



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“RASTREO DE CÉLULAS METASTÁSICAS DE CÁNCER DE MAMA
CON CÉLULAS TRONCALES NEURALES QUE EXPRESAN tGAS1”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN
FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

P R E S E N T A:

M. en C. DANIEL ROMERO TREJO

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JOSÉ SEGOVIA VILA**

Ciudad de México, julio 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado con el número de registro 445993, la cual me sirvió para la realización de este proyecto.

A mi director de Tesis Dr. José Segovia Vila por su apoyo, orientación, motivación y consejos que me brindo para mi formación y realización de este trabajo.

A mi comité Dra. María Eugenia Mendoza Garrido, Dra. María del Carmen Vivar Estudillo por sus consejos para la realización de este trabajo. A la Dra. Rosa Obdulia González Robles por su apoyo, consejos y enseñanza durante el análisis estadístico. A mis sinodales Dra. Magdalena Guerra Crespo y Guadalupe Reyes Cruz por sus consejos y observaciones en la revisión del escrito.

A todos mis compañeros de laboratorio por las observaciones que me hicieron durante el desarrollo de mi trabajo.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1) INTRODUCCIÓN	1
Cáncer de mama	1
1.1) Epidemiología	1
1.2) Clasificación del cáncer de mama.....	1
1.3) Factores de riesgo.....	2
1.4) Tratamiento del cáncer de mama	4
1.5) Terapia génica como posible tratamiento contra el cáncer	4
1.6) Métodos de transferencia de genes.....	6
1.7) Vectores no virales	7
1.8) Vectores virales	7
1.9) Células troncales como vector para dirigir el transgén al sitio del tumor	8
1.10) Terapia génica de GAS1 contra el cáncer	10
2) JUSTIFICACIÓN	14
3) HIPOTESIS	14
4) OBJETIVO GENERAL	15
4.1) OBJETIVOS PARTICULARES	15
5) MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1) Cultivos celulares	16
5.2) Extracción de RNA total	17
5.3) Obtención de cDNA por retrotranscripción	17
5.4) Reacción en cadena de la polimerasa.....	18
5.5) Obtención de células estables 4T1-fLuc-RFP	19
5.6) Producción de los lentivirus tGAS1, GFP y represor de tetraciclina (TR)	20
5.7) Obtención de células troncales neurales ReNcell-GFP-tGAS1 y ReNcell-fLuc	20
5.8) Obtención de medio condicionado de células ReNcell-GFP-tGAS1	21
5.9) Ensayo de viabilidad celular	21

5.10) Análisis de ciclo celular	22
5.11) Establecimiento de un modelo de cáncer de mama metastásico <i>in vivo</i> en ratones desnudos	22
5.12) Tropismo <i>in vivo</i> de células ReNcell-GFP en un modelo de cáncer de mama	22
5.13) Inmunofluorescencia	23
5.14) Efecto de tGAS1 en un modelo de cáncer de mama	24
5.15) Western blot	25
5.16) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier	26
5.17) Análisis estadístico	26
6) RESULTADOS	27
6.1) Caracterización molecular de la línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón	27
6.2) Obtención de la línea celular estable ReNcell-GFP-tGAS1	27
6.3) tGAS1 inhibe la proliferación de las líneas celulares ReNcell y 4T1	30
6.4) tGAS1 induce arresto celular en células 4T1 al atenuar la fosforilación de AKT y ERK1/2	31
6.5) Obtención de la línea celular estable 4T1-fLuc-RFP	33
6.6) Establecimiento del modelo de cáncer de mama metastásico en ratones <i>nu/nu</i>	34
6.7) Tropismo de las células troncales neurales ReNcell-GFP a los sitios del tumor	37
6.8) Distribución <i>in vivo</i> de células troncales neurales ReNcell-fLuc en ratones desnudos sin tumor	38
6.9) ReNcell-GFP-tGAS1 inhibe el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis	40
6.10) tGAS1 promueve la supervivencia de los ratones con cáncer de mama	44
7) DISCUSIÓN	47
8) CONCLUSION	52
9) PERSPECTIVAS	53
10) REFERENCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	GAS1 tiene similitud estructural con los receptores GFR α s	10
Figura 2	GAS1 inhibe la vía de señalización de GDNF, a través de la inactivación de RET y AKT	12
Figura 3	Caracterización molecular de la línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón	28
Figura 4	Obtención y caracterización de la línea celular ReNcell-GFP y ReNcell-GFP-tGAS1	29
Figura 5	Evaluación del efecto inhibitorio de tGAS1 sobre la proliferación celular	30
Figura 6	tGAS1 induce arresto celular al decrecer los niveles de p-AKT y p-ERK1/2 en las células 4T1	32
Figura 7	Expresión de las proteínas RFP y luciferasa en células 4T1 transfectadas con los plásmidos pDsRed1-N1 y pCMV-fLuc	33
Figura 8	Expresión de las proteínas RFP y luciferasa en ratones desnudos <i>nu/nu</i> inoculados con células 4T1-WT y 4T1-fLuc-RFP	35
Figura 9	Expresión de la proteína RFP en órganos internos de ratones inoculados con 4T1-fLuc-RFP	36
Figura 10	Expresión de las proteínas luciferasa, RFP y GFP en ratones desnudos	37
Figura 11	Distribución de células troncales ReNcell-fLuc en ratones sin tumor	39
Figura 12	tGAS1 atenúa el crecimiento del tumor primario y la metástasis en ratones con formación de tumor	41
Figura 13	tGAS1 inhibe la formación de metástasis en los ratones con tumor	43
Figura 14	La expresión de tGAS1 atenúa los niveles de p-ERK1/2 y p-AKT en los tumores de mama	44
Figura 15	tGAS1 aumenta la supervivencia de los ratones con formación de tumor	45
Figura 16	ReNcell-GFP-tGAS1 inhibe el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis	52

ABREVIATURAS

ARTN:	Artemina
CMV:	Citomegalovirus
CDIS:	Carcinoma ductual <i>in situ</i>
CLIS:	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
CK:	Citoqueratina
CTN:	Células troncales neurales
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
ER:	Receptor de estrógeno
ERK1/2:	Cinasa reguladora de la señal extracelular
EGF:	Factor de crecimiento epitelial
FGF:	Factor de crecimiento fibroblástico
FLuc:	Luciferasa de luciérnaga
HGF:	Factor de crecimiento hepático
GAS1:	Growth arrest specific 1
GDNF:	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFRα:	Receptor de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de la glía
GFLs:	Ligandos del factor neurotrófico derivado de la glía
GFP:	Proteína verde fluorescente
GPI:	Glicosil fosfatidil inositol
HER2:	Receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano
IL-1:	Interleucina 1
I.V:	Intravenosa
IVIS:	Sistema de imagen <i>in vivo</i>
I.P:	Intraperitoneal
NRTN:	Nerturina
PSPN:	Persefina
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PBS:	Solución de buffer de fosfatos
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PR:	Receptor de progesterona

PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RET	Receptor tirosina cinasa
RFP:	Proteína roja fluorescente
RNA:	Ácido ribonucleico
SDF-1:	Factor derivado del estroma
SFB:	Suero fetal bovino
TNFα:	Factor de necrosis tumoral
TR:	Represor de tetraciclina
URL:	Unidades relativas de luminiscencia
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB:	Western blot

RESUMEN

La metástasis a diferentes órganos es la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer de mama. El pobre pronóstico clínico y la falta de tratamientos exitosos para los pacientes con cáncer de mama metastásico demandan el desarrollo de nuevas terapias selectivas contra el tumor. La terapia génica parece ser una alternativa promisoriosa para combatir el cáncer de manera selectiva mediante el uso de células troncales neurales (CTN), las cuales pueden ayudar a localizar a las células cancerosas y dirigir la expresión del transgén (gen terapéutico) en el sitio del tumor. Una forma soluble de GAS1 (tGAS1) ha despertado un gran interés al inhibir el crecimiento de los tumores de mama triple negativo y glioblastomas. Por lo que en el presente trabajo modificamos células troncales neurales ReNcell CX para expresar tGAS1 bajo un sistema inducible Tet/on usando vectores lentivirales. Demostramos que el tratamiento con ReNcell-tGAS1, en combinación con tetraciclina, inhibe el crecimiento del tumor primario y la generación de metástasis en los ratones al reducir los niveles de fosforilación de AKT y ERK1/2 en los tumores de glándula mamaria. Además, observamos que ReNcell-tGAS1 prolonga un 25% la supervivencia de los ratones con formación de tumores de glándula mamaria. Estos datos sugieren que la entrega de tGAS1 por ReNcell puede ser un efectivo adyuvante para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo.

ABSTRACT

Metastasis to several organs is the major cause of death in breast cancer patients. The poor clinical prognosis and lack of successful treatments for metastatic breast cancer patients demand the development of new tumor-selective therapies. Neural stem cells are an attractive vehicle for tracking tumor cells and delivering anticancer agents. We previously demonstrated that a soluble form of GAS1 (Growth arrest specific-1) inhibits the growth of triple-negative breast tumors and glioblastoma. In this study, we engineered ReNcell CX neural progenitor cells to express tGAS1 under a Tet/on inducible system using lentiviral vectors. Here, we show that the treatment with ReNcell-tGAS1, in combination with tetracycline, inhibited primary tumor growth and the generation of metastases in tumor-bearing mice by decreasing the phosphorylation of AKT and ERK1/2 in orthotopic breast tumors. Moreover, we observed that ReNcell-tGAS1 prolonged 25% the survival of 4T1 tumor-bearing mice. These data suggest that the delivery of tGAS1 by ReNcells could be an effective adjuvant for the treatment of triple-negative breast cancer.

1) INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama

1.1) Epidemiología

A nivel mundial el cáncer de mama representa la incidencia más frecuente de cáncer (11.7%), y comprende la quinta causa más común de muerte por cáncer para ambos sexos (6.9%). Aunque el cáncer de mama se presenta con mayor incidencia en la población femenina, se estima que menos del 1% de la población masculina también puede desarrollar esta enfermedad, principalmente por antecedente familiares. De acuerdo con el GLOBOCAN, se estima que para el año 2023, el cáncer de mama tendrá una prevalencia del 15.4% siendo la prevalencia más frecuente por cáncer, lo que representa un importante problema de salud pública [1].

1.2) Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama comprende histológicamente dos grupos: el carcinoma ductal y el carcinoma lobulillar, que pueden ser *in situ* e invasivos. El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) es el tipo más común de cáncer de mama, y se caracteriza por la proliferación de células epiteliales malignas que normalmente no invaden más allá de los ductos mamarios, los cuales son rodeados por células mioepiteliales y una membrana basal intacta. Sin embargo, una extensión de la malignidad ductal más allá de la membrana basal que constituye el borde epitelial, es considerado como un carcinoma ductal invasivo, generando potencial de metástasis y en última instancia, la muerte [2-3]. Por otra parte, el carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) comienza en los lobulillos que son las glándulas productoras de leche, sin invasión a través de las paredes de los lobulillos. Esta enfermedad puede propagarse a otras partes del cuerpo al atravesar la membrana basal, lo que se considera como un carcinoma lobulillar invasivo [4].

A nivel molecular, el cáncer de mama se ha clasificado en cuatro subtipos empleando marcadores biológicos que incluyen la presencia y/o ausencia de receptores tales como; el

receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [5].

1.- Luminal A: Es el subtipo más común y menos agresivo, y representa el 40% de todos los cánceres de mama. Estos tumores son positivos al RE, RP, citoqueratinas CK8/18 y negativos a HER2, comúnmente presentes en el epitelio luminal que delimita los ductos en el tejido mamario. Las pacientes que presentan este subtipo tienen un buen pronóstico, pero pueden desarrollar metástasis a hueso sino se detecta a tiempo la enfermedad.

2.- Luminal B: Representa del 25-30% de los cánceres de mama. Estos tumores son positivos al RE, RP y HER2, y presentan un alto índice de proliferación con un mal pronóstico. Las pacientes con este subtipo presentan un fenotipo más agresivo que el luminal A, generando con frecuencia metástasis a hueso y a hígado.

3.- HER2⁺: Representan del 15-20% de los cánceres de mama. Estos tumores son negativos al RE y RP, pero positivos al HER2. Los cánceres de mama que sobreexpresan HER2 son muy proliferativos y alrededor del 75% son de alto grado histológico y cerca del 40% tienen mutaciones en p53.

4.- Triple negativo: Representan el 15% de los cánceres de mama y son negativos al RE, RP y HER2. Los cánceres de mama triple negativo, tienden a ser carcinomas ductales invasivos con un alto índice mitótico y necrótico, generando una alta frecuencia de diseminación a pulmones, sistema nervioso central y nódulos linfáticos. Las pacientes con cáncer de mama triple negativo muestran el peor pronóstico y una alta recurrencia, incluso después de los tratamientos convencionales lo que limita sus opciones terapéuticas empeorando la vida del paciente.

1.3) Factores de riesgo

El cáncer de mama puede desarrollarse por diversos factores, en su mayoría parcialmente conocidos. Los primeros incluyen la menarquia y los factores genéticos como: edad, raza, antecedentes familiares de cáncer de mama y antecedentes personales de enfermedades benignas de la mama. Mientras que los segundos se encuentran relacionados con el medio

ambiente o estilos de vida, tales como: alimentación, consumo de tabaco y alcohol, actividad física, sobrepeso u obesidad; pero entre los que tienen una mayor carga contributiva están los genéticos [6].

La edad es el factor de riesgo más importante en la mujer, pues aproximadamente 2 de cada 3 cánceres de mama se encuentran en mujeres de más de 50 años, diagnosticándose más del 75% de los cánceres de mama después de la menopausia. El cáncer de mama entre los hombres puede presentarse a cualquier edad, pero generalmente se detecta en aquellos de 60 a 70 años, y se asocia a la exposición a radiaciones, altas concentraciones de estrógenos en la sangre producto de la cirrosis o el Síndrome de Klinefelter (trastorno genético caracterizado por la presencia de uno o más cromosomas X extra) y por antecedentes heredofamiliares de mutaciones en el gen BRCA 2 [7].

El cáncer de mama hereditario sugiere la alteración de los genes supresores de tumor: BRCA 1 y BRCA 2. Un tercio de las pacientes con historia familiar de cáncer de mama son portadoras de la mutación heredable de estos genes, o se asocian a trastornos en la reparación del DNA [8].

El estado hormonal influenciado por la acción estrogénica constituye un peligro en el incremento de la neoplasia, sobre todo en mujeres con menarquía precoz y menopausia tardía, pues se relaciona con un daño genético en las células epiteliales mamarias en las edades de alta actividad proliferativa de estas células. Las mujeres que han perdido la menstruación antes de los 40 años, es decir, que han tenido una menopausia adelantada ya sea espontánea o secundaria a cirugía, tienen un menor riesgo de padecer cáncer de mama. Sin embargo, tendrán mayor riesgo de padecer osteoporosis y enfermedades cardiovasculares [9]. El consumo de bebidas alcohólicas aumenta el riesgo de las mujeres de sufrir cáncer de mama, aunque su efecto no está definido. Según los resultados de algunas investigaciones, este puede estar provocado por la acción directa de los productos del etanol sobre las membranas celulares del epitelio mamario que permite que se incrementen los niveles de estrógenos [10].

1.4) Tratamiento del cáncer de mama

Existen ciertos tratamientos que son específicos para cada subtipo molecular. Las pacientes con cáncer de mama con subtipo luminal A y luminal B dan una respuesta favorable a terapias hormonales con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa prolongando la vida del paciente [11]. Las pacientes con subtipo HER2⁺ son tratadas con Trastuzumab (Herceptin), un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra el dominio extracelular del receptor HER2, disminuyendo la recurrencia en un 50% [12]. Mientras que las pacientes con cáncer de mama con subtipo triple negativo (RE⁻, RP⁻ y HER2⁻) no responden a la terapia hormonal ni al Trastuzumab, lo que limita sus opciones terapéuticas [13].

A pesar de los progresos en el conocimiento de las bases genéticas y los mecanismos moleculares de esta enfermedad, el cáncer de mama con subtipo triple negativo sigue siendo una patología muy agresiva con una alta tasa de mortalidad, y aunque el cáncer de mama puede ser removido por resección quirúrgica y tratado con quimioterapia, radioterapia o terapia combinada, este tipo de tratamientos puede prolongar la vida del paciente, pero aun así, la supervivencia casi siempre es menor a los 5 años debido a que esta enfermedad es detectada en estadios avanzados cuando la metástasis se ha esparcido a pulmón, hueso, hígado o cerebro. De ahí la importancia de buscar nuevas alternativas terapéuticas que nos ayuden a localizar y erradicar el crecimiento del tumor.

1.5) Terapia génica como posible tratamiento contra el cáncer

En los últimos cincuenta años, tanto la cirugía, como la quimioterapia y la radioterapia, han sido fundamentales para el tratamiento del cáncer, prolongando la vida del paciente; sin embargo, han sido insuficientes para mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con tumores malignos, debido a que estos tratamientos también provocan la muerte de células normales. Razón por la cual se están buscando nuevas alternativas terapéuticas que ayuden a erradicar selectivamente a las células tumorales sin afectar a las células normales.

La terapia génica parece ser una modalidad promisoras para el tratamiento del cáncer, mediante la ayuda de vehículos virales (lentivirus, adenovirus y retrovirus) y no virales (lipoplex, células troncales) los cuales pueden expresar un transgén en las células tumorales [14-15]. Sin embargo, este procedimiento terapéutico no ha sido completamente exitoso debido a la falta de moléculas con actividad antitumoral que puedan erradicar el desarrollo del tumor y por la falta de un vehículo ideal que puedan ayudar a localizar y entregar el transgén en el sitio del tumor sin afectar órganos sanos.

La terapia génica, se define como una estrategia terapéutica basada en la modificación del repertorio genético de las células, mediante la administración de ácidos nucleicos [16]. Esta estrategia, requiere diferentes técnicas de ingeniería genética para ejercer una función terapéutica, entre las que se incluyen: introducir o eliminar genes específicos, alterando o supliendo a un gen anormal, reparándolo, introduciendo una copia del gen normal o introduciendo un gen que añada nuevas funciones o regule la actividad de otros genes. Las enfermedades que se pueden tratar con terapia génica se clasifican de acuerdo a las siguientes categorías [17-18].

❖ **Enfermedades genéticas hereditarias:**

- a) Monogénicas; Hemofilias, anemia falciforme, deficiencias inmunológicas severa, hipercolesterolemia familiar y fibrosis quística.
- b) Multifactoriales; Hipertensión, diabetes tipo II, enfermedades coronarias, Parkinson y Alzheimer.

❖ **Enfermedades genéticas adquiridas:** Cáncer.

❖ **Enfermedades infecciosas:** Herpes, hepatitis y SIDA.

En función del tipo de célula blanco, existen dos modalidades de terapia génica:

Terapia génica germinal: Dirigida a modificar la dotación genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides y, por tanto, transmisible a la descendencia.

Terapia génica somática: Dirigida a modificar la dotación genética de células no germinales, es decir, de las células de cualquier órgano o tejido, por lo que la modificación genética no puede transmitirse a la descendencia [16, 19].

Por otra parte, en función de la estrategia para aplicar la terapia génica, también se puede clasificar en:

- A) **Terapia génica *in vivo***: Agrupa las técnicas en las que el material genético se introduce a las células directamente en el organismo, ya sea administrándolo directamente al órgano o tejido en estudio (*in situ*), o por vía sistémica, mediante el uso de vehículos genéticos. Como desventaja tienen el grado de control, ya que el proceso de transferencia y la eficiencia global es baja hasta el momento y, además, todavía es difícil conseguir un alto grado de especificidad tisular.

- B) **Terapia génica *ex vivo***: Comprende aquellas técnicas en las que las células a tratar se extraen del paciente (biopsia), se disgregan, se crecen en cultivo y se someten al proceso de transfección *in vitro*. Se seleccionan las células que expresen el gen terapéutico, se multiplican en cultivo y se introducen de nuevo al paciente. Sus principales ventajas son permitir la elección del tipo de célula a tratar, mantener un estrecho control sobre todo el proceso y tener una mayor eficacia de transfección [20].

