



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CCR5 COMO POSIBLE MARCADOR DE CÉLULAS TRONCALES TUMORALES
EN CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Sandra Lucía Guerrero Rodríguez

Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez
TUTOR PRINCIPAL
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Martha Robles Flores
[Facultad de Medicina](#)
Dra. Elizabeth Langley McCarron
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

Ciudad de México. Noviembre 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por el Instituto Científico Pfizer México y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN228616.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido No. 574946.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico otorgado para poder participar en el congreso internacional "Cancer Stem Cell Conference 2016" en Cleveland, Estados Unidos.

A la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Por el préstamo de sus instalaciones y la asesoría de sus expertos para la realización de algunos de los experimentos de este trabajo de investigación.

A mi comité tutorial: al Dr. Eduardo García Zepeda, a la Dra. Martha Robles Flores y a la Dra. Elizabeth Langley McCarron, que a lo largo del proyecto aportaron valiosos comentarios e ideas que permitieron la culminación de este proyecto y a mi crecimiento profesional.

A los miembros del jurado que revisaron el escrito de tesis:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dra. María Antonieta Chávez González

Dr. Ernesto Soto Reyes-Solís

Por sus valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las herramientas para mi crecimiento y formación profesional.

Agradecimientos personales

Al Dr. Marco Velasco, por la asesoría de este trabajo, por compartir su valioso conocimiento que me ha permitido tener un crecimiento profesional y personal; y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Charmina Aguirre y a la Dra. Wendy Xolalpa, por las múltiples enseñanzas brindadas que enriquecieron este trabajo.

A las personas que conforman el laboratorio de Farmacología Molecular. A Angel Ruiz, por su amistad y apoyo a lo largo de estos años. A Abimael Mondragón, por las múltiples experiencias tanto profesionales como personales que nos han permitido crecer como personas a lo largo de este tiempo de amistad. A Luz Vázquez, Fabiola Cortés, Selene Castro y a Diana Casique; que son unas grandes amigas que me han apoyado en todo momento y que han compartido conmigo su gran conocimiento.

A Araceli, Julio y a Carmen; por su amistad y por el tiempo compartido durante toda la maestría.

A mi mamá, por ser una persona ejemplar que siempre ha estado ahí incondicionalmente con palabras de aliento cuando más las he necesitado. Por su paciencia e interés en mi tema de investigación. Por cuidar de mí y siempre brindarme las herramientas necesarias para mi crecimiento profesional y personal. Agradezco a Rocío por ser un pilar para mi mamá y para la familia, por su fortaleza y sus sabios consejos.

A mi hermana, por brindarme su apoyo incondicional y estar conmigo en esas noches de desvelo. Por su gran amistad y su sonrisa que siempre han sido mi motor para ser una mejor persona y un ejemplo a seguir. Por sus consejos que han sido trascendentales en mi vida.

A Miguel, por ser flexible y tolerante a las múltiples modificaciones de horarios de salida ante las variaciones de los experimentos. Por comprenderme, escucharme y darme siempre un punto de vista objetivo. Por ser una gran compañía al final de un largo día de trabajo.

Este trabajo está dedicado en memoria de mi padre.

Abreviaturas

AF	Autofluorescencia
AKT	Cinasa serina-treoinina, por sus siglas en inglés
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosin trifosfato, por sus siglas en inglés
CSF-1	Factor estimulante de colonias tipo 1, por sus siglas en inglés
CSR	Consensus Stemness Ranking, nombre de una firma genética
CT	Células Troncales
CTE	Células troncales embrionarias
CTLA-4	Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico
CTM	Células troncales mesénquimales
CTT	Células Troncales Tumorales
CTTM	Células Troncales Tumorales Mamarias
DAVID	Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery
DCIS	Carcinomas ductales <i>in situ</i> , por sus siglas en inglés
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés
EGF	Factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés
EGFR	Receptor al factor de crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ER	Receptor a estrógenos, por sus siglas en inglés
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés
GLUT-1	Transportador de glucosa 1, por sus siglas en inglés
GRB7	Gen de la proteína-7 ligada al receptor de factor de crecimiento, por sus siglas en inglés
GSEA	Análisis de enriquecimiento de subgrupos de genes, por sus siglas en inglés

GST	Genes supresores de tumor
HER2	Receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2, por sus siglas en inglés
HIF	Factores inducibles por hipoxia, por sus siglas en inglés
IA	Inhibidores de la aromatasa, por sus siglas en inglés
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDH	Isocitrato deshidrogenasa 1/2, por sus siglas en inglés
IGS	Invasiveness Gene Signature, nombre de una firma genética
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
iPS	induced Pluripotent Stem Cells
KO	Knockout
MAPK	Cinasa activada por mitógenos, por sus siglas en inglés
MET	Transición mesénquima-epitelio, por sus siglas en inglés
mRNA	RNA mensajero, por sus siglas en inglés
MUC1	Mucina 1, por sus siglas en inglés
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP	Polimerasa de la poliribosa adenosin difosfato, por sus siglas en inglés
PD-1	Molécula de muerte programada 1
PGAP3	Gene de la fosfolipasa específica del glicosilfosfaditilinositol, por sus siglas en inglés.
PgR	Receptor a progesterona , por sus siglas en inglés
PHD	Protil hidrolasa de HIF, por sus siglas en inglés
PI3K	Cinasa fosfatidil-inositol 3 fosfatos, por sus siglas en inglés
PIP3	Fosfatidil-inositol.3,4,5 trifosfato, por sus siglas en inglés
RET	Transferencia de energía de resonancia, por sus siglas en inglés
RNA	Ácido Ribonucleico, por sus siglas en inglés

SCF	Factor de células troncales
SD	Side population
SERM	Moduladores de respuesta selectiva al receptor a estrógenos, por sus siglas en inglés
SLC2A1	Miembro 1 de la familia 2 del acarreador de solutos, por sus siglas en inglés
snoRNA	RNAs pequeños nucleolares, por sus siglas en inglés
snoRNP	Riboproteínas pequeñas nucleolares, por sus siglas en inglés
TAC	Transcriptome Analysis Console
TAM	Macrófagos asociados al tumor, por sus siglas en inglés
TAM-R	Resistencia a Tamoxifen
TBST	TBS-Tween al 0.1%
TERT	Transcriptasa reversa de la telomerasa, por sus siglas en inglés
TNM	Sistema de clasificación de Tumor, Nodo y Metástasis
TSP	Trombospondina, por sus siglas en inglés
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular, por sus siglas en inglés
vHL	Von Hippel Lindau, por sus siglas en inglés
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Índice

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	10
2.1 Definición de cáncer.....	10
2.2 Tipos de cáncer.....	10
2.3 Generalidades del cáncer.....	11
2.4 El cáncer como problema de salud pública.....	20
2.5 Cáncer de mama.....	21
2.6 Terapias actuales contra el cáncer de mama.....	25
2.7 Células Troncales y Células Troncales Tumorales.....	28
2.8 Células Troncales Tumorales Mamarias.....	31
2.9 Las CTTM son responsivas a quimiocinas.....	34
2.9.1 CXCR1.....	35
2.9.2 CCR7.....	36
2.9.3 CXCR4.....	37
3. Antecedentes.....	38
3.1 El eje CCR5/CCL5 en la progresión del cáncer de mama.....	38
4. Justificación del proyecto.....	40
5. Hipótesis.....	41
6. Objetivos.....	41
6.1 Objetivo general.....	41
6.2 Objetivos particulares.....	41
7. Metodología.....	42
7.1 Líneas celulares y tratamientos.....	42
7.2 Expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo y separación de subpoblaciones.....	42
7.3 Ensayos de formación de mamoesferas.....	43
7.4 Análisis de microarreglos.....	44
7.5 Análisis de enriquecimiento de sub-grupos de genes (“GSEA, por sus siglas en inglés”).....	44
7.6 Generación de sublíneas SUM-159 que sobre—expresan establemente CCR5.....	45
7.7 Ensayos de gen reportero en respuesta a la actividad transcripcional de promotores a factores de transcripción asociados a pluripotencia.....	46
7.8 Inmunoblot.....	47
7.9 Análisis estadístico.....	49

8.	Resultados.....	50
8.1	Capacidad clonogénica y análisis del perfil transcripcional de células CCR5 ⁺ de la línea celular SUM-159	50
8.2	Análisis de enriquecimiento de sub-grupos de genes (“GSEA”) de células CCR5 ⁺ de la línea celular SUM-159.....	51
8.3	Sobre-expresión de CCR5 en la línea celular SUM-159.....	53
8.4	Efecto de la sobre-expresión de CCR5 en la capacidad clonogénica de las sublíneas de SUM-159	54
8.5	Efecto de la sobre-expresión de CCR5 sobre el porcentaje de células CD44 ⁺ CD24 ⁻ de las sublíneas de SUM-159	55
8.6	Efecto de la sobre-expresión de CCR5 sobre la actividad transcripcional de los promotores a factores de transcripción asociados a troncalidad	57
8.7	Efecto de la sobre-expresión de CCR5 en el nivel de la proteína Sox2	58
9.	Discusión	60
10.	Conclusiones	67
11.	Referencias.....	68

1. Resumen

Las células troncales tumorales mamarias (CTTM) son quimio y radio-resistentes, invasivas y metastásicas. Las CTTM se han caracterizado por el fenotipo CD44+/CD24-, no obstante sólo un subgrupo de éstas presentan características de CTTM, por lo que se requieren marcadores adicionales para identificarlas. El receptor CCR5 tiene un papel clave en la invasión y metástasis, características propias del programa de transición epitelio-mesénquima, implicado directamente en la ganancia del fenotipo de CTTM.

El presente trabajo evaluó el papel de CCR5 como posible marcador de CTTM en la línea celular SUM-159. Se comparó el perfil transcripcional de células CCR5+ y CCR5- mediante microarreglos. Se realizó un análisis de anotación funcional utilizando los genes de expresión diferencial, sin encontrarse enriquecimiento en procesos biológicos ni funciones moleculares asociados a troncalidad. El perfil de expresión génica también se comparó con firmas genéticas de troncalidad previamente reportadas, encontrando que el fenotipo CCR5+ esta enriquecido en un sub-conjunto de genes sobre-expresados en una firma consenso de troncalidad. Lo anterior sugiere que la expresión del receptor podría favorecer la troncalidad.

Para estudiar su papel en CTTM, se sobre-expresó el receptor CCR5 mediante transfección. El porcentaje de células que sobre-expresaron CCR5 fue del 90%. Subsecuentemente, se comparó la capacidad clonogénica de esas células CCR5+ en ensayos de mamoesferas, encontrando que tienen una mayor clonogenicidad que las CCR5-. Asimismo se evaluó el porcentaje de células CD44+/CD24-, sin observarse diferencias entre las células CCR5+ y CCR5-, por lo que CCR5 no es de utilidad para identificar esta subpoblación. Posteriormente se evaluó la expresión de factores de transcripción asociados a pluripotencia (OCT4, NANOG y SOX2) mediante ensayos de gen reportero. En células CCR5+, la señal de SOX2 fue mayor por lo que se midió consecuentemente el nivel de proteína, sin encontrarse diferencias. Los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que CCR5 no es

un buen marcador de CTTM pero tiene un papel relevante en la clonogenicidad y posiblemente en la tumorigenicidad de células de cáncer de mama.

Palabras clave: cáncer de mama, células troncales tumorales, CCR5

2. Introducción

2.1 Definición de cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades resultado de un proceso multi-etapa en el cual las células de un individuo presentan cambios genéticos o epigenéticos. Estos cambios resultan en una ganancia en la proliferación de las células de manera incontrolada que pueden llegar a formar un tumor. Algunos tumores llegan a ser malignos por la adquisición de características que les permiten evadir el sistema inmune e incluso a invadir sitios circundantes y/o distantes formando metástasis a través del sistema linfático y/o sanguíneo [1].

2.2 Tipos de cáncer

Los tumores se pueden clasificar en dos categorías dependiendo del grado de agresividad: 1) benignos como aquellos que crecen localmente sin invadir tejidos adyacentes y 2) los malignos que invaden y realizan metástasis. Por otra parte existen diferentes tipos de cánceres que se pueden agrupar de acuerdo al tipo de célula que da origen [1, 2]:

- i) Carcinomas que es el tipo de cáncer más común cuyo origen es de células epiteliales. En este grupo se encuentran los adenocarcinomas, carcinomas de la lámina basal, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células de transición.
- ii) Sarcomas que comienzan a partir de una variedad de células mesénquimales de los tejidos conectivos como hueso, cartílago, grasa, músculos o vasos sanguíneos.
- iii) Leucemias que comienzan de células de la médula ósea, no forman tumores sólidos pero si un gran número de glóbulos blancos anormales.
- iv) Linfomas y mielomas donde las células origen son las del sistema inmune. En los linfomas las células parten del sistema linfático, mientras que en los mielomas son de células plasmáticas.

v) Tumores de cerebro y cáncer de la médula espinal provienen de células del sistema nervioso central. Dentro de este sub-grupo el tumor cerebral más común es el glioma y se desarrolla a partir de células gliales.

2.3 Generalidades del cáncer

Las células normales cambian su fenotipo hacia células neoplásicas debido a cambios en el genoma en respuesta al estilo de vida de la persona o bien por la exposición a carcinógenos, que pueden ser agentes químicos, biológicos y/o físicos. Las células tumorales sufren un proceso de múltiples etapas llamado **carcinogénesis**, que comprende las siguientes etapas [3, 4]:

La **iniciación** es la etapa donde carcinógenos producen mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) de células normales. Estas mutaciones pueden ocurrir tanto en proto-oncogenes como en genes supresores de tumor (GST) creando un potencial de desarrollo neoplásico que les permita a las células cancerosas proliferar más allá del límite permitido [3].

Los proto-oncogenes al ser desregulados afectan rutas de señalización asociadas con la proliferación y de procesos como la comunicación, desarrollo y diferenciación celulares. Mutaciones en éstos resultan en la sobre-expresión o en la alteración de la estructura de la proteína, alguno de estos oncogenes son RAS o MYC. Los GST son reguladores negativos de la proliferación que se encargan de checar la progresión del ciclo celular, mutaciones en estos genes resulta en la pérdida de su función. Por ejemplo *TP53* que codifica para una proteína que actúa como un freno del ciclo celular al evitar la división celular inapropiada, mutaciones en este gen causan su pérdida de función y por ende contribuyen al desarrollo del cáncer [5].

La **promoción** es la etapa donde células transformadas siguen expuestas a estímulos repetidos o continuos que las llevan a adquirir ventajas para proliferar de tal manera que se da el crecimiento tisular del tumor. El desarrollo entre las

etapas se ve influenciado por el ambiente tanto intra como extracelular, por ejemplo citocinas o metabolitos lipídicos o factores de crecimiento [6].

Posteriormente sigue la etapa de **progresión**, donde las células adquieren capacidades más agresivas que les permiten dejar el tumor primario e invadir tejidos circundantes o lejanos realizando metástasis. Este proceso permite que se incrementen subpoblaciones heterogéneas malignas lo que resulta en un aumento del tamaño del tumor. Dentro de otras capacidades que adquieren por el incremento del tamaño del tumor, es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que lo proveen de nutrientes y oxígeno, característica necesaria para que las células inicien el proceso metastásico [7, 8].

Durante el proceso de carcinogénesis las células cancerosas adquieren características distintivas conocidas como los “Hallmarks” o alteraciones del cáncer las cuales se pueden visualizar en la Fig.1 [9]. A continuación se da una descripción de cada una de las características.

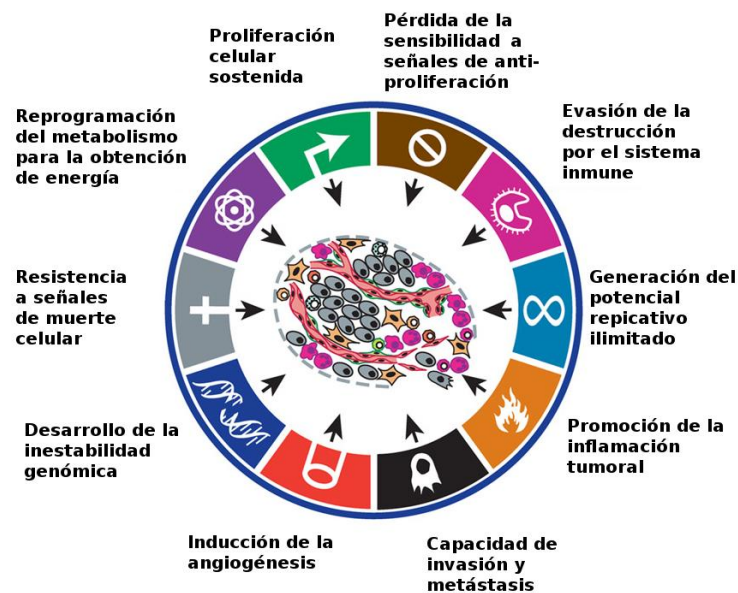


Fig. 1. Características distintivas del cáncer o “Hallmarks” durante el proceso de carcinogénesis. Modificado de [9].

Proliferación celular sostenida. En células normales hay control de la producción y liberación de señales promotoras de la proliferación. La unión de factores de crecimiento a su receptor regula la entrada y progresión del ciclo celular, por tanto la proliferación y supervivencia de las células. En células cancerosas no existe ese control por lo que la proliferación es desregulada y mediada por múltiples mecanismos [9].

Las células cancerosas pueden estimular la producción de los factores de crecimiento autocrinamente, por ejemplo el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) se une a su receptor EGFR (receptor del factor del crecimiento epidérmico, por sus siglas en inglés) fosforilándolo y activándolo para que su señalización resulte en la proliferación celular. Existen rutas de señalización como las de la fosfolipasa C o las de las Ras-MAPK (quinasas activadas por mitógenos)/PI3K(fosfatidil-inositol-3-cinasa)-AKT(proteína cinasa de serina-treonina) que se activan por la unión de factores de crecimiento, resultando en la transcripción de genes asociados a proliferación y supervivencia [10]. Por otra parte, también son capaces de estimular a los factores de crecimiento de manera paracrina, por ejemplo las células epiteliales y los fibroblastos son estimulados por las células cancerosas para que produzcan citocinas como CXCL14, CXCL12 que promueven la proliferación de las células cancerosas [11, 12].

Otro mecanismo es el aumento de niveles de receptores en la superficie celular, permitiendo que las células cancerosas sean hiper-responsivas a grandes cantidades de factores de crecimiento. Además de eso, los receptores pueden sufrir modificaciones estructurales que les permitan ser constitutivamente activos, sin necesidad de la unión de su ligando. Por ejemplo, mutaciones en la subunidad catalítica de PI3K permiten que la vía de señalización de PI3K-AKT se encuentre siempre activa [13, 14] o mutaciones en *EGFR* ocasionan la pérdida del dominio citoplasmático resultando en una proliferación desregulada [15].

También la proliferación celular sostenida se puede dar por desregulaciones en los mecanismos de retroalimentación negativa que fisiológicamente atenúan las vías de señalización asociadas. Un ejemplo es la fosfatasa PTEN, que en condiciones

normales atenúa la vía de señalización de PI3K-AKT al degradar el fosfatidil-inositol (3, 4, 5) trifosfato (PIP3, por sus siglas en inglés). En cáncer, PTEN se encuentra frecuentemente silenciada resultando en que la vía de señalización PI3K-AKT se encuentra constitutivamente activa [13, 14].

Otro mecanismo conocido es la pérdida de función de los GST, por ejemplo *RB* y *TP53* que controlan el ciclo celular al decidir si la célula prolifera o muere. Defectos en *RB* permiten una proliferación constante ya que no produce las señales de inhibición. *TP53* sensa señales de estrés y el malfuncionamiento de los sistemas de operación en las células. Si la proteína p53 sensa daño excesivo en el genoma o si los niveles de factores de crecimiento son sub-óptimos, se detiene la progresión del ciclo celular e incluso si son irreparables puede resultar en muerte celular. En cáncer más del 50% de los pacientes tienen p53 inactivado resultando en la pérdida de su función permitiendo que las células cancerosas proliferen a pesar de múltiples daños a su genoma [9, 15-19].

La pérdida de la sensibilidad de señales de antiproliferación. Las células cancerosas evaden la inhibición de la proliferación por contacto. Esta inhibición limita el número de células y asegura una homeostasis en tejidos sanos. Por ejemplo, el gen *NF2* que codifica para la proteína Merlin la cual regula la inhibición por contacto al limitar la señalización de EGFR, en cáncer esta proteína se encuentra inactivada por lo que no limita la proliferación celular [20]. Otro ejemplo es e-cadherina que también inhibe la proliferación por contacto, en células cancerosas se pierde su expresión. Vías de señalización como la de hippo se ven desreguladas, resultando en la proliferación de células cancerosas ya que se pierde el complejo regulador de la vía que se conforma por e-cadherina y β -catenina [21].

La resistencia a señales de muerte celular. Las células cuentan con la maquinaria necesaria que recibe y procesa señales de inducción de muerte celular. La muerte por apoptosis se da en respuesta a estrés fisiológico y por la pérdida del

balance entre los componentes que la promueven y la evitan. La evasión de señales de apoptosis se puede dar por: i) el incremento de reguladores anti-apoptóticos como Bcl-2 o Bcl-K_L o de genes de supervivencia como Igf1/2; 2) la disminución de factores pro-apoptóticos como Bax, Bim, o Puma y de los circuitos de inducción de muerte como Fas con Fas-ligando [22-25].

La autofagia es otro mecanismo de muerte que opera reciclando organelos y catabolitos para la biosíntesis y el metabolismo energético [26]. En cáncer, las vías de señalización como las de PI3K-AKT o mTOR se encuentran activas, resultando en la inhibición de la apoptosis y la autofagia. Por otro lado, las proteínas como la Beclina-1 son necesarias para la inducción de la autofagia, se encuentra inactiva en cáncer. Cuando hay deficiencia de nutrientes o cuando las células cancerosas son expuestas a radio y/o quimioterapia, se ha visto que se elevan los niveles de autofagia como mecanismo cito-protector [27]. Las células pueden entrar a un estado reversible de latencia o quiescencia que les permite sobrevivir a las condiciones de estrés y posteriormente cuando las condiciones son óptimas salen de ese estado y les permite re-poblar el tumor [26-30].

Otro mecanismo de muerte es la necrosis, la cual libera señales pro-inflamatorias al tejido circundante y que permite el reclutamiento de células del sistema inmune al tumor. Los tumores presentan cierto grado de necrosis lo que recluta a células del sistema inmune que promuevan la formación y el mantenimiento del tumor al generar factores de crecimiento [31-33] .

La generación del potencial replicativo ilimitado. Las células no neoplásicas limitan su replicación mediante la senescencia, estado irreversible al cual entra la célula para mantenerse viable pero ya no se puede replicar, o bien la célula puede entrar en una crisis celular que la lleva a muerte celular [34]. En cáncer, las células son capaces de replicarse ilimitadamente debido a que sus telómeros se encuentran protegidos por segmentos repetidos de DNA telomérico en los extremos de los cromosomas. La enzima encargada de adicionar los segmentos de DNA telomérico

es la telomerasa reversa transcriptasa (TERT, por sus siglas en inglés) que se encuentra siempre activa para evitar la erosión de los telómeros [34, 35].

La inducción de la angiogénesis. El tumor para sustentar su crecimiento debe de adquirir nutrientes y oxígeno a través de la generación de nuevos vasos sanguíneos (vasculogénesis) a partir de los ya existentes. La regulación de la angiogénesis se da mediante inductores e inhibidores, como el factor de crecimiento endotelial vascular - A (VEGF-A, por sus siglas en inglés) y la trombospondina-1 (TSP-1, por sus siglas en inglés) respectivamente. En los tumores existe un desbalance hacia la señalización de moléculas pro-angiogénicas que generan nuevos capilares y vasos sanguíneos excesivamente ramificados, distorsionados y alargados. Células de sistema inmune como: macrófagos, neutrófilos, mastocitos y progenitores mieloides, son reclutadas al tumor donde producen moléculas pro-angiogénicas o Ras y Myc pueden sobre-regular la expresión de estas [36-39].

En condiciones de hipoxia que se refiere cuando hay bajos niveles de oxígeno, los factores inducibles por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés) son producidos. HIF1 α en su forma activa, es translocado al núcleo donde puede formar un heterodímero con la subunidad HIF1 β , permitiendo la transcripción del FGF (factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés) y de VEGF-A. En células cancerosas VEGF-A se encuentra sobre regulado para sustentar el crecimiento del tumor mediante la vasculogénesis [38, 40-42].

La capacidad de invadir y realizar metástasis. Para que células cancerosas puedan invadir y realizar metástasis deben de seguir ciertos pasos: i) invasión local, ii) intravasación, que es la entrada de células cancerosas a vasos sanguíneos o linfáticos cercanos, iii) sobrevivida de éstas en circulación, iv) escape de células cancerosas hacia el parénquima de tejidos distantes, conocida como extravasación, v) formación de pequeños nódulos de células cancerosas o micrometástasis y finalmente vi) colonización al proliferar de micro a macro-metástasis [43, 44].

El programa de transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) se ha asociado con la adquisición de capacidades de invadir, evitar apoptosis y poder diseminarse. Células cancerosas epiteliales que prenden este programa presentan la pérdida de moléculas de adhesión célula-célula, como por ejemplo la pérdida de E-cadherina, vinculada con la migración de las células. Por otra parte la sobreexpresión de marcadores asociados al fenotipo mesénquimal como la N-cadherina, vimentina, se asocia con capacidades migratorias [45, 46]. El proceso de EMT induce la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular que incrementan la motilidad celular. Este programa es orquestado por factores de transcripción como Snail, Slug, Twist y/o Zeb1/2 [47, 48].

Las células del borde del tumor se ha observado que presentan EMT, se sugiere que es por estar sujetos a estímulos del microambiente. Por ejemplo, los macrófagos en la periferia del tumor permiten invasión local al suplir enzimas que degradan la matriz extracelular, como metaloproteinasas y proteasas [49, 50]. Las células cancerosas proveen de IL-4 a los macrófagos que en cambio generan EGF para que éstas proliferen y generen el factor estimulante de colonias tipo1 (CSF-1 por sus siglas en inglés) hacia los macrófagos. Los macrófagos participan en la intravasación hacia el torrente sanguíneo al formar grupos o clústeres de macrófagos en el que las células cancerosas egresan. Además suprimen la respuesta de células T citotóxicas hacia células cancerosas facilitando la intravasación al sistema circulatorio y la diseminación a otros tejidos [51, 52].

Las células que logran diseminar a sitios distantes dejan de estar expuestas a las señales que las llevaron a inducir el programa de EMT y tienen la capacidad de revertirlo mediante la transición mesénquima-epitelio (MET, por sus siglas en inglés) [53]. En el sitio distante las células cancerosas pueden pasar por un estado de latencia al activar programas de autofagia en respuesta a falta de nutrientes, cuando las condiciones del microambiente son favorables salen de esta fase y proliferan [28, 54].

El desarrollo de la inestabilidad genómica. La inestabilidad genómica se caracteriza por translocaciones en los cromosomas, pérdida o duplicación de fragmentos largos en los cromosomas o por aneuploidias (número aberrante de cromosomas) [55]. Esta inestabilidad puede ser generada por mutaciones, por cambios epigenéticos como la metilación del DNA y/o modificaciones a histonas que afectan la regulación de expresión de genes. La mutabilidad de células cancerosas se debe a la alta sensibilidad a agentes mutagénicos y/o por malfuncionamiento de la maquinaria de mantenimiento genómico. La inestabilidad genómica confiere ventajas a algunas clonas que les permite su expansión y una posible dominancia sobre la demás sub-clonas. [56, 57].

La plasticidad en la reprogramación del metabolismo de obtención de energía para tener un crecimiento y proliferación continúa. A pesar que en el tumor no existan las condiciones óptimas que permitan el crecimiento tumoral, las células cancerosas se adaptan. Las células cancerosas cambian su metabolismo de procesamiento de glucosa hacia glicolisis para permitir que las células produzcan energía y sobrevivan. El incremento de la glicolisis permite que existan varios intermediarios para diferentes rutas biosintéticas de generación de nucleósidos, aminoácidos, macromoléculas y organelos para nuevas células [58].

En los tumores la deficiencia en la producción del adenosin trifosfato (ATP) se ve subsanada al sobre-expresar transportadores de glucosa, como es el caso del transportador de glucosa-1 (*GLUT1*, por sus siglas en inglés) que se sobre-expresa cuando hay condiciones de hipoxia y permite ingresar mayores cantidades de glucosa para ser procesada. [59, 60]. Por otra, parte las enzimas en la ruta glicolítica se ven alteradas por mutaciones, como la isocitrato deshidrogenasa 1/2 (IDH, por sus siglas en inglés) que altera el metabolismo [61]. HIF-1 α es hidroxilada por la protil hidrolasa de HIF (PHD, por sus siglas en inglés) marcándolo para que sea ubiquitinizado por la proteína von Hippel Lindau (vHL, por sus siglas en inglés) y llevado a degradación por el proteasoma. Para lo anterior, PHD necesita de O₂ y de α -cetoglutarato como sustratos, cuando hay mutaciones en la IDH, hay baja

disponibilidad de α -cetoglutarato, por lo que HIF-1 α se estabiliza y se logra dimerizar con HIF-1 β . La estabilización de HIF lleva a la transcripción de VEGF y del, por lo que la angiogénesis e invasión se ven promovidas y del miembro 1 de la familia 2 del acarreador de solutos (SLC2A1, por sus siglas en inglés); resultando en la alta sobrevivencia, angiogénesis y de la invasión de las células [62].

La capacidad de células cancerosas de evadir el sistema inmune. Células con inestabilidad genómica o que no se reconocen como propias, el sistema inmune las detecta y las destruye. La tolerancia periférica es el proceso por el cual el sistema inmune regula la activación de linfocitos T durante la respuesta inmune o para prevenir la autoinmunidad [63]. Existen vías que regulan la activación de células del sistema inmune o para prevenir la autoinmunidad, como: 1) la vía del antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4, por sus siglas en inglés); 2) la vía de la molécula de la muerte programada 1 (PD-1, por sus siglas en inglés). Las células cancerosas utilizan estos dos puntos de control para evadir la respuesta inmune [64, 65]

Por otra parte, se ha visto que el sistema inmune juega un papel importante en la formación del tumor al crear un microambiente pro-inflamatorio. Este microambiente se crea mediante factores de crecimiento que permiten la proliferación, sobrevivencia, factores pro-angiogénicos, enzimas remodeladoras de la matriz extracelular que facilitan angiogénesis, invasión y metástasis [31, 66].

Las células del sistema inmune que se han encontrado dentro del tumor son: macrófagos, mastocitos, neutrófilos y linfocitos B/T. Dentro de las moléculas de señalización que se ha visto que son liberadas por las células del sistema inmune son: EGF, VEGF, FGF2, quimiocinas, citocinas que permiten un estado inflamatorio y por ende promotor de la formación de tumores. Otras moléculas son factores pro-angiogénicos, pro-invasivos que facilitan la invasión a tejidos y apoyan la diseminación hacia sitios metastásicos [67-69]. Aunado a estas funciones, también se ha observado que progenitores mieloides suprimen la actividad de linfocitos T y de NKs en los tumores y contribuyen a la angiogénesis [70].

2.4 El cáncer como problema de salud pública

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Para 2012 más de 14 millones de casos nuevos fueron diagnosticados y a 2015 alrededor de 8.8 millones de personas murieron por cáncer [71].

La IARC (International Agency for Research on Cancer) reporta que a nivel mundial para hombres el cáncer del pulmón es el de mayor incidencia y mortalidad seguido del cáncer de estómago, colorectal y el de próstata. Para mujeres el cáncer de mama es el de mayor incidencia y mortalidad seguido del cáncer de cuello uterino, de pulmón y el colorectal (Fig. 2) [72]. Dado lo anterior es de nuestro interés el cáncer de mama.

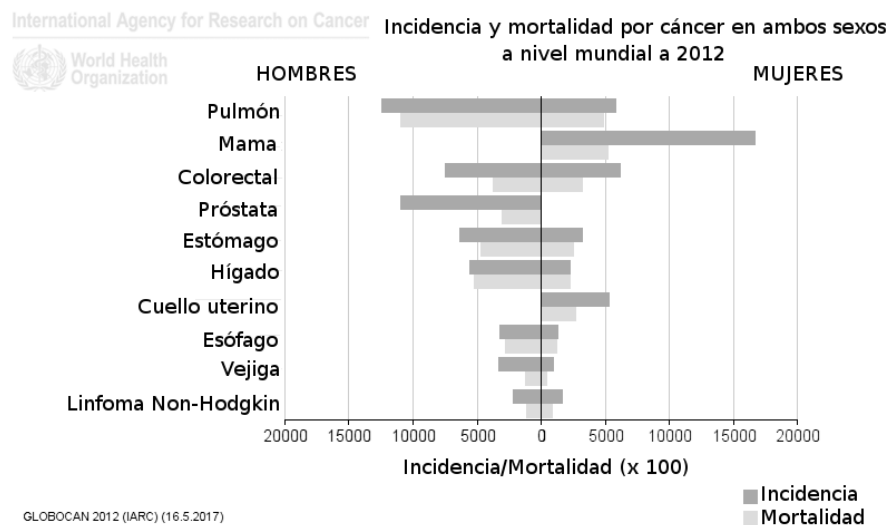


Fig. 2. Número de casos de incidencia y mortalidad a nivel mundial para ambos sexos por tipo de cáncer a 2012 (Modificado de [72]).

En México dentro de las principales causas de muerte se encuentran los tumores malignos [73]. La IARC reporta que para mujeres en México a 2012, el cáncer de mama es el de mayor incidencia y mortalidad [72]. De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en 2015 la incidencia del cáncer de mama en

mujeres de 20 años y más, es de 27.9 nuevos casos por cada 100 mil personas. En 2014 se registró una tasa de mortalidad de 15.21 por cada 100 mil mujeres cuya edad promedio fue de 59 años, dicha tasa asciende de acuerdo a la edad (Fig. 3) [74].

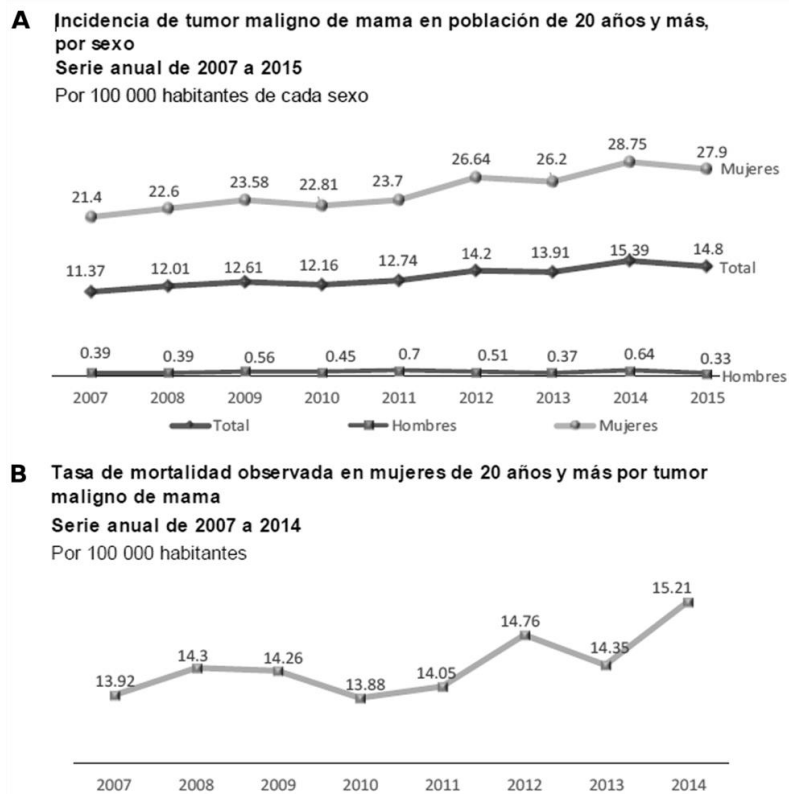


Fig. 3. Tendencia de incidencia y mortalidad por cáncer de mama en México. A) Incidencia por género en población de 20 años y más de 2007 a 2015. B) Tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres de 20 años y más de 2007 a 2014 (Modificado de [74]).

2.5 Cáncer de mama

El cáncer de mama puede ser invasivo o no invasivo. Los no invasivos no van más allá de los ductos o lóbulos de la glándula mamaria. Los invasivos son los que se diseminan a tejidos circundantes. De acuerdo al lugar en donde se origina el cáncer pueden ser [75]:

- Carcinomas ductales que inician en los ductos mamarios. Suelen ser la mayoría de los cánceres de mama. Si solo se localizan en el ducto son los

carcinomas ductales *in situ* (DCIS, por sus siglas en inglés) o si se diseminan fuera de los ductos son los carcinomas ductales invasivos o infiltrantes.

- Carcinomas lobulares que inician en los lóbulos mamarios.

Existen otro tipos menos comunes: i) medulares, ii) mucinosos, iii) tubulares, iv) metaplásicos, v) papilares, vi) inflamatorios y la enfermedad de Paget que es un tipo de cáncer benigno que inicia en los ductos del pezón mamario [75].

Se utiliza el sistema de tumor, nodo y metástasis (TNM) para determinar el estadio en el cual el paciente se encuentra. Hay cinco etapas, donde la etapa 0 es un DCIS no invasivo, las etapas I-IV son usadas para cánceres invasivos. A continuación se describe con más detalle las etapas en las que se divide de acuerdo al sistema TNM [76]:

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama por el sistema TNM [76].

T por tamaño y localización del tumor	N por la examinación de los nódulos linfáticos.	M cuando células cancerosas han diseminado a otras partes del cuerpo.
TX cuando el tumor primario no se puede evaluar.	NX cuando los nódulos linfáticos no pueden ser evaluados.	MX si la distancia de diseminación no puede ser evaluada.
T0 sin evidencia de cáncer.	N0 no hay células cancerosas en los nódulos linfáticos.	M0 cuando la enfermedad no ha metastizado.
Tis carcinoma <i>in situ</i> que puede ser ductal, lobular o de Paget.	N0 (i+) hay células cancerosas en una área pequeña de los nódulos linfáticos axilares de 0.2 mm o al encontrarse al menos 200 células.	M0 (i+) cuando hay evidencia microscópica de células cancerosas en sangre, médula ósea, y otros nódulos linfáticos que no miden menos que 0.2 mm.
T1 la parte invasiva del tumor es de 20 mm o de menor área.	N1mic cuando se encuentran células cancerosas en los nódulos linfáticos axilares con un	M1 cuando hay evidencia de metástasis hacia otra parte del cuerpo.

<p>T1a mayor a 1 mm y hasta 5 mm.</p> <p>T1b mayor a 5 mm y hasta 10 mm.</p> <p>T1c mayor a 10 mm y hasta 20 mm.</p>	<p>área de más de 0.2 mm pero menos de 2 mm de tamaño.</p>	
<p>T2 la parte invasora del tumor es mayor a 20 mm pero no mayor que 50 mm.</p>	<p>N1 el cáncer se ha diseminado de 1 a 3 nódulos linfáticos axilares con al menos 2 mm de tamaño.</p>	
<p>T3 la parte invasora es mayor a 50 mm.</p>	<p>N2 cuando se encuentra cáncer en: N2a diseminado de 4 a 9 nódulos axilares.</p> <p>N2b cuando se ha diseminado a nódulos internos mamarios sin encontrarse en los axilares.</p>	
<p>T4 cuando cae en alguna de las siguientes categorías:</p> <p>T4a si ha crecido en la pared del pecho.</p> <p>T4b si ha crecido hacia la piel.</p> <p>T4c si ha crecido a la pared del pecho y a la piel.</p> <p>T4d si es un cáncer inflamatorio.</p>	<p>N3 cuando se encuentra cáncer en: N3a se ha diseminado a 10 o más nódulos debajo del brazo o debajo de la clavícula.</p> <p>N3b cuando se ha diseminado tanto a los nódulos internos mamarios como a los axilares.</p> <p>N3c cuando el cáncer se ha diseminado a los nódulos debajo de la clavícula.</p>	

También está la clasificación por grado histológico, basado en la descripción de las células del tumor bajo el microscopio, de acuerdo al sistema de grados de Nottingham, se puede clasificar de acuerdo a las siguientes características [77] :

- Formación tubular: Que tanto se parece el tumor en estructuras encontradas en tejido normal, como los conductos mamarios de leche.
- Grado nuclear: Se evalúa el tamaño y la forma de los núcleos en las células cancerosas.
- La proporción mitótica: Se refiere al número de células en división celular que están presentes, lo que permite medir que tan rápido las células cancerosas están proliferando.

A cada categoría se le asigna una puntuación del 1 al 3; siendo 1 cuando el tejido tumoral se asemeja al normal y 3 cuando la mayoría de las células cancerosas en el tejido tumoral son anormales. Al final se suma la puntuación de cada categoría para poderlos clasificar de acuerdo a [77]:

- De 3 a 5 puntos – Grado G1, bajo o bien diferenciado.
- De 6 a 7 puntos – Grado G2, intermedio o moderadamente diferenciado.
- De 8 a 9 puntos – Grado G3, alto o pobremente diferenciado.

Por otra parte, el cáncer de mama se puede clasificar en subtipos moleculares de acuerdo al análisis de expresión de genes mediante microarreglos [78]. Una firma genética es definida como aquel patrón de expresión genética que representa un estado biológico único [79]. Existen varias firmas genéticas que analizan diferentes genes relacionados con la sobrevida, reincidencia o de mal pronóstico de pacientes con cáncer de mama para poder definir los siguientes subtipos moleculares [80-83]:

Luminales. Se caracterizan por expresar las citoqueratinas 8 y 18. Pueden llegar a expresar receptores a hormonas como el receptor a estrógenos (ER, por sus siglas en inglés) o el receptor a progesterona (PgR, por sus siglas en inglés) o ambos. Expresan genes como: el transportador del flujo de Zinc regulado por estrógenos o también conocido como *LIV1* y de la ciclina D1 (cuyo gen es el de *CCND1*). Suelen responder bien a terapias hormonales [81, 84].

Tumores que sobre-expresan el receptor al factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2, por sus siglas en inglés). Se pueden caracterizar por que no expresan receptores a hormonas o en muy bajos niveles de ER. Expresan mucina-1 (*MUC1*) y E-cadherina [85]. Se caracterizan por sobre-expresar genes como el de la proteína 7 ligada al receptor de factores de crecimiento (*GRB7*, por sus siglas en inglés) o el gen que codifica para un fosfolipasa específica del glicosilfosfatidilinositol (*PGAP3*, por sus siglas en inglés). Suelen presentar mutaciones en p53 y en PTEN. Actualmente se utiliza Trastuzumab como terapia, un anticuerpo monoclonal contra HER2 [86, 87].

Basales. Dentro de éstos se encuentran los que son triples negativos, ya que no expresan ER, PgR ni HER2. Suelen tener mutaciones el gene BRCA1, que codifica para una fosfoproteína nuclear que tiene un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Tienen una alta expresión de marcadores basales como las queratinas 5, 6, 14, 17 y EGFR [16,24]. Los tumores de este subtipo tienden a realizar metástasis hacia órganos viscerales [39]. El tamaño de los tumores es mucho más grande que otros tipos de tumores, su crecimiento es más rápido por estar asociado a su alta expresión de genes de proliferación. Actualmente no se tiene una terapia dirigida para este subtipo molecular y son considerados los más agresivos [40].

Tumores que son parecidos al tejido normal. Aquellos que no presentan características de los demás subtipos, se caracterizan por la expresión de citoqueratinas 8 y 18.

2.6 Terapias actuales contra el cáncer de mama

La clasificación de los tumores por sus características ha llevado a que los pacientes reciban una terapia más dirigida de acuerdo a su subtipo. Sin embargo, también depende de la etapa en el cáncer que haya sido diagnosticado, que tan rápido está creciendo el tumor. Los tratamientos incluyen: cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal [88] .

La cirugía ocurre al resear el tumor, el tejido no neoplásico de alrededor (conocido como borde) e incluso se puede llegar a remover la mama en sí. En busca de ver si células cancerosas del tumor han diseminado, se hace una biopsia del nodo linfático axilar ya que es el primer nodo que pudiera recibir células cancerosas hacia el sistema linfático. A pesar de que se haya removido todo el tumor, los pacientes suelen recibir terapia adyuvante o post-operativa como quimio o radioterapia con el fin de erradicar posibles células cancerosas reminiscentes [88].

La quimioterapia suele administrarse como terapia neoadyuvante o pre-operativa para reducir el tamaño del tumor. Es la administración intravenosa u oral de agentes que producen citotoxicidad en las células cancerosas o que prevén que se dividan. Los agentes quimioterapéuticos más usados son las antraciclinas como doxorubicina o epirubicina, o el uso de taxanos como paclitaxel o docetaxel, de igual manera el uso 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, entre otros agentes [89] .

La radioterapia es el tratamiento que usa energía de rayos X u otros tipos de radiación ionizante con el objetivo de eliminar a las células cancerosas o evitar que sigan proliferando [90] .

Pacientes con tumores del subtipo luminal reciben terapia hormonal para remover o bloquear la acción de las hormonas y así evitar la proliferación de células cancerosas. La terapia hormonal incluye moduladores de la respuesta selectiva al receptor a estrógenos (SERM, por sus siglas en inglés) o inhibidores de la aromataasa (IA). Algunas mujeres reciben como tratamiento agonistas de la hormona luteinizante para disminuir los niveles de estrógenos y progesterona en el cuerpo. Otras reciben inhibidores de aromataasa para impedir que la enzima produzca estrógeno a partir de andrógenos [88]. El tamoxifen es un SERM que compite con el ER para poderse unir al estradiol, tiene una actividad anti-proliferativa por lo que suele utilizarse como tratamiento hormonal [91].

HER-2 es un receptor tipo tirosina cinasa, miembro de la familia de receptores a factores de crecimiento epidérmico, su sobre-expresión se asocia con un pobre pronóstico. Los tumores que sobre-expresan HER-2 reciben terapia anti-HER2 en combinación con agentes quimioterapéuticos citotóxicos. El primer agente comercial

cuyo blanco es HER2 fue el anticuerpo monoclonal humanizado Trastuzumab (Herceptin®). Trastuzumab se une a la parte extracelular del receptor, inhibiendo la proliferación de las células que sobre-expresan HER2. El uso en pacientes ha mejorado la supervivencia de éstos. Se utiliza como terapia adyuvante para pacientes diagnosticados en etapas tempranas. Para pacientes con metástasis pero que sobre-expresan al receptor se les da Trastuzumab en combinación con quimioterapia [92].

Lapatinib es una molécula pequeña que inhibe tirosinas cinasas, es capaz de interferir en la señalización mediada por HER2. Lapatinib evita la auto-fosforilación o activación de HER2 o EGFR al unirse a la cavidad de unión del ATP. Los pacientes con metástasis que sobre-expresan HER2 y ER reciben lapatinib en combinación con letrozole. Pacientes que ya han recibido alguna terapia de taxanos, antraciclina y Trastuzumab pero que sobre-expresan HER2, reciben lapatinib en combinación con capecitabina, agente quimioterapéutico convertido a 5-fluorouracilo en el tejido tumoral. A pesar de que se tiene una terapia dirigida a HER2, algunos pacientes siguen avanzando en el curso de la enfermedad o presentan reincidencia por la resistencia a Trastuzumab [93].

Los pacientes cuyos tumores son basales no reciben una terapia dirigida, su única opción es recibir quimioterapia con agentes citotóxicos. Sin embargo, se están estudiando proteínas como la polirribosa adenosin difosfato polimerasa (PARP, por sus siglas en inglés). La PARP1 es una familia de enzimas que están involucradas en la reparación del DNA por escisión de bases, transcripción de genes, en la arquitectura de cromatina y apoptosis en células normales [94].

La inhibición de PARP lleva a la acumulación de quiebres de DNA de cadena sencilla y por ende de doble cadena que provoca que al replicarse las células entren en apoptosis y mueran. El uso de inhibidores de PARP1 lleva a la muerte de células con mutaciones en BRCA, característica presente en tumores del subtipo basal. El uso de estos inhibidores como iniparib, olaparib y veliparib, están siendo investigados más a fondo en pacientes con este subtipo molecular de tumor [95].

Las células cancerosas ante los tratamientos existentes como quimioterapia, radioterapia tienden a generar resistencia dada la expresión de genes de resistencia

a múltiples fármacos. Las células cancerosas tienen transportadores transmembranales de la familia ABCB1 dependientes de ATP que reducen la concentración intracelular de esos agentes quimio y radio-terapéuticos por bombas de eflujo [96]. Ante otras terapias, las células cancerosas han encontrado como hacerse resistentes por ejemplo, con receptores a los que los fármacos no se pueden unir o rutas de señalización activas independientes de la unión del ligando al receptor. La resistencia a las terapias existentes causa la recurrencia del cáncer [97].

2.7 Células Troncales y Células Troncales Tumorales

Las células troncales normales (CT) se encuentran en bajas proporciones en los tejidos, tienen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse hacia distintos tipos celulares [98]. Se pueden dividir en dos clases funcionales: 1) las que renuevan el tejido al reemplazar células diferenciadas maduras que mueren. 2) Las que se activan en respuesta a factores ambientales, por ejemplo en respuesta a daño y que permiten la reparación del tejido [99]. También pueden clasificarse de acuerdo a su potencial de diferenciación [100]: i) Totipotenciales, CT que son capaces de formar todos los linajes del organismo, en mamíferos solo el cigoto es totipotencial. ii) Pluripotentes, estas células son capaces de formar todos los linajes del embrión, incluye las CT embrionarias (CTE). Las CTE son células derivadas de la masa interna celular del blastocisto en etapas tempranas del embrión; expresan factores de transcripción como Oct4, Sox2 y Nanog que regulan la pluripotencia [101]. iii) Multipotentes, que tienen el potencial de formar células restringidas a una capa embrionaria en particular. iv) Unipotente, aquellas células que forman un solo tipo celular en específico.

Las células troncales tumorales (CTT) se refiere a la subpoblación celular cancerosa capaz de diferenciarse y auto-renovarse, sin necesariamente definir el origen de la célula [102]. El descubrimiento de las CTT en pacientes con cáncer y el estudio de su papel en la biología de tumores indican que juegan un papel fundamental en el curso clínico de la enfermedad. Se les ha implicado en el mantenimiento y crecimiento del tumor contribuyendo a la heterogeneidad celular

del tumor [103], a la invasión, metástasis y resistencia a agente citotóxicos, radiación y/o quimioterapia [104]. Por lo tanto, la presencia de un mayor número de CTT reduce tanto el tiempo de sobrevida libre de metástasis como la sobrevida total [105].

Las CTT pueden adquirir características similares a las CT, en la Fig 4. Se muestran las características comunes que comparten: i) Autorenovación, ii) Capacidad de diferenciación, iii) Actividad de la telomerasa y rutas anti-apoptóticas, iv) Incremento en la actividad de los transportadores de membrana y v) Supervivencia independiente de anclaje y la habilidad de migrar. Cada una de estas características funge una funcionalidad de acuerdo a si se presenta en CT o en CTT [106].

En la actualidad no existe un conjunto de marcadores que sean capaces de identificar específicamente ni sensiblemente a la subpoblación de CTT. Sin embargo, como se muestra en la tabla 2 se han utilizado marcadores para describir a las CTT en diferentes tipos de cánceres sin ser específicos ni universales [107].

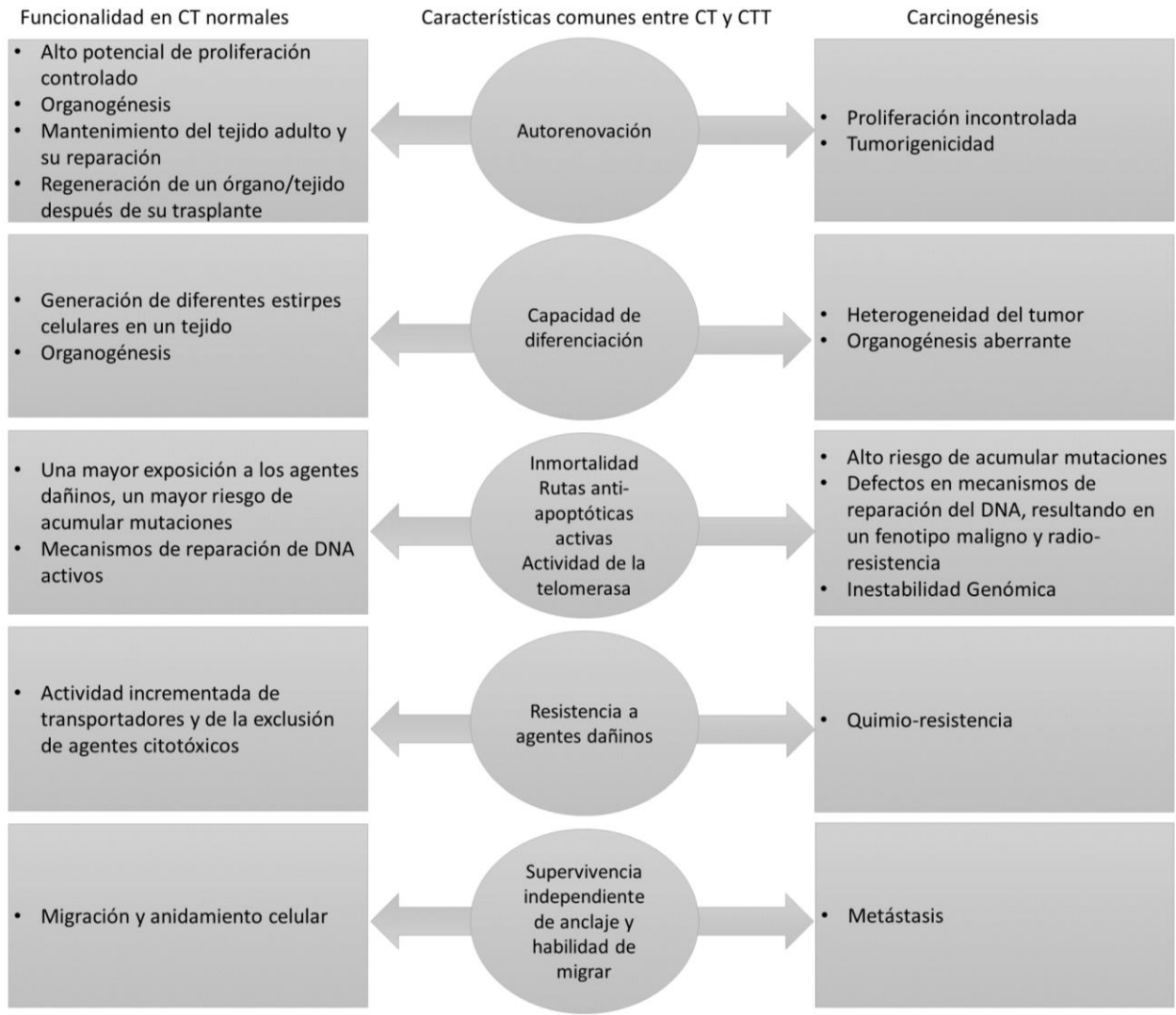


Fig. 4. Características comunes entre CT y CTT. Modificado de [106].

Tabla 2. Poblaciones de CTT y sus correspondientes marcadores en varios tipos de cánceres. Modificado de [107]

Tipo de Cáncer	Marcadores
Leucemia/Linfoma	CD34 ⁺ , CD47 ⁺ , CD96 ⁺ , CD25 ⁺ , CCL-1 ⁺ CD38 ⁻
Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	CD44 ⁺ , BMI 1 ⁺ , CD24 ⁺ , CD133 ⁺
Glioblastoma multiforme	CD133 ⁺ , CD49f ⁺ , JAM-A, HER2 ⁺ , EGFRvIII ⁺
Pulmón	CD44 ⁺ , CD133 ⁺
Mama	ESA ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} Lin ⁻ , ALDH1 ⁺ , CD133 ⁺ , CD61 ⁺
Ovario	CD44 ⁺ , CD177 ⁺
Páncreas	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ESA ⁺
Gástrico	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ABCB1 ⁺ , ABCG2 ⁺
Colorectal	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , CD166 ⁺ , CD24 ⁺
Próstata	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH ⁺
Vejiga	CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD49f ⁺
Melanoma	CD20 ⁺ , CD271 ⁺ , ABCB5 ⁺

2.8 Células Troncales Tumorales Mamarias

En el 2003 Al-Hajj y colaboradores identificaron una subpoblación en muestras de tumores mamarios humanos, caracterizada por la expresión de marcadores de superficie ESA⁺ CD44⁺ CD24^{-/low}, las CTTM. Se requieren 50, 000 células totales sin separarse con base en un fenotipo en específico para generar tumores en ratones NOD/SCID; mientras que sólo se requieren 200 células ESA⁺ CD44⁺ CD24^{-/low} y 1000 células CD44⁺ CD24^{-/low} para generar tumores. Los tumores generados por ambas subpoblaciones tienen una mezcla de células cancerosas, indicando que recapitulan la heterogeneidad del tumor del cual provienen [108].

Las CTTM han sido aisladas y cultivadas *in vitro* a partir de muestras de pacientes o de líneas celulares de cáncer de mama [109, 110]. Las CTTM tienen la habilidad de formar mamoesferas en cultivo en superficies no adherentes en presencia de factores de crecimiento [111, 112]. Cuando se evalúa la autorenovación

de células con el fenotipo CD44⁺ CD24^{-/low} mediante pases seriados de mamoesferas, se observó que solo una fracción es capaz de autorenovarse. Lo anterior puede indicar que este fenotipo no es capaz de identificar todas las CTTM [113].

CD44 es una glicoproteína de superficie celular que une ácido hialurónico, su señalización celular se encuentra involucrada en adhesión, movilidad, migración e invasión [114]. CD24 es una glicoproteína de superficie celular que se expresa en bajos niveles en tumores y vinculada con la proliferación y capacidad de realizar metástasis [115].

Otro marcador reconocido para identificar a las CTTM, es la alta actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH, por sus siglas en inglés), así como en CT hematopoyéticas y neurales. Tiene un papel importante en la diferenciación temprana de CT a través de la oxidación de retino hacia ácido retinoico [116]. Se ha encontrado que induce la radio-resistencia a través de la remoción de radicales de oxígeno que son producidos durante la terapia y al generar compuestos antioxidantes [117]. Además se asocia a la progresión, invasión y metástasis [118]. Otros marcadores que han sido utilizados para identificar CTTM son CD133, C49f, CD61.

Por otra parte, se han identificado las CTTM a partir de la desregulación que presentan en vías de señalización como Notch, Hedgehog, Wnt. Dichas vías de señalización juegan un rol importante durante el desarrollo embrionario, se han implicado en la resistencia a terapias e incremento en el número de CTTM [119].

La familia de Notch está formada por proteínas transmembranales que se han asociado con el destino celular en el desarrollo, por ende se encuentran expresadas en células troncales y en progenitores tempranos [120]. Notch-4 suprime el desarrollo de las glándulas mamarias, mientras que en cáncer promueve el desarrollo de tumores mamarios [121]. Miembros de la familia Notch se encuentran expresados en mamoesferas y sus ligandos afectan la autorenovación [106].

La vía de señalización de Wnt se encuentra involucrada en la determinación del destino celular de varios tejidos, incluyendo el de la glándula mamaria [105]. En cáncer de mamá la sobre-expresión de Wnt lleva a la formación de tumores, encontrando que β -catenina juega un papel importante en la desregulación de células troncales hacia CTT [122].

La vía hedgehog es importante durante el desarrollo embrionario y la determinación del destino celular. En cáncer se ha encontrado que la proteína PITCH, receptor de membrana de la familia hedgehog, tiene un papel clave en la tumorigénesis en etapas tempranas [123].

Por otra parte, las CTTM se caracterizan por la expresión de genes reguladores de la pluripotencia como: *POU5F1* (que codifica para Oct3/4), *NANOG* y *SOX2*, que se tienen un papel importante en el desarrollo y en la tumorigénesis. Por ejemplo, la línea celular de epitelio mamario MCF-10A fue transducida con los factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4. Resultando en células parecidas a las “iPS” (induced Pluripotent stem cells) que adoptaron el fenotipo de CTTM por su alta expresión de $CD44^+ CD24^-$, $ALDH^+$ y por tener una alta tumorigenicidad *in vivo* [124].

Existe la evidencia que las CTTM pudieran originarse a partir de EMT ya que son susceptibles a la transformación maligna y tienen comportamientos similares a las CT y a las CTT [125]. Las células $CD44^+ / CD24^{-/low}$ extraídas a partir de tejidos mamarios normales y cancerosos expresan muchos genes asociados a EMT. Las células que han sufrido EMT se comportan como CTTM *in vitro*, pues son capaces de formar diez veces más mamoesferas que las correspondientes células control [126].

Adicionalmente, el proceso de EMT promueve la adquisición de un fenotipo invasivo y metastásico en tumores mamarios [127]. Las CTTM muestran motilidad e invasividad celular aumentadas, y sobre-expresan genes que promueven la formación de metástasis [128, 129].

Las vías de señalización que mantienen la pluripotencia tanto en CT como en las CTT, también regulan el proceso de EMT. Notch puede llevar a la iniciación del

programa al activar K κ B o al alterar la vía de señalización de TGF- β [130], el cual induce la transcripción de factores como Snail, Twist, Six, Zeb que orquestan EMT. TGF- β se ha visto que regula el fenotipo troncal y mantiene la pluripotencia en cáncer de mama [126, 131]. La vía de hedgehog permite el proceso de EMT al inducir la expresión de un represor de E-cadherina, *SNAIL1* [132]. Estos datos proporcionan evidencia que correlaciona tres procesos celulares que son clave en la progresión de neoplasias: el proceso de EMT, la formación de metástasis, y la expansión de CTT.

2.9 Las CTTM son responsivas a quimiocinas

El microambiente del tumor se ha reportado que juega un papel importante en el soporte y mantenimiento de las CTT. La vía de señalización de IL-6 que conlleva a la activación de STAT3/NF κ B que se encuentra involucrada en la resistencia a Trastuzumab y en incremento de CTTM en células HER2⁺. El bloqueo de la vía de señalización de IL-6 *in vivo* inhibe la formación de metástasis y el crecimiento del tumor [133].

Dentro del microambiente tumoral se encuentran las quimiocinas que son proteínas de bajo peso molecular de 8-12 kDa y que se componen de uno a tres puentes disulfuro. Tienen como función principal regular el tráfico de leucocitos tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas. Tienen la capacidad de unirse a varios receptores. Se dividen en subgrupos de acuerdo a su estructura y función. Estructuralmente se clasifican en cuatro subgrupos de acuerdo al número y localización de los residuos de cisteínas en el amino terminal [134, 135]:

- i) CXC o α -quimiocinas – tiene entre la primera y segunda cisteína un amino ácido diferente a cisteína.
- ii) CC o β -quimiocinas – cuando la primera y segunda cisteína queda adyacentes.
- iii) XC o γ -quimiocinas – aquellas que no tienen la primera cisteína.
- iv) CX₃C o δ -quimiocinas – tienen entre la primera y segunda cisteína tres residuos.

De acuerdo a su función se dividen en las quimiocinas de homeostasis e inflamatorias. Las de homeostasis se expresan en órganos linfoides y median el tráfico de leucocitos hacia éstos órganos, juegan un papel importante en la hematopoyesis. Las inflamatorias se expresan en tejidos dañados o en sitios de infección para reclutar a los leucocitos, importantes en la respuesta hacia insultos inmunológicos como los patógenos. Las quimiocinas pueden provenir de células como fibroblastos, células endoteliales, CT mesénquimales (CTM) o incluso de las células tumorales [136]; tienen la habilidad de inducir quimiotaxis, inflamación, vigilancia inmune y tiene un papel en la progresión del cáncer tanto de manera anti como pro-tumoral [137].

En cáncer, no solo tienen efecto en las células del sistema inmune, sino pueden tener efecto sobre las células del estroma e incluso sobre las células cancerosas [138, 139]. Son responsables del reclutamiento de células del sistema inmune que generan una respuesta anti-tumoral, soportan la sobrevivencia tumoral, están involucradas en la progresión y en metástasis [140]. Las señales en conjunto con factores de crecimiento y moléculas provenientes de la matriz extracelular establecen un microambiente favorable para: i) adquisición de un fenotipo CTT; ii) supervivencia, autorenovación de las CTT e inhibir la diferenciación [141, 142]. A continuación se encuentran ejemplos de quimiocinas que se han asociado al fenotipo CTT.

2.9.1 CXCR1

En 2010, Ginestier y colaboradores estudiaron la subpoblación correspondiente a CTTM por la expresión de ALDH, identificando que esta subpoblación sobreexpresa el receptor CXCR1. La población CTTM ALDH⁺ aumenta cuando se agrega la citocina ligando al receptor IL-8 o CXCL8, al igual que aumenta la capacidad invasiva. Al inhibir al receptor CXCR1 con un anticuerpo bloqueador o repertaxina (molécula pequeña inhibidora de CXCR1/2) resultó en el decremento de la subpoblación CTTM tanto *in vitro* teniendo ocho veces menos formación de

tumoresferas, y en modelos xenógrafos. Cabe destacar que dicho efecto no se observó al utilizar un anticuerpo bloqueador anti-CXCR2 [143].

Al inyectar células ALDH⁺/CXCR1⁺ o ALDH⁺/CXCR1⁻ a ratones NOD/SCID, ambas subpoblaciones generaron tumores sin embargo, solo las ALDH⁺/CXCR1⁺ recapitulaban la heterogeneidad del tumor de origen. El uso de repertaxina retrasó el crecimiento de tumores y el desarrollo de metástasis en ratones NOD/SCID. IL-8 se une tanto a CXCR1 como a CXCR2, la repertaxina es capaz de inhibir ambos receptores. Sin embargo, CXCR1 es el que se sobre-expresa en las células ALDH⁺ [143].

Se trataron tumores con repertaxina o en combinación con docetaxel lo que provocó un decremento de un 75% de células ALDH⁺ y de igual manera de la subpoblación CD44⁺ CD24^{-/low}. En modelos de metástasis se observó una reducción cuando se utilizó repertaxina, que posiblemente pudiera verse mediado por la subpoblación de CTTM. En este trabajo vieron que el eje IL-8/CXCR1 juega un papel regulatorio sobre la subpoblación de CTTM [143].

Aunado a lo anterior se ha observado que la actividad incrementada de la vía de señalización de TGF- β y la expresión de IL-8 lleva al incremento de CTTM en tumores triple negativos y a la resistencia por paclitaxel. Por ende el bloqueo de la vía de señalización de IL-8, previene la expansión de CTTM [144].

2.9.2 CCR7

Es un receptor a quimiocinas cuya función se ha implicado en metástasis en múltiples cánceres por su papel en la motilidad, migración, adhesión y supervivencia por inhibición de la anoikis [145-147]. En cáncer de mama existe una correlación entre la expresión de CCR7 con un pobre pronóstico, un mayor grado del tumor e incidencia de tumores secundarios [148, 149].

El grupo de Boyle y colaboradores, en 2016 observaron que al deletar CCR7 se veía reducida la formación de mamoesferas de células de epitelio mamario transformadas. Evaluaron fenotipos asociados a la troncalidad tanto en ratón CD24⁺

CD29^{hi}, como en humano CD44⁺ CD24⁻, encontrando que el 90% de estas células también expresan CCR7. La formación de mamoesferas se vio potenciada en células que expresan CCR7 al estimularlas con los ligandos CCL19 y CCL21; pero cuando se utiliza un antagonista a CCR7, CCL19 (8-83) disminuye la eficiencia de formación de mamoesferas [150].

En ratones knockout (KO) de CCR7 el tiempo de supervivencia es más largo que los que ratones que expresan el receptor, en cuanto a la formación de metástasis en ratones KO de CCR7 las metástasis se vieron disminuidas. En esos ratones KO se evaluó el porcentaje de la subpoblación troncal CD24⁺ CD29^{hi} la cual disminuyó significativamente. Analizaron la capacidad de formar tumores a partir de células capaces de formar mamoesferas dependiendo de la expresión o delección de CCR7, encontrando que aquellas células que expresan CCR7 presentan tumores con un mayor tamaño. Al utilizar CCL19 (8-83) se vieron reducidos los marcadores asociados a troncalidad, la reducción en la formación de mamoesferas y la formación de tumores primarios. Por lo que los autores concluyeron que CCR7 muy posiblemente tenga un papel regulatorio en la troncalidad de las CTTM [150].

2.9.3 CXCR4

La expresión de CXCR4 en células cancerosas mamarias es alta y no así en células epiteliales mamarias normales. En sitios metastásicos como: nódulos, pulmón, hígado, médula ósea; se ha encontrado que CXCR4 y su ligando CXCL12 se encuentran expresados. Se ha relacionado al eje CXCR4/CXCL12 con la capacidad metastásica de las células, el incremento de la motilidad, migración e invasión ante el estímulo por CXCL12. El bloqueo con un anticuerpo neutralizante α -CXCR4, disminuyó la capacidad invasora y metastásica de las células tanto *in vitro* como *in vivo* [145]. Dontu y colaboradores encontraron que CXCR4 fue uno de los genes cuya expresión se vio incrementada por cuatro veces cuando las células provenían de mamoesferas [106].

Dada la relación de la falla de las terapias con la subpoblación CTT, en cáncer de mama se han desarrollado sublíneas celulares a partir de la línea celular MCF7 que

son resistentes a tamoxifen (TAM-R). El desarrollo de la sublínea celular se propone como herramienta para la identificación de mecanismos importantes en el mantenimiento y viabilidad de células resistentes a estos compuestos. Se ha identificado que CXCR4 se encuentra vinculado con un factor de transcripción del receptor de aril hidrocarbano en la señalización que regula la tumorigenicidad de células TAM-R.

Cuando se usa el antagonista a CXCR4, AMD3100 se ven inhibidas *in vitro* la proliferación, invasión, la exclusión de colorantes como Hoechst 3342 que es característico de la subpoblación “side population” (SD) por sus alta expresión de transportadores ABC, e incluso disminuye el número de células TAM-R ALDH⁺. *In vivo* se inhibe el crecimiento del tumor de células TAM-R [151].

3. Antecedentes

3.1 El eje CCR5/CCL5 en la progresión del cáncer de mama

CCR5 es un receptor de siete pasos transmembranales acoplado a proteínas G, media cascadas de señalización en respuesta de unión a sus ligandos, siendo los principales CCL5, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β). Es conocido por ser el mayor co-receptor del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [152]. Se expresa en linfocitos T, monocitos, macrófagos y en células dendríticas inmaduras [152].

CCL5 pertenece a la familia de quimiocinas C-C, es uno de los genes blanco de la actividad de NF κ B. Se expresa en linfocitos T, plaquetas, macrófagos, en epitelio tubular, fibroblastos sinoviales, células endoteliales y en células cancerosas. Recluta linfocitos T, macrófagos, eosinófilos, basófilos a sitios de inflamación [153-155]. CCL5 se une a CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, GPR75, que son receptores acoplados a proteínas G. También se une de manera atípica a ACKR1, ACKR2 y a CCRL2, los cuales no señalizan [156-158].

A pesar de que CCL5 puede unirse a otros receptores, se ha observado que al mutar CCR5 las células de cáncer de mama no son capaces de responder a la quimiotaxis mediada por CCL5, sugiriendo entonces que el eje CCR5/CCL5 es importante [159]. CCL5 recluta células del sistema inmune y células estromales que promueven la formación del tumor. Por ejemplo, se incrementa la proporción de macrófagos asociados al tumor (TAM, por sus siglas en inglés) que secretan factores pro-angiogénicos y factores que suprimen la actividad antitumoral de linfocitos T [160, 161].

El eje CCR5/CCL5 favorece la progresión tumoral al actuar como factor de crecimiento, promoviendo la angiogénesis, modulando la matriz extracelular [162]. CCL5 contribuye a la activación de la integrina $\alpha v \beta 3$ y a la migración celular a través de PI3K/AKT que lleva a la activación de IKK α/β y de NF κ B. NF κ B promueve la invasión al elevar la secreción de metaloproteinasas como MMP-2 y/o MMP-9 que a su vez activan la señalización de RAC y de RHO [163-166].

El eje CCR5/CCL5 se ha implicado en proliferación celular al inducir la vía de mTOR sobre-regulando la ciclina D1, c-Myc. CCL5 se ha involucrado en la resistencia de tamoxifen en la sublíneas TAM-R por la vía STAT3 [167]. Por otra parte se sabe que CCL5 se encuentra altamente expresado en el tumor primario, en nódulos linfáticos y en sitios metastásicos en comparación con otras quimiocinas [155]. CCL5 es generado tanto por las células cancerosas, como células del sistema inmune y por CTM [168-170]. Se ha encontrado que la hipoxia induce la expresión de CCL5 y de CCR5 en células cancerosas. En condiciones de hipoxia es que se ve inducida la migración de las células [171]. Células troncales mesénquimales y osteoblastos producen CCL5 que en células cancerosas inducen migración, invasión y migración [168, 170].

Karnoub et al. 2007, observaron que CCL5 proveniente de CTM que son reclutadas al estroma por células cancerosas, le confiere ventajas a las células cancerosas de mama de colonizar sitios distantes como el pulmón. Dicho efecto sugiere que CCL5 ayuda en la extravasación de las células al sitio secundario o bien en la motilidad células, mediante la fosforilación del residuo serina 473 de la proteína Akt [168].

La inducción de la expresión de CCL5 se da por la activación del factor de transcripción c-Jun, que permite que AP-1 se una al promotor de CCL5 en células cancerosas HER2⁺ para inducir su expresión y la del factor de células troncales (SCF, por sus siglas en inglés). Mientras que CCL5 se ve implicado en el control de la migración e invasión, SCF se ha visto involucrado en la inducción del fenotipo troncal [172].

El análisis de 2,254 muestras de pacientes de cáncer de mama, demostró que existe una correlación con la expresión de CCR5 y de su ligando CCL5, sobretodo en pacientes con el subtipo molecular HER2 y del subtipo basal. La expresión de CCL5 correlaciona con la progresión tumoral. Se demostró que la transformación oncológica de células humanas epiteliales mamarias inmortalizadas induce la expresión del receptor CCR5 [173].

Las células CCR5⁺ mostraron una mayor invasividad celular que las células CCR5⁻ el uso de los antagonistas Maraviroc y Vicriviroc bloqueó la capacidad invasiva de las células *in vitro*. El papel de CCR5 en la formación de metástasis fue estudiado *in vivo*, empleando el antagonista específico Maraviroc. El tratamiento con Maraviroc redujo tanto el número como el tamaño de las metástasis pulmonares causadas por la inyección intravenosa de células tumorales del subtipo basal [173]. CCL5 se ha reportado se encuentra sobre-expresada en células con un fenotipo CD44⁺ CD24^{-/low} [174], lo cual sugiere que CCL5 pudiera estar ejerciendo una activación autocrina de manera similar a como lo hace IL-8 o IL-6.

4. Justificación del proyecto

Dado los antecedentes del eje CCR5/CCL5 es que en el presente proyecto se propuso analizar la importancia del receptor CCR5 en las funciones celulares que definen al fenotipo de las CTTM. Estos estudios podrían llevar a la identificación de CCR5 como marcador de CTTM o como un marcador adicional. Por otro lado, si CCR5 es importante en la función de las CTTM, este estudio llevaría a proponer su

inhibición farmacológica como una alternativa terapéutica para el tratamiento de subtipos específicos de cáncer de mama.

5. Hipótesis

La fracción de células de cáncer de mama del subtipo basal positiva para el receptor CCR5 se encuentra enriquecida para CTT, por lo que CCR5 podría ser utilizado como marcador de selección o adicional para CTTM.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Estudiar el papel del receptor CCR5 como marcador de troncalidad en células de cáncer de mama del subtipo basal.

6.2 Objetivos particulares

1. Comparar el perfil transcripcional de células CCR5⁺ y CCR5⁻ de cáncer de mama del subtipo basal.
2. Generar la sublínea de cáncer de mama del subtipo basal que sobre-exprese CCR5, como herramienta de estudio.
3. Estudiar la capacidad clonogénica de células que sobre-expresan el receptor CCR5.
4. Analizar simultáneamente la expresión de CCR5 y marcadores establecidos de CTTM por citometría de flujo, de células que sobre-expresan al receptor CCR5.
5. Analizar la expresión y activación de factores de transcripción asociados a pluripotencia (Oct4, Nanog y Sox2), de células que sobre-expresan al receptor CCR5.

7. Metodología

7.1 Líneas celulares y tratamientos

La línea celular de cáncer de mama del subtipo basal, SUM-159 se cultivó en medio F12 Ham's (Gibco) suplementado con: 5 µg/ml de insulina (Santa Cruz), 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma) y 5% de suero fetal bovino (SFB, de Gibco) a 37°C a 5% de CO₂. En experimentos en los que se adicionó el ligando CCL5 (R&D Systems) fue a una concentración de 25 ng/ml. El antagonista a CCR5, Maraviroc (SelleckChem) se utilizó a 100 nM y el correspondiente control de solvente fue medio con 0.01% de DMSO (Sigma). La línea celular de cáncer de mama del subtipo luminal, MCF7 fue empleada como control positivo en los experimentos de inmunoblot dada su expresión de la proteína Sox2, se cultivó en medio DMEM de alta glucosa (4.5 g/l, Gibco) suplementado con 10% SFB (Gibco) a 37 ° C y en una atmósfera de 5% de CO₂.

7.2 Expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo y separación de subpoblaciones

Las células se cosecharon con tripsina 0.05% EDTA (Gibco) diluida 1:1 con PBS (Gibco) para evitar eliminar artificialmente al receptor de interés. Se realizó una suspensión celular de 1 x 10⁵ células en 50 µl de amortiguador de tinción (PBS al 10% de SFB inactivado por calor). Para la tinción del receptor CCR5 se utilizaron 2.5 µl del anticuerpo αCCR5-APC contra humano/ratón/rata clona CTC5 (R&D Systems) en 50 µl del amortiguador de tinción. Para la tinción del receptor CD44 se utilizaron 0.5 µl del anticuerpo αCD44-BV421 clona G44-26 (BD Bioscience) en 50 µl del amortiguador de tinción y para el receptor CD24 se utilizaron 2 µl del anticuerpo αCD24-PE clona ML5 (BD Bioscience) en 50 µl del amortiguador de tinción.

Los tubos con los anticuerpos se incubaron a 4° C en oscuridad y en agitación constante (200 rpm) por 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 800 g por 5 min, se retiró el sobrenadante y se les adicionaron 100 µl de amortiguador de lavado

(PBS al 1% de SFB inactivado por calor y 0.09% de azida de sodio). Se procedió a centrifugar a 800 g por 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 200 µl de PBS. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Scientific). El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo 10.0.7r2 (Tree Star).

Para separar las muestras teñidas, las células se adquirieron en el citómetro de flujo FACS ARIA III (BD Bioscience). Se establecieron las regiones de las subpoblaciones positivas y negativas para el receptor CCR5. La separación celular se realizó en condiciones de asepsia hacia tubos de centrifuga de 15 ml (Corning) con medio de cultivo para SUM-159, estreptomycin y penicilina.

A las células separadas de acuerdo a los fenotipos de interés se les extrajo el ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés) con el kit "RNeasy Plus Mini" (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con el objetivo de realizar un análisis de microarreglos.

7.3 Ensayos de formación de mamoesferas

Se utilizaron placas de 96 pozos de ultra-baja adherencia (Corning COSTAR) sembrando 100 células únicas en 100 µl de medio MammoCult (StemCell Technologies) con suplementos de proliferación 1:10 (StemCell Technologies), heparina a 4 µg/ml (StemCell Technologies) e hidrocortisona a 0.48 µg/ml (Sigma). Las placas se incubaron a 37 ° C y 5 % de CO₂, reconstituyendo cada pozo con 50 µl del medio correspondiente a la condición experimental cada 3 días.

Tras 7 días de incubación, se documentó la formación de mamoesferas mediante la toma de fotografías con una cámara acoplada a un microscopio invertido (Nikon Ti-U). La cuantificación del número de mamoesferas se realizó con el software NIS Elements BR (Nikon). Se consideró una mamoesfera, como una colonia de células con un diámetro mayor a 80 µm [175].

7.4 Análisis de microarreglos

A partir del RNA procedente de la separación de células SUM-159 con fenotipo CCR5⁻ o CCR5⁺, se realizaron microarreglos con el chip HuGene-1 0-st para 28,869 genes (Affymetrix) en las instalaciones de la unidad de microarreglos del Kimmel Cancer Center, Universidad Thomas Jefferson (Dr. Richard Pestell). Los datos se normalizaron inter e intra muestra utilizando la paquetería de Limma del software R Studio (Versión 0.99.902.) Posteriormente con el programa “Transcriptome Analysis Console” (TAC, V 3.1.0.5) de Affymetrix se obtuvo la lista de expresión diferencial de genes por fenotipo y se realizó el mapa de calor correspondiente con ayuda del software GEN-E [176]. La firma de expresión diferencial se alimentó al “Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” (“DAVID”) [177, 178] disponible en la página <https://david.ncifcrf.gov/> utilizando la herramienta de anotación funcional. Se analizó si los genes de expresión diferencial se encontraban relacionados con procesos biológicos o funciones moleculares asociadas a troncalidad.

7.5 Análisis de enriquecimiento de sub-grupos de genes (“GSEA, por sus siglas en inglés”)

A los datos normalizados de expresión provenientes de los microarreglos se les dio el formato requerido para correr el análisis de GSEA, generando un archivo (extensión .gct). Se creó un segundo archivo con las condiciones fenotípicas correspondientes a las dos condiciones biológicas (CCR5⁺ y CCR5⁻).

Para realizar la comparación se buscaron en la literatura firmas transcripcionales asociadas con la función biológica de troncalidad. Se emplearon tres firmas genéticas de referencia:

“Consensus Stemness Ranking” (“CSR”) [179]; los genes listados se encuentran sobre-regulados en muestras enriquecidas en CTT y en muestras de pobre pronóstico en varios tipos de cáncer. No se emplearon los genes sub-regulados pues el número de genes en la firma es menor a 25.

“Invasiveness Gene Signature” (“IGS”) [180] ; los genes contenidos se expresan diferencialmente en muestras de pacientes con cáncer de mama con el fenotipo CD44⁺CD24^{-/low} lin⁻ contra células de epitelio normal mamario.

“induced Pluripotent Stem cells” (“iPS”) [181]; los genes listados se expresan diferencialmente después de que se reprogramaron fibroblastos humanos hacia células pluripotentes mediante la expresión ectópica de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y Myc.

El análisis se realizó en el software “GSEA”, v2.2.3 del Broad Institute [182, 183] con las condiciones de 1,000 permutaciones del tipo genotípico. Los desarrolladores recomiendan el uso de estas condiciones, dado que el número de replicados de cada condición (n=3) es pequeña.

7.6 Generación de sublíneas SUM-159 que sobre—expresan establemente CCR5

Las células SUM-159 se cosecharon con tripsina 0.05% EDTA (Gibco), se contaron en hematocitometro y se evaluó la viabilidad mediante el método de exclusión de azul tripán (Sigma). Los ensayos se realizaron con cultivos con una viabilidad celular mayor al 95%. Se sembraron 1.5×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos (Nunc) en 2 ml de medio correspondiente y se incubaron por 24 h a 37 ° C y 5 % de CO₂.

Se prepararon los reactivos para la transfección con lipofectamina 2000 (Life Technologies) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizaron los plásmidos que codifican para el transgen *CCR5* subclonado en el vector pcDNA3.1⁺/Zeo⁺ y el correspondiente vector pcDNA3.1⁺/Zeo⁺ (proporcionados por la Dra. Eleanor Fish, Universidad de Toronto).

Los plásmidos se transfectaron a una concentración de 2 µg/ml en 300 µl de Opti-MEM (medio reducido en suero, ideal para la transfección con lipofectamina de Gibco) diluido 1:1 en Opti-MEM con lipofectamina. Se incubaron por 24 h y posteriormente se realizó una presión de selección por dos semanas con zeocina

(antibiótico de selección de Gibco) a 200 µg/ml como se describió previamente [184]. De aquí en adelante a la sublínea transfectada con el vector se le nombró SUM-159 pcDNA3.1 y a la sublínea con el transgen se le nombró SUM-159 CCR5⁺. La presión de selección se mantuvo durante todos los experimentos realizados con estas sublíneas.

7.7 Ensayos de gen reportero en respuesta a la actividad transcripcional de promotores a factores de transcripción asociados a pluripotencia

Las sublíneas celulares SUM-159 pcDNA3.1 y SUM-159 CCR5⁺ se cosecharon con tripsina 0.05% EDTA diluida 1:1 con PBS. Se sembraron 8×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos (Nunc) en 500 µl de medio correspondiente y se incubaron por 24 h a 37 ° C a 5 % de CO₂.

Se realizaron co-transfecciones transitorias para estos ensayos. Se prepararon los reactivos para la transfección con lipofectamina 2000 de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizaron los plásmidos cuyo reportero codifica para el gen de la luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional de los promotores de los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG subclonados en el vector pGL3 [185, 186] (proporcionados por el Dr. Richard Pestell, Universidad Thomas Jefferson). Se co-transfectó con el plásmido pSV-β-Galactosidasa de promega (donado por la Dra. Elizabeth Langley, INCAN) para normalizar la actividad relativa de la luminiscencia de acuerdo a la eficiencia de la transfección.

La co-transfección se realizó a una concentración de 0.45 µg/ml del plásmido reportero y a 0.05 µg/ml del plásmido pSV-β-Galactosidasa en 25 µl de Opti-MEM diluido 1:1 en Opti-MEM con lipofectamina. Se incubaron por 4 h a las condiciones adecuadas y se retiró el medio para poder agregar medio F12-Ham suplementado con 5 µg/ml de insulina y 1 µg/ml de hidrocortisona.

Consecutivamente a una incubación de 24 h se retiró el medio y las células se lisaron con 100 µl de amortiguador de extracción (ver tabla 3) en agitación (100 rpm) por 10 min. Se recolectó el sobrenadante de cada pozo a un tubo de 1.5 ml ultra-

transparente (Axygen). Posteriormente, a cada tubo se agregaron 300 μ l del amortiguador de ensayo (ver tabla 3). Al momento de la lectura en el luminómetro (Promega), a cada tubo se agregaron 100 μ l de la solución de luciferasa (ver tabla 3). Se obtuvo la lectura de cada uno de los tubos en unidades arbitrarias de luminiscencia. Subsecuentemente se cuantificó la señal de β -Galactosidasa. Se agregaron a cada tubo 100 μ l del amortiguador de reacción (ver tabla 3) y se dejó incubar por 1 h (protegido de la luz y a temperatura ambiente). La lectura al luminómetro se realizó al agregar 100 μ l de la solución aceleradora (ver tabla 3), dichas lecturas se usaron para normalizar las lecturas obtenidas de los plásmidos de gen reportero.

Tabla 3. Reactivos utilizados en ensayos de gen reportero

Amortiguador GME	Amortiguador de Extracción	Amortiguador de ensayo	Solución de luciferasa	Amortiguador de Reacción	Solución Aceleradora
25 mM de amortiguador Glicilglicina 15 mM MgSO ₄ 4 mM EGTA	Tritón X-100 al 1% 1 mM DTT Amortiguador GME	2.6 mM ATP 20 mM de K Phos 1.3 mM DTT Amortiguador GME	0.2 mM D-Luciferina 10 mM DTT Amortiguador GME	100 mM de amortiguador de Fosfato de sodio pH 8 1 mM MgCl ₂ Galactón	10 % del acelerador (Tropix Emerald) 0.2 N de NaOH

7.8 Inmunoblot

Para determinar la cantidad de proteína de Sox2 en las sublíneas celulares de SUM-159, se lisaron 1×10^6 células con 100 μ l de amortiguador RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa (recién añadidos, ver tabla 4) a 4 ° C durante 5 min. Se recuperó el lisado para centrifugarlo a 13,000 rpm, a 4 ° C por 10 min. Posteriormente, se separó el sobrenadante, con el cuál se procedió a determinar la concentración de proteínas mediante el método espectrofotométrico de BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce – Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

De cada muestra 30 µg de proteína total se separaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 12% en amortiguador Laemmli 6x (ver tabla 4) previamente incubado a 90 ° C por 10 min. En el gel se incluyó un marcador de peso molecular (Precision plus protein dual color Standard, BIO-RAD) y se corrió a 130 v por 1 h en amortiguador de corrida (ver tabla 4).

La transferencia a la membrana de PDVF (Millipore) se realizó en condiciones semi-húmedas, utilizando el TransBlot Turbo (BIO-RAD) a 1.3 Å, 25 v por 10 min. La membrana se bloqueó con TBS-Tween al 0.1% (TBST) al 5% de leche baja en grasa por 45 min en agitación constante. Se lavó con TBST y se procedió a incubar el anticuerpo primario durante toda la noche a 80 rpm a 4 ° C. Para la detección de Sox2 se utilizó el anticuerpo monoclonal de GeneTex (GTX627405) clona GT135 (donado por el Dr. Miguel Vargas, CINVESTAV) en una dilución 1:1000 en TBST al 1% de leche. Terminada la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBST.

Para la detección del anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con peroxidasa (IgG₁-HRP, Millipore) en una dilución 1:5000 en TBST al 1% de leche, durante 1 h a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBST. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit de ECL Western Blotting Substrate (Pierce, Thermo Scientific). Las membranas se expusieron a placas fotosensibles para sistemas de quimioluminiscencia (GE, Healthcare Bio Sciences).

Como control de carga se cuantificó β-actina (Santa Cruz) en la misma membrana empleando un anticuerpo policlonal en una dilución 1:4000 en TBST al 1 % de leche, después de haber utilizado un amortiguador de “stripping” (ver tabla 4) y haber bloqueado la membrana. El anticuerpo anti-β-actina se incubó durante toda noche en agitación constante y a 4 ° C. La incubación y detección del anticuerpo secundario, se realizó como ya se describió arriba.

Las placas se escanearon para poder tener una imagen digital y así cuantificar las bandas correspondientes a cada proteína. Para la cuantificación de las bandas se

utilizó el programa ImageJ [187]. Los valores provenientes de las bandas de Sox2 se normalizaron contra los valores de las bandas de β -actina.

Tabla 4. Reactivos utilizados para ensayos de Inmunoblot

Amortiguador RIPA	Inhibidores de proteasas y fosfatasas	Amortiguador Laemmli 6x	Amortiguador de Corrida	Amortiguador de Stripping (pH 2.2)
150 mM de NaCl	2 μ g/ml de Apropitinina	SDS al 12%	25 nM de Tris pH 8.3	15 g/L de Glicina
Tritón X-100 al 1%	5 μ g/ml de Leupeptina	β -Mercaptoetanol al 30 %	192 nM de Glicina	1 g/ml de SDS
Desoxicolato de sodio al 0.5%	1 μ g/ml Pepstatina A	Glicerol al 60%	SDS al 0.1%	1:100 de Tween 20
SDS al 0.1%	1 mM de Ortovanadato de Sodio	Azul de bromofenol al 0.012%		
50 nM Tris pH8	5 mM de Fluoruro de Sodio	0.125 M de Tris HCl		

7.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron en el programa Prism 6 (GraphPad). Los datos de los ensayos de mamoesferas se les realizaron pruebas de normalidad, con la prueba de D'Agostino & Pearson. Dado que los datos se comportan como una distribución no normal, se realizaron pruebas de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. Los porcentajes de células positivas de los ensayos de citometría de flujo se compararon con una t de student de dos colas Mann-Whitney. Los datos de los ensayos de gen reportero y de inmunoblot se analizaron con pruebas de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. En todos los casos el nivel de significancia (α) fue del 0.05%.

8. Resultados

8.1 Capacidad clonogénica y análisis del perfil transcripcional de células CCR5⁺ de la línea celular SUM-159

Se determinó por citometría de flujo la expresión de CCR5 en la línea celular SUM-159, el porcentaje de células que expresan el receptor varía de un 1 a un 3%. Para analizar las diferencias en células CCR5⁺ se realizó una separación celular por citometría de flujo. El análisis “post-sorting” muestra que no se tienen células positivas para CCR5 en aquellas que se separaron como CCR5⁻, mientras que aquellas consideradas como CCR5⁺ tienen un nivel de expresión de un 78% (Fig. 5A). Con dichas muestras se procedió a: i) realizar mamoesferas y ii) extraer el RNA para poder realizar un análisis de microarreglos.

En cuanto a los ensayos de mamoesferas se muestra que el fenotipo CCR5⁺ forma el doble del número de mamoesferas que el fenotipo CCR5⁻ (Fig. 5B). Por otra parte los datos de expresión transcripcional obtenidos por el análisis de microarreglos se normalizaron inter e intra muestra para obtener una lista de genes de expresión diferencial entre los fenotipos CCR5⁺ y CCR5⁻. En la Fig. 5C se muestra un mapa de calor de los genes de expresión diferencial y el análisis de anotación funcional para procesos biológicos y funciones moleculares realizado con “DAVID”.

En su mayoría los genes que se expresan diferencialmente corresponden a RNAs pequeños, nucleares o nucleolares. Con el análisis de anotación funcional con “DAVID” se encontró que estos genes sub-expresados en el fenotipo CCR5⁺ se encuentran involucrados en la biosíntesis de proteínas, en la regulación negativa de la proliferación y del tamaño celular, así como en la unión de RNA y en la estructura del ribosoma. Sin embargo, no se identificó ninguna función molecular ni proceso biológico de troncalidad.

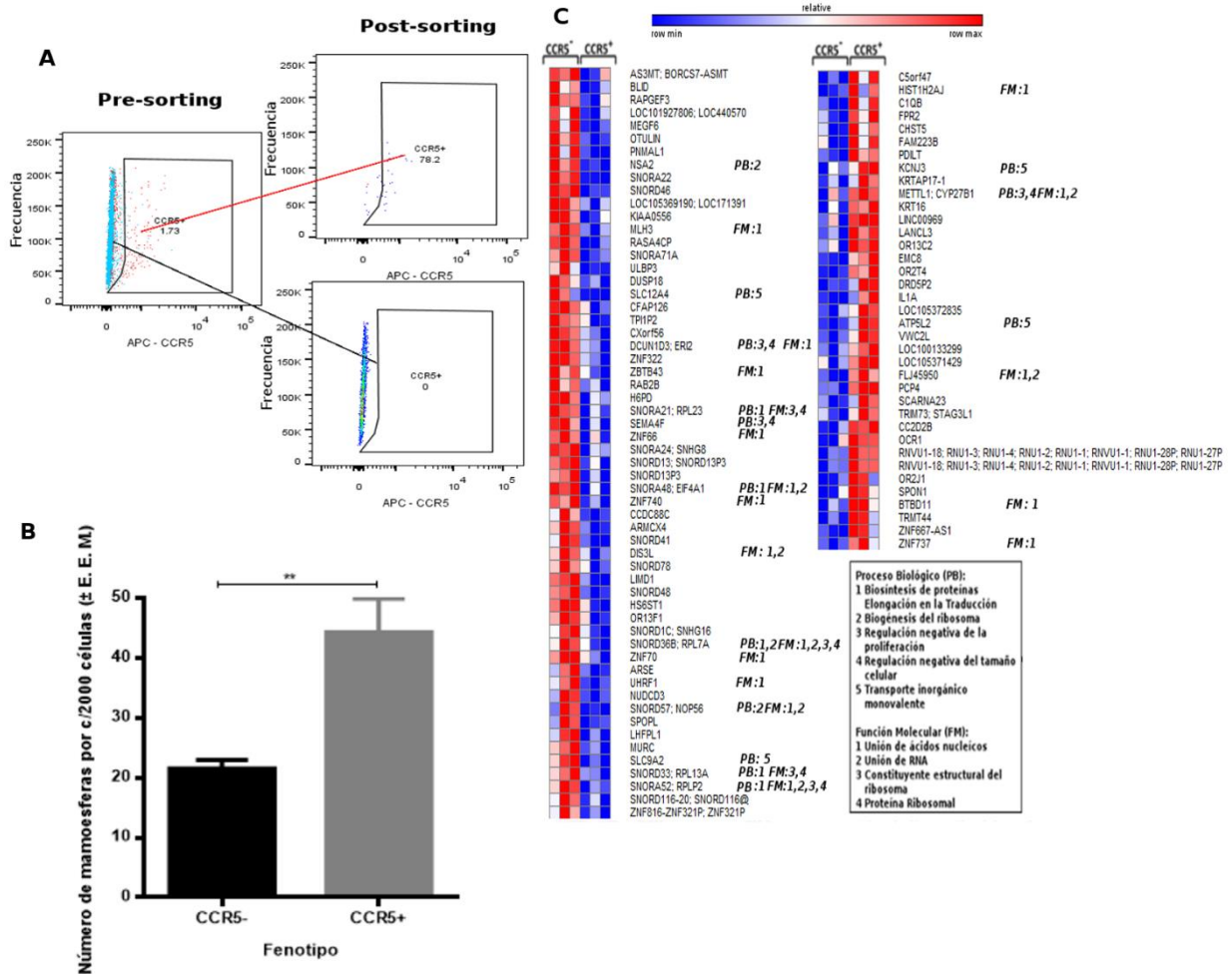


Fig. 5. Clonogenicidad y genes de expresión diferencial de células SUM-159 CCR5⁺ y CCR5⁻. A) Cuantificación de la expresión de CCR5 por citometría de flujo en SUM-159 y análisis de la expresión de CCR5 “post- sorting” en ambas muestras. B) Mamoesferas a partir de las células sorteadas en A. ** P < 0.01 (Prueba estadística, t de student no pareada). C) Mapa de calor de genes de expresión diferencial entre los fenotipos CCR5⁺ y CCR5⁻ y el correspondiente análisis de anotación funcional (DAVID).

8.2 Análisis de enriquecimiento de sub-grupos de genes (“GSEA”) de células CCR5⁺ de la línea celular SUM-159

Un segundo análisis de los datos del perfil transcripcional se comparó si el fenotipo de interés se encontraba enriquecido en un conjunto de genes que se han asociado a troncalidad. [183]. Analizando genes de la firma “CSR”, un subconjunto de genes

sobre-regulados está enriquecido en el fenotipo CCR5⁺, lo que puede significar que la expresión del receptor pudiera identificar a células con funciones asociadas a troncalidad (Fig. 6A). Al analizar la firma de “iPS”, los genes sobre-regulados se encontraron enriquecidos el fenotipo CCR5⁻ indicando que pudiera contener una subpoblación de células con características troncales (Fig. 6B). Por último los resultados con la firma “IGS” muestran que el fenotipo CCR5⁺ se encuentra enriquecido tanto en los genes sobre-expresados como en los sub-regulados (Fig. 6C y 6D).

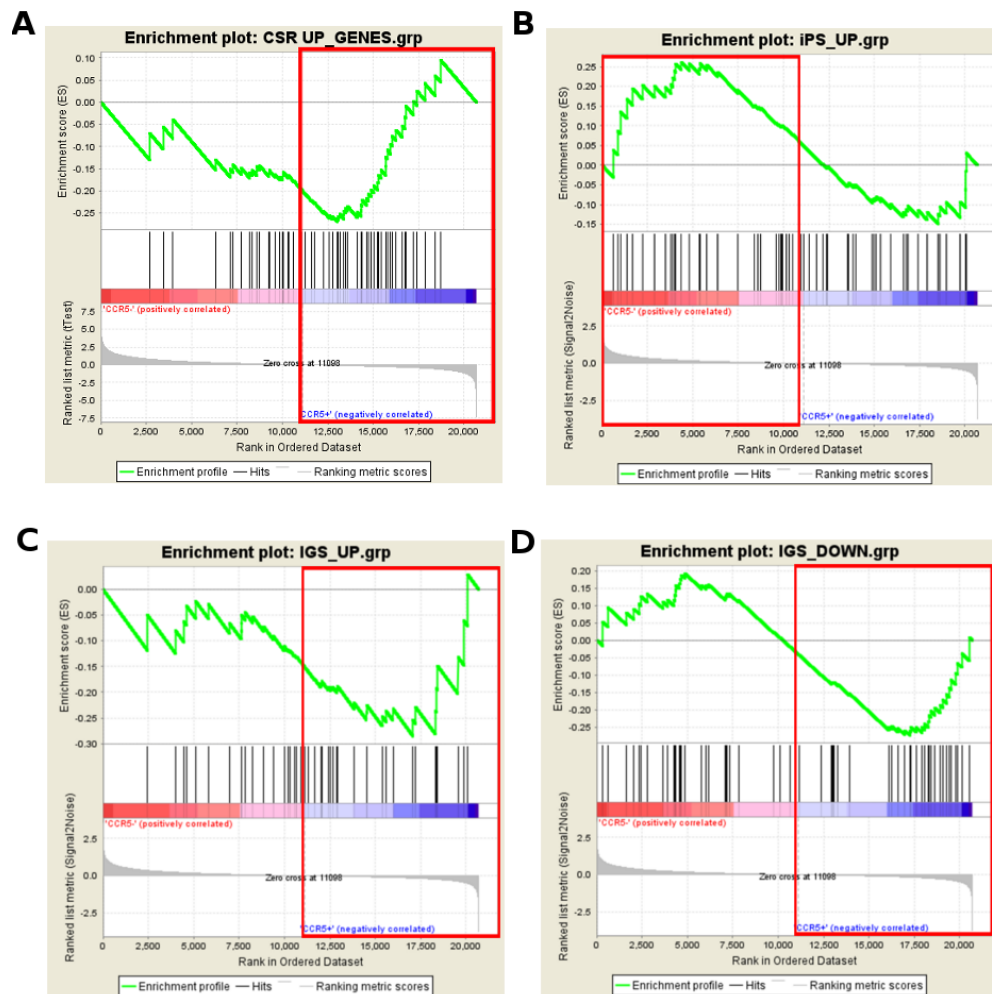


Fig. 6. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) de células SUM-159 CCR5⁺ y CCR5⁻. A) Gráfica de enriquecimiento de genes sobre-regulados de la firma “CSR” (Consensus Stemness Ranking). B) Gráfica de enriquecimiento de genes sobre-regulados de la firma “iPS” (induced Pluripotent Stem Cells). C) Gráfica de enriquecimiento de genes sobre-regulados de la firma “IGS” (Invasiveness Gene Signature). D) Gráfica de enriquecimiento de genes sub-regulados de la firma “IGS”.

8.3 Sobre-expresión de CCR5 en la línea celular SUM-159

Los resultados muestran que existe una posibilidad de que la expresión de CCR5 identifique a células con características de CTT. Lo anterior y tomando en cuenta los antecedentes del proyecto es que se procedió a la generación de la sublínea celular SUM-159 que sobre-expresa CCR5, para evaluar el papel del receptor en la troncalidad (Fig. 7A).

Tras la selección con zeocina por 7 días, se evaluó la expresión de CCR5 en las sublíneas por citometría de flujo. Como se observa en la Fig. 7B la sublínea SUM-159 CCR5⁺ tiene un 89% de células positivas para CCR5. La sublínea SUM-159 pcDNA3.1 tiene un 4% de células positivas para CCR5, valor similar a la expresión en la línea parental. Estas sublíneas generadas se utilizaron en ensayos posteriores.

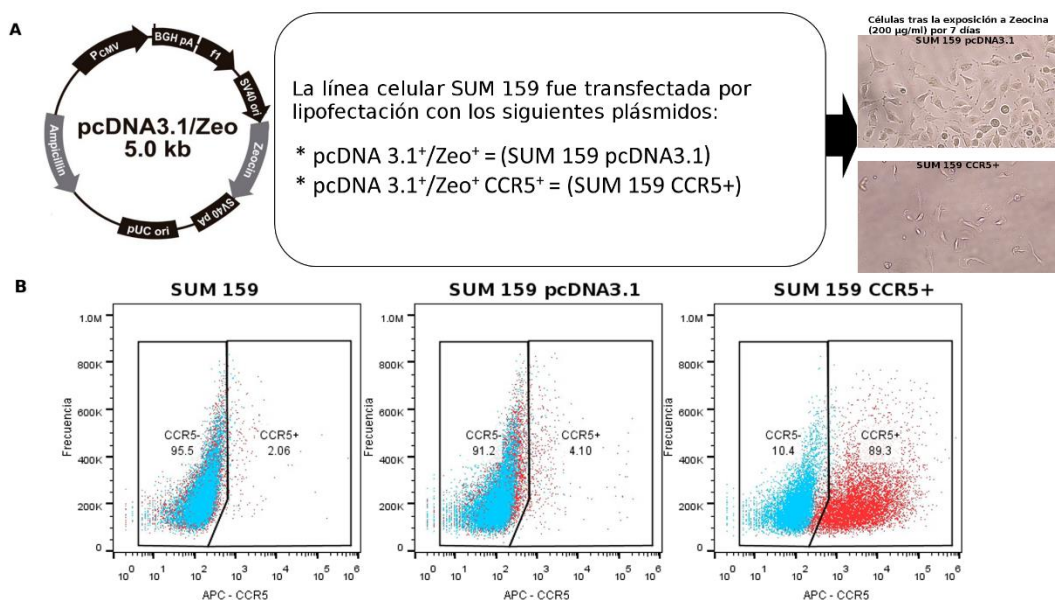


Fig. 7. Generación de sublíneas de SUM-159. A) Esquema de lipofectación para la generación de sublíneas SUM-159 pcDNA3.1 y SUM-159 CCR5⁺. B) Análisis de la expresión de CCR5 por citometría de flujo de las sublíneas generadas. La subpoblación azul corresponde a la autofluorescencia (AF), mientras que la subpoblación roja corresponde a la muestra teñida con α CCR5-APC.

8.4 Efecto de la sobre-expresión de CCR5 en la capacidad clonogénica de las sublíneas de SUM-159

Con las sublíneas celulares se realizaron ensayos de formación de mamoesferas para poder estudiar el efecto de la sobre-expresión de CCR5 sobre la capacidad clonogénica SUM-159 CCR5⁺. Dado que se ha observado que la activación o la inhibición de receptores a quimiocinas afectan la capacidad clonogénica de las células [143, 188], se trabajó en presencia del ligando CCL5 y del antagonista Maraviroc.

La sublínea celular SUM-159 CCR5⁺ muestra una mayor eficiencia en la formación de mamoesferas en comparativa con la sublínea celular SUM-159 pcDNA3.1. Sin embargo, la activación de CCR5 con CCL5 o la inhibición con Maraviroc no afecta la eficiencia de la formación de mamoesferas en ninguna de las sublíneas de SUM-159 (Fig. 8).

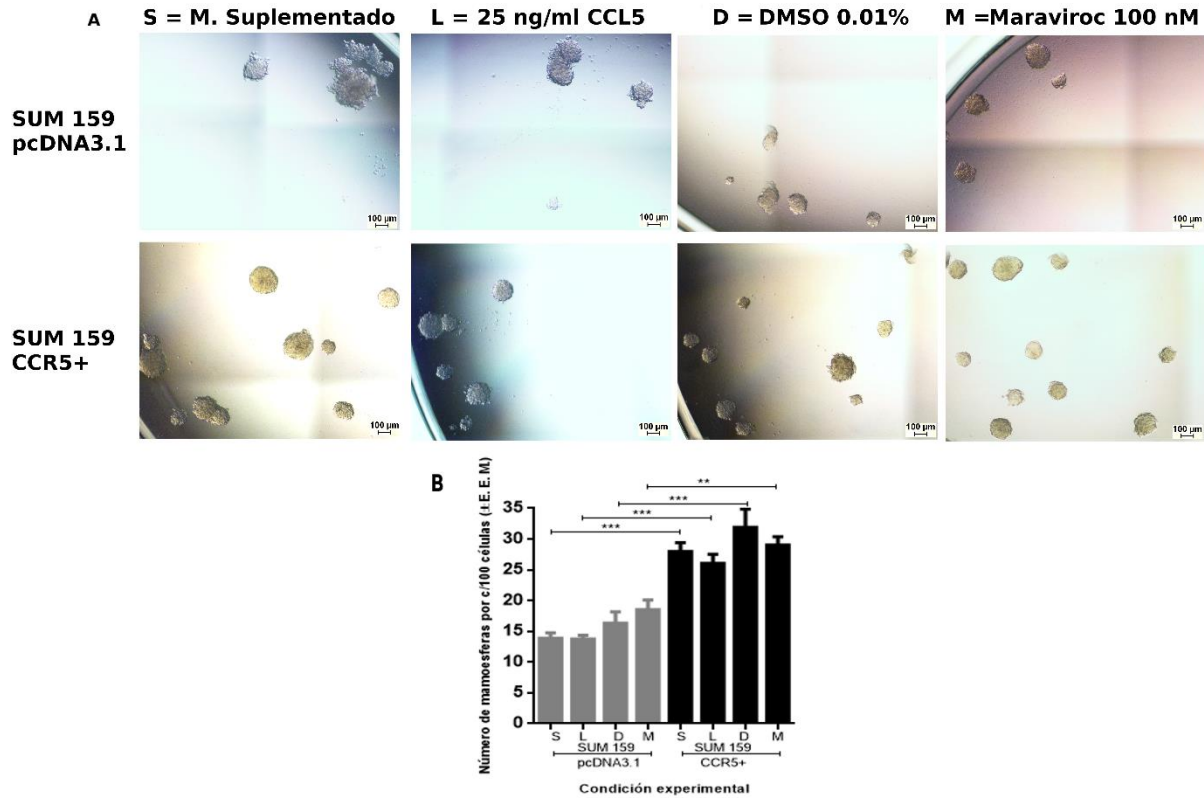


Fig. 8. Formación de mamoesferas de las sublíneas de SUM-159. A) Eficiencia de formación de mamoesferas por sublínea celular y condición experimental. B) Fotografías representativas de mamoesferas formadas por sublínea celular y condición experimental. S = Medio MammoCult Suplementado. L = S + 25 ng/ml de CCL5. D = S al 0.01% de DMSO. M = S + Maraviroc 100 nM. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno con \pm el error estándar de la media. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Prueba estadística de Dunn).

8.5 Efecto de la sobre-expresión de CCR5 sobre el porcentaje de células CD44⁺CD24⁻ de las sublíneas de SUM-159

Dado que la sobre-expresión del receptor CCR5 aumenta la eficiencia de la formación de mamoesferas se evaluó: i) el porcentaje de CD44⁺/CD24⁻ en las células CCR5⁺ y CCR5⁻ por citometría de flujo y ii) la expresión de factores de pluripotencia.

La sublínea SUM-159 pcDNA3.1 no muestra una diferencia significativa de la proporción de células CD44⁺/CD24⁻ con respecto a la sublínea SUM-159 CCR5⁺ tal como se muestra en la Fig. 9.

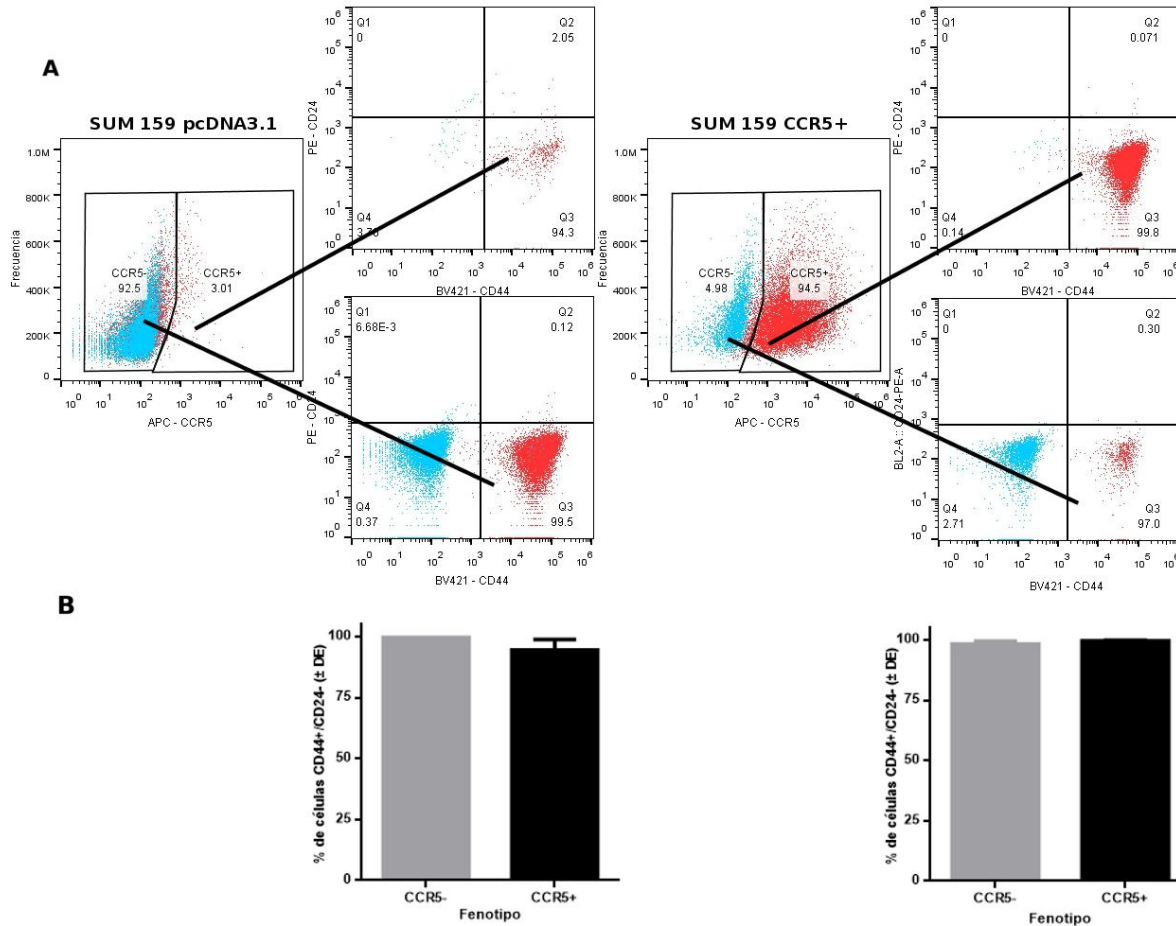


Fig. 9. Expresión del fenotipo CD44⁺/CD24⁻ en sublíneas de SUM-159 de acuerdo a la expresión de CCR5. A) Expresión de CCR5 y de CD44⁺/CD24⁻ en sublíneas de SUM-159. B) Porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻ en células CCR5⁺ y CCR5⁻ en sublíneas de SUM-159. Se realizaron 2 experimentos independientes, cada uno por duplicado. * P < 0.05, ** P < 0.01, * P < 0.001 (Prueba estadística Mann-Whitney).**

8.6 Efecto de la sobre-expresión de CCR5 sobre la actividad transcripcional de los promotores a factores de transcripción asociados a troncalidad

Se realizaron transfecciones transitorias con plásmidos reporteros de luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor de los factores de transcripción OCT4, NANOG y SOX2. Los resultados se normalizaron contra la señal obtenida del vector vacío pGL3.

La señal de luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor de OCT4 fue la más baja, incluso menor que la señal proveniente del vector pGL3 (Fig. 10A). En cuanto la actividad transcripcional del promotor de NANOG no encontramos una tendencia clara de cómo se pudiera estar comportando entre sublíneas (Fig. 10B). Al medir la señal de la luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor a SOX2 encontramos que la señal fue más alta que con los otros factores de transcripción, y que la señal proveniente de la sublínea SUM-159 CCR5⁺ es mayor con respecto a la señal de SUM-159 pcDNA3.1 (Fig. 10C).

La adición del ligando CCL5 a la sublínea celular SUM-159 pcDNA3.1 no provocó una diferencia significativa en la señal de la luciferasa correspondiente a la actividad transcripcional de los tres promotores de los factores de transcripción evaluados. En contraste con las señales provenientes de la sublínea celular SUM-159 CCR5⁺, que disminuyeron con la adición de CCL5, sin ser estadísticamente significativo.

Dado que se realizaron transfecciones transitorias la eficiencia de la transfección puede ser diferente entre sublíneas, por lo anterior decidimos co-transfectar con el plásmido para β -galactosidasa y así medir la eficiencia de la misma. Estos ensayos se hicieron para SOX2, donde vimos una mayor diferencia de señal entre sublíneas y de la adición de CCL5. La señal de luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor de SOX2 se normalizó con la señal proveniente de β -galactosidasa y posteriormente a la proveniente del vector vacío pGL3. Como se observa en la Fig. 11A la tendencia parece conservarse, la sublínea SUM-159 CCR5⁺ tiene una mayor señal que SUM-159 pcDNA3.1 y que al adicionar CCL5 dicha señal disminuye.

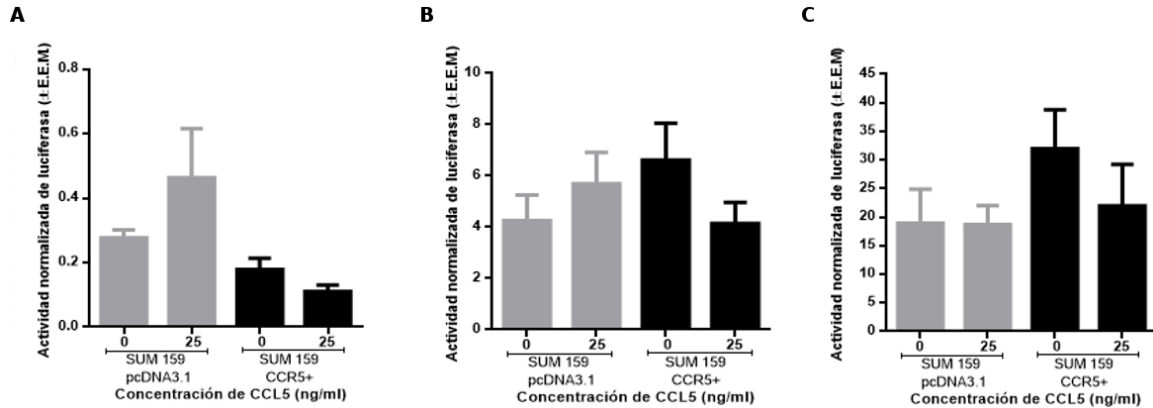


Fig. 10. Efecto en la actividad transcripcional de los promotores a factores de transcripción asociados a pluripotencia en sublíneas de SUM-159 en presencia de CCL5. A) Actividad normalizada de la luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor de OCT4 en sublíneas de SUM-159. B) Actividad normalizada de la luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor de NANOG en sublíneas de SUM-159. C) Actividad normalizada de la luciferasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor de SOX2 en sublíneas de SUM-159. Se realizaron 4 experimentos independientes, señal normalizada contra pGL3 (Prueba estadística de Dunn).

8.7 Efecto de la sobre-expresión de CCR5 en el nivel de la proteína Sox2

Dichos ensayos de gen reportero nos llevaron a buscar si existen diferencias entre las sublíneas de SUM-159 en la proteína de Sox2, por lo que se realizaron inmunoblots. Para estos se utilizó como control positivo a la línea células de cáncer de mama MCF7, que ya se sabe que expresa Sox2 [189]. De acuerdo a la Fig. 11B y 11C entre sublíneas de SUM-159 no existe diferencias en la expresión de la proteína Sox2.

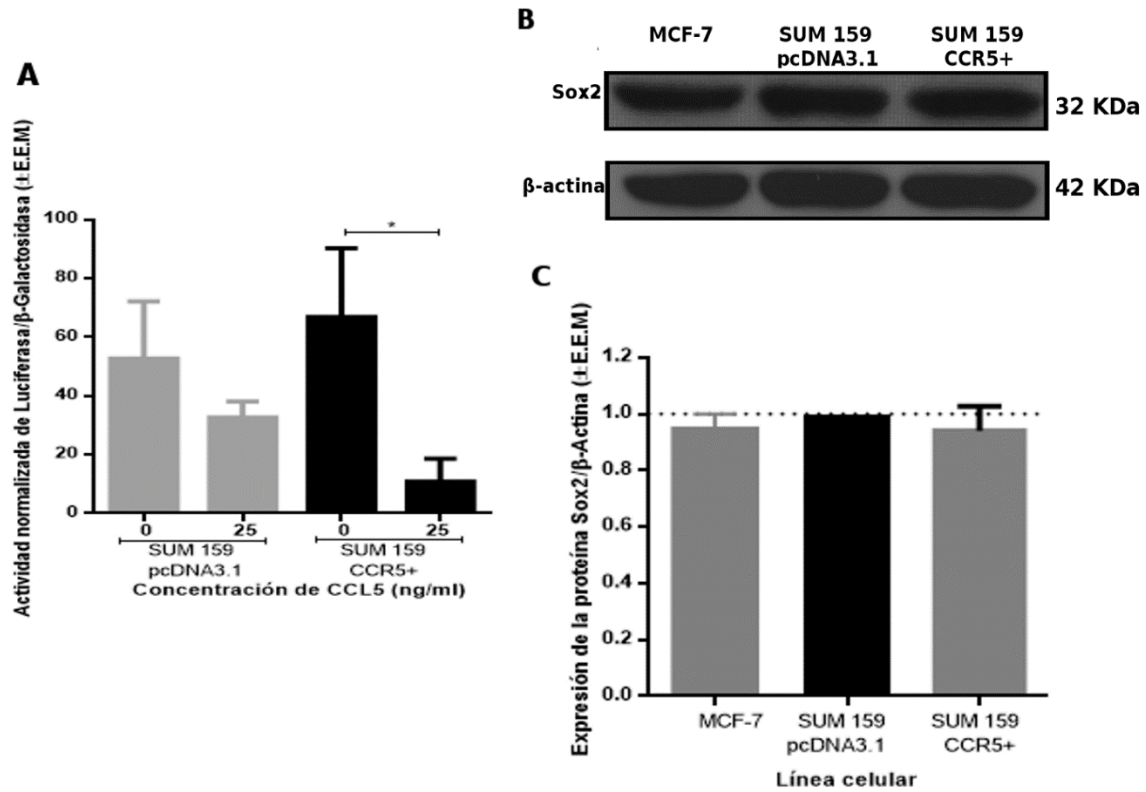


Fig. 11. Expresión de Sox2 en las sublíneas de SUM-159. A) Actividad normalizada de la luciferasa con respecto a la señal de β -galactosidasa en respuesta a la actividad transcripcional del promotor de SOX2. $n=3 \pm$ el error estándar de la media, normalizados contra la señal de β -Galactosidasa y posteriormente de pGL3. B) Inmunoblot representativo, donde se muestra la expresión de Sox2 y de β -actina de MCF7, SUM-159 pcDNA3.1 y SUM-159 CCR5⁺. C) Cuantificación del nivel de la proteína Sox2 en MCF7 y en las sublíneas SUM-159 pcDNA3.1 y SUM-159 CCR5⁺. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Prueba estadística de Dunn). $n=3$ experimentos independientes \pm el error estándar de la media.

9. Discusión

El cáncer de mama sigue siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial a pesar de los tratamientos existentes. El estudio de la relevancia de las CTT en la progresión de tumores ha llevado a la identificación de su papel en la resistencia a las terapias actuales y en la reincidencia del cáncer. En el cáncer de mama las CTT se han identificado mediante el fenotipo CD44⁺/CD24⁻, sin embargo las líneas celulares en las que el 90% de las células presentan este fenotipo no son más tumorigénicas que aquellas líneas celulares que sólo presentan 5% [110]. Lo anterior indica que sólo un subgrupo de estas células tiene características de CTTM, requiriendo entonces la identificación de marcadores adicionales para las CTTM.

El receptor a quimiocinas CCR5 tiene un papel clave en la invasión y en la capacidad de realizar metástasis en células de cáncer de mama [173] y de cáncer de próstata [190]. La invasión y la metástasis son características propias del programa de EMT, que se ha implicado directamente con la ganancia del fenotipo de las CTTM [126]. Lo anterior nos llevó a estudiar el posible rol del receptor CCR5 en las CTTM.

Para evaluar la clonogenicidad y el perfil transcripcional de células de cáncer de mama que expresan CCR5 se separaron por “sorting celular” las poblaciones CCR5⁺ y CCR5⁻ a partir de la línea celular SUM-159. En cuanto a la clonogenicidad, las células con el fenotipo CCR5⁺ tienen una mayor eficiencia en la formación de mamoesferas que las que tienen el fenotipo CCR5⁻. Con anterioridad se ha demostrado que otros receptores a quimiocinas como CXCR1 o CXCR4 son importantes en el mantenimiento del fenotipo troncal, por lo que su expresión afecta la formación de mamoesferas [143, 188]. Los datos obtenidos sugieren que el receptor CCR5 se expresa en células con mayor capacidad clonogénica y que pudiera tener un rol importante en el mantenimiento del fenotipo troncal.

Para comparar el perfil transcripcional entre células CCR5⁺ y CCR5⁻ se realizaron microarreglos. Los genes expresados diferencialmente se analizaron con la herramienta de anotación funcional “DAVID” que nos permitió determinar si alguno

de los fenotipos expresaba diferencialmente genes que participan en funciones moleculares o procesos biológicos de troncalidad. El análisis con “DAVID” no encontró lo anterior pero identificó que genes sub-expresados en el fenotipo CCR5⁺ se relacionan con procesos biológicos como la biosíntesis de proteínas y de la etapa de elongación de la traducción.

Dentro de estos genes de expresión diferencial se encuentran RNAs pequeños nucleolares (snoRNA, por sus siglas en inglés) no codificantes. Los snoRNA tienen un tamaño de 60 a 300 pb y suelen ser componentes vitales de riboproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs, por sus siglas en inglés) [191]. Los snoRNA son encargados de guiar las modificaciones químicas de los RNA de transferencia y ribosomales por pseudo-uridilación o metilación. En células CCR5⁺ se encontraron sub-expresados snoRNA como: 1) SNORD13 que es requerido para el corte pre-rRNA [192, 193]; 2) SNORD33 que guía la metilación del rRNA [194]; 3) SNORD48 que dirige la metilación de la 2'-O- ribosa en la biogénesis del ribosoma [195] y que en cáncer de mama se encuentra correlacionado negativamente con el grado de tumor y sobrevida [196]; y 4) SNOR78 que en cáncer de pulmón de células pequeñas en conjunto con el SNORD33 y otros snoRNA sirven como pronóstico por encontrarse sobre-expresados [197]. El papel de los snoRNA en la tumorigénesis aún se desconoce dado que se sigue estudiando su rol en la biología de las células cancerosas [198] por lo que incluso pudieran estar implicados en funciones de las CTT.

Que varios snoRNA se encuentren sub-expresados en las células CCR5⁺ pudiera significar que la biosíntesis de proteínas está disminuida. En CTE, la traducción de los RNA mensajeros (mRNA) es menor que en su progenie diferenciada. La inducción de la diferenciación celular incrementa los niveles de transcritos y la síntesis de proteínas [199, 200]. Por otra parte se ha visto que en las CTE existe una correlación positiva entre la actividad incrementada del proteosoma y la expresión de factores de pluripotencia [201]. Durante la diferenciación de las CTE la síntesis de proteínas se incrementa, por lo que bajos niveles de traducción y una alta degradación de proteínas promueven el mantenimiento de las CTE [202].

Blanco *et al.*, 2016 demostraron en un modelo de piel que células troncales y CTT tienen bajos niveles de síntesis de proteínas, como consecuencia de su estado troncal [203]. Lo anterior pudiera sugerir que las células CCR5⁺ se comportan de igual manera que las CTE, dado que los genes de expresión diferencial sub-expresados participan en la biogénesis de proteínas.

Dado que el análisis de anotación funcional no encontró una asociación directa con la troncalidad decidimos utilizar el análisis de “GSEA” para contrastar los datos de expresión génica de células CCR5⁺ y CCR5⁻ con firmas genéticas previamente reportadas. Las firmas seleccionadas provienen de comparar el perfil transcripcional de células con un fenotipo troncal y el de células no troncales, dichas firmas las denominamos como firmas de troncalidad.

La firma “CSR” proviene del consenso de 4 firmas de troncalidad cuyos genes se expresan diferencialmente en: 1) CTE de ratón y de humano; 2) CTE de humano; 3) Células de cáncer de mama con el fenotipo CD44⁺ CD24^{-/low} lin⁻ altamente tumorigénicas; 4) Fibroblastos humanos reprogramados hacia células pluripotentes.

Shats *et al.*, 2013 demostraron que la firma “CSR” es capaz de identificar fenotipos relacionados con la troncalidad en varios tipos de cáncer. Para corroborarlo confrontaron la firma contra datos de expresión génica provenientes de células separadas por un fenotipo especial y de muestras clínicas de varios tipos de tumor [179]: 1) En células de glioblastoma el perfil de expresión de células CD133⁺ correlacionan positivamente con la firma y estas células muestran propiedades de CTT [204]. 2) Las líneas celulares con un alto porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺, presentan una mayor agresividad, tumorigenicidad y su expresión diferencial de genes correlaciona positivamente con la firma [110]. 3) En muestras clínicas de adenocarcinoma de pulmón, una mayor correlación con la firma identifica a pacientes con un pobre pronóstico y sobrevida reducida [205]. 4) En pacientes con meduloblastoma, aquellos con un pobre pronóstico muestran una correlación positiva con la firma [206]. Al comparar nuestros datos de expresión diferencial de genes entre los fenotipos CCR5⁺ y CCR5⁻ con la firma “CSR”, encontramos que un sub-conjunto de genes sobre-expresados de la firma se encuentra enriquecido en

el fenotipo CCR5⁺, lo cual sugiere que la expresión del receptor se asocia a propiedades troncales.

Posteriormente contrastamos los datos de expresión diferencial entre los fenotipos CCR5⁺ y CCR5⁻ con la firma "IGS" que proviene de la comparación del perfil transcripcional de células CD44⁺/CD24^{-low} de cáncer de mama con células de epitelio mamario normal. La firma "IGS" se ha confrontado a la expresión génica de datos clínicos provenientes de pacientes con cáncer de mama, próstata y de meduloblastoma. Datos de pacientes cuya sobrevida fue baja y con una alta recurrencia, tuvieron una correlación positiva con la firma [180]. En nuestro caso los datos de expresión diferencial provenientes del fenotipo CCR5⁺ se encuentran enriquecidos tanto en los genes sub-expresados como en los sobre-expresados de la firma. Por lo que esta firma no nos ayudó a discernir si el receptor permite la identificación de las CTTM. Nuestros resultados pudieran sugerir que solo es capaz de identificar cierta subpoblación de CTTM con características específicas.

Por último, comparamos los datos de expresión diferencial entre los fenotipos CCR5⁺ y CCR5⁻ con la firma "iPS" que proviene de los genes expresados diferencialmente en fibroblastos humanos reprogramados mediante la expresión ectópica de cuatro factores de transcripción que inducen pluripotencia: Oct4, Sox2, Klf4 y Myc [181]. De acuerdo a nuestro análisis, el fenotipo CCR5⁻ se encuentra enriquecido en genes sobre-expresados de la firma "iPS", lo cual no era lo que se esperaba. Lo anterior pudiera deberse a la diferencia en el origen celular, los fibroblastos reprogramados son de origen mesénquimal [207] mientras que las células de cáncer de mama tienen un origen epitelial [106] dificultando que la firma pueda identificar a las CTTM. Hoy en día sigue habiendo controversia acerca de si las "iPS" comparativamente con las células troncales embrionarias son o no distintos tipos celulares. Algunos han reportado que son poblaciones indistinguibles [208], mientras otros resaltan que difieren en su firma molecular [209], en su metilación del DNA [210] o en el potencial de diferenciación [211]. Por lo anterior pudiera ser que la firma "iPS" no es la ideal para la identificación de CTT.

El análisis de “GSEA” de las tres firmas de troncalidad nos permitió conocer que los genes expresados diferencialmente en las células CCR5⁺ no correlacionan claramente con genes de expresión diferencial del fenotipo de las CTT. Por lo que nos interesó evaluar la clonogenicidad, la expresión de marcadores y la actividad transcripcional de genes asociados a la troncalidad en función de la sobre-expresión del receptor CCR5.

Para poder tener un sistema de estudio en el cuál las células mayoritariamente expresaran CCR5, creamos una sublínea celular de SUM-159 que sobre-expresa el receptor CCR5 mediante la transfección con el plásmido pcDNA3.1⁺/Zeo⁺ que contiene el transgen. Para corroborar la sobre-expresión del receptor evaluamos mediante citometría de flujo el porcentaje de células que lo expresan tanto en la línea celular SUM-159 como en las sublíneas generadas. El porcentaje de células que expresan CCR5 en la línea celular SUM-159 reportado es de un 6% [173], en nuestro caso un 2% de células expresan CCR5, siendo un porcentaje menor a lo esperado. La sublínea SUM-159 pcDNA3.1 transfectada con el vector tuvo un 4% de células positivas a CCR5, lo que indica que la transfección con el vector no aumenta el número de células que expresan el receptor más allá de lo reportado previamente. Por último en la sublínea SUM-159 CCR5⁺ observamos que un 90% de las células expresan CCR5, por lo que nos permitió tener un sistema en el cual pudimos evaluar el rol del receptor en la troncalidad.

Con estas sublíneas evaluamos la clonogenicidad mediante ensayos de formación de mamoesferas. La eficiencia de formación de mamoesferas fue mayor en la sublínea SUM-159 CCR5⁺ comparativamente con la sublínea celular SUM-159 pcDNA3.1. También evaluamos la formación de mamoesferas en presencia del ligando CCL5 de CCR5 o de su antagonista Maraviroc [100 nM]. Se tiene evidencia experimental que receptores a quimiocinas como CXCR1 en presencia del ligando tienen un aumento en la eficiencia de formación de mamoesferas o en presencia de un antagonista hay una disminución en el número de mamoesferas [143]. Nuestros datos muestran que ya sea que se agregué CCL5 o Maraviroc a las sublíneas de

SUM-159 no hay cambio en el porcentaje de células capaces de formar mamoesferas.

Dado que hay evidencia que los receptores a quimiocinas tienen la capacidad de formar homo y heterodímeros [212], existe la posibilidad que se pudieran estar formando heterodímeros de CCR5 con otros receptores a quimiocinas. La unión de ligandos a los heterodímeros pueden modular su conformación ya sea quebrantándola o estabilizándola [213]. Se sabe que las vías de señalización activas en los heterodímeros son distintas a las de los homodímeros [214]. En la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se ha demostrado que hay formación de los heterodímeros de los receptores a quimiocinas CXCR4 y CXCR7 que participan en la migración dependiente de la adición del ligando SDF-1 mediante la señalización de β -arrestina [215]. Por lo anterior se sabe que es posible que se formen heterodímeros entre receptores a quimiocinas y jueguen un papel importante en la carcinogénesis. El receptor CCR5 tiene la capacidad de formar homo y heterodímeros con otros receptores a quimiocinas como CCR2 [216] o CXCR4 [217]. Para saber si esto ocurre en nuestro sistema de estudio podríamos medir si existen los heterodímeros en presencia y ausencia de los ligandos por co-inmunoprecipitación e inmunoblot. Además podríamos utilizar el método de transferencia de energía de resonancia (RET, pos sus siglas en inglés) para evaluar las interacciones de los receptores, su dinámica de conformación en presencia o en ausencia de los ligandos CCL5 y SDF-1. Probablemente sea necesario que ambos ligandos se encuentren presentes para que podamos ver un efecto potenciador en la formación de mamoesferas.

También evaluamos el porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻ en células CCR5⁺ y CCR5⁻ por citometría flujo y la actividad transcripcional de factores de transcripción asociados a pluripotencia mediante ensayos de gen reportero. Al evaluar la expresión del fenotipo CD44⁺/CD24⁻ en células CCR5⁻ y CCR5⁺ no observamos diferencias en el porcentaje de células que expresan CD44⁺/CD24⁻, sugiriendo que CCR5 no ayuda a identificar la subpoblación de CTTM. En 2014 Liu y colaboradores identificaron que en cáncer de mamá existen dos estados de CTTM que pueden ser

identificados por la expresión de marcadores específicos y que tienen perfiles transcripcionales diferentes. Aquellas que tienen un fenotipo parecido al mesénquimal se caracterizan por la expresión del fenotipo CD44⁺/CD24⁻ y por ser quiescentes. Por otro lado, aquellas que tienen un fenotipo parecido al epitelial se caracterizan por la expresión de ALDH y por ser altamente proliferativas [218]. Para poder saber si CCR5 podría ser un marcador que identifique a la subpoblación de CTTM con fenotipo epitelial podría medirse la co-expresión de ALDH y CCR5. De igual manera se podrían medir otros marcadores asociados a troncalidad como por ejemplo ESA [111] o CD49f [219] para determinar si CCR5 es capaz de identificar alguna de estas subpoblaciones.

Para evaluar la actividad transcripcional de los factores de transcripción asociados a la pluripotencia en CTT [220] se realizaron transfecciones transitorias en las sublíneas de SUM-159 con plásmidos de gen reportero a las secuencias promotoras de los genes OCT4, NANOG o SOX2 [185, 186]. En el caso de OCT4 la señal obtenida fue menor a la proveniente del vector pGL3 por lo que no nos permitió concluir al respecto a la actividad transcripcional del gen. Las señales obtenidas del gen reportero de NANOG no muestran que haya diferencia marcada entre sublíneas por lo que lo descartamos para ensayos posteriores. Sin embargo, en el caso de SOX2 encontramos que hay una mayor señal en la sublínea celular SUM-159 CCR5⁺.

En ensayos posteriores utilizamos el plásmido de pSV- β -Galactosidasa como control de la eficiencia de la transfección. En esos ensayos corroboramos que en la sublínea celular SUM-159 CCR5⁺ la actividad transcripcional de SOX2 es mayor en comparativa con SUM-159 pcDNA3.1. La expresión de SOX2 en cáncer de mama se correlaciona con un grado y tamaño mayor del tumor, además se encuentra involucrado en procesos de proliferación, formación de mamoesferas, invasión y tumorigénesis [221, 222]. Se sabe que el knock-out de SOX2 inhibe la formación de mamoesferas y su sobre-expresión las incrementa [221]. Por lo anterior proponemos que la alta actividad transcripcional de SOX2 podría ser parte del

mecanismo por el cual el receptor CCR5 está potenciado la formación de mamoesferas.

Dado que observamos una mayor actividad transcripcional del gen SOX2 en la sublínea SUM-159 CCR5⁺, decidimos medir el nivel de la proteína mediante inmunoblot, encontrando que no había diferencias en los niveles entre las sublíneas de SUM-159. Lo anterior podría deberse al control sobre la traducción que regula que transcritos se traducen bajo ciertos contextos de manera independiente a su abundancia [223]. En CTT provenientes de glioblastomas se ha demostrado que SOX2 se encuentra regulado a nivel de la traducción de manera independiente al nivel del transcrito [224]. Tomando en cuenta que el contexto es importante para el control de la traducción y que SOX2 puede ser regulado a este nivel, podría ser que por eso no veamos diferencias en el nivel de la proteína entre las sublíneas de SUM-159 en cultivos 2D. Podríamos medir el nivel de la proteína por inmunoblot de células que ya formaron mamoesferas, contexto biológico en el cual observamos que el receptor CCR5 tiene un papel clave y en el cual pudiera ser que observemos diferencias en el nivel de la proteína Sox2.

10. Conclusiones

- El análisis de los genes de expresión diferencial entre las poblaciones CCR5⁺ y CCR5⁻, nos permitió identificar que en células CCR5⁺ hay un subconjunto de genes sobre-expresados de la firma de troncalidad “CSR”, que se encuentran enriquecidos.
- El receptor CCR5 tiene un papel importante en la capacidad clonogénica ya que las células CCR5⁺ tienen una mayor eficiencia en la formación de mamoesferas. La presencia del ligando CCL5 o del antagonista Maraviroc no afecta la formación de mamoesferas.
- El porcentaje de células que presentan el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ en células CCR5⁺ y CCR5⁻ es similar; por lo que CCR5 no es de utilidad para identificar a la subpoblación troncal tumoral.
- Las células CCR5⁺ tienen una mayor actividad transcripcional del gen SOX2, sin verse reflejado en el nivel de la proteína.

11. Referencias

1. NCI. What is cancer? : National Cancer Institute; 2015 [cited 2017 July 07]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
2. Weinberg RA. The biology of cancer. New York: Garland Science; 2007.
3. Devi P. Basics of carcinogenesis. Health Administrator. 2004;XVII(1):16-24.
4. Ruddon RW. Cancer Biology. 4th ed. New York Oxford University Press; 2007. 530 p.
5. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymoth A, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. Cancer Gene Ther. 2009;16(1):1-12. doi: 10.1038/cgt.2008.69. PubMed PMID: 18802452.
6. Martin de Civetta MT, Civetta JD. [Carcinogenesis]. Salud Publica Mex. 2011;53(5):405-14. PubMed PMID: 22218794.
7. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. Vasc Health Risk Manag. 2006;2(3):213-9. PubMed PMID: 17326328; PubMed Central PMCID: PMCPMC1993983.
8. Colville-Nash PR, Willoughby DA. Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. Mol Med Today. 1997;3(1):14-23. doi: 10.1016/S1357-4310(96)10048-4. PubMed PMID: 9021738.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.
10. Jia LT, Zhang R, Shen L, Yang AG. Regulators of carcinogenesis: Emerging roles beyond their primary functions. Cancer letters. 2014. doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.048. PubMed PMID: 25448403.
11. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Nature. 2004;432(7015):332-7. Epub 2004/11/19. doi: 10.1038/nature03096. PubMed PMID: 15549095; PubMed Central PMCID: PMCPMC3050735.
12. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. Mol Cancer Res. 2008;6(10):1521-33. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203. PubMed PMID: 18922968; PubