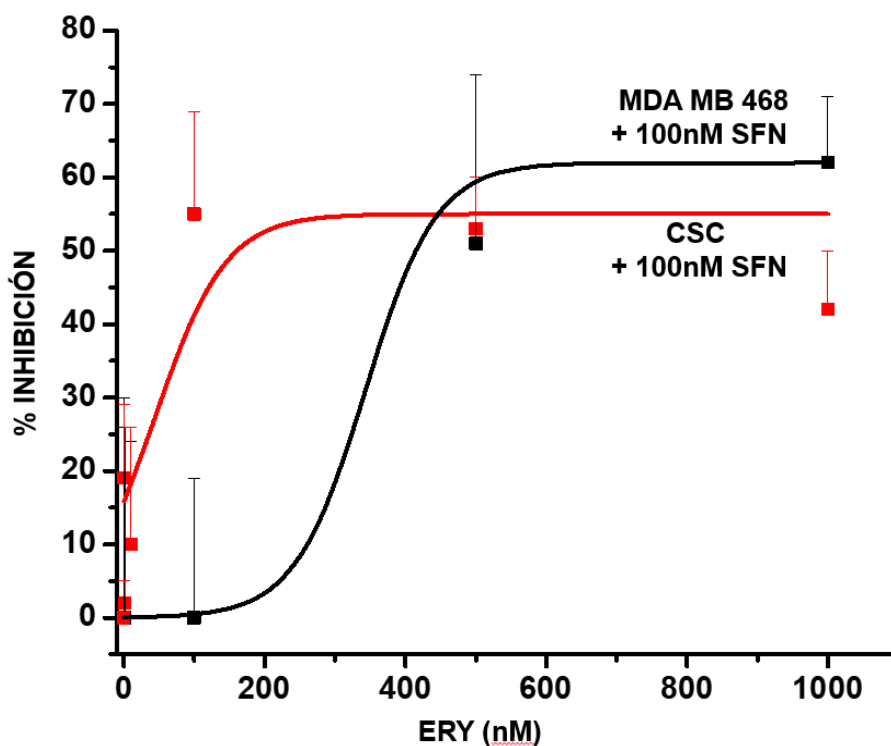


Figura 18: Porcentaje de inhibición de viabilidad en células troncales de cáncer y MDA-MB-468 con diferentes concentraciones de eritrosa +100 nM de sulforafano. n=3

| nM | % VIABILIDAD ERY | %VIABILIDAD SFN | %VIABILIDAD SFN/ERY |
|---------|---------------------|--------------------|------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 10 | 131±43 | 109±4 | - |
| 100 | 152±16 | 107±2 | - |
| 1000 | 147±14 | 99±1 | - |
| 100/100 | - | - | 76±11 |

Tabla 3: Efecto de ERY y SFN por separado y en combinación sobre la línea celular no tumoral H9C2. n=3.

Se utilizó la concentración de 100nM ERY/ 100nM SFN para determinar el efecto sobre el metabolismo energético y funciones de troncalidad en CSC.

6.4 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ERY Y SFN SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN CSC

6.4.1 FLUJO GLUCOLÍTICO

Las células troncales de cáncer de mama, así como su línea parental MDA-MB-468 fueron colocadas con la combinación de 100nM SFN / 100nM ERY (debido al efecto observado sobre la inhibición de la viabilidad) durante 24 horas. Posteriormente se evaluó la glucólisis como la cantidad de lactato producido. Se utilizó 2-desoxi-glucosa para conocer el lactato producido por la glutaminólisis.

En las CSC y su línea parental con la combinación, la producción total de lactato disminuyó significativamente (2-5 veces) (Figura 19A) con respecto a aquellas no tratadas (Figura 15A). Al determinar el flujo de glucólisis, se determinó que, después de las 24 horas con la combinación, existió una disminución significativa (3-6 veces) en ambos casos (Figura 19 B) con respecto a aquellas células no tratadas (Figura 15B). Por otro lado, la glutaminólisis en CSC tratadas no presenta cambio con respecto a aquellas sin tratamiento (Figura 15 B; Figura 19 B).

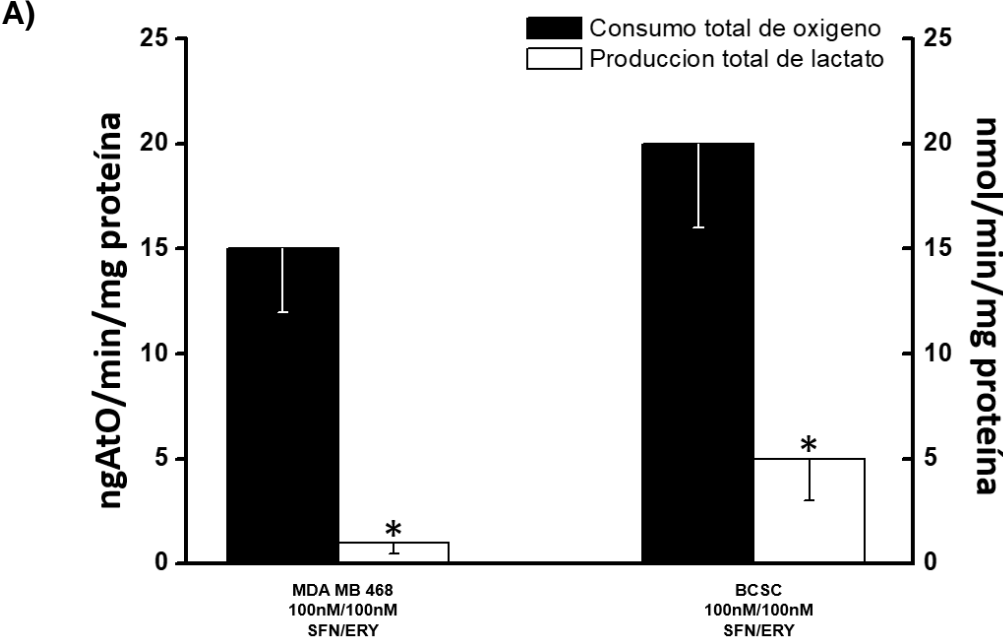
6.4.2 FLUJO MITOCONDRIAL

Al igual que para el flujo glucolítico, para el flujo mitocondrial las células troncales de cáncer de mama y su línea parental MDA-MB-468 fueron colocadas con la combinación de 100nM SFN / 100nM ERY durante 24 horas.

Se evaluó el consumo total de oxígeno en las CSC y en MDA-MB-468 después del tratamiento y se observó una tendencia a disminuir solo en la línea parental comparado con aquellas no tratadas, pero este cambio no fue significativo, mientras que en CSC el consumo total de oxígeno no presentó cambios (Figura 19 A).

Al añadir oligomicina (inhibidor de la ATP synthase) se determinó el consumo de oxígeno acoplado a la síntesis de ATP (FO), el cual presenta una tendencia a disminuir tanto en CSC como en su línea parental con la combinación con

respecto a aquellas no tratadas, pero esta tendencia no es significativa (Figura 19 B).



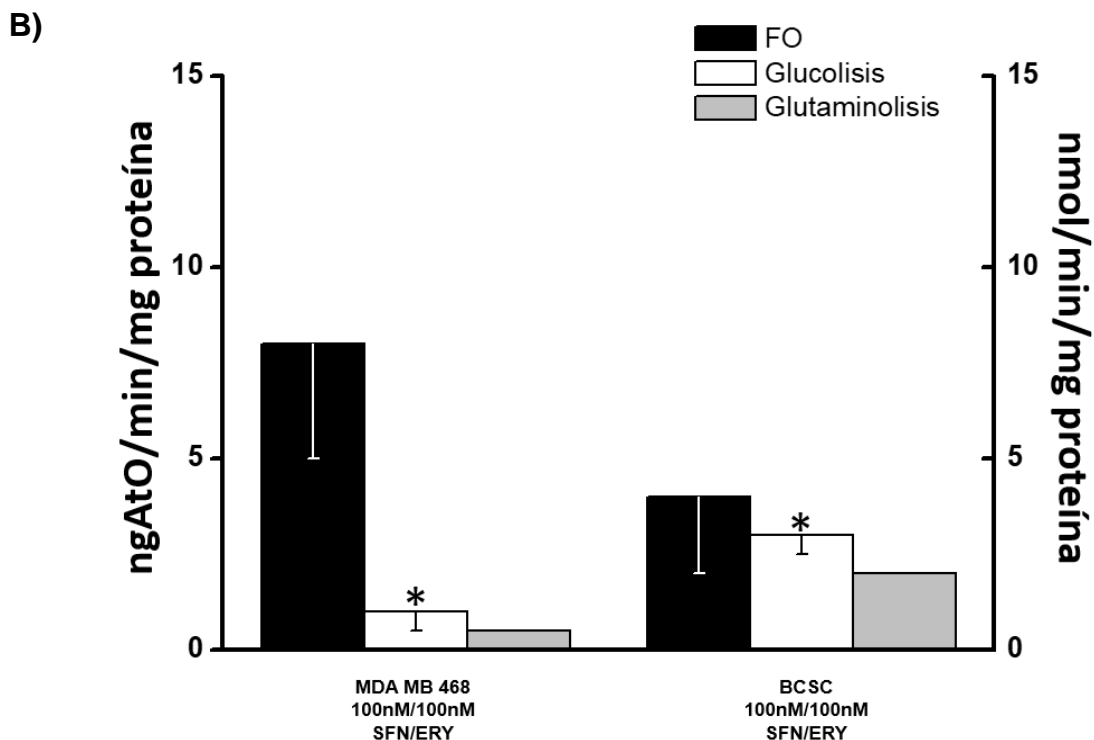


Figura 19: Efecto de la combinación de ERY y SFN sobre A) consumo total de oxígeno y producción total de lactato; B) Glucólisis, FO y glutaminólisis en MDA-MB-468 y CSC. n=3, *P<0.05 vs MDA-MB-468 y CSC no tratadas

6.4.3 CONTRIBUCION DE ATP

Con este efecto inhibitorio de la combinación sobre la glucólisis, el aporte de ATP que presentaban tanto CSC como MDA-MB-468 (Figura 16) cambió. Por un lado, en la línea parental la contribución por parte de la mitocondria aumentó de 80% a 94%, mientras que en CSC este cambio fue más evidente ya que la mitocondria aportaba el 49%, pero después del tratamiento este valor aumentó hasta un 70% (Figura 20).

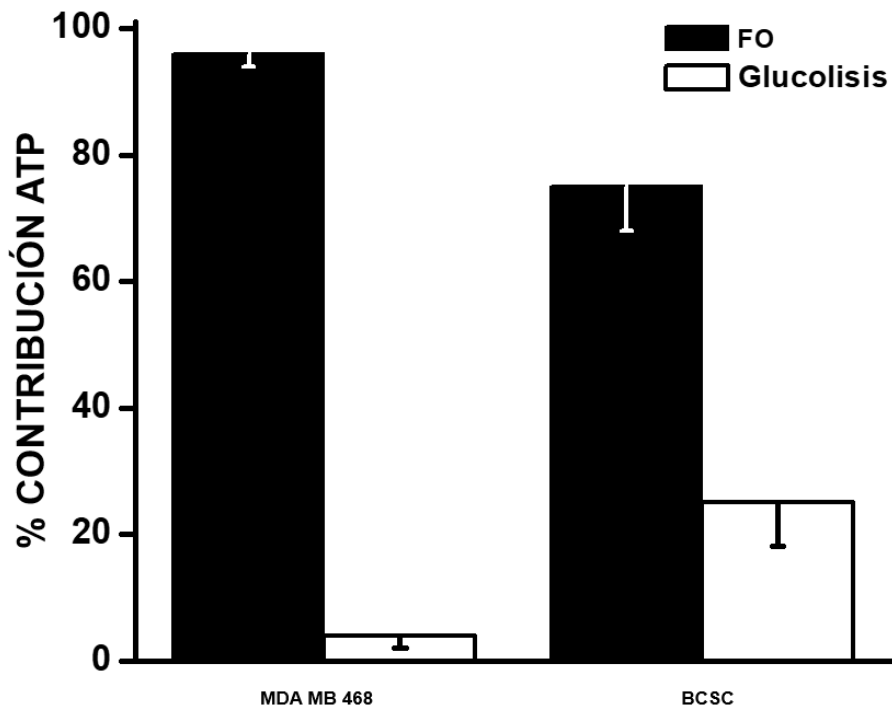


Figura 20: Aporte de ATP en MDA-MB-468 y CSC con la combinación SFN/ERY. n=3.

6.5 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRONCALIDAD, METÁSTASIS Y METABOLISMO ENERGÉTICO CON LA COMBINACIÓN SFN/ERY EN CSC

A continuación, se evaluó el efecto de la combinación después de 24 horas sobre la expresión de algunas proteínas marcadoras de troncalidad, metástasis y metabolismo. Por un lado, el marcador de troncalidad CD44+ presenta una disminución en su expresión (7 veces). Por otro lado, GLUT-1 presenta una disminución significativa (4 veces) comparada con las CSC sin la combinación, lo que posiblemente está relacionado con el efecto inhibitorio en la glucólisis. La expresión de ATP synthase no se ve afectada con la combinación lo que también correlaciona con que el flujo de FO no se vio afectado (Figura 21).

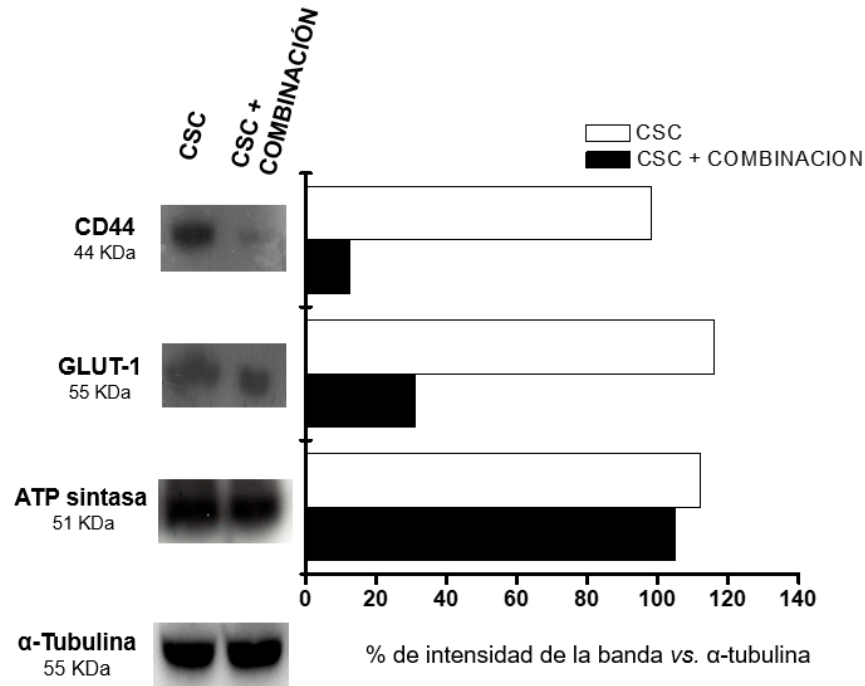


Figura 21: Efecto de la combinación de SFN/ERY sobre la expresión de proteínas de troncalidad, metástasis y metabolismo energético. n=2.

6.6 FORMACIÓN DE MICROESFERAS EN PRESENCIA DE LA COMBINACIÓN (SFN/ERY)

Finalmente, se observó una función de CSC (formación de microesferas) en presencia de la combinación. Las CSC fueron sembradas en una superficie antiadherente, en agitación y en medio sin suero durante 10 días. En este día se midió el tamaño del esferoide y se pudo observar que la combinación impidió la formación de un tamaño similar al que presentan las CSC sin combinación (Figura 22), reduciéndolo a un tamaño como los que forma la línea parental (Figura 12).

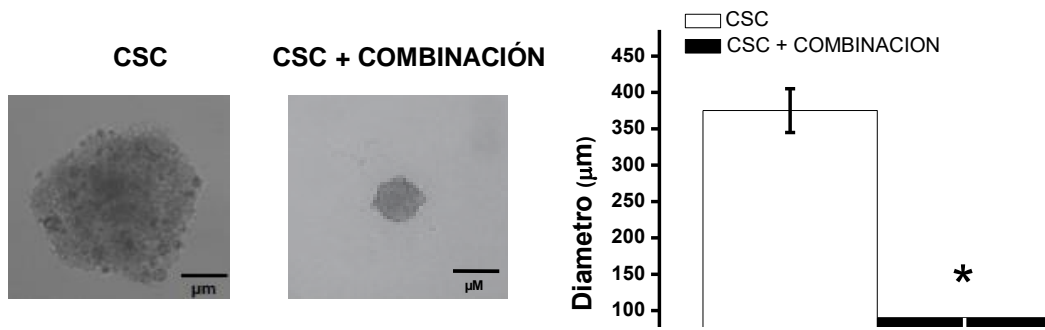


Figura 21: Formación de microesferas al día 10 en medio sin suero de CSC luego de la combinación (ERY/SFN). Barra= 100µm. n=20 esferoides; *P<0.01 vs. MDA-MB-468.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años, el metabolismo energético se ha propuesto como un blanco terapéutico para eliminar a las cancer stem cells. Esto debido a que las diferentes estrategias en las que se han basado diversas terapias no han tenido el éxito esperado [Nassar & Blanpain, 2016; Visvader & Lindeman, 2012; Annett & Robson, 2018]. Muchos de los fármacos utilizados van dirigidos a afectar la función mitocondrial, ya que se sabe que en muchos tipos de cáncer (mama, cérvix, colon, próstata, etc.) es donde se da el principal aporte de ATP. Este aporte energético es fundamental para la activación de diversas funciones como metástasis y supervivencia celular [Sutendra *et al.*, 2014; Sancho *et al.*, 2016; Chae y Kim, 2018; Wong *et al.* 2017]. Pero uno de los problemas con estos fármacos es que la mayoría de las veces llegan a afectar a células de tejido sano, o se necesitan concentraciones elevadas que pueden ocasionar muchos efectos secundarios [Sotgia *et al.*, 2018].

Es por eso que se han propuesto algunos compuestos naturales (que incluso se llegan a encontrar de manera normal en el cuerpo) que se conozca que puedan tener algún efecto antitumoral. Dos compuestos que han sido objeto de investigación son la eritrosa y el sulforafano (ambos obtenidos mediante la dieta), los cuales presentan actividad antitumoral, en parte ya que afectan la función mitocondrial [Liu *et al.*, 2015; Sestilli & Fimognari, 2015].

7.1 METABOLISMO ENERGÉTICO

El efecto de la eritrosa sobre la función mitocondrial aún no es claro, pero se ha hipotetizado que este compuesto puede afectar la FO (directa o indirectamente), además de causar muerte celular al activar la apoptosis intrínseca [Liu *et al.*, 2015]. Por otro lado, el efecto del sulforafano se ha estudiado más, y se sabe que puede afectar directamente al metabolismo mitocondrial (en concentraciones de 10-100 μM) al inhibir la actividad de los complejos I, II y III de la cadena transportadora de electrones [Xiao *et al.*, 2009] ocasionando un aumento en

especies reactivas de oxígeno y llevando a muerte celular, aunque no se ha observado un efecto aparente en la producción total de lactato [Wiczak *et al.*, 2012]. Además, se ha visto que este compuesto puede potenciar su efecto al ser combinado con algunas drogas citostáticas y/o nuevos compuestos antitumorales [Naujokat & Laufer, 2013].

Sin embargo, el efecto de ambos compuestos no ha sido elucidado sobre los flujos de glucólisis y FO. Nuestros resultados indican que la combinación de SFN/ERY a concentraciones nanomolares, presentó un efecto sinérgico ya que se administraron en concentraciones menores a la IC₅₀ de viabilidad, pero esta no afectó el consumo total de oxígeno ni en el flujo de FO, así como proteínas relacionadas con este metabolismo como COXIV y ND1, pero que, sí se presenta un efecto inhibitorio en el flujo glucolítico lo cual está relacionado con la disminución en la expresión de una de las proteínas controladoras de este flujo; GLUT1, todo esto sin un efecto aparente en la viabilidad de células no tumorales H9C2 (Tabla 3).

Este efecto puede ser más evidente en el flujo de glucólisis ya que, 1) las concentraciones utilizadas son mucho menores a las reportadas para la inhibición del flujo mitocondrial (aun al estar en combinación), y 2) que al ser seleccionadas y obtener células con fenotipo troncal se da un switch metabólico (el cual ya ha sido reportado para cáncer de mama [Sancho *et al.*, 2016; Chae & Kim, 2018]), en el cual se da un aumento en la obtención de energía por parte de la glucólisis (Figura 16). Como ya se ha mencionado, el efecto de ambos compuestos por separado había sido investigado sobre alguna parte de la vía metabólica, pero en este estudio se elucidó su efecto real ya sobre los flujos de FO y glucólisis, a pesar de eso falta mayor investigación para conocer el mecanismo de acción de esta combinación, pero con los datos obtenidos hasta el momento, podría funcionar como una buena estrategia terapéutica ya que se afecta significativamente el aporte de ATP, y con eso se pueden comprometer algunas funciones de malignidad, y sensibilizar al tumor a alguna terapia convencional, sobre todo

porque el cáncer de mama triple negativo en la actualidad no tiene una terapia específica.

7.2 FENOTIPO TRONCAL

El efecto de ambos compuestos, por separado, también se ha evaluado sobre células troncales de cáncer de mama. Para el caso de la eritrosa, se ha visto que al ser administrada en CSC derivadas de la línea celular MCF7 en concentraciones sub IC_{50} , inhibe la activación de algunas vías relacionadas con la malignidad ya que se une a la citocina extracelular HPI/AMF e impide que esta interaccione con su receptor [Gallardo-Pérez *et al.*, 2017]; mientras que el sulforafano, al ser administrado en concentraciones de entre 5 y 10 μ M, inhibe la formación de microesferas [Naujokat & Laufer, 2013].

En nuestros resultados, uno de los problemas presentes en las CSC derivadas de la línea celular MDA-MB-468, es que para ninguno de los dos compuestos se obtuvo una IC_{50} (observando una gran resistencia por parte de estas células) y por ello no se tenía una concentración con la cual evaluar un posible efecto sobre la malignidad. En los últimos años, la combinación de compuestos naturales se ha tomado como una estrategia para combatir el cáncer, y así disminuir las concentraciones utilizadas, aumentar o potenciar el efecto y reducir la resistencia de la enfermedad a las terapias convencionales [Rejhova *et al.*, 2018]. Al combinar SFN y ERY, a concentraciones nanomolares, se obtuvo una disminución en la viabilidad de aproximadamente el 50% y con esto se calculó una nueva IC_{50} para ERY (Tabla 2) dejando constante la concentración de SFN (100nM) ya que si esta se aumentaba se veía un efecto positivo en la proliferación.

Al administrar la combinación 100nM SFN / 100 nM ERY se presentó un efecto en la proteína marcadora de troncalidad CD44⁺, la cual presentó una disminución significativa en su expresión (>7 veces). Por otro lado, también se vio un efecto en la formación de microesferoides, ya que, al añadir la combinación al medio después de 10 días, se inhibió su formación casi por completo (aproximadamente

5 veces), presentando un tamaño similar al de la línea parental, en la cual sólo forma agregados de células. Este efecto puede estar relacionado con la disminución de marcadores de troncalidad como CD44⁺ o algunos otros no evaluados en este proyecto, lo cual disminuye la supervivencia en medio sin suero y por ende impide la formación de microesferas. Esto concuerda con algunos estudios en donde la disminución de CD44⁺ en células troncales de cáncer de páncreas y colon correlaciona con la inhibición de formación de esferoides, además de su capacidad de auto renovación en estas células induciendo su diferenciación, disminuyendo la quimio resistencia, así como la capacidad de invasión y migración en modelos *in vitro* de metástasis; y formación de tumores en modelos *in vivo* [Chanmee *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2016].

Estos resultados son de gran importancia ya que en los últimos años el cáncer de mama, a nivel mundial, ha aumentado su incidencia (aproximadamente 1.5% anual), y su mortalidad en la población femenina (aproximadamente 10%) [Arce *et al.*, 2011]. Además, el subtipo triple negativo tiene una gran relevancia clínica ya que suele ser más agresivo, presentando una alta metástasis hacia hígado, pulmón o sistema nervioso central, una recurrencia temprana y un mayor riesgo de muerte, comparado con aquellos subtipos que son dependientes de hormonas [Zaharia & Gómez, 2013]. Es por esto, que la combinación de estos compuestos puede funcionar como una buena estrategia terapéutica, primero porque estos se encuentran presentes en la dieta de las personas por lo que sabe que tienen un beneficio, y segundo, porque pueden sensibilizar las CSC y las quimioterapias convencionales podrían aumentar su efectividad, disminuyendo el riesgo de recurrencia y/o muerte. Esto además es de gran importancia ya que la viabilidad en células sanas no se vio significativamente afectada (15-30%), a diferencia de algunas terapias que han sido utilizadas en donde intentan bloquear a CD44⁺ con anticuerpos monoclonales (algunas veces combinándolos con doxorubicina), ya que estos afectan en gran medida tanto al receptor expresado en CSC como en células normales, además de que después de ciertas dosis estos comienzan a acumularse y causan efectos secundarios muy importantes (eg. problemas en la

piel y/o en la barrera hematoencefálica ya que CD44⁺ cumple un papel fisiológico muy importante en esta) [Annett & Robson, 2018; Ghasemi *et al.* 2019].

En resumen, las CSC derivadas de la línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 presentan una gran resistencia a ERY y SFN cuando se administran por separado, pero, cuando estos son combinados, se observa un sinergismo en su efecto a concentraciones nanomolares, lo cual disminuye su viabilidad aproximadamente el 50-55%, además de disminuir la expresión de la proteína controladora GLUT 1 y por ende el flujo glucolítico (aunque la inhibición de esta proteína no describe todo el fenómeno), la expresión de la proteína relacionada con troncalidad (CD44⁺) y la formación de microesferas, todo esto sin un efecto aparente en el consumo total de oxígeno, FO y proteínas relacionadas con el metabolismo mitocondrial.

8. CONCLUSIONES

Diversos estudios han probado el efecto tanto de ERY como de SFN sobre diferentes funciones celulares y/o partes del metabolismo energético, pero en ninguno se ha revelado un efecto sobre los flujos. En este trabajo se observa que los compuestos naturales ERY y SFN, al ser administrados en combinación a las cancer stem cells derivadas de la línea celular MDA-MB-468 a concentraciones nanomolares, afectan el metabolismo energético, en específico el glucolítico, haciendo que ahora dependan más de la mitocondria, esto similar a su línea parental MDA-MB-468, y que, además afecta el fenotipo troncal ya que las está regresando a un fenotipo similar al de su línea parental ya que disminuye la expresión de CD44⁺ y su capacidad para formar microesferoides en ausencia de suero.

9. REFERENCIAS

Adán-Ladrón de Guevara A. Efecto de inhibidores mitocondriales sobre la viabilidad de células con fenotipo troncal de cáncer de mama MCF7. Licenciatura. 2016. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Adán-Ladrón de Guevara A. Efecto de inhibidores mitocondriales sobre la invasión de células con fenotipo troncal de cáncer de mama MCF7. Maestría. 2019. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernández A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(7): 3983-3988.

Annett S, Robson T. Targeting cancer stem cells in the clinic: Current status and perspectives. *Pharmacol Ther*. 2018; 187: 13-30. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.001.

Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell T, Bucala R. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase / fructose 2,6 bisphosphatase (iPFK-2: PFKFB3) in human cancers. *Cancer Res*. 2002; 62: 5881–5887.

Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez V, Villareal P. Oncoguía: Cáncer de mama. *Cancerología*. 2011; 6: 77-86.

Cadrón I, Van Gorp T, Amant F, Leunen K, Neven P, Vergote I. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2007. 107(1): s113-118.

Chae YC, Kim JH. Cancer Stem Cell metabolism: target for cancer therapy. *BMB Rep*. 2018; 51(7): 319-326. doi: 10.5483/bmbrep.2018.51.7.112.

Chanmee T, Ontong P, Kimata K, Itano N. Key roles of hyaluronan and its CD44 receptor in stemness and survival of cancer stem cells. *Front Oncol*. 2015; 5: 180. doi: 10.3389/fonc.2015.00180.

Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlayculture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 1984; 95: 1-23. doi: 10.1007/978-3-642-82340-4_1.

Couch DB. Carcinogenesis: basic principles. *Drug Chem Toxicol.* 1996; 19(3): 133-48. doi: 10.3109/01480549608998231.

De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Peiges M, Ozsvari B, Smith DL, Sánchez-Álvarez R, Martínez-Outschoorn UE, Cappello A, Pezzi V, Lisanti MP, Sotgia F. Mitochondrial biogenesis is required for anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget.* 2015; 6(17): 14777-14795. doi: 10.18632/oncotarget.4401.

Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016; 4. doi: 10.1101/pdb.prot087379.

Filmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contains stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(2): R25.

Fiorillo M, Sotgia F, Lisanti MP. “Energetic” cancer stem cells (e-CSCs): a new hiper-metabolic and proliferative tumor cell phenotype, driven by mitochondrial energy. *Front Oncol.* 2019; 8: 677. doi: 10.3389/fonc.2018.00677.

Foucquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol res Perspect.* 2015; 3(3): e00149. doi: 10.1002/prp2.149.

Gallardo-Pérez JC, Adán-Ladrón de Guevara A, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. HPI/AMF inhibition halts the development of the aggressive phenotype of breast cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017; 1864(10): 1679-1690. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.06.015.

García-Amezcu MA. Análisis del metabolismo energético en células MCF7 de cancer de mama con fenotipo truncal. Licenciatura. 2016. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Ghasemi F, Sarabi PZ, Athari SS, Esmaeilzadeh A. Therapeutics strategies against cancer stem cell in breast cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019; 109:76-81. doi: 10.1016/j.biocel.2019.01.015.

Global Cancer Observatory. Cancer Causes. 2018; Recuperado de: <https://gco.iarc.fr/>

Global Cancer Observatory. Cancer Today. 2018; Recuperado de: <https://gco.iarc.fr/today/home>

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1): 57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Idikio, HA. Human cancer classification: a systems biology- based model integrating morphology, cancer stem cells, proteomics, and genomics. *J Cancer.*2011; 2:107-115.

Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es el cáncer?. 2018. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

Kim RJ, Nam JS. OCT 4 expression enhances features of cancer stem cells in a mouse model of breast cancer. *Lab Anim Res.* 2011; 27(2): 147-152. doi: 10.5625/lar.2011.27.2.147.

Lehninger A, Nelson D, Cox M. Lehninger: Principles of Biochemistry.2015; 6ta edición. Barcelona. Omega

Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cells markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 13856. doi: 10.1038/s41598-017-14364-2.

Liu LL, Yi T, Zhao X. Antitumor effect of D-erythrose in an abdominal metastatic model of colon carcinoma. *Oncol Lett.* 2015; 9(2): 769-773. doi: 10.3892/ol.2014.2764.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.

Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez, S. Antimitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(3): 541-551. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.11.013.

Manuel-Iglesias J, Beloqui I, García-García F, Leis O, Vazquez-Martín A, Eguiara A, Cufi S, Pavon A, Menendez JA, Dopazo J, Martín AG. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-Cadherin. *PLoS One.* 2013; 8(10): e77281. doi: 10.1371/journal.pone.0077281.

Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* 2006; 273(9): 1975-1988. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05214.x.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Escalada R, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Modeling Cancer Glycolysis. *Biochim Biophys Acta.* 2011. 1807; 755-767. doi: 10.1016/j.bbabbio.2010.11.006.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Del Mazo-Monsalvo I, Robledo-Cadena DX, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Hypoglycemia enhances epithelial-mesenchymal transition and invasiveness, and restrains Warburg phenotype, in hypoxic HeLa cell cultures and microspheroids. *J Cell Physiol.* 2017; 232(6): 1346-1349. doi: 10.1002/jcp.25617.

Mimeault M, Batra SK. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23(2): 234-54. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0785

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; 274(6): 1393-1418. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.

Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. Contribution of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res.* 1984; 44(12pt1): 5702-5706.

Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol.* 2016; 11: 47-76. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.

Naujokat C, Laufer S. Targeting cancer stem cells with defined compounds and drugs. *Journal Cancer Research.* 2013; 2: 36-67.

OMS. Cáncer. 2018. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang CV. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21797-21800.

Pacheco-Velázquez SC, Robledo-Cadena DX, Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype. *Mol Pharm.* 2018; 15(6): 2151-2164. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00015.

Pastó A, Bellio C, Pilotto G, Ciminale V, Silic-Benussi M, Guzzo G, Rasola A, Frasson C, Nardo G, Zulato E, *et al.* Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget.* 2014; 5(12): 4305-4319. doi: 10.18632/oncotarget.2010.

Pectasides D, Pectasides M, Farmakis D, Gaglia A, Koumariou A, Nikolaou M, Papaxoinis G, Mitrou P, Economopoulos T, Raptis SA. Oxaliplatin plus high-dose leucovorin and 5-fluorouracil (FOLFOX 4) in platinum-resistant and taxane-pretreated ovarian cancer: a phase II study. *Gyneco Oncol.* 2004. 95(1): 165-172. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.06.029.

Pham PV. Breast Cancer Stem Cells and Therapy Resistance. 2015; Springer International Publishing.

Ravinovich I, Sebastião AP, Lima RS, Urban CA, Junior ES, Anselmi KF, Elifio-Esposito S, Noronha L, Moreno-Amaral AN. Cancer stem cells markers ALDH1 and CD44+/CD24- phenotype and their prognosis impact in invasive ductal carcinoma. *Eur J Histochem*. 2018; 62(3): 2943. doi: 10.4081/ejh.2018.2943

Rejhova A, Opattova A, Cumova A, Slíva D, Vodicka P. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *Eur J Med Chem*. 2018; 144: 582e594. doi: 10.1016/j.ejm.ech.2017.12.039.

Reynoso-Noverón N, Torres-Domínguez JA. Epidemiología del Cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*. 2018; 8(1): 9-15.

Robledo-Cadena DX. Efecto sinérgico de la casiopeína II-gly con drogas empleadas en el sector clínico sobre la proliferación del cáncer cervicouterino (CCU) de HeLa. 2016. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Avilés-Salas A, Marín-Hernández A, Carreño-Fuentes L, Maldonado-Lagunas V, Moreno-Sánchez R. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol*. 2008; 216(1): 189-197. doi: 10.1002/jcp.21392.

Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Aguilar-Ponce JL, Mandujano-Tinoco EA, Meneses A, Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation as a target to arrest malignant neoplasias. *Curr Med Chem*. 2011; 18(21): 3156-3167.

Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, El Hafidi M, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Rodríguez-Zabala JS, Pacheco-Velázquez SC, Moreno-Sánchez R. Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 65: 209-221. doi: 10.1016/j.biocel.2015.06.010.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Pacheco-Velázquez SC, Belmont-Díaz J, Robledo-Cadena DX, Vargas-Navarro JL, Corona de la Peña NA, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. Transcriptional regulation of energy metabolism in tumor cells. *Cells*. 2019; 8(10): 1225. doi: 10.3390/cells81011225.

Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer*. 2016; 114(12): 1305-1312. doi: 10.1038/bjc.2016.152.

Sestili P, Fimognari C. Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 402386. doi: 10.1155/2015/402386.

Schmidt MM, Dringen R. Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front Neuroenergetics*. 2009; 1: 1-10. doi: 10.3389/neuro.14.001.2009.

Sotgia F, Ozsvari B, Fiorillo M, De Francesco EM, Bonuccelli G, Lisanti MP. A mitochondrial based oncology platform for targeting cancer stem cells (CSCs): MITO-ONC-RX. *Cell Cycle*. 2018; 17(17): 2091-2100. doi: 10.1080/15384101.2018.1515551.

Sutendra G, Kinnaird A, Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Hashimoto K, Zhang N, Flaim E, Michelakis ED. A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell*. 2014;158(1):84-97. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.046.

Tysnes BB, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1775(2): 283-297. doi: 10.1016/j.bbcan.2007.01.001.

Valle-Mendiola A, Soto-Cruz I. Metabolismo energético y cáncer. *Vertientes revista especializada en ciencias de la salud*.2014; 17(2): 108-113.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(6): 717-728. doi:10.1016/j.stem.2012.05.007.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123(3191): 309-14.

Wiczak A, Hofman D, Konopa G, Herman-Antosiewicz A. Sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived isothiocyanate, inhibits protein synthesis in human prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823(8): 1295-1305. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.020.

Wong TL, Che N, Ma S. Reprogramming of central carbon metabolism in cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017; 1863(7): 1728-1738. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.05.012.

Xiao D, Powolny AA, Antosiewicz J, Hahm ER, Bommareddy A, Zeng Y, Desai D, Amin S, Herman-Antosiewicz A, Singh SV. Cellular responses to cancer chemopreventive agent D,L-sulforaphane in human prostate cancer cells are initiated by mitochondrial reactive oxygen species. *Pharm Res*. 2009;26(7):1729-1738. doi: 10.1007/s11095-009-9883-5.

Yan Y, Li Z, Kong X, Jia Z, Zuo X, Gagea M, Huang S, Wei D, Xie K. KLF4-Mediated suppression of CD44 signaling negatively impacts pancreatic cancer stemness and metastasis. *Cancer Res*. 2016; 76(8): 2419-2431. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1691.

Zaharia M, Gómez H. Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2013; 30(4): 649-656.



Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313(3): 459-465. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.136.

11. Anexo 1



Review

Transcriptional Regulation of Energy Metabolism in Cancer Cells

Sara Rodríguez-Enríquez ^{1,*} , Álvaro Marín-Hernández ¹, Juan Carlos Gallardo-Pérez ¹, Silvia Cecilia Pacheco-Velázquez ¹, Javier Alejandro Belmont-Díaz ¹, Diana Xochiquetzal Robledo-Cadena ¹, **Jorge Luis Vargas-Navarro** ¹, Norma Angélica Corona de la Peña ², Emma Saavedra ¹ and Rafael Moreno-Sánchez ¹ 

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México 14080, Mexico; marinhernandez@yahoo.com.mx (Á.M.-H.); jega_1999@yahoo.com.mx (J.C.G.-P.); suerte11@hotmail.com (S.C.P.-V.); belmont81@hotmail.com (J.A.B.-D.); xochiquetzal@ciencias.unam.mx (D.X.R.-C.); jorge.navarro6@hotmail.com (J.L.V.-N.); emma_saavedra@hotmail.com (E.S.); rafael.moreno@cardiologia.org.mx (R.M.-S.)

² Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Hospital General Regional Carlos McGregor-Sánchez, México CP 03100, Mexico; norma_acp@hotmail.com

* Correspondence: saren960104@hotmail.com or sara.rodriguez@cardiologia.org.mx

Received: 22 July 2019; Accepted: 1 October 2019; Published: 9 October 2019



Abstract: Cancer development, growth, and metastasis are highly regulated by several transcription regulators (TRs), namely transcription factors, oncogenes, tumor-suppressor genes, and protein kinases. Although TR roles in these events have been well characterized, their functions in regulating other important cancer cell processes, such as metabolism, have not been systematically examined. In this review, we describe, analyze, and strive to reconstruct the regulatory networks of several TRs acting in the energy metabolism pathways, glycolysis (and its main branching reactions), and oxidative phosphorylation of nonmetastatic and metastatic cancer cells. Moreover, we propose which possible gene targets might allow these TRs to facilitate the modulation of each energy metabolism pathway, depending on the tumor microenvironment.

Keywords: cancer transcriptional regulators; energy metabolism regulation; glycolysis; oncogenes; oxidative phosphorylation; transcriptional factors

1. Introduction

All stages of cancer progression, including initial formation, growth, and metastasis (i.e., epithelial to mesenchymal transition, adhesion protein expression, migration, invasiveness, colonization, and angiogenesis), are regulated and coordinated by several transcriptional regulators (TRs), including transcriptional factors (TFs), transcriptional coactivators, oncogenes, tumor-suppressor genes, and protein kinases [1–3]. The term “transcription factor” describes any protein able to bind to DNA in a sequence able to regulate transcription or alter gene expression. “Transcriptional coactivator” describes any protein or protein complex that binds to a transcription factor to increase the transcription rate of a gene or set of genes. “Oncogene” describes a gene whose protein product carries the ability to induce cancer and confer at least one aspect of the transformed phenotype on a cell. “Tumor-suppressor gene” describes a gene whose encoded protein protects a cell from one step on the path to cancer. Cancer progresses when oncogene function results from the activation of proto-oncogenes or when tumor-suppressor genes are inactivated.

The roles of transcriptional regulators (TRs) in cancer development and metastasis have been well documented and analyzed [3,4]. Besides their allocated canonical roles (Table 1), TRs may also be