1.6) Métodos de transferencia de genes

Para alcanzar el efecto biológico deseado en la terapia génica, es necesario introducir de manera eficiente, el material genético de interés en la célula blanco y conseguir su expresión. Por lo que es necesario contar con vehículos genéticos, los cuales son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia del gen terapéutico a la célula blanco, facilitando su entrega y biodisponibilidad intracelular [16, 21]. Aunque las prioridades del vehículo ideal pueden variar, en función de la aplicación concreta, en todos los casos el vehículo desempeña una función importante en el éxito de la terapia génica. Por tanto, las características de un vehículo genético ideal deben ser las siguientes:

- 1) Que pueda ser destinado con especificidad a la célula blanco.
- 2) Que proteja al DNA contra la degradación enzimática durante su transporte.
- 3) Que facilite la entrega del gen terapéutico a la célula con una elevada biodisponibilidad.

- 4) Que permita la expresión del gen con alta eficiencia.
- 5) Que no sea reconocido por el sistema inmune evitando la respuesta inflamatoria.
- 6) Que sea seguro para el paciente y su entorno.

Con base en esto, se pueden identificar dos tipos de vehículos para la transferencia génica: vehículos genéticos no-virales y vehículos virales.

1.7) Vectores no virales

Dentro de los vehículos no virales, podemos encontrar: la microinyección, biobalística, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, policomplejos y liposomas. En general, los vehículos genéticos no virales tienen la ventaja de ser seguros y tener la posibilidad de transferir genes terapéuticos de gran tamaño, son poco tóxicos y no son inmunogénicos. Sin embargo, su principal desventaja, hasta ahora, radica en la baja eficiencia de transfección [22]. De todos ellos, los liposomas catiónicos y el sistema poliplex parecen ser los más prometedores para una alta eficiencia de transferencia de genes con un grado muy alto de seguridad. Los liposomas catiónicos se forman con lípidos catiónicos sintéticos, en contraste con los liposomas cargados negativamente o neutros. Los liposomas catiónicos interactúan eficientemente con las cargas negativas de moléculas aniónicas como los ácidos nucleicos (DNA, mRNA, oligonucleótidos sintéticos), proteínas y péptidos, principalmente por interacciones electrostáticas que permiten la formación de lipocomplejos [23]. Un sistema que resulta interesante y prometedor para la terapia génica empleando vectores no virales es el uso del poliplex, el cual es un conjugado de una molécula de poli-L-lisina, un ligando para el cual las células blanco tienen receptores de superficie y DNA plasmídico con el gen de interés. Cuando el ligando del poliplex es reconocido por los receptores celulares específicos, es endocitado y se expresa el transgén [24].

1.8) Vectores virales

Los vectores virales, son virus que han sido modificados genéticamente mediante la eliminación de genes esenciales para replicación y ensamble, y su consiguiente reemplazo por el gen terapéutico de interés. Dentro de éstos se incluyen: adenovirus, retrovirus,

parvovirus (virus adeno-asociados), herpesvirus y lentivirus [25-26]. Cada sistema viral tiene características particulares como son: la preferencia para reconocer y transferir su material genético a un tipo de célula en particular, así como la capacidad de almacenamiento de genes, por lo tanto, dependiendo de las necesidades se debe realizar su elección.

En general, la principal ventaja de los vectores virales radica en que son los sistemas más eficaces para transferir genes debido a que infectan una elevada proporción de células blanco [27]. Sin embargo, tienen importantes limitaciones, entre las que se encuentran: la probabilidad de producirse una transferencia involuntaria del virus nativo patógeno, que se convierta en un reactivante, que exista una recombinación genética y provoque mutagénesis insercional, o que provoque una reacción inmunitaria hacia el producto del gen terapéutico, directamente hacia las células transfectadas o incluso hacia el vehículo mismo [25], además de generar una respuesta inflamatoria y antiviral por parte del sistema inmune, lo que limita su uso en modelos con metástasis.

Los ensayos clínicos se han centrado en entregar directamente el gen terapéutico en el sitio del tumor por inyección intratumoral, empleando vectores virales, evitando la expansión del virus a los tejidos normales [14-15]. Sin embargo, aunque hay ensayos muy prometedores de terapia génica contra el cáncer, como es la introducción de genes suicidas (HSV-tk y CD), la inmunoterapia con citocinas (IL-2, IL-4, IL-12 y TNF- α), la resistencia a fármacos, la antiangiogénesis (VEGF, angiostatina) y la utilización de receptores tejido-específicos [28-30] todavía no se ha encontrado un procedimiento adecuado que permita localizar y dirigir la expresión del transgén en modelos de cáncer con metástasis.

1.9) Células troncales como vector para dirigir el transgén al sitio del tumor

Idealmente, las células troncales parecen ser una buena estrategia terapéutica para tratar el cáncer, actuando como vehículo para localizar y entregar agentes terapéuticos contra tumores sólidos. Numerosos estudios han mostrado que las células troncales pueden migrar hacia el sitio del tumor, entre las que se incluyen células troncales embrionarias, células

troncales mesénquimas, células troncales neurales (CTN) y células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) [31-34].

Las células troncales embrionarias derivadas de la masa celular interna del blastocisto, así como las células troncales derivadas de tejido fetal, fueron el primer tipo de células identificadas como fuente de obtención de células troncales, sin embargo, aspectos bioéticos en la obtención de estas células han sido una limitante para su uso. Por lo que se ha explorado varios tipos de células troncales de adulto para su uso terapéutico.

Las células troncales mesenquimales derivadas de medula ósea y de tejido adiposo, han demostrado su capacidad de tropismo hacia el tumor en diferentes modelos de cáncer incluyendo glioblastoma, melanoma, hepatocarcinoma y cáncer de mama [35]. Sin embargo, existe controversia sobre este tipo de células debido a que existen estudios que reportan un efecto carcinogénico por parte de las células troncales mesenquimales [36-37].

Las CTN son células progenitoras del sistema nervioso central que pueden diferenciarse en diferentes linajes celulares incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos [38]. Debido a su capacidad migratoria y tropismo innato hacia las células tumorales, las CTN han surgido como un atractivo vehículo celular para la entrega de genes terapéuticos, tanto a los tumores sólidos primarios como a las metástasis [39-41]. El mecanismo molecular de “homing” hacia el tumor no ha sido completamente elucidado, sin embargo, hay evidencia de que las células tumorales liberan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento durante el desarrollo del tumor que permiten el tropismo de las CTN hacia las células cancerosas. Entre los factores inductores del tropismo se incluye: HGF, VEGF, PDGF, SDF-1, HMGB1, IL-1, IL-6, TNF α [42-45].

Estudios previos han reportado, en modelos animales, que las CTN humanas inyectadas en el torrente sanguíneo tienen la habilidad de seguir tumores de mama metastásicos en varios órganos incluyendo pulmón, hueso, hígado, y nódulo linfático [39, 46]. De igual manera, las CTN han sido empleadas para tratar células tumorales invasivas y tumores distantes, incluyendo las células de glioblastoma, meduloblastoma y neuroblastoma [40-42, 47]. Recientemente, Aboody y su grupo de trabajo han empleado las CTN que expresan la

enzima citosina desaminasa, la cual convierte la prodroga 5-Fluorocitosina a 5-Fluorouracilo para tratar pacientes con glioblastoma, mostrando la eficacia y seguridad de estas células, primero para localizar a los tumores de cerebro y, segundo para producir localmente la quimioterapia [48].

1.10) Terapia génica de GAS1 contra el cáncer

GAS1 por sus siglas en inglés “growth arrest specific 1” es una proteína de 37 KDa, presente en la membrana celular anclada por el glicolípido glicosil fosfatidil inositol (GPI) en su extremo carboxilo terminal [49]. GAS1 es una proteína supresora de tumores capaz de inducir arresto celular y apoptosis en diferentes tumores incluyendo glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de mama triple negativo, hepatocarcinoma, melanoma, cáncer gástrico y cáncer de colorrectal [50-56].

Por otra parte, GAS1 muestra una alta similitud estructural con los receptores de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de la glía (GFR α 1-4), debido a que ambas moléculas se anclan a la membrana celular mediante un sitio GPI. Los dominios D3 de los GFR α son homólogos con los dominios D-C de GAS1, mientras que, los dominios D2 son homólogos con los dominios D-N de GAS1 (Figura 1). Además, en ambos receptores se observa la presencia de un péptido señal y de cinco puentes disulfuro lo que sugiere que el plegamiento de estas proteínas es muy similar entre ellas. Con base en esto, se ha descrito que GAS1 funciona como un co-receptor negativo para los ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), al interferir con la vía de supervivencia mediada por los receptores GFR α [55].

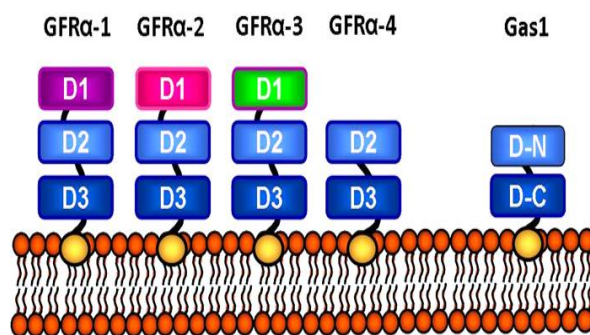


Figura 1. GAS1 tiene una similitud estructural con los GFR α s, y ambos se anclan a la membrana celular mediante una molécula GPI. Los dominios D3 de los GFR α s son homólogos con el dominio D-C de GAS1, mientras que los dominios D2, son homólogos con el dominio D-N de GAS1 [57].

Los ligandos del factor neurotrófico derivado de la glía (GFLs) pertenecen a la familia de TGF- β e incluyen al factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), nerturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN) que promueven la supervivencia de neuronas dopaminérgicas y motoneuronas [58]. Los GFL interactúan con los receptores GFR α 1, GFR α 2, GFR α 3 y GFR α 4, respectivamente, sin embargo, pueden interactuar con otros receptores de menor afinidad, tal como GDNF que puede interactuar con GFR α 2 o NRTN y ARTN con GFR α 1 [55]. La unión del GFL a su GFR α en forma de homodímero promueve la formación de un complejo que recluta a RET (receptor tirosina cinasa) induciendo su homodimerización y autofosforilación permitiendo la activación de diferentes vías de señalización como PI3K/AKT y MAPK (proteína cinasas activadas por mitógenos) involucradas en la proliferación y supervivencia celular [59-63]. Interesantemente, las células de cáncer de mama tienen bajos niveles de GAS1, pero una sobreexpresión del ligando ARTN que se une a su receptor GFR α 3 y GFR α 1 promoviendo la proliferación celular, invasión, angiogénesis y crecimiento del tumor [64-65].

Estudios previos en el laboratorio han mostrado que GAS1 interfiere con la vía de supervivencia mediada por los receptores GFR α , al reducir la fosforilación de RET en el residuo de tirosina 1062 y por consiguiente inhibir la actividad de la vía PI3K/AKT, lo que conlleva a la translocación de Bad (gen proapoptótico) a la mitocondria, la liberación del citocromo-c al citosol, y a la activación de las caspasas 3 y 9, induciendo apoptosis en las células C6 de glioblastoma de rata y SH-SY5Y de neuroblastoma de humano (Figura 2) [56, 66-67].

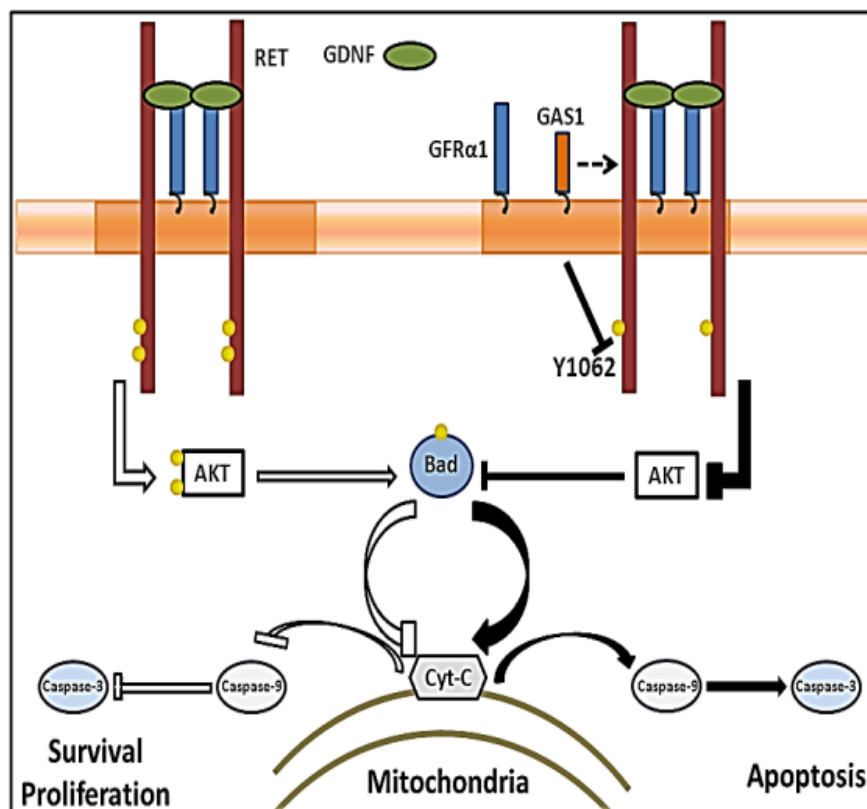


Figura 2. GAS1 está involucrado en inhibir la vía de señalización de GDNF, a través de la inactivación de RET y AKT, lo que conlleva a la liberación de citocromo C de la mitocondria y a la activación de las caspasas 9 y 3 induciendo apoptosis [56].

Una forma secretable y soluble de GAS1 (tGAS1), se ha obtenido truncando la secuencia de GAS1 humano a partir de la arginina 315 por lo que no tiene la secuencia que codifica para el sitio GPI, lo que impide que se ancle a la membrana celular potenciando su efecto tanto de forma autocrina como paracrina [68-69]. Interesantemente, los lentivirus con tGAS1 han mostrado tener un efecto antitumoral tanto en modelos de glioblastoma como en cáncer de mama triple negativo, al inhibir el crecimiento del tumor y reducir la formación de vasos sanguíneos, siendo de gran importancia debido a la falta de terapias blanco contra el subtipo triple negativo [70]. Sin embargo, los lentivirus presentan ciertas desventajas para su aplicación ya que pueden generar una respuesta inflamatoria y antiviral por parte del sistema inmune, lo que constituye un riesgo y una limitación para el tratamiento con dosis múltiples. Además de que estos lentivirus necesitan ser inyectados directamente en el tumor lo que limita su uso en modelos de cáncer con metástasis. Por lo que hay una urgente necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que nos permitan

localizar y entregar altas concentraciones de agentes anticancerosos selectivamente en los tumores minimizando los efectos secundarios sobre los órganos sanos.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las CTN inyectadas intracerebralmente o sistémicamente en ratones, son capaces de migrar hacia los tumores implantados intracerebralmente [44] y entregar tGAS1 inhibiendo el volumen del tumor primario e incrementando la supervivencia de los ratones [47]. El uso de las CTN parece ser una estrategia prometedora para direccionar la terapia génica en la mayoría de los tumores, sobre todo los que no son accesibles para ser tratados por inyección directa (*in situ*), y de esta manera asegurar la distribución adecuada del transgén en la masa tumoral primaria y en los sitios metastásicos.

2) JUSTIFICACIÓN

- ❖ El cáncer de mama representa la primera incidencia y la quinta causa más común de muerte por cáncer a nivel mundial, lo que representa un importante problema de salud pública.
- ❖ El desarrollo de nuevas estrategias, como la terapia génica, podría ayudar a combatir de manera más eficiente este padecimiento, mediante el uso de células troncales neurales para dirigir el transgén al sitio del tumor.
- ❖ tGAS1 ha mostrado tener efecto antitumoral, lo cual la hace una molécula con gran potencial en la terapia contra el cáncer.
- ❖ En el presente trabajo se utilizaron células troncales neurales como vehículo para dirigir la expresión del transgén tGAS1 al sitio del tumor y así atenuar el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis en un modelo de cáncer de mama triple negativo.

3) HIPOTESIS

Las células troncales neurales que expresan tGAS1 de manera dependiente de tetraciclina migrarán al sitio del tumor y al sobreexpresar tGAS1 atenuará el crecimiento del tumor y la generación de las metástasis.

4) OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar el tropismo de las células troncales neurales, y el efecto antitumoral y anti-metastásico de tGAS1 en un modelo de cáncer de mama triple negativo.

4.1) OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-** Caracterizar la línea celular 4T1 de cáncer de mama.
- 2.-** Establecer la línea celular ReNcell-GFP-tGAS1.
- 3.-** Evaluar el efecto de tGAS1 sobre la proliferación de los cultivos de la línea celular 4T1.
- 4.-** Establecer la línea celular 4T1 bioluminiscente (fLuc) y fluorescente (RFP), “4T1-fluc-RFP”.
- 5.-** Establecer un modelo de cáncer de mama metastásico empleando la línea celular 4T1-fLuc-RFP.
- 6.-** Determinar el tropismo de las células troncales neurales “ReNcell-GFP” hacia el sitio del tumor.
- 7.-** Evaluar el efecto antitumoral y anti-metastásico de tGAS1 en un modelo de cáncer de mama empleando las células troncales ReNcell-GFP-tGAS1.
- 8.-** Evaluar la supervivencia de los ratones con tumores de mama tratados con células troncales ReNcell-GFP-tGAS1.

5) MATERIALES Y MÉTODOS

5.1) Cultivos celulares

Se emplearon las líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y de ratón 4T1 obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection). Las células se cultivaron en medio DMEM F12 (Dulbecco Modified Eagle's Medium)/F12 (Invitrogen) suplementadas con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco) y antibióticos Penicilina 100 U/ml y Estreptomicina 100 mg/ml (Gibco). También se emplearon células de glioblastoma humano U87, de neuroblastoma humano SH-SY5Y y células C6 de glioblastoma de rata y se cultivaron en DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle Medium High-Glucose) suplementadas con SFB al 10%, 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 1% de antibióticos. También se utilizaron células epiteliales de riñón embrionario humano HEK293FT que fueron crecidas en DMEM-HG suplementadas con SFB al 10%, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio (Invitrogen) y 1% de antibióticos.

La línea celular humana ReNcell CX (Millipore), derivada de la corteza cerebral de un feto humano de 10 semanas de gestación se cultivó sobre matrigel (BD Biosciences), el cual se incubó durante 4 h antes de sembrar las células. Las células fueron crecidas en un medio comercial ReNcell (EMD Millipore) en presencia de bFGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico) (Gold Biotechnology, USA) y EGF (Factor de Crecimiento Epidermal) a una concentración de 20 ng/ml (Sigma-Aldrich) para prevenir la diferenciación celular [47]. Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire con cambio de medio cada tercer día.

5.2) Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó con el reactivo Trizol Isolation Reagent (Invitrogen Life Technologies Inc), de la siguiente manera: A una caja de 60 mm de diámetro (Falcon) con células en cultivo confluentes, se le adicionó 1 ml de la solución Trizol con la cual se lisaron y homogenizaron las células, y se guardaron toda la noche a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 20 min para su descongelamiento. Por cada ml de lisado celular, se adicionó 200 μl de cloroformo y se invirtió por 15 segundos. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 3 min, y se centrifugaron a $14\ 000\ \times\ g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. La fase acuosa se colocó en un microtubo y los RNAs se precipitaron con 1 volumen de alcohol isopropílico frío (v/v). Las muestras se incubaron 1 h a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugaron por 20 min a $14\ 000\ \times\ g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes se eliminaron cuidadosamente y los botones de RNA se lavaron con 1 ml de etanol al 75%, y se centrifugaron por 10 min a $14\ 000\ \times\ g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes se eliminaron y el exceso de etanol se evaporó casi a sequedad al incubar a temperatura ambiente las muestras por 10 min. Los botones de RNA se resuspendieron con 15 μl de agua libre de DNasa y RNasa (Gibco) y se incubaron en baño maría a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Las muestras de RNA se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración y pureza de los RNAs se determinó espectrofotométricamente, la absorbancia a 260 nm se utilizó para calcular la concentración de RNA y con el valor de la relación 260/280, se determinó la pureza. La integridad de los RNAs se analizó en un gel de agarosa al 1 %, a 70 V por 70 min y se observó en el transiluminador. Por último, 3 μg de RNA total fueron tratados con DNasa (New England BioLabs) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min, de acuerdo al protocolo establecido en la hoja técnica.

5.3) Obtención de cDNA por retrotranscripción

La obtención del cDNA se llevó a cabo con el juego de reactivos “cDNA Cycle $\text{\textcircled{R}}$ ” de Invitrogen, bajo las siguientes condiciones: En un microtubo de 0.6 ml se colocó 3 μg de RNA total previamente tratados con DNasa, 1 μl de oligo dT (desoxitimidina trifosfato) y 3 μl de dNTP's 10 mM, se llevó a un volumen de 42 μl con agua libre de DNasa y RNasa (Gibco) y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Posteriormente, las muestras se incubaron 5 min en

hielo y se adicionaron 12 μ l del regulador M-MLV 5X, más 3 μ l de DTT 100 mM, que se incubaron durante 2 min a 37 °C. A la mezcla de reacción se le agregaron 3 μ l de la enzima M-MLV y se incubó por 50 min a 37 °C para la activación de la enzima. Por último, se inactivó la enzima por 15 min a 70 °C y el cDNA se almacenó a -70 °C.

5.4) Reacción en cadena de la polimerasa

A partir de los cDNAs obtenidos de la retrotranscripción, se amplificaron *GDNF*, *ARTN*, *GFR α 1*, *GFR α 3*, *RET*, *GAS1* y β -*ACTINA* por PCR, de acuerdo al protocolo establecido en la hoja técnica (Invitrogen). Para determinar la expresión de *GDNF* se usaron los iniciadores 5' ATGAAGTTATGGGATGTCGTGGCT 3' y 5' TCAGATACATCCACACCTTTTAGC 3' reportados por Domínguez-Monzón [57], con una temperatura de alineamiento de 55.1 °C. Para amplificar *ARTN* se usaron los iniciadores 5' GCTGAGGATGATCTATCTCCAAG 3' y 5' CCGACATCTTTCCTCTGTCTG 3' con una temperatura de alineamiento de 54 °C, establecidos en el programa primer-BLAST. Para amplificar *GFR α 1* se usaron los iniciadores 5' CTGCAGCACCAAGTACCGCA 3' y 5' ACCTTGACTCTGGCTGGCAGT 3' reportados por López Ramírez [67], con una temperatura de alineamiento de 58.4 °C. Para amplificar *GFR α 3*, se usaron los iniciadores 5' GCCACAGAGAACAGGTTTGTG 3' y 5' GGGTGAGACATCCAACCTCGTAG 3' con una temperatura de alineamiento de 54.5 °C, establecidos en el programa primer-BLAST. Para determinar la expresión de *GAS1* se usaron los iniciadores 5' CTGTGCCTGATGGCGCTGCTGC 3' y 5' ACGCAGTCGTTGAGCAGCGCC 3' con una temperatura de alineamiento de 63 °C reportados por Domínguez-Monzón [57]. Para amplificar *RET* se usaron los iniciadores 5' GGGATCACCAGGAACTTCTCC 3' y 5' GGGAGGCGTTRTCTTTCAGC 3', reportados por Domínguez-Monzón [57], con una temperatura de alineamiento de 62 °C. Por último, para amplificar β -*ACTINA* se usaron los iniciadores 5' TGGCACCCACCTTCTACA 3' y 5' TCACGCACGATTTCCC 3', reportados por Domínguez-Monzón [57], con una temperatura de alineamiento de 53 °C.

5.5) Obtención de células estables 4T1-fLuc-RFP

Para la obtención de las células 4T1 bioluminiscentes (fLuc) y rojas fluorescentes (RFP) se emplearon los plásmidos pCMV-fLuc que contiene el gen que codifica para la luciferasa de luciérnaga y el pDsRed1-N1 que contiene el gen que codifica para la proteína RFP, ambos regidos por el promotor del citomegalovirus. Las células 4T1 se sembraron sobre una caja de 35 mm (Falcon) y una vez que alcanzaron un 80% de confluencia se realizó la transfección. Para ello, los lipocomplejos se formaron al agregar 7 µl de lipofectamina 3000 (Invitrogen) en 118 µl de medio OPTIMEM y 3.5 µg de DNA plasmídico (pCMV-fLuc), 7 µl de reactivo P3000 en 118 µl de OPTIMEM, se mezclaron y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a la monocapa de células se le agregó la preparación de los lipocomplejos, en un volumen total de 250 µl de medio y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Los lipocomplejos fueron eliminados y 1.5 ml de medio DMEM completo fue agregado a la monocapa de células. Las células transfectadas con el plásmido pCMV-fLuc, se seleccionaron con el antibiótico geneticina 500 µg/ml (Gibco) durante 2 semanas, con cambio de medio fresco cada tercer día. Por último, esas células fueron co-transfectadas con el plásmido pDsRed1-N1 usando lipofectamina 3000 con las condiciones antes mencionadas, y después de 72 h de cultivo las células fueron seleccionadas en el FACS (sorteo celular activado por fluorescencia) y mantenidas en medio de cultivo con el antibiótico geneticina 500 µg/ml (Gibco) obteniendo las células estables 4T1-fLuc-RFP.

Las células estables se caracterizaron por la expresión de la proteína RFP usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 y fueron procesadas con el software Image-Pro PLUS (Media Cybernetics, Inc.). Para la medición *in vitro* de la señal de luciferasa presente en las células 4T1-fLuc-RFP, se incubó 1×10^6 células en una placa de 96 pozos (Corning™) realizando diluciones seriadas 1:2 durante 6 h. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido de los pozos y 100 µl del sustrato D-luciferina (150 µg/ml Perkin Elmer) se agregó a las células. La intensidad de la quimioluminiscencia se evaluó 15 min después de adicionar el sustrato en el equipo de imagen *in vivo* IVIS (Perkin-Elmer).

5.6) Producción de los lentivirus tGAS1, GFP y represor de tetraciclina (TR)

Para la producción de lentivirus se cultivaron 6×10^6 células HEK-293 FT, en cajas de 100 mm y se incubaron por 24 h a 37 °C. Al día siguiente, las células se transfectaron de manera independiente con los vectores lentivirales pLenti6.3-tGAS1, pLenti6.3-GFP y pLenti3.3/RT, y una mezcla de empaquetamiento lentiviral (ViraPower Packing Mix, Invitrogen) empleando Lipofectamina 3000. Después de 48 h, los medios de cultivo que contienen los lentivirus fueron recolectados, centrifugados a 20, 000 g por 3 h, filtrados en membranas de 0.22 μm (Millipore) y almacenados a -70 °C.

5.7) Obtención de células troncales neurales ReNcell-GFP-tGAS1 y ReNcell-fLuc

Para la obtención de las células ReNcell-GFP-tGAS1/TR se sembraron células ReNcell CX sobre matrigel en una caja p35 y se infectaron con los lentivirus que codifican para el elemento represor de tetraciclina (TR) en presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de polybrene en el medio de mantenimiento. A las 24 h post-infección, el medio que contenía los lentivirus se aspiró y se aplicó medio de crecimiento. Las células infectadas con el TR fueron seleccionadas con el antibiótico blasticidina a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 semanas, y entonces fueron re infectadas con los lentivirus tGAS1 seguido de la selección con blasticidina a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ durante dos semanas. Finalmente, las células ReNcell-tGAS1/TR se coinfectaron con los lentivirus GFP. A las 48 h post-reinfección, las células fueron seleccionadas en el FACS para la obtención de las células ReNcell-GFP-tGAS1/TR. Las células estables fueron caracterizadas por la expresión de la proteína tGAS1 en presencia de tetraciclina a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ y por la expresión de la proteína verde fluorescente, tanto por inmunocitoquímica como por Western blot y RT-PCR.

Para la obtención de las células ReNcell bioluminiscentes (fLuc) se empleó el plásmido pCMV-fLuc que contiene el gen que codifica para la luciferasa de luciérnaga. Las células ReNcell se sembraron sobre una caja de 35 mm (Falcón) y una vez que alcanzaron un 70% de confluencia se realizó la transfección. Para ello, los lipocomplejos se formaron al agregar 14 μl de lipofectamina 3000 (Invitrogen) en 236 μl de medio OPTIMEM y 7 μg de DNA plasmídico (pCMV-fLuc), 14 μl de reactivo P3000 en 236 μl de OPTIMEM, se mezclaron y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a la

monocapa de células se le agregó la preparación de lipocomplejos, en un volumen total de 500 μ l de medio y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Finalmente, el medio que contenía los lipocomplejos fue eliminado y 2 ml de medio de mantenimiento fue agregado a las células. Las células se seleccionaron con el antibiótico geneticina 100 μ g/ml (Gibco) durante 2 semanas, con cambio de medio fresco cada tercer día.

5.8) Obtención de medio condicionado de células ReNcell-GFP-tGAS1

Para obtener medio condicionado con tGAS1, 1×10^6 ReNcell-GFP-tGAS1 y 1×10^6 ReNcell-GFP fueron sembradas sobre Matrigel con medio de mantenimiento durante toda la noche. Al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco y las células fueron mantenidas por 48 h en presencia de tetraciclina a una concentración de 2 μ g/ml. El medio de los diferentes cultivos fue recolectado, centrifugado, filtrado en membranas de 0.22 μ m y aplicado como medio condicionado tanto a las células 4T1 como a ReNcell. La cantidad de proteína GAS1 liberada en el medio condicionado de las células ReNcell-GFP-tGAS1 fue medida usando el kit comercial Human GAS1 DuoSet ELISA (R&D Systems, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El medio condicionado obtenido de ReNcell-GFP y medio de mantenimiento fresco fueron usados como control negativo.

5.9) Ensayo de viabilidad celular

Para determinar el efecto de tGAS1 sobre la proliferación celular, 7, 500 células tanto 4T1 como ReNcell fueron sembradas en cajas de 24 pozos de manera independiente. Al día siguiente, las células fueron tratadas con los medios condicionados obtenidos de las líneas celulares ReNcell-GFP-tGAS1 y ReNcell-GFP. Después de 72 h de exposición al medio condicionado con o sin tGAS1, las células 4T1 se levantaron de la placa utilizando tripsina 1X, y acutasa para las células ReNcell durante 3 minutos. Las células se centrifugaron a 1 000 x g durante 5 min. Los paquetes celulares se resuspendieron en 200 μ l de medio completo, para cuantificar la viabilidad celular mediante la técnica de azul de tripano. Se contaron tanto las células vivas (refringentes) como las muertas (permeables al azul de tripano) en cada condición.

5.10) Análisis de ciclo celular

Las células 4T1 fueron incubadas con medio condicionado obtenido de las células ReNcell-GFP-tGAS1 y ReNcell-GFP (control negativo). Después de 72 h de cultivo, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS frío y 1×10^6 de estas células se fijaron con etanol al 70% a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y resuspendidas en una solución de PBS/0.1% Triton X-100 con 200 µg/ml RNasa (Sigma) y 20 µg/ml de yoduro de propidio e incubadas por una hora a temperatura ambiente en oscuridad. La fluorescencia a 570 nm se midió usando un equipo FACS Calibur (Becton Dickinson).

5.11) Establecimiento de un modelo de cáncer de mama metastásico *in vivo* en ratones desnudos

Todos los procedimientos en animales fueron realizados de acuerdo con la norma vigente NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) y en acuerdo con la Guía para el uso y cuidado de animales de experimentación de The National Institutes of Health y la normativa interna (CINVESTAV).

El modelo de cáncer de mama metastásico consistió en implantar de forma ortotópica 1×10^5 células 4T1-fLuc-RFP o 4T1-WT, en la cuarta glándula mamaria de ratones hembra *nu/nu* de 6-8 semanas de edad (n=5 por grupo). Posteriormente, los ratones inoculados se analizaron a los 15 min después de la inyección intraperitoneal del sustrato D-luciferina (150 mg/kg) (PerkinElmer) en un sistema de imagen *in vivo* (IVIS) (Perkin-Elmer, USA) en los días 0, 9, 18 y 24. Una vez que la metástasis fue detectada en los pulmones (día 24), los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los pulmones fueron extraídos para cuantificar la señal de luciferasa usando el IVIS. El volumen tumoral, se calculó utilizando la fórmula $V = (D_{max})(D_{min})^2/(2)$; donde D_{max} y D_{min} representan el diámetro mayor y menor del tumor, respectivamente, empleando un vernier.

5.12) Tropismo *in vivo* de células ReNcell-GFP en un modelo de cáncer de mama

Para evaluar *in vivo* el tropismo de las células ReNcell-GFP hacia los tumores, 1×10^5 células 4T1-fLuc-RFP se implantaron en la cuarta glándula mamaria de ratones hembra

nu/nu. A los 14 días de crecimiento del tumor los animales fueron divididos en dos grupos e inyectados vía intravenosa por la vena de la cola del ratón con: 50 μ l de PBS (vehículo) para el primer grupo, y con 1×10^6 de células ReNcell-GFP resuspendidas en 50 μ l de PBS para el segundo grupo. Las imágenes de bioluminiscencia de los ratones fueron obtenidas en los días 0, 14 y 24 post-implantación del tumor usando el sistema de imagen IVIS. En el día 24, los tumores de mama ortotópicos fueron cubiertos de la cámara IVIS con papel negro para permitir la baja detección de luciferasa de las metástasis originadas en la parte ventral superior de los ratones de los dos grupos de ratones. Finalmente, los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital (Sigma), perfundidos con solución salina isotónica y fijados con PFA al 4% para analizar en los tumores de glándula mamaria y pulmón de ambos grupos de ratones, la expresión de las proteínas RFP y GFP por inmunohistofluorescencia. Cada grupo estuvo formado por 5 animales.

Para investigar la distribución *in vivo* de las CTN inyectadas vía sistémica en ratones desnudos sin tumor, se inyectaron por la vena de la cola del ratón 1×10^6 células ReNcell-fLuc y los ratones se monitorearon en los días 0 y 3 en un sistema de imagen *in vivo* (IVIS) (Perkin-Elmer, USA). Tres días después de la inyección de las células ReNcell-fLuc, los ratones fueron sacrificados y el hígado, riñón, corazón, estómago, bazo, hueso, cerebro y pulmón fueron analizados en un sistema de imagen *in vivo* (IVIS) (Perkin-Elmer, USA).

5.13) Inmunofluorescencia

Para caracterizar a la línea celular 4T1, las células se sembraron en portaobjetos, se fijaron con PFA al 4% por 15 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma) al 0.25% por 15 min, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se bloquearon con BSA al 1% durante 1 h. Posteriormente, las células se incubaron a 4 °C toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios GFR α 1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), GFR α 3 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), RET (1:300, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), t-AKT (1:100, Cell Signaling, Danver, MA, USA), t-ERK1/2 (1:100, Cell Signaling, Danver, MA, USA) y GAS1 humano (1:100, ProScience Inc., Poway, CA). Para analizar la expresión de las proteínas RFP y GFP en los tumores ortotópicos de mama y pulmón, se realizaron cortes de esos tejidos de 8 μ m de espesor utilizando un crióstato (LEICA

CM1100) e inmediatamente se montaron en portaobjetos gelatinizados y subsecuentemente se incubaron con PBS/Tritón X-100 0.2% por 10 min. Enseguida se bloquearon con PBS/BSA al 1% por 1 h y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-RFP (1:100, Santa Cruz) y anti-GFP (1:100, Abcam) a 4 °C. Al siguiente día, las células o secciones del tumor fueron lavados con PBS e incubados con el respectivo anticuerpo secundario fluorescente (1:200) por 1 h, seguido de lavados con PBS para ser contrateñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 20X usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 acoplado a una cámara CoolSNAP-Pro y procesadas con el software Image-Pro PLUS (Media Cybernetics, Inc.).

5.14) Efecto de tGAS1 en un modelo de cáncer de mama

Para determinar el tropismo de las células ReNcell-GFP-tGAS1 hacia el tumor y evaluar el efecto antitumoral de tGAS1, se inocularon subcutáneamente 1×10^5 células 4T1-fLuc-RFP en la glándula mamaria 4T de ratones desnudos de 6-8 semanas de edad. A los 7 días de crecimiento del tumor los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos (n=6, por grupo):

- 1er grupo. Se administró por la vena de la cola del ratón 50 μ l de PBS.
- 2do grupo. Se inyectó por la vena de la cola del ratón 1×10^6 de células ReNcell-GFP resuspendidas en 50 μ l de PBS.
- 3er grupo. Se inyectó vía intravenosa por la vena de la cola del ratón 1×10^6 de células ReNcell-GFP-tGAS1 resuspendidas en 50 μ l de PBS.

Posteriormente, se permitió que las CTN migraran por 3 días para subsecuentemente administrar vía intraperitoneal en los tres grupos de ratones tetraciclina a una concentración de 50 mg/kg/día, cada dos días, un total de 7 veces (días 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22). Las imágenes de bioluminiscencia de los ratones fueron obtenidas en los días 0 (inoculación de células 4T1), 7 (inyección de RenCell-GFP-tGAS1) y 24 (día del sacrificio) usando el sistema de imagen IVIS. El volumen del tumor fue monitoreado con un vernier en los días 6,12, 19, 22 y 24 empleando la fórmula descrita previamente. Al final de los experimentos, día 24 post-implantación del tumor (día 17 post-inyección de las CTN), los tumores de

mama ortotópicos fueron cubiertos de la cámara IVIS con papel negro, para permitir la detección y cuantificación de la baja señal de luciferasa de las metástasis originadas en los diferentes grupos de ratones. Finalmente, se anestesió profundamente a los ratones, y los tumores y tejidos incluyendo pulmón, hueso, hígado, cerebro, bazo, riñón y corazón fueron colectados, homogenizados y procesados para ensayos de western blot y bioluminiscencia.

5.15) Western blot

Las proteínas totales de las células o de los tumores fueron extraídas usando un amortiguador de lisis que contiene un cocktail inhibidor de proteasas (Complete Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Las muestras se desnaturalizaron mediante ebullición durante 12 minutos y después se diluyeron 1:5 en amortiguador Laemmli con urea 5x. La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinonínico (Pierce, Rockford, IL, USA). 50 µg de proteínas totales por condición fueron separadas en geles al 12 % de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF (Amersham Bioscience)). La unión no específica se bloqueó incubando la membrana con 6% de caseína en solución de fosfato salina (PBS) 1x que contiene 0.1% de Tween 20, durante 1 h, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios contra GAS1 humano (1:1000, ProScience, Poway, CA) [68], actina (1:1000, Cell Signaling), t-ERK1/2 (1:1500, Cell Signaling), p-ERK1/2 (1:500, Cell Signaling), t-AKT (1:1000, Cell Signaling), p-AKT (1:500, Cell Signaling) y caspasa 3 humana (1:1000, Cell Signaling) durante toda la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron en tres ocasiones con PBS 1X y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (dilución 1:10,000) durante 1 h. Finalmente, las membranas se lavaron por tres ocasiones con PBS 1X, y las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia en un transiluminador (EC3 imaging system, UVP Bioimaging Systems). La densidad de la banda de las proteínas se cuantificó por densitometría (UVP Bioimaging Systems software).

5.16) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier

Se utilizó un total de 24 ratones hembra *nu/nu* de 6-8 semanas de edad, las cuales fueron inoculadas subcutáneamente con 1×10^5 células 4T1-fLuc-RFP en la cuarta glándula mamaria de los ratones. Después de una semana de crecimiento del tumor, los ratones fueron divididos aleatoriamente en tres grupos e inyectados vía intravenosa por la vena de la cola del ratón con 200 μ l de PBS para el primer grupo, 1×10^6 células ReNcell-GFP para el segundo grupo y 1×10^6 células ReNcell-GFP-tGAS1 para el tercer grupo. Para el día 10, a los tres grupos de ratones se les administró 50 mg/kg de tetraciclina vía intraperitoneal cada 2 días, un total de 7 veces (día 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22). Por último, los ratones fueron observados y censados hasta el día de su muerte. Cada grupo consistió de 8 animales.

5.17) Análisis estadístico

Diferencias entre las medias de dos diferentes grupos fueron analizadas usando la prueba t-Student. Para analizar las diferencias significativas entre tres grupos experimentales se utilizó la prueba One-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Para el análisis de crecimiento de tumor, los datos de la señal de luciferasa *in vivo* y el volumen de tumor con observaciones independientes a través del tiempo sobre la misma unidad experimental, fueron analizados usando el método parcelas divididas. De acuerdo al siguiente modelo de volumen de tumor $V_{i,j,k} = \mu + Tr_i + \epsilon_{ij} + t_k + [Tr * t]_{i,k} + \delta_{i,j,k}$, donde $\epsilon_{ij} \sim N[0, \sigma^2_{fp}]$, y $\delta_{i,j,k} \sim N[0, \sigma^2_{sp}]$ donde fp es full plot (parcela completa) y sp es split plot (parcelas divididas); los tratamientos [Tr] $i = 1, 2$ y 3 , representan PBS, GFP y tGAS1, las repeticiones $j = 1, 2, 3, 4$ y 5 , el tiempo $k = 6, 12, 19, 22$ y 24 días, las pruebas Duncan *post-hoc* se realizaron para mostrar las diferencias entre los tratamientos y la interacción tratamientos-tiempo. El análisis estadístico de los datos de supervivencia fue analizado usando la prueba log-rank seguido del método Holm-Sidak para pruebas de comparación múltiple por pares. Los resultados se consideraron significativamente diferente cuando $* p < 0.05$. Las pruebas se realizaron usando los programas NSCC y SPSS.

6) RESULTADOS

6.1) Caracterización molecular de la línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón

A partir del RNA total obtenido de la línea celular 4T1, se analizó la expresión de los mensajeros para los ligandos *GDNF* y *ARTN*, así como los receptores *GFR α 1*, *GFR α 3*, *RET* y *GAS1* mediante la RT-PCR. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa, donde se observaron fragmentos de 635, 186, 695, 303, 648 y 595 pb correspondientes a *GDNF*, *ARTN*, *GFR α 1*, *GFR α 3*, *RET* y *GAS1* respectivamente (Figura 3A). Mediante inmunofluorescencia se corroboró la expresión de las proteínas en la línea celular 4T1, donde se observó la expresión de GRF α 1, GFR α 3, RET, AKT y ERK1/2 (Figura 3B). Estos resultados indicaron que la línea celular 4T1 expresa *ARTN*, *GFR α 1*, *GFR α 3*, *RET*, *AKT* Y *ERK1/2* pero no expresa *GDNF* ni *GAS1*.

6.2) Obtención de la línea celular estable ReNcell-GFP-tGAS1

La línea celular progenitora neural humana ReNcell se infectó con tres diferentes plásmidos lentivirales pLenti6.3-RT (elemento represor de tetraciclina), pLenti6.3-tGAS1 (*GAS1* truncado) y pLenti6.3-GFP (proteína verde fluorescente), con lo que se obtuvo la línea celular estable ReNcell-GFP-tGAS1 (Figura 4). Las células ReNcell-GFP-tGAS1 se caracterizaron mediante inmunocitoquímica, en donde se observó la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) de forma constitutiva y únicamente la expresión de la proteína truncada *GAS1* (tGAS1) en presencia de tetraciclina (Figura 4A). A partir del RNA total obtenido de la línea celular ReNcell-GFP (control negativo), ReNcell-GFP-tGAS1 y C6-tGAS1 (control positivo), se amplificó el gen tGAS1 mediante la RT-PCR. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa, donde se observó un fragmento de 595 pb correspondiente a *GAS1* (Figura 4B). La expresión de la proteína tGAS1 se corroboró mediante Western blot en la línea celular ReNcell-GFP-tGAS1 en presencia de tetraciclina, donde se observó un fragmento de 37 KDa correspondiente a la proteína tGAS1. Como control positivo de la expresión de *GAS1* se

usó la línea celular SH-SY5Y incubada en ausencia de suero (Figura 4C). Este resultado demuestra la obtención de la línea celular estable ReNcell-GFP-tGAS1.

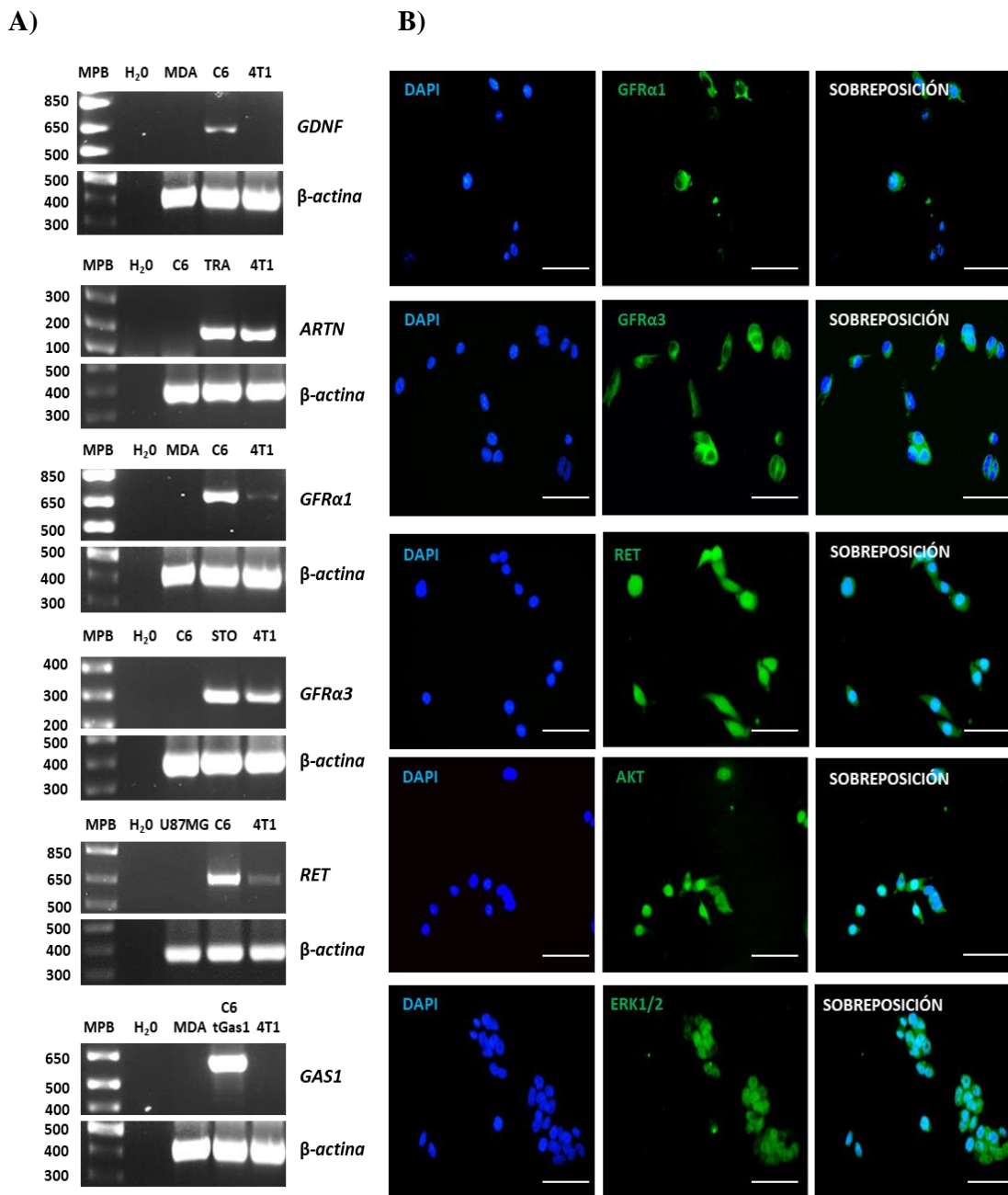
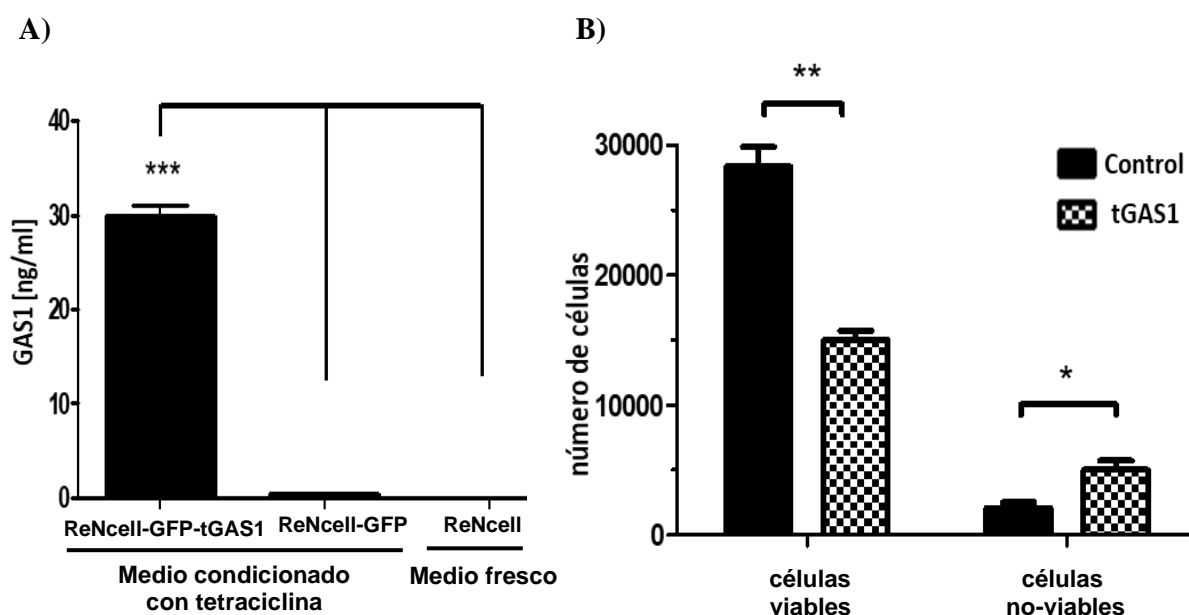


Figure 3. Caracterización molecular de la línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón. A. Productos amplificados para GDNF (635 pb), ARTN (186 pb), GFRα1 (695 pb), GFRα3 (303 pb), RET (648 pb), GAS1 (595 pb) y β-ACTINA (377 pb). Carril 1: marcador de pares de bases de 1000 pb. Carril 2: control negativo del producto de la RT-PCR, H₂O sin cDNA. Carril 3: células negativas al producto de la RT-PCR y carril 5: línea celular 4T1. **B.** Imágenes de epifluorescencia para GFRα1, GFRα3, RET, AKT y ERK1/2 (panel de en medio); los núcleos fueron teñidos con DAPI (panel izquierdo); y las imágenes con sobreposición muestran al núcleo y a la molécula de interés (panel derecho). Barra de calibración de 50 μm.

6.3) tGAS1 inhibe la proliferación de las líneas celulares ReNcell y 4T1

Para evaluar el efecto inhibitorio de tGAS1 sobre la división celular, primero se determinó la concentración de tGAS1 secretado al medio condicionado de la línea celular ReNcell-GFP-tGAS1 mediante la técnica de ELISA, donde se obtuvo una concentración de 28 ng/ml de tGAS1. Por el contrario, la presencia de la proteína tGAS1, no fue observada en las células ReNcell ni ReNcell-GFP aun en presencia de tetraciclina, debido a que estas células no secretan GAS1 (Figura 5A). Mediante la técnica de azul tripano se evaluó el efecto de tGAS1 tanto en las células ReNcell como 4T1. Se observó que el medio condicionado con tGAS1 inhibió la proliferación de las células ReNcell un 47% cuando comparamos con células ReNcell tratadas con medio condicionado sin tGAS1 (Figura 5B). Mientras que las células 4T1 tratadas con el medio condicionado que contiene tGAS1, mostró una inhibición en la proliferación celular hasta de un 85% cuando comparamos con células 4T1 tratadas con medio condicionado sin tGAS1 a las 72 h, sin embargo, aquí no se observó diferencia en la cantidad de células muertas cuando se sobreexpresó tGAS1 en comparación con el grupo control (Figura 5C). La actividad de caspasa-3 en la línea celular 4T1 tratada con el medio condicionado en presencia o ausencia de tGAS1 se evaluó mediante Western blot, donde se observó la ausencia de caspasa-3 activa en las células 4T1 tratadas con ambos medios, lo que indica que tGAS1 no mata a las células 4T1. Como control positivo de la actividad de caspasa-3 se utilizó estaurosporina (Figura 5D).



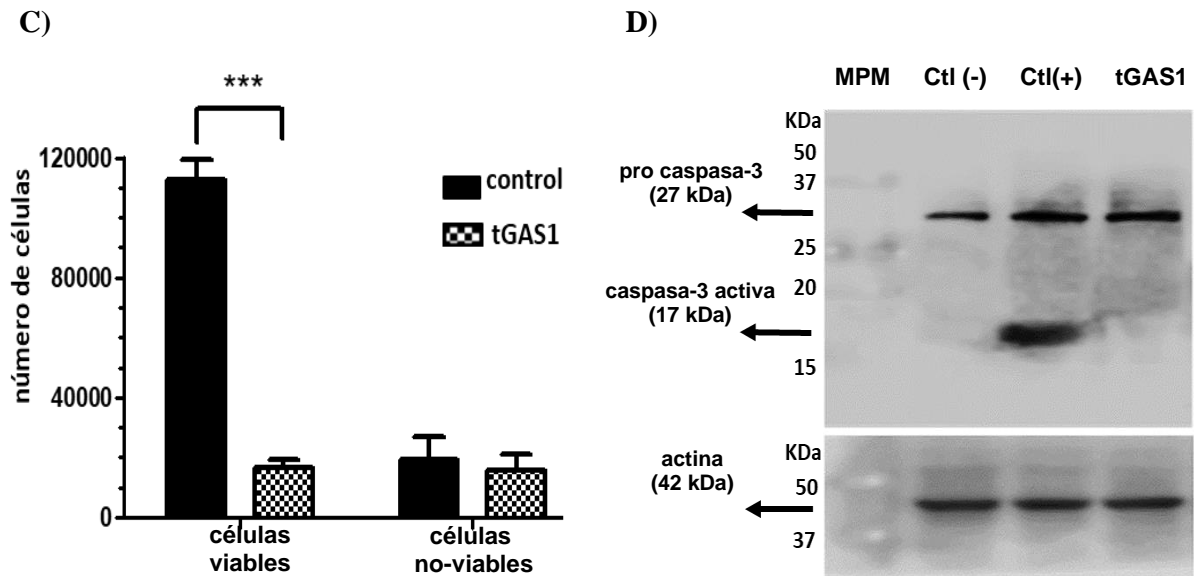


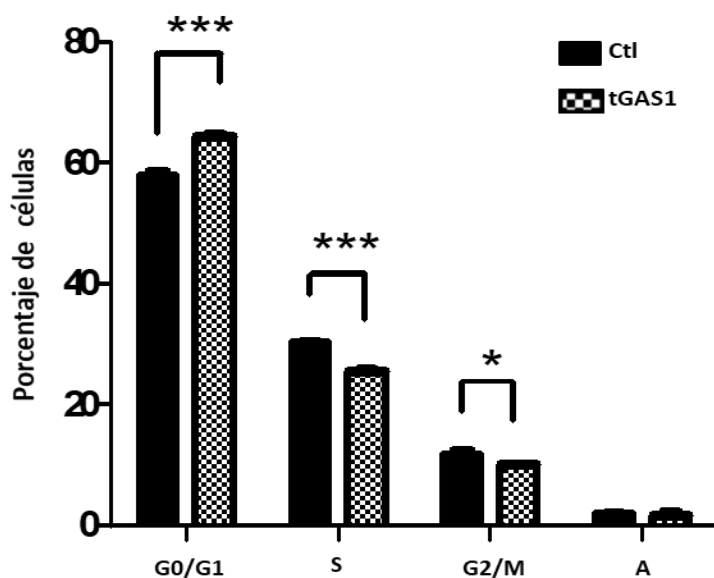
Figura 5. Evaluación del efecto inhibitorio de tGAS1 sobre la proliferación celular. A. Concentración de tGAS1 soluble por ELISA, a partir del medio condicionado de las células ReNcell-GFP y ReNcell-GFP-tGAS1 después de 48 h de cultivo en presencia de tetraciclina. El medio fresco ReNcell se usó como control negativo para el ELISA. **B.** La línea celular ReNcell mostró inhibición en la proliferación celular al ser tratada con el medio condicionado tGAS1 por 72 h mediante la técnica de azul tripano. **C.** Las células 4T1 tratadas con el medio condicionado con tGAS1, inhibió un 85% el número de células viables cuando comparamos con células 4T1 tratadas con medio condicionado sin tGAS1. **D.** La línea celular 4T1 tratada con el medio condicionado en presencia y/o ausencia de tGAS1 mostró falta de actividad de caspasa-3. Como control positivo de caspasa-3 activa se utilizó estaurosporina a una concentración de 1 μ M. Los resultados se analizaron utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey y t de Student, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Las barras representan la media \pm la media del error estándar $n=3$ por grupo.

6.4) tGAS1 induce arresto celular en células 4T1 al atenuar la fosforilación de AKT y ERK1/2

Para determinar si la inhibición en la proliferación de las células 4T1 se debe a la detención del ciclo celular, se midió por citometría de flujo la incorporación de yoduro de propidio. Los resultados mostraron un aumento en el porcentaje de células en la fase G0/G1 del ciclo celular y una reducción en las fases S y G2/M en las células 4T1 tratadas con tGAS1, cuando comparamos con las células 4T1 tratadas con medio condicionado sin tGAS1 (Figura 6A). Para evaluar el mecanismo molecular por el cual tGAS1 inhibe la proliferación de la línea celular 4T1 se evaluó la expresión de AKT y ERK1/2 mediante Western blot, donde se observó una reducción significativa en los niveles de fosforilación de AKT y ERK1/2 únicamente en las células 4T1 tratadas con medio condicionado con

tGAS1, y no así en las mismas células tratadas con medio condicionado sin tGAS1 (Figura 6B).

A)



B)

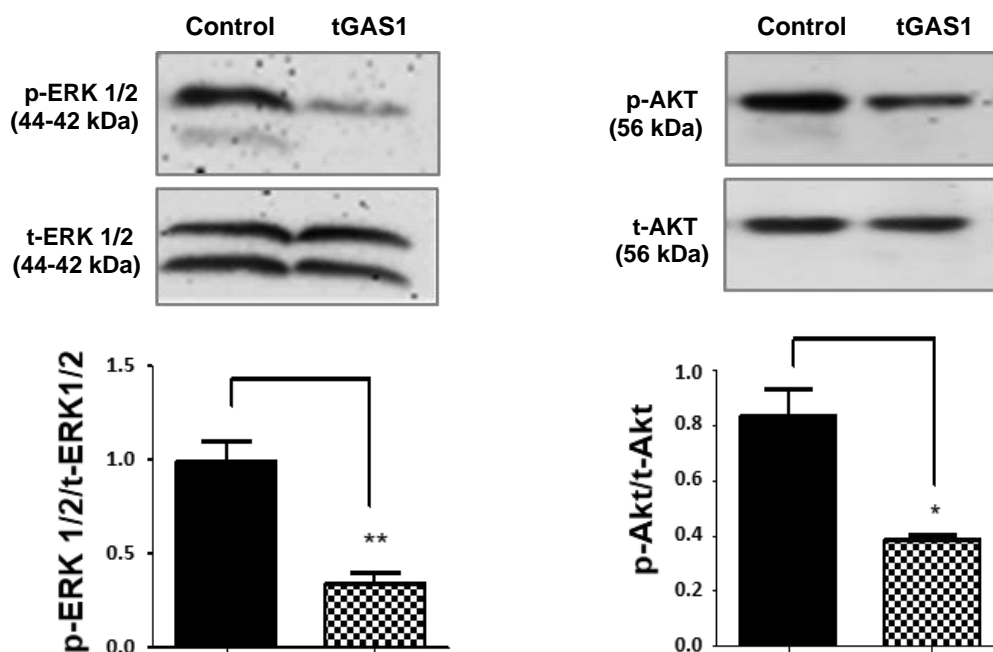


Figura 6. tGAS1 induce arresto celular al decrecer los niveles de p-AKT y p-ERK1/2 en las células 4T1. A. Análisis del ciclo celular en las células 4T1 tratadas con medio condicionado con y sin tGAS1 (n=3). **B.** Análisis densitométrico de p-ERK1/2 normalizado con ERK1/2 total, y p-AKT normalizado con AKT total (n=3). Las barras negras representan las células en ausencia de tGAS1 (control) y las barras grises en presencia de tGAS1. t de Student, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

6.5) Obtención de la línea celular estable 4T1-fLuc-RFP

La línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón, se co-transfectó por lipofección con los plásmidos pDsRed1-N1 y pCMV-fLuc, en donde se observó de manera selectiva tanto la expresión de la proteína roja fluorescente (Figura 7A), como la proteína luciferasa de luciérnaga únicamente en las células transfectadas, y no así en las mismas células 4T1 sin transfectar (control negativo) (Figura 7B). Una relación lineal entre el número de células y la señal de luciferasa fue medida para determinar las Unidades Relativas de Bioluminiscencia (URL), donde se observó que a mayor número de células 4T1-fLuc-RFP mayor intensidad en la señal de luciferasa, comparado con las células 4T1 sin transfectar (Figura 7C). Este resultado muestra la obtención de la línea celular 4T1-fLuc-RFP.

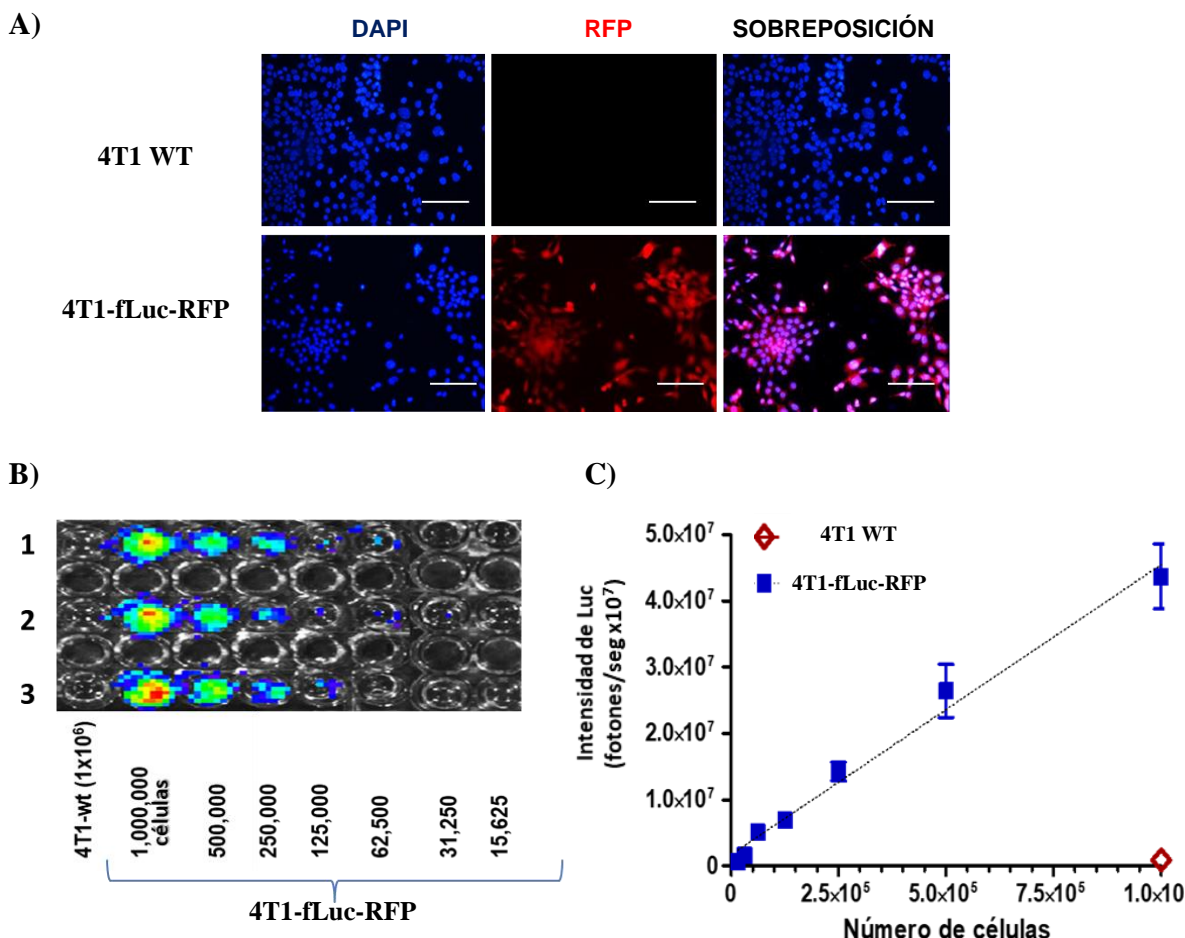


Figura 7. Expresión de las proteínas RFP y luciferasa en células 4T1 transfectadas con los plásmidos pDsRed1-N1 y pCMV-fLuc. A. Mediante epifluorescencia se observa la expresión de la proteína roja fluorescente únicamente en la línea celular 4T1 transfectada. **B-C.** Con el sustrato D-luciferina se observa la expresión de la luciferasa únicamente en las células 4T1-fLuc-RFP, y no así en las células 4T1 sin transfectar. Barra de calibración de 50 μ m.

6.6) Establecimiento del modelo de cáncer de mama metastásico en ratones *nu/nu*

Para establecer el modelo de cáncer de mama metastásico, se inocularon células 4T1-WT y 4T1-fLuc-RFP en ratones hembra inmunosuprimidos y se monitorearon con un sistema de imagen *in vivo* (IVIS), donde se observó un aumento en la señal de bioluminiscencia a los 9, 18 y 24 días en los ratones inyectados con las células 4T1-fLuc-RFP, pero no así en los ratones inyectados con células 4T1 WT (control negativo). Interesantemente, en los ratones inyectados con las células 4T1-fLuc-RFP, se observó señal de bioluminiscencia tanto en la mama como en la parte ventral superior del ratón en el día 24, lo que indica la formación de metástasis (Figura 8A). Un análisis cuantitativo de la señal de luciferasa en el tumor primario de los ratones inyectados con las células 4T1-fLuc-RFP se realizó en los días antes mencionados, donde se observó un aumento de la intensidad de luminiscencia con respecto al tiempo, cuando comparamos con ratones inyectados con las células 4T1-WT (Figura 8B).

Para confirmar que las células 4T1-fLuc-RFP fueron diseminadas del sitio de inoculación a los pulmones, se extrajeron y analizaron los pulmones de los ratones al día 24, donde se observó señal de bioluminiscencia únicamente en los pulmones de los ratones inyectados con las células 4T1-fLuc-RFP, comparado con los pulmones de los ratones inoculados con células 4T1 WT (Figura 8C). Una diferencia estadísticamente significativa en la señal de luciferasa fue observada en los pulmones de los ratones inyectados con las células 4T1-fLuc-RFP, cuando comparamos con el control negativo (Figura 8D).

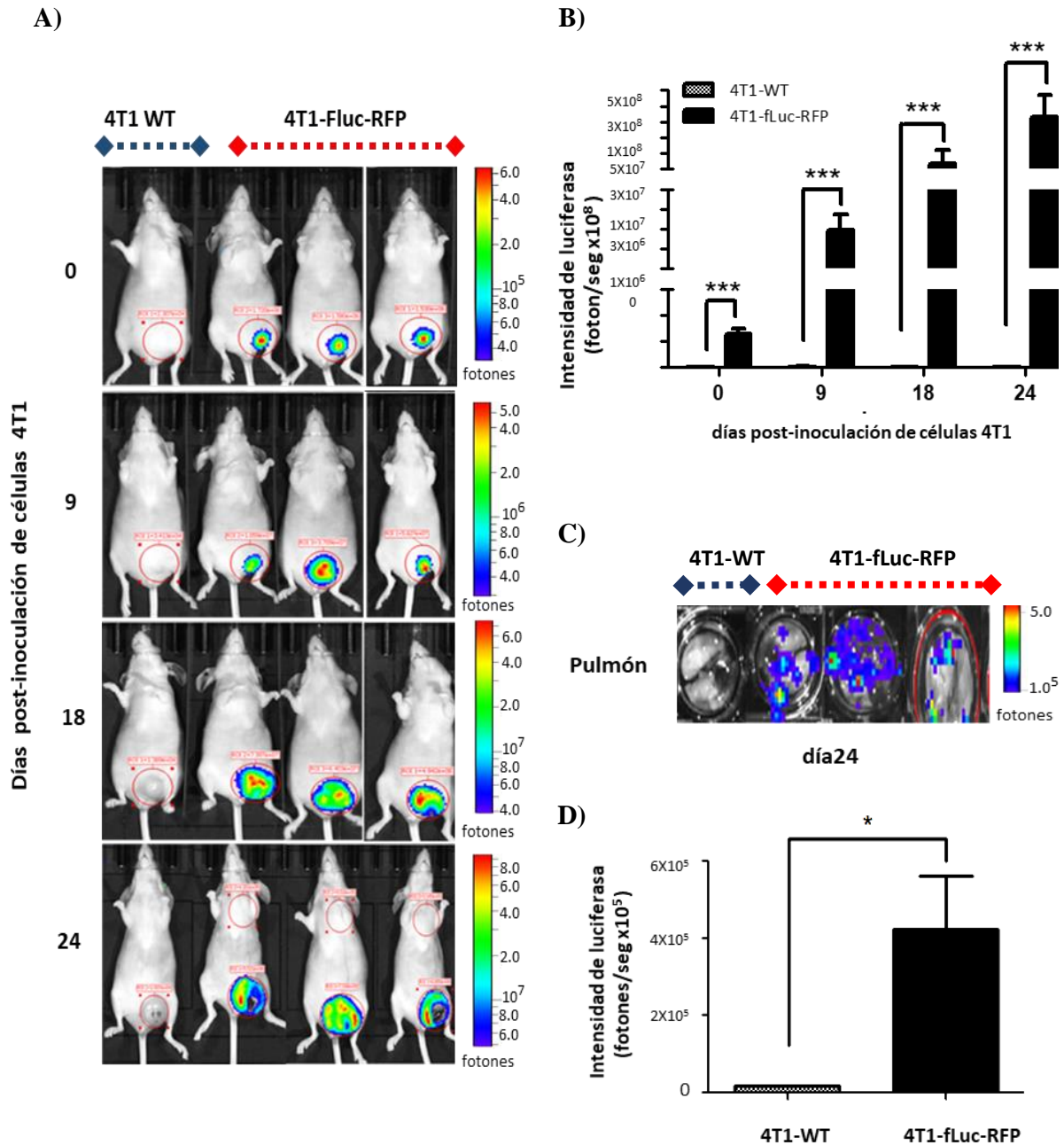


Figura 8. Expresión de las proteínas RFP y luciferasa en ratones desnudos *nu/nu* inoculados con células 4T1-WT y 4T1-fLuc-RFP. **A.** Ratones inoculados con células 4T1-WT (panel izquierdo) y 4T1-fLuc-RFP (panel derecho), donde se observa un aumento en el tamaño del tumor y en la señal de bioluminiscencia con respecto al tiempo. **B.** Análisis cuantitativo de la señal de luciferasa en los tumores primarios de mama en los días 0, 9, 18 y 24. **C.** Imagen de pulmones *ex vivo* al día 24 post- inoculación de las células tumorales. **D.** Análisis cuantitativo de la señal de luciferasa en los pulmones de los ratones en el día 24. t de Student * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Las barras representan la media \pm la media del error estándar $n=5$ por grupo.

Para corroborar la formación de metástasis se analizó por inmunohistoquímica la expresión de la proteína RFP, en los principales órganos de los ratones inyectados con las células 4T1-fLuc-RFP, donde se observó únicamente expresión de la proteína RFP en el tumor de mama y en el pulmón, pero no en el hígado, cerebro ni bazo de esos ratones, lo que demostró la generación de metástasis a pulmón al día 24 (Figura 9A).

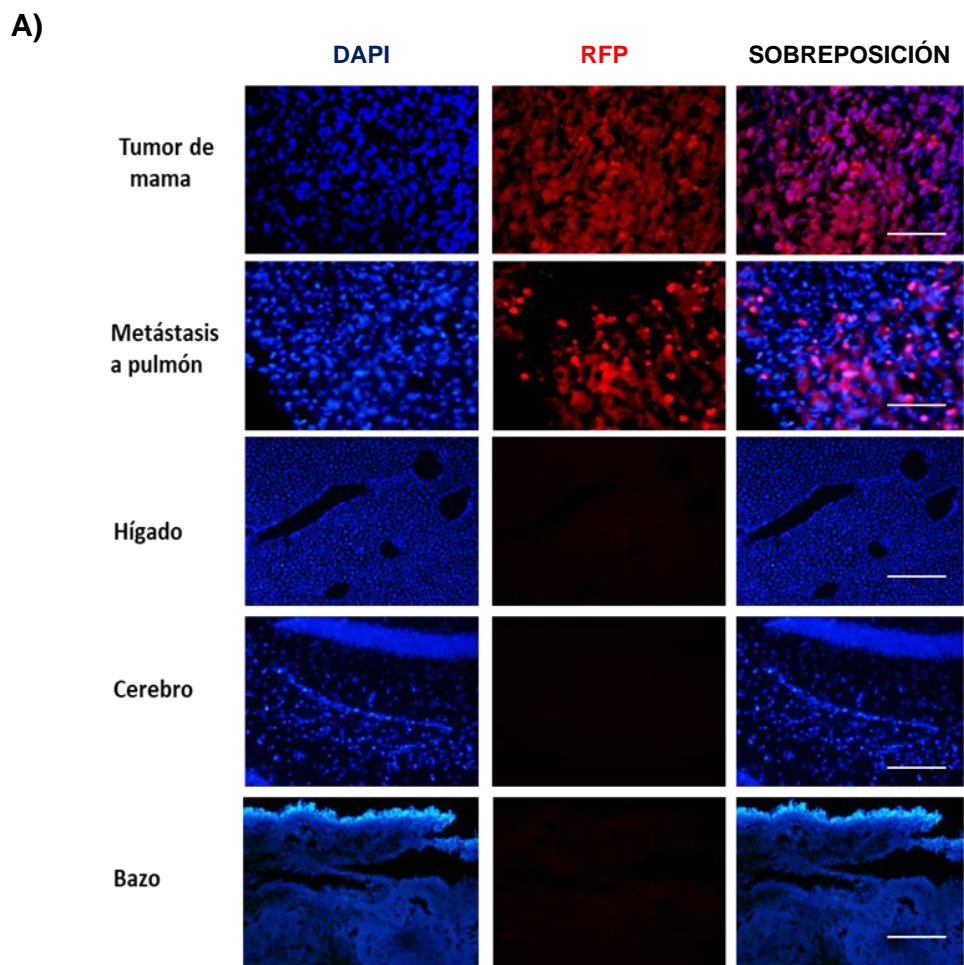
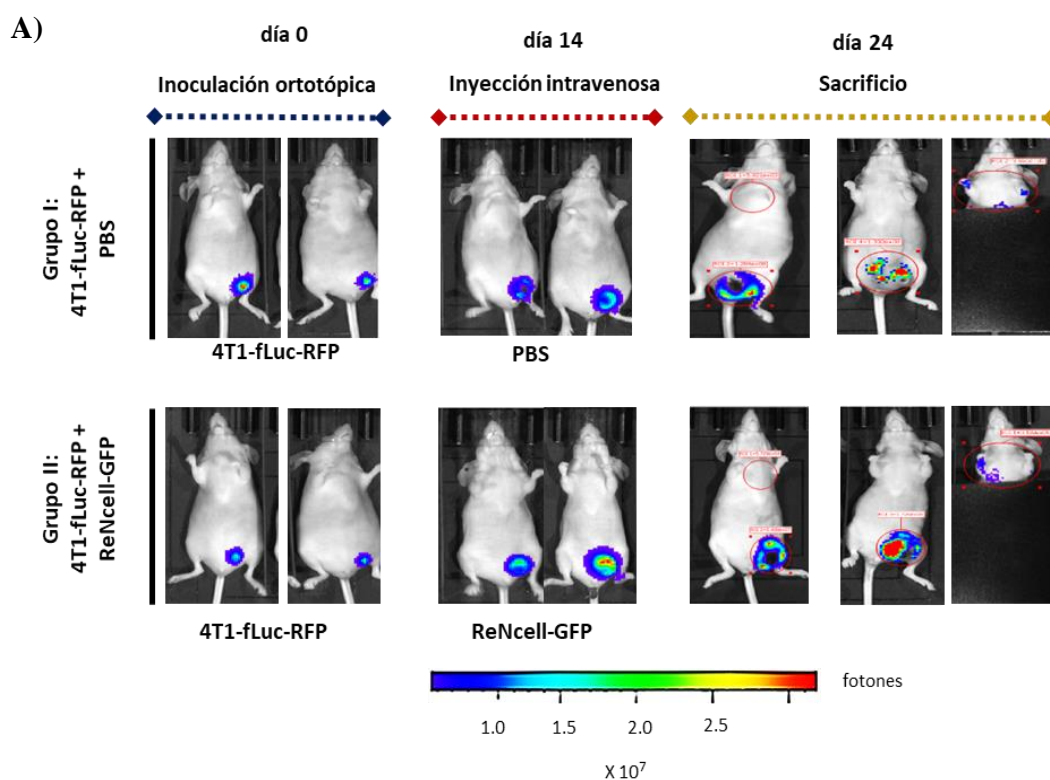


Figura 9. Expresión de la proteína RFP en órganos internos de ratones inoculados con 4T1-fLuc-RFP. A. Inmunohistofluorescencia de órganos internos de los ratones, donde se observa expresión de la RFP en la mama y el pulmón de ratones inoculados con células 4T1-fLuc-RFP. Barra de calibración de 50 μ m.

6.7) Tropismo de las células troncales neurales ReNcell-GFP a los sitios del tumor

Para determinar si las CTN podían migrar hacia el sitio del tumor primario o a las metástasis, se implantaron de manera ortotópica células 4T1-fLuc-RFP en la mama de los ratones *nu/nu* (Figura 10A), 14 días después los ratones se dividieron en dos grupos y fueron inyectados en la vena de la cola. El primer grupo se inyectó únicamente con PBS (vehículo), mientras que el segundo grupo fue inyectado con células ReNcell-GFP resuspendidas en PBS (Figura 10A). Veinticuatro días después de la implantación de las células 4T1-fLuc-RFP (10 días post-inyección de las células ReNcell-GFP), se observó por bioluminiscencia el crecimiento del tumor y la formación de metástasis en ambos grupos de ratones (Figura 10A).

Finalmente, los animales fueron anestesiados profundamente en el día 24 post-implantación de las células 4T1-fLuc-RFP, y los tejidos de tumor de mama y pulmón de ambos grupos de ratones se colectaron y procesaron para su análisis por inmunofluorescencia, donde se observó tanto la expresión de la proteínas RFP como GFP en los tumores de mama y pulmón de los ratones inyectados con las células ReNcell-GFP (panel inferior), cuando comparamos con los tumores de mama y pulmón de ratones inyectados con PBS donde únicamente se expresó la proteína RFP (panel superior) (Figura 10B). Estos resultados indican la capacidad de las CTN de migrar tanto al tumor primario de la mama como a la metástasis a pulmón.



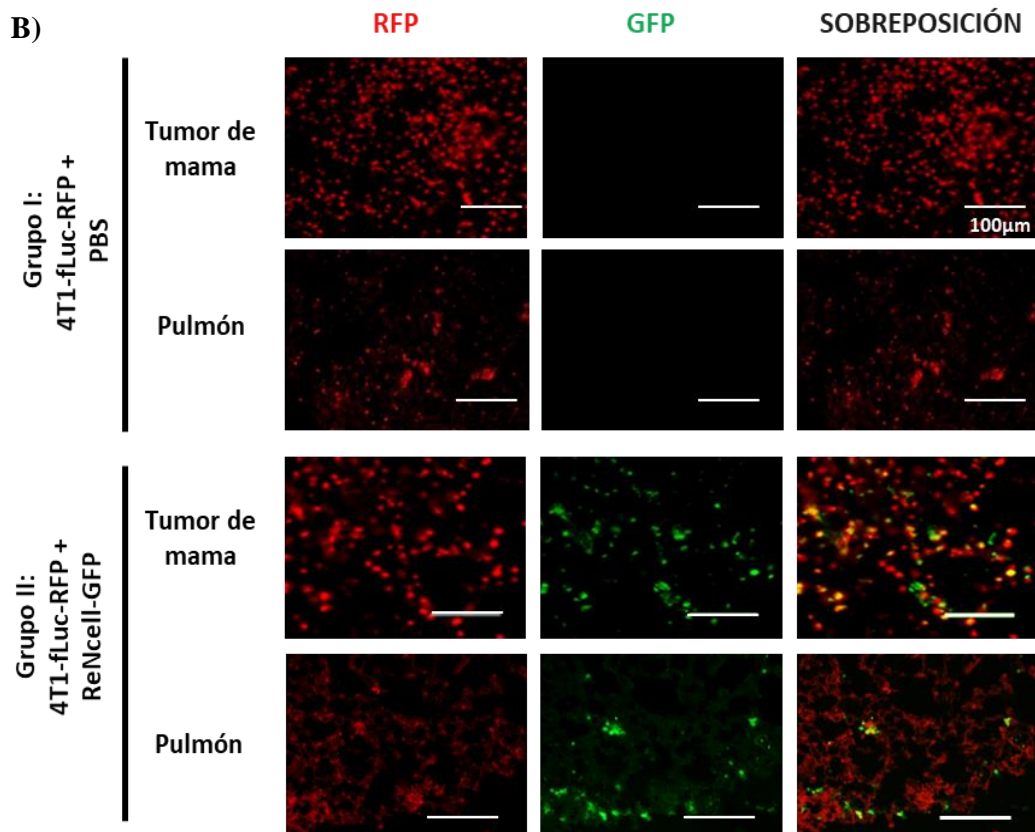


Figura 10. Expresión de las proteínas luciferasa, RFP y GFP en ratones desnudos. A. Ratones inoculados con células 4T1-fLuc-RFP, donde se observa un aumento en la señal de bioluminiscencia con formación de metástasis en ambos grupos de ratones al día 24. **B.** Imagen de microscopía de epifluorescencia donde se observa la expresión de la proteína RFP y GFP tanto en el tumor primario de la mama como en el pulmón del segundo grupo de ratones inoculados con células ReNcell-GFP, comparado con en el primer grupo de ratones inyectados con PBS. Barra de calibración de 50 μm .

6.8) Distribución *in vivo* de células troncales neurales ReNcell-fLuc en ratones desnudos sin tumor

Para investigar la distribución *in vivo* de las CTN inyectadas vía sistémica en ratones desnudos sin tumor, se inyectaron por la vena de la cola del ratón 1×10^6 células ReNcell-fLuc. Los ratones se monitorearon en los días 0 y 3 en un sistema de imagen *in vivo* (IVIS) (Perkin-Elmer, USA), donde se observó señal de bioluminiscencia en los pulmones de los ratones sanos al día 0 post-inyección de las células ReNcell-fLuc comparado con el día 3 (Figura 11A). Finalmente, los animales fueron anestesiados profundamente (día 3 post-inyección de las células ReNcell-fLuc), y los órganos de los ratones se colectaron y monitorearon en el sistema de imagen *in vivo* (IVIS) para la detección de luciferasa, donde se observó la ausencia de luciferasa en los tejidos de los ratones sanos al día 3 post-

inyección de las células ReNcell-fLuc (Figura 11B). Estos resultados indican que las CTN son eliminadas en los ratones sin tumor.

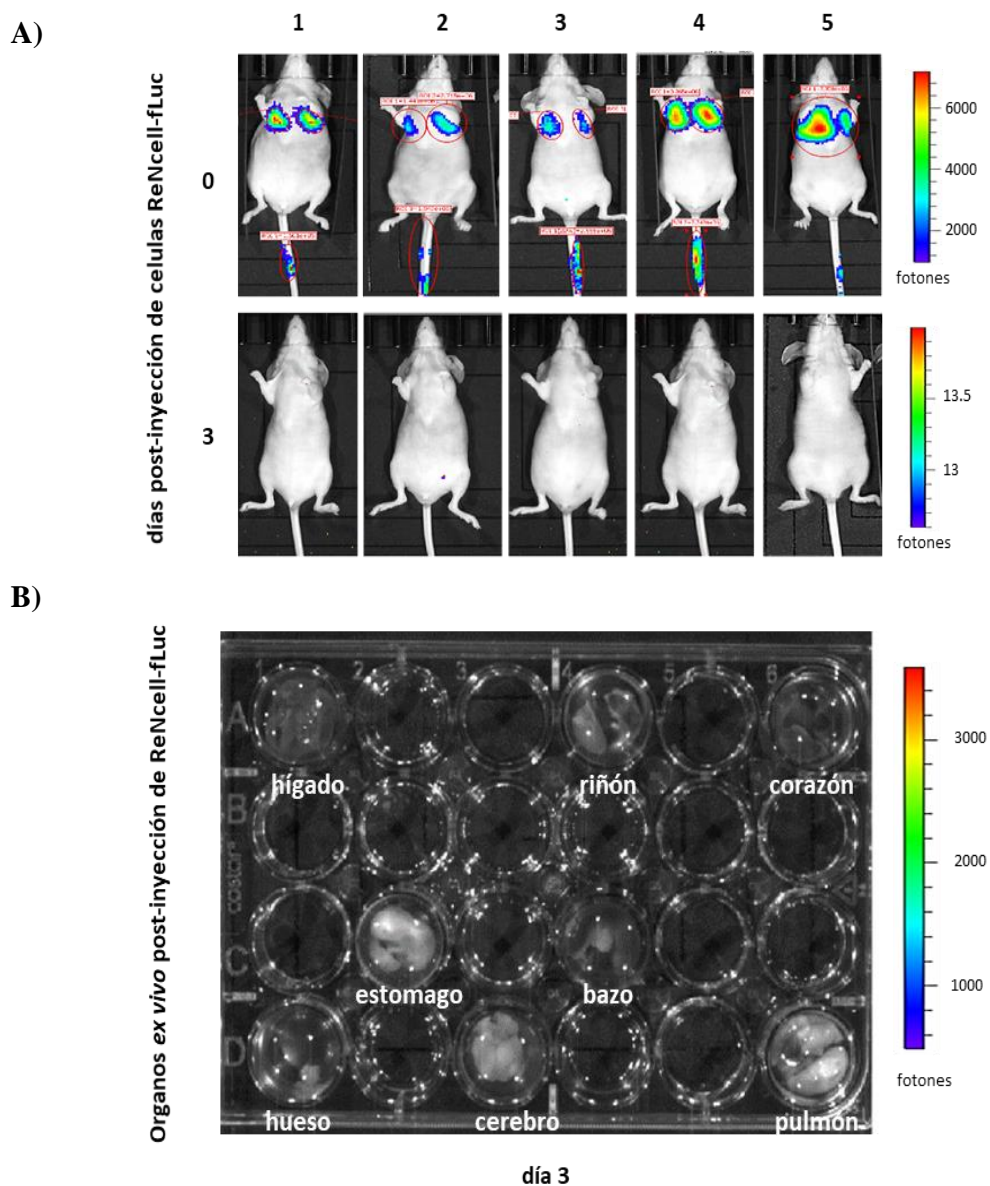


Figura 11. Distribución de células troncales ReNcell-fLuc en ratones sin tumor. A. Ratones inyectados vía sistémica con células ReNcell-fLuc, donde se observa señal de bioluminiscencia en los pulmones a los 20 min post-inyección de las células (panel superior) pero no así al día 3 (panel inferior). B. Análisis de la señal de luciferasa en los diferentes órganos de los ratones al día 3 post-inyección de las células ReNcell-fLuc donde se muestra que las células troncales bioluminiscentes son eliminadas en ausencia del tumor. Los órganos *ex vivo* de los ratones van de la parte superior izquierda a la parte inferior derecha: hígado, riñón, corazón, estomago, bazo, hueso, cerebro y pulmón.

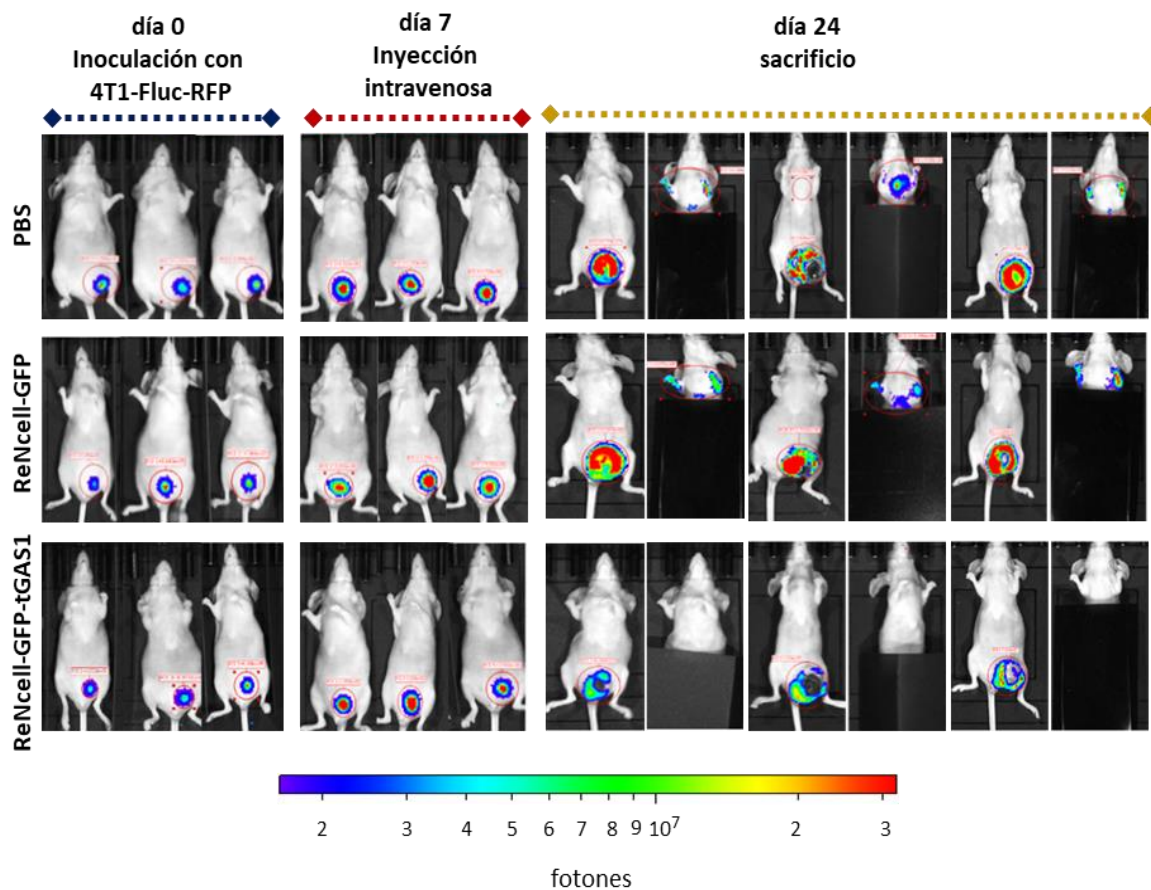
6.9) ReNcell-GFP-tGAS1 inhibe el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis

Para investigar si las células troncales ReNcell pueden mediar la entrega de tGAS1 en el sitio del tumor, se implantaron células 4T1-fLuc-RFP en la cuarta mama de los ratones, después de siete días se dividió a los ratones en tres grupos y se inyectaron por la vena de la cola: El primer grupo fue inyectado con PBS, el segundo grupo se inyectó con células ReNcell-GFP y el tercer grupo fue inyectado con células ReNcell-GFP-tGAS1, donde se observó un incremento gradual en la señal de luciferasa a los 7 y 24 días post-inoculación de las células 4T1-fLuc-RFP en los diferentes grupos de ratones. Interesantemente, los niveles más bajos de luciferasa fueron observados en los tumores de mama tratados con ReNcell-GFP-tGAS1 cuando los comparamos con los otros dos grupos control (PBS y ReNcell-GFP) (Figura 12A). Veinticuatro días después de la implantación de las células 4T1-fLuc-RFP (14 días post-inyección de PBS, ReNcell-GFP o ReNcell-GFP-tGAS1), se cubrieron los tumores de mama para detectar la baja señal bioluminiscente en los diferentes grupos de ratones, donde se observó que no hubo señal de luciferasa en el tórax de los ratones tratados con tGAS1 comparado con los otros dos grupos experimentales (Figura 12A). Un análisis cuantitativo de la señal de luciferasa, indicativo del tamaño del tumor demostró que las células ReNcell-GFP-tGAS1 atenuaron de manera significativa el crecimiento del tumor de mama, cuando comparamos con los otros dos grupos control (PBS o GFP) (Figura 12B). Asimismo, no observamos formación de metástasis distante en los ratones tratados con tGAS1 cuando se cuantificó la intensidad de luciferasa en el tórax de los tres grupos de ratones (Figura 12C).

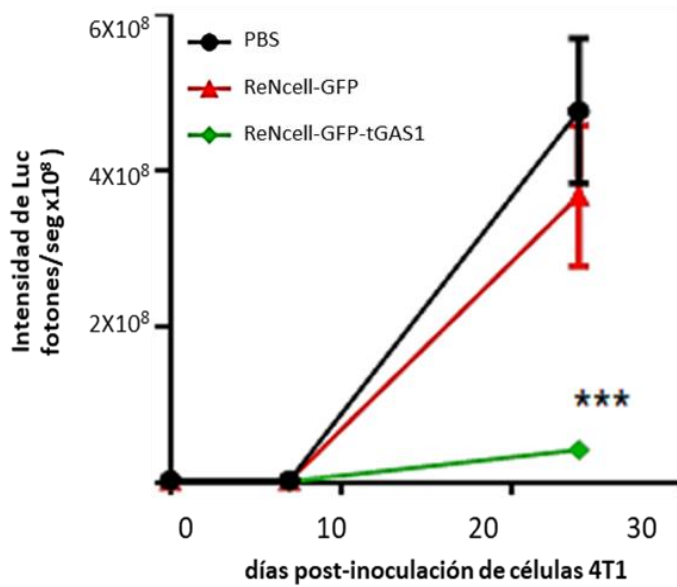
Además de los resultados de bioluminiscencia, se evaluó el volumen de los tumores primarios en los tres grupos de ratones inoculados con células 4T1-fLuc-RFP, donde se observó que los ratones tratados con células ReNcell-GFP-tGAS1 en combinación con tetraciclina mostraron una inhibición significativa en el tamaño de los tumores de mama en los días 22 y 24, cuando comparamos con los ratones inyectados con células ReNcell-GFP o PBS en presencia de tetraciclina (Figura 12D). Al finalizar el seguimiento de los ratones (día 24 post-implantación de las células 4T1-fLuc-RFP), los animales fueron anestesiados profundamente y los tumores de mama de los tres grupos de ratones fueron colectados y pesados, donde se observó que los ratones tratados con ReNcell-GFP-tGAS1 en

combinación con tetraciclina presentaron tumores con una menor masa de tejido que los grupos control, siendo estadísticamente significativa la diferencia (Figura 12E).

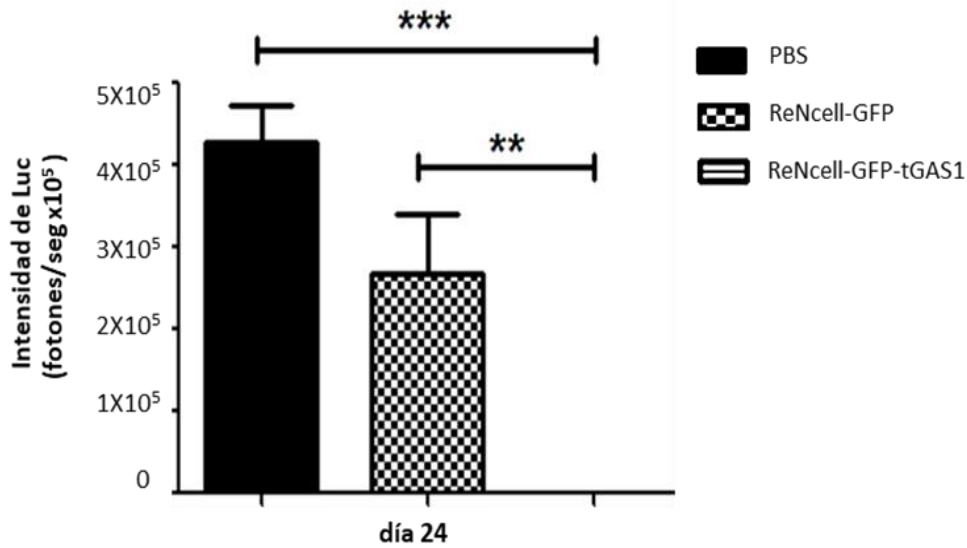
A)



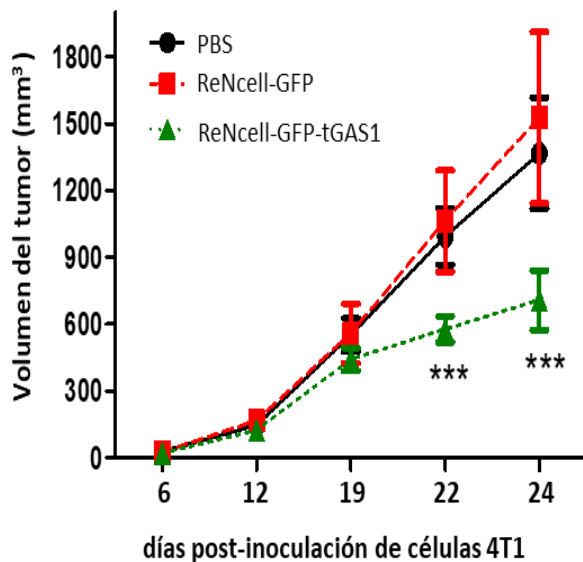
B)



C)



D)



E)

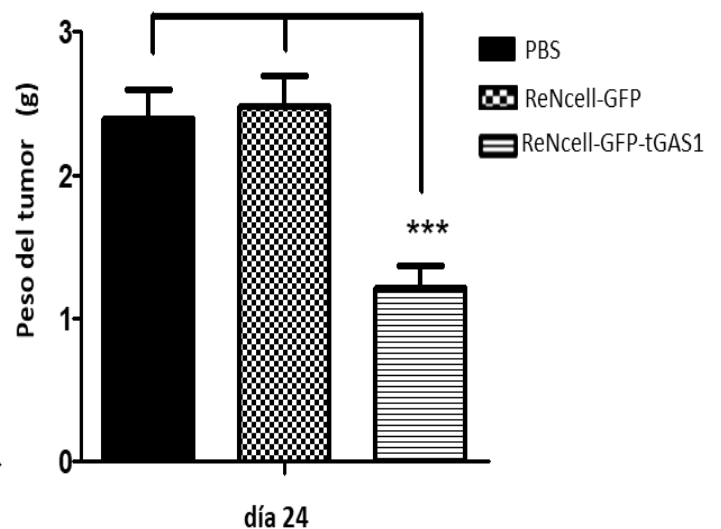


Figura 12. tGAS1 atenúa el crecimiento del tumor primario y la metástasis en ratones con formación de tumor. **A.** Imágenes representativas de los tres grupos de ratones a los 0, 7 y 24 días post-inyección de las células 4T1-fLuc-RFP, empleando el sistema de imagen *in vivo*. En el día 24 los tumores primarios se cubrieron para detectar bajas señales de metástasis en los diferentes grupos de ratones. **B.** Análisis cuantitativo de la señal de luciferasa en los tumores de mama de los tres grupos experimentales en los 0, 7 y 24 días. **C.** Análisis comparativo de la intensidad de luciferasa en la parte ventral superior de los ratones al día 24. **D.** Crecimiento de tumores ortotópicos con los diferentes tratamientos. **E.** Comparación del peso de los tumores de mama en los diferentes grupos. Los resultados se analizaron utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Las barras representan la media \pm la media del error estándar.

Adicionalmente el pulmón, fémur, hígado, cerebro, bazo, riñón y corazón de los tres grupos de ratones fueron colectados y analizados, donde se observó señal de luciferasa en los pulmones y fémur de los ratones tratados con PBS o ReNcell-GFP, mientras que en los órganos de los ratones con el tratamiento ReNcell-GFP-tGAS1 no se detectó señal de luciferasa en el día 24 (Figura 13). Lo que indica que el tratamiento con células ReNcell-GFP-tGAS1 inhibió el crecimiento del tumor primario atenuando la formación de metástasis en esos órganos.

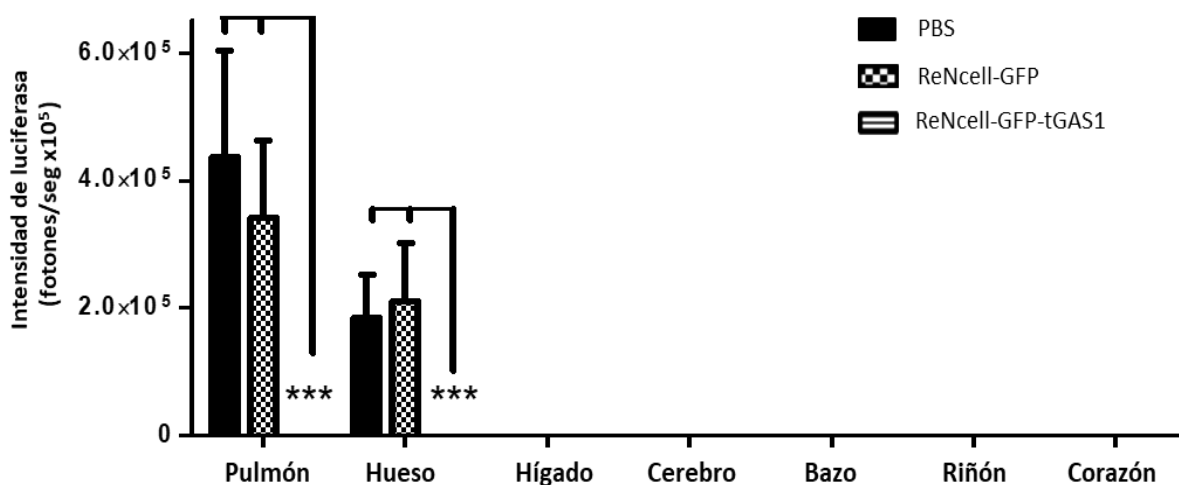


Figura 13. tGAS1 inhibe la formación de metástasis en los ratones con tumor. Análisis cuantitativo de la señal de luciferasa de los diferentes órganos colectados *post-mortem* al día 24 en los tres grupos experimentales. De izquierda a derecha: pulmón, fémur, hígado, cerebro, bazo, riñón y corazón. Los resultados se analizaron utilizando un ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey *** $P \leq 0.001$. Las barras representan la media \pm la media del error estándar.

Para corroborar que las células ReNcell-GFP-tGAS1 migraron al tumor de mama y expresaron tGAS1 después de la administración de tetraciclina, se realizaron ensayos de Western blot en los tumores de mama de los diferentes grupos experimentales, donde se observó la expresión de tGAS1 únicamente en los tumores de mama de los ratones tratados con las células ReNcell-GFP-tGAS1 cuando comparamos con los grupos PBS o ReNcell-GFP (Figura 14A). Asimismo, se observó que únicamente los tumores de mama tratados con ReNcell-GFP-tGAS1, redujeron los niveles de fosforilación de AKT y ERK1/2 comparado con los tumores de los ratones tratados con PBS o ReNcell-GFP (Figura 14B). Estos resultados indican que el tratamiento con ReNcell-GFP-tGAS1 inhibió el crecimiento

del tumor de mama, y se correlaciona con la disminución de la fosforilación de AKT y ERK1/2 en un modelo de cáncer de mama triple negativo.

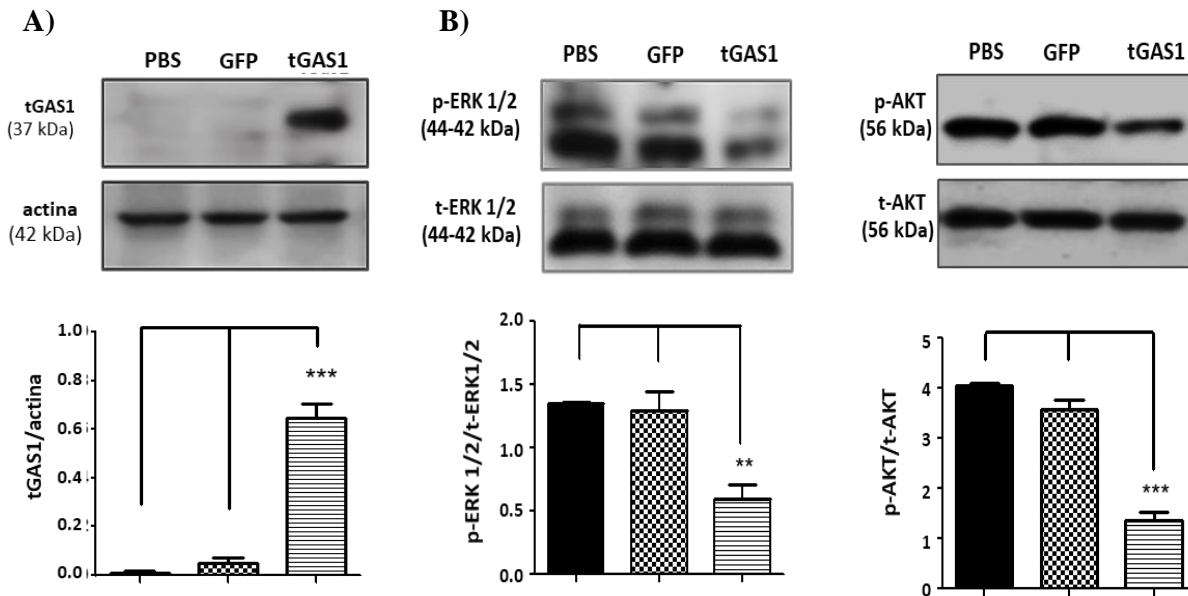


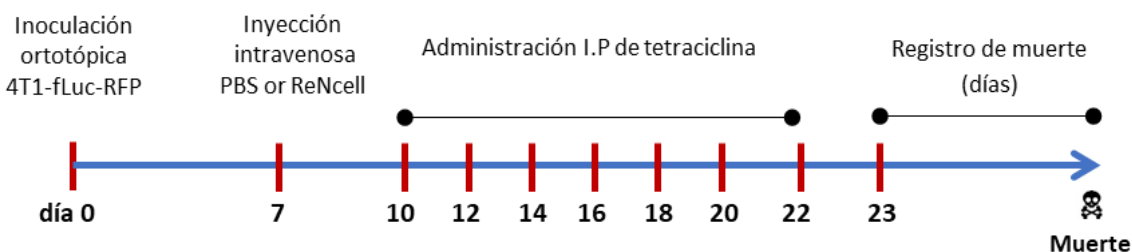
Figura 14. La expresión de tGAS1 atenúa los niveles de p-ERK1/2 y p-AKT en los tumores de mama. A. Expresión de tGAS1 (normalizado con actina). B. Análisis densitométrico de p-ERK1/2 y p-AKT (normalizados con ERK1/2 y AKT total, respectivamente.) de los tumores de mama de los tres grupos experimentales. Las barras representan la media \pm la media del error estándar. Los resultados se analizaron utilizando ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

6.10) tGAS1 promueve la supervivencia de los ratones con cáncer de mama

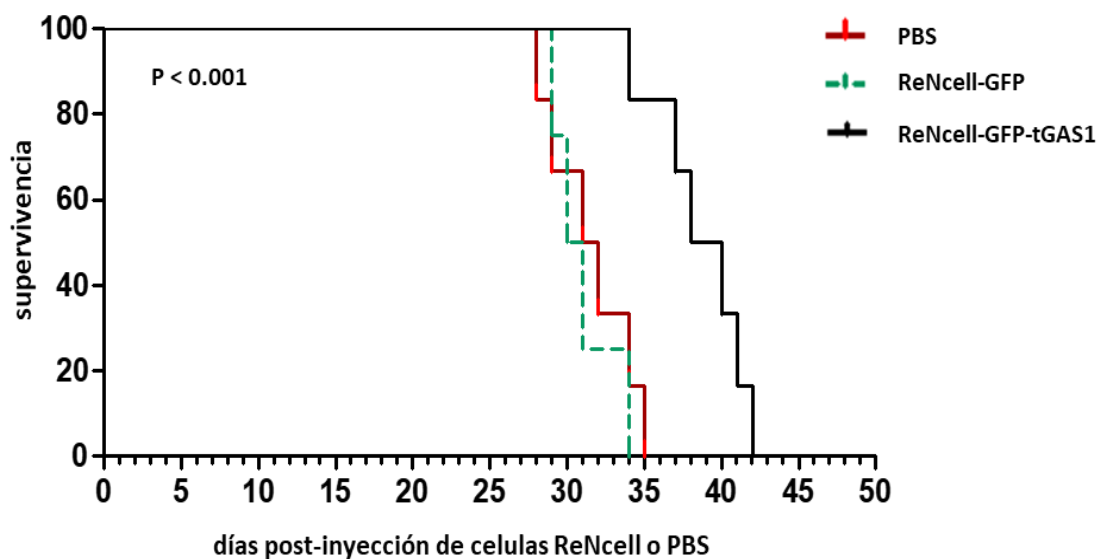
Para evaluar el potencial de la terapia génica mediada por las células ReNcell-GFP-tGAS1 en la supervivencia de los ratones con cáncer de mama triple negativo, se construyó una curva de supervivencia de Kaplan-Meier. Para ello, se implantaron células 4T1-fLuc-RFP de manera ortotópica en ratones desnudos hembra, y una semana después, los ratones se dividieron en tres grupos que fueron inyectados por la vena de la cola con PBS, ReNcell-GFP y ReNcell-GFP-tGAS1 respectivamente (n=8 ratones por grupo). Tres días después de la inyección intravenosa (día 10 post-inoculación de 4T1-fLuc-RFP), a todos los ratones se les administró tetraciclina intraperitonealmente cada 2 días por siete veces (día 10 al 22). En el día veintitrés los ratones no recibieron más tratamiento y el tiempo de muerte se registró para cada animal (Figura 15A), donde se observó que el último ratón tratado con ReNcell-GFP-tGAS1 murió hasta el día 42 mostrando una diferencia significativa con

respecto a los grupos control tratados con PBS o ReNcell-GFP (Figura 15B). Un análisis cuantitativo del tiempo de supervivencia de los ratones fue realizado empleando los resultados de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, donde se observó que la media de supervivencia fue de 30 y 31 días para los ratones tratados con ReNcell-GFP y PBS respectivamente, y de 39 días para el grupo de ratones tratados con ReNcell-GFP-tGAS1. Lo que indica que el tiempo de supervivencia de los ratones tratados con tGAS1 incrementó 8 días comparado con los grupos control los cuales no difirieron entre ellos (Figura 15C).

A)



B)



C)

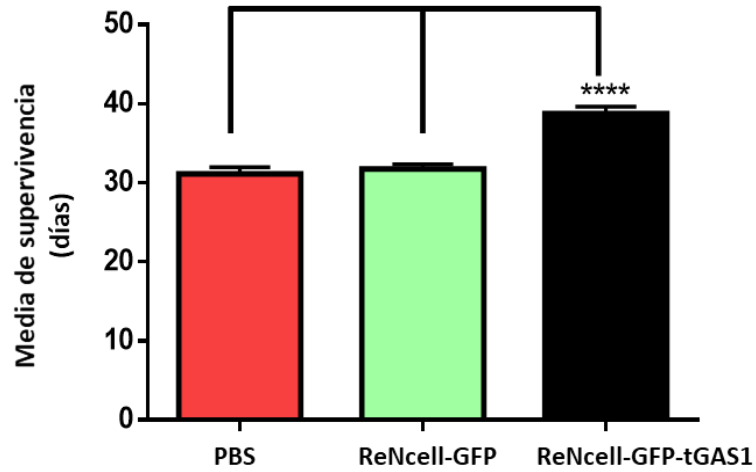


Figura 15. tGAS1 aumenta la supervivencia de los ratones con formación de tumor. A. Esquema general que abarca desde el momento de implantación de las células 4T1-fLuc-RFP hasta su registro de muerte, de los diferentes grupos experimentales. **B.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier, donde se observa que los ratones inyectados con las células ReNcell-GFP-tGAS1, muestran un periodo de supervivencia más largo que los grupos control (ReNcell-GFP o PBS). **C.** Análisis comparativo de la media de supervivencia de los tres grupos experimentales. Los resultados se analizaron utilizando la prueba log-rank, y ANOVA de una vía seguido de la prueba Tukey **** $P \leq 0.0001$.

7) DISCUSIÓN

El cáncer de mama metastásico es la principal causa de muerte de pacientes con cáncer de mama, lo que representa un importante problema de salud pública a nivel mundial [1]. A pesar del amplio conocimiento sobre las bases genéticas y los mecanismos moleculares de la enfermedad estos han sido insuficientes para mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con subtipo triple negativo. Por tanto, la falta de terapias exitosas para el cáncer de mama con el subtipo triple negativo demanda el uso de nuevas moléculas con actividad antitumoral y antimetastásica.

tGAS1 es una proteína que puede inducir arresto celular y apoptosis en diferentes tipos de cáncer, incluyendo glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de mama triple negativo, hepatocarcinoma, cáncer gástrico y carcinoma colorrectal [50, 53-54, 56-57, 64, 66, 68-69, 71]. Además, un efecto antimetastásico de GAS1 ha sido demostrado en melanoma reduciendo la carga metastásica a los pulmones [51]. Por otra parte, se ha observado que la sobreexpresión de GAS1 inhibe la vía de señalización de la familia GDNF involucrando a los receptores GFR α s-RET, desregulando la vía de señalización de PI3K/AKT [56, 67]. Interesantemente, una forma soluble y secretable de GAS1 (tGAS1) ha mostrado reducir la actividad de ERK1/2 en tumores de glioblastoma y cáncer de mama triple negativo tanto de manera autocrina como paracrina [47, 64, 68-69]. En el cáncer de mama la desregulación de GAS1 se asocia con una transición de células epiteliales a células migratorias invasivas con un alto potencial metastásico [72].

En el presente trabajo se empleó la línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón y se desarrolló un modelo de cáncer de mama triple negativo, donde se observó que la sobreexpresión de tGAS1 inhibió la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo* y reduce los niveles de fosforilación de AKT y de ERK1/2. Los resultados en la inhibición del crecimiento del tumor sugieren que tGAS1 ejerce su efecto al interferir con el ligando ARTN y su receptor GFR α 3. Estos resultados son consistentes con los reportados por Jiménez et al, quien demostró que tGAS1 interfiere con la interacción entre ARTN y GFR3 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 de una manera independiente de RET [64].

Sin embargo, aunque tGAS1 ha mostrado tener un efecto antitumoral en modelos de glioblastoma y cáncer de mama triple negativo empleando vectores lentivirales, estos virus presentan ciertas desventajas debido a que pueden generar una respuesta inflamatoria y antiviral por parte del sistema inmune además de que estos virus necesitan ser inyectados vía intratumoral lo que limita su uso en áreas del tumor donde existe metástasis. Por lo anterior es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que nos permitan dirigir el transgén tGAS1 hacia los sitios del tumor con la finalidad de potenciar su efecto terapéutico de forma local.

El uso de las CTN como vehículo para dirigir el transgén al sitio del tumor es una buena estrategia para tratar el cáncer de mama metastásico, al sobreexpresar de manera local altas concentraciones de la proteína terapéutica evitando en gran medida daño en los tejidos sanos. Se ha descrito en la literatura que las CTN no solo presentan tropismo a los tumores del cerebro [44, 47], sino también a tumores sólidos de origen no-neural como el cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de ovario [39, 46]. Recientemente, Aboody y su grupo de trabajo han empleado las CTN con el gen terapéutico citosina desaminasa para tratar pacientes con glioblastoma mostrando la eficacia y seguridad de las CTN de localizar a los tumores de cerebro y liberar de manera local la quimioterapia [48]. Esto abre la posibilidad del uso de CTN como un vehículo para entregar altas concentraciones de agentes antitumorales selectivamente en los tumores primarios y distantes, resolviendo algunas limitaciones de las terapias convencionales. Aunque el mecanismo molecular de “homing” hacia el tumor no ha sido completamente elucidado hay evidencia de que las células cancerosas liberan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento durante el desarrollo del tumor generando un microambiente tumoral, entre los que se incluye: HGF, VEGF, PDGF, SDF-1, HMGB1, IL-1, IL-6, TNF α [42-45] permitiendo el tropismo de las células troncales hacia el tumor. Otros estudios han demostrado la eficacia y seguridad de usar las CTN con genes terapéuticos para tratar células tumorales invasivas y tumores distantes, incluyendo glioblastoma, meduloblastoma y neuroblastoma [40-42, 47-48]. Con base en estos antecedentes, nuestro siguiente objetivo consistió en determinar el tropismo de las CTN ReNcell-GFP en un modelo de cáncer de mama metastásico. Para ello células 4T1-fLuc-RFP se implantaron de forma ortotópica en la glándula mamaria de los ratones, donde se observó la formación tanto del tumor primario de la mama como del tumor secundario en el

pulmón (metástasis), por lo que la distribución progresiva de estas células tumorales a otros órganos es muy similar a los cánceres de mama en humanos. Interesantemente, nuestros resultados mostraron que las células troncales ReNcell-GFP migraron vía sistémica tanto al tumor primario de la mama como al tumor secundario en el pulmón. Esto es de gran importancia porque las terapias disponibles hasta el momento no poseen la capacidad de rastrear a los tumores metastásicos en humanos. Para poder direccionar aún más este tipo de terapia se podría utilizar un sensor de pH ácido en las CTN, para que una vez que localice el tumor se libere la proteína terapéutica específicamente en las células tumorales sin afectar los tejidos sanos que presentan un pH neutro [39]. Interesantemente, nuestros resultados mostraron que las CTN pudieron localizar el tumor primario de la mama y el tumor secundario en el pulmón, y no mostraron efecto antitumoral *per se*, ni por la expresión de la proteína verde fluorescente en los ratones inyectados con células ReNcell-GFP al compararlas con el grupo de ratones que se inyectó con PBS, lo que indica que las CTN son un buen vehículo para dirigir el transgén hacia los diferentes sitios de metástasis, pero que carecen de efecto terapéutico por sí mismas. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Zhao et al, donde demostró que las células troncales migran a los tumores secundarios en un modelo de cáncer de mama metastásico [46].

Por otra parte, López-Ornelas et al, mostró en un modelo de glioblastoma que las CTN pueden transportar el transgén tGAS1 hacia el tumor primario inhibiendo su crecimiento [47]. Con base en este antecedente, nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar el tropismo de las células troncales neurales ReNcell-GFP-tGAS1 y el efecto antitumoral y anti-metastásico de tGAS1 en un modelo de cáncer de mama triple negativo empleando un sistema regulable Tet/on. Nuestros resultados mostraron una reducción significativa en el tamaño y peso de los tumores de mama después del tratamiento con células ReNcell-GFP-tGAS1, comparado con los grupos control. Esta reducción en el tamaño del tumor primario se debe a que las CTN inyectadas por vía intravenosa llegaron al sitio del tumor primario y al sobreexpresar tGAS1 por la inducción con tetraciclina, una reducción en los niveles de fosforilación de AKT y ERK1/2 fue detectada en los tumores de mama comparado con los grupos control. De manera interesante, la sobreexpresión de tGAS1 en el tumor de mama no solamente inhibió el crecimiento del tumor primario sino también atenuó la formación de metástasis en el pulmón y hueso de los ratones en el día 24. Esta prevención en la

formación de metástasis puede ser parcialmente explicada por el efecto de tGAS1 en inhibir de manera significativa el crecimiento del tumor primario. Estos resultados coinciden con los reportados por Jiménez et al, quien mostró que tGAS1 reduce la angiogénesis en los tumores de mama triple negativo, indicando que este es uno de los mecanismos por el cual tGAS1 puede evitar la formación de metástasis [64]. Por otro lado, Gobeil et al, sugiere que el efecto de GAS1 en atenuar la metástasis es por la inducción de apoptosis en las células diseminadas que formarán tumores secundarios [51]. Sin embargo, este problema puede ser resuelto al generar el modelo empleando un periodo más largo para el establecimiento de la metástasis antes de administrar las células troncales o la inyección de células 4T1 por la vena de la cola, por inyección intracardiaca o intrahepática, que pueden acelerar la formación de metástasis en corto tiempo y entonces inyectar las células ReNcell-GFP-tGAS1 para evaluar su efecto.

Otro de nuestros objetivos fue evaluar la supervivencia de los ratones con tumores de mama tratados con células ReNcell-GFP-tGAS1, donde demostramos que cuando tGAS1 es secretado de las células ReNcell-GFP-tGAS1 por la administración de tetraciclina, se observó un incremento del 25% en la supervivencia de los ratones comparado con los grupos control que murieron días antes, lo cual es indicador de mejoría de la enfermedad. Nuestros resultados son consistentes con López-Ornelas quien observó en un modelo de glioblastoma que tGAS1 mejora la supervivencia de los ratones [47]. Con base en estos resultados, demostramos que ni las células troncales ReNcell *per se*, ni la tetraciclina a la concentración usada en este estudio tienen efecto alguno en el modelo de cáncer de mama establecido, lo cual es consistente con un estudio previo [47], mostrando que el efecto terapéutico de la terapia génica es causado por la sobreexpresión de tGAS1 en el tumor primario. Además, de manera interesante observamos *in vitro* que tGAS1 producido por las células ReNcell-GFP-tGAS1 induce la muerte de estas mismas células, reduciendo la probabilidad de que las células ReNcell puedan promover o potenciar el crecimiento del tumor al momento de ser inyectadas.

Este sistema regulatorio inducible, junto con el tropismo de las células ReNcell hacia el sitio del tumor, mejora la entrega de agentes anticancerosos a áreas de tumor específicas reduciendo el daño en tejido sano. Además, el desarrollo de una forma soluble de GAS1

incrementa el rango de muerte en las células tumorales tanto de forma autocrina como paracrina. Este tipo de terapia génica podría ser usada como una terapia adyuvante, minimizando los efectos secundarios tóxicos de las terapias convencionales y mejorando la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama con subtipo triple negativo.

8) CONCLUSION

La estrategia terapéutica de emplear células ReNcell-GFP-tGAS1 mediante un sistema regulable Tet/on mostró que tGAS1 es un potente agente antitumoral y antimetastásico al atenuar el crecimiento del tumor primario e inhibir la formación de metástasis al día 24 por interferir con la vía de señalización intracelular PI3K/AKT y ERK1/2.

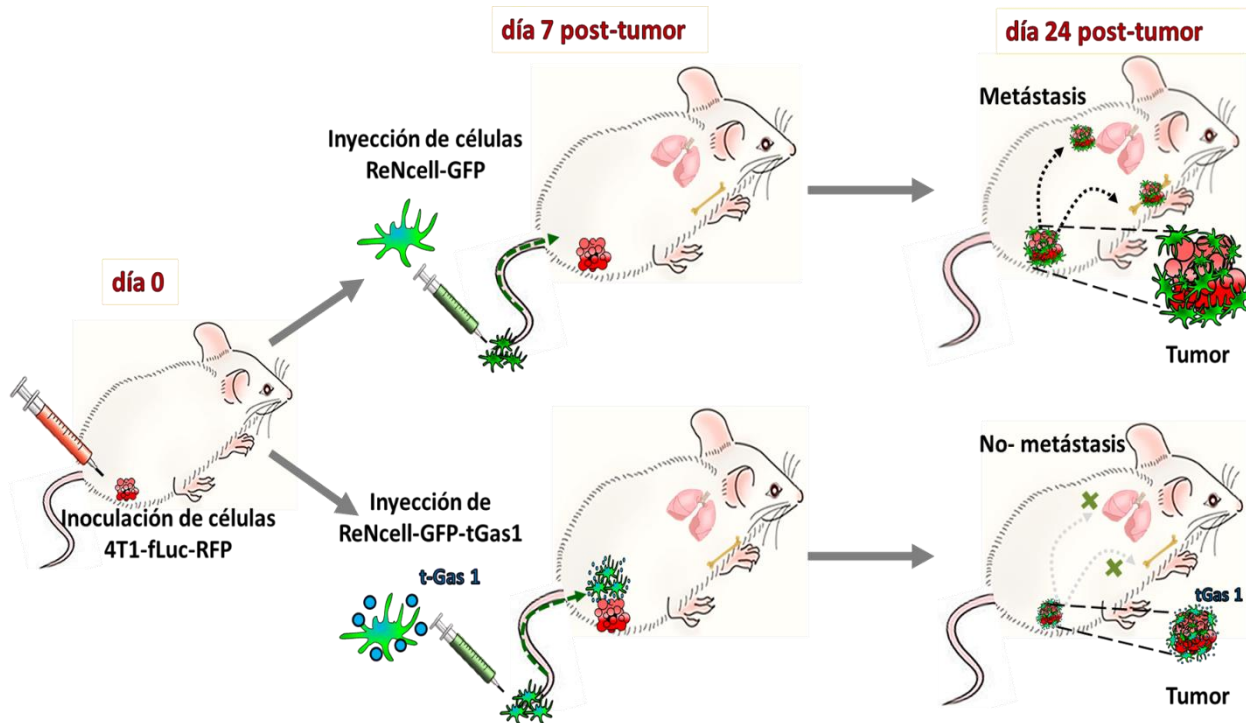


Figura 16. ReNcell-GFP-tGAS1 inhibe el crecimiento del tumor primario y la formación de metástasis. Esquema general que abarca desde el momento de implantación de las células 4T1-fLuc-RFP hasta la inoculación de las CTN en los diferentes grupos experimentales, donde se demuestra que la sobreexpresión de tGAS1 inhibe el crecimiento del tumor primario evitando la formación de metástasis a pulmón y hueso.

9) PERSPECTIVAS

- ✓ Evaluar el efecto de tGAS1 en el modelo de cáncer de mama con inyecciones continuas de tetraciclina.
- ✓ Determinar el efecto de células ReNcell-GFP-tGAS1 en un modelo de metástasis en estadio avanzado.
- ✓ Diseñar células iPSC-CTN para evitar alguna respuesta inmune al momento de inyectar las células troncales en los ratones.
- ✓ Determinar el efecto de las células ReNcell-GFP-tGAS1 en diferentes modelos de cáncer que sean susceptibles al tratamiento con tGAS1.
- ✓ Evaluar diferentes vías de administración de las células CTN para facilitar su tropismo hacia la célula tumoral en diferentes modelos de cáncer evitando en gran parte los órganos sanos.

10) REFERENCIAS

- [1] Global Cancer Observatory. Accessed January 7, 2020.
- [2] Rodney C. Richie, MD, FACP, FCCP; John O. Swanson, MD, Breast Cancer: A Review of the Literature. *Journal of Insurance Medicine* 35 (2013) 85–101.
- [3] Espina V, Liotta LA. What is the malignant nature of human ductal carcinoma in situ? *Nature Reviews Cancer* 1 (2011) 68-75.
- [4] ACS Detailed Guide: Breast Cancer (2009).
- [5] Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A, Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* 38 (2012) 698-707.
- [6] Osorio Bazar, Niurka, Bello Hernández, Claudia, & Vega Bazar, Lianet. Factores de riesgo asociados al cáncer de mama. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. (2020) 1136-1147.
- [7] Instituto Nacional del Cáncer, Cáncer de seno (mama) masculino (2015).
- [8] Aguilar YR, Torres ER, González CC, Sena BJ, Morejón WV. Cáncer de mama, su caracterización epidemiológica. *Revista de Ciencias Médicas* (2015).
- [9] Sifuentes Álvarez A, Castañeda Martínez LY, Lugo Nevares M, Reyes Romero MA. Factores de riesgo asociados con el cáncer de mama en mujeres del estado de Durango, México. *Revista de ginecología y obstetricia de México* (2015).
- [10] González MP, Pérez MM, Roig ID, Carmenate AR, Marrero ME, Betancourt AL. Factores de riesgo asociados al cáncer de mama en el municipio de Sancti Spíritus. *Gaceta Médica Espirituana* (2012).
- [11] Dent R, Trudeau M, Kathleen P, Wedad L, Lickley R, Sun and Narod. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* (2017).
- [12] Benson JR. Diagnosis and local management of breast cancer: part I. *Future Oncology*. (2011) 955-957.
- [13] Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *Journal of the American Medical Association* (2019) 288–300.

- [14] Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* (2018) 1529-1541.
- [15] Zarrabi A, Mohammadinejad R, Dehshahri A, Sagar Madamsetty V, Zahmatkeshan M, Tavakol S, Ghasemipour Afshar E. In vivo gene delivery mediated by non-viral vectors for cancer therapy. *J Control* (2020) 249-275.
- [16] Durviz, S.L. Terapia génica. Programa de terapia génica, Universidad de Valencia (2016) 365– 372
- [17] Rodríguez Yunta, E. Terapia génica y principios éticos. *Acta Bioethica* (2013) 69-79.
- [18] Lukashev AN, Zamyatnin AA Jr. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry* (2016) 700-708.
- [19] García R. y González M. Terapia Génica. Perspectivas y consideraciones éticas en relación con su aplicación. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* (2018) 1-15.
- [20] Ronchera, C.L. y González, J.M. Terapia Génica. *Farmacia Hospitalaria* (2014) 919-927.
- [21] Athanasopoulos T, Munye MM, Yáñez-Muñoz RJ. Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematology/Oncology Clinics of North America* (2017) 753-770.
- [22] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics* (2014) 541-55.
- [23] Tamaddon AM, Shirazi FH, Moghimi HR. Modeling cytoplasmic release of encapsulated oligonucleotides from cationic liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* (2017) 174-82.
- [24] Martinez-Fong D, Bannon MJ, Trudeau LE, Gonzalez-Barrios JA, Arango-Rodriguez ML. NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine* (2012) 1052-69.
- [25] Sourav R, Eloise Hudry, Casey A, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Grandi P. Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology* (2017) 63-80.
- [26] Roman Gardlík, Roland Pálffy, Július Hodosy, Ján Lukács, Ján Turna, Peter Celec. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor* (2015) 110-121.
- [27] Waehler Russell S, Curiel D. "Engineering targeted viral vectors for gene therapy." *Nature Reviews Genetics* (2007) 573-87.

- [28] Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: Recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut Journal* (2002) 130-135.
- [29] Peng D, Sun J, Wang Y, Tian J, Zhang Y, Noteborn M, Qu S. Inhibition of hepatocarcinoma by systemic delivery of Apoptin gene via the hepatic asialoglycoprotein receptor. *Cancer Gene Therapy* (2007) 66-73.
- [30] Kidner, Dai, Adusumilli and Fong. Advances in experimental and translational research in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Surgical Oncology Clinics of North America* (2018) 377-89.
- [31] Jones B, Lamb L, Goldman F, Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Frontiers in Pharmacology* (2014) 245-254.
- [32] Knoop K, Schwenk N, Schmohl K, Muller A, Zach C, Cyran C. Mesenchymal stem cell (MSC)-mediated, tumor stroma-targeted radioiodine therapy of metastatic colon cancer using the sodium iodide symporter as theranostic gene. *Journal of Nuclear Medicine* (2015) 600–606.
- [33] Singh, V, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2015).
- [34] Stuckey D and Shah K. Stem cell-based therapies for cancer treatment: Separating hope from hype. *Nature Reviews Cancer* (2014) 683–691
- [35] Chen X, Lin X, Zhao J, Shi W, Zhang H, Wang Y. A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene engineered MSCs. *Molecular Therapy* (2008) 749–756
- [36] Karnoub E, Dash A, Vo A, Sullivan A, Brooks M, Bell G, Richardson A, Polyak K, Tubo R, Weinberg R. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* (2007) 557-63.
- [37] Liu H, Wang Y, Belz T, Bock D. The nuclear receptor tailless induces long-term neural stem cell expansion and brain tumor initiation. *Genes Development* (2010) 683-95.
- [38] Ahmed A, Lesniak M. Glioblastoma multiforme: can neural stem cells deliver the therapeutic payload and fulfill the clinical promise? *Expert Review of Neurotherapeutics* (2011) 775-777.
- [39] Zhu D, Lam D, Purwanti Y, Goh S, Wu C, Zeng J. Systemic delivery of fusogenic membrane glycoprotein-expressing neural stem cells to selectively kill tumor cells. *Molecular Therapy* (2013) 1621–30.

- [40] Yin P, Shah S, Pasquale N, Garbuzenko O, Minko T, Lee K. Stem cell-based gene therapy activated using magnetic hyperthermia to enhance the treatment of cancer. *Biomaterials* (2016) 46–57.
- [41] Portnow J, Synold T, Badie B, Tirughana R, Lacey S, D'Apuzzo M. Neural Stem Cell-Based Anticancer Gene Therapy: A First-in-Human Study in Recurrent High-Grade Glioma Patients. *Clin Cancer Res* (2017) 2951–60
- [42] Shah K. Stem cell-based therapies for tumors in the brain: are we there yet. *Neuro Oncol* (2016) 1066–78.
- [43] Bhare D, Shah K. Stem Cell-Based Therapies for Cancer. *Adv Cancer Res* (2015) 159–89.
- [44] Díaz-Coranguéz M, Segovia J, López-Ornelas A, Puerta-Guardo H, Ludert J, Chavez B, et al. Transmigration of Neural Stem Cells across the Blood Brain Barrier Induced by Glioma Cells. *PLoS One* (2013) 8:e60655.
- [45] Momin, E. N., Vela, G., Zaidi, H. A., & Quinones-Hinojosa, A. The oncogenic potential of mesenchymal stem cells in the treatment of cancer: Directions for future research. *Current Immunology Reviews* (2010) 137–148.
- [46] Zhao D, Najbauer J, Annala AJ, Garcia E, Metz MZ, Gutova M, et al. Human neural stem cell tropism to metastatic breast cancer. *Stem Cells* (2012) 314–25.
- [47] Lopez-Ornelas A, Vergara P, Segovia J. Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytherapy* (2014) 1011–23.
- [48] Portnow J, Synold TW, Badie B, Tirughana R, Lacey S, D'Apuzzo M, Metz M, Najbauer J, Bedell V, Vo T, Gutova M, Frankel P, Chen M, Aboody KS. Neural Stem Cell-Based Anticancer Gene Therapy: A First-in-Human Study in Recurrent High-Grade Glioma Patients. *Clin Cancer Res* (2017).
- [49] Stebel M, Vatta P, Ruaro M, Del Sal G, Parton R, Schneider C. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein, *FEBS Lett* 481 (2000) 152-158.
- [50] Sacilotto N, Castillo J, Riffo-Campos A, Flores J, Hibbitt O, Wade-Martins R. Growth arrest specific 1 (Gas1) gene overexpression in liver reduces the in vivo progression of murine hepatocellular carcinoma and partially restores gene expression levels. *PLoS One* (2015).
- [51] Gobeil S, Zhu X, Doillon CJ, Green MR. A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev* (2008) 2932–40.
- [52] Evdokiou A, Cowled P. Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines. *Int J Cancer* (1998) 568–77.

- [53] Wang H, Zhou X, Zhang Y, Zhu H, Zhao L, Fan L, et al. Growth arrest-specific gene 1 is downregulated and inhibits tumor growth in gastric cancer. *FEBS J* (2012) 3652–64.
- [54] Li Q, Qin Y, Wei P, Lian P, Li Y, Xu Y, et al. Gas1 inhibits metastatic and metabolic phenotypes in colorectal carcinoma. *Mol Cancer Res* (2016) 830–40.
- [55] Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M. Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands. *Trends Pharmacol Sci* (2006) 72–7.
- [56] Zarco N, Gonzalez-Ramírez R, Gonzalez RO, Segovia J. GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis* (2012) 627–35.
- [57] Domínguez-Monzon G, Benítez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J. Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *Int J Dev Neurosci* (2009) 305–13.
- [58] Lin L, Doherty D, Lile J, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* (1993) 1130-1132.
- [59] Airaksinen M, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value, *Nat Rev Neurosci* (2002) 383-394.
- [60] Saavedra A, Baltazar G, Duarte EP, Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights, *Prog Neurobiol* 86 (2008) 186-215.
- [61] Kang J, Perry JK, Pandey V, Fielder GC, Mei B, Qian PX, et al. Artemin is oncogenic for human mammary carcinoma cells. *Oncogene* (2009) 2034–45.
- [62] Kang J, Qian PX, Pandey V, Perry JK, Miller LD, Liu ET, et al. Artemin is estrogen regulated and mediates antiestrogen resistance in mammary carcinoma. *Oncogene* (2010) 3228–40.
- [63] Banerjee A, Wu Z, Qian P, Kang J, Liu D, Zhu T, et al. ARTEMIN promotes de novo angiogenesis in ER negative mammary carcinoma through activation of TWIST1-VEGF-A signalling. *PLoS One* (2012) 7:e50098.
- [64] Jiménez A, López-Ornelas A, Estudillo E, González-Mariscal L, González RO, Segovia J. A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. *Exp Cell Res* (2014) 307–17.
- [65] Schrors B, Boegel S, Albrecht C, Bukur T, Bukur V, Holtstr C, et al. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Frontiers in Oncology* (2020) 1195

- [66] Zamorano A, Mellstrom B, Vergara P, Naranjo JR, Segovia J. Glial-specific retrovirally mediated gas1 gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth in vivo. *Neurobiol Dis* (2004) 483–91.
- [67] Lopez-Ramirez MA, Dominguez-Monzon G, Vergara P, Segovia J, Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling, *Int J Dev Neurosci* 26 (2008) 497-503.
- [68] Lopez-Ornelas A, Mejía-Castillo T, Vergara P, Segovia J. Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth. *Cancer Gene Ther* (2011) 87–99.
- [69] Sanchez-Hernandez L, Hernandez-Soto J, Vergara P, Gonzalez RO, Segovia J. Additive effects of the combined expression of soluble forms of GAS1 and PTEN inhibiting glioblastoma growth. *Gene Ther* (2018) 439–49.
- [70] Jiménez Hernández A. Efecto de la sobreexpresión de GAS1 en cáncer de mama. Tesis Doctoral (2014).
- [71] Benítez J, Arregui L, Vergara P, Segovia J. Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Ther* (2007) 836–46.
- [72] Dettogni R, Stur E, Laus A, da Costa Vieira R, Marques M, Santana I, et al. Potential biomarkers of ductal carcinoma in situ progression. *BMC Cancer* (2020) 1:119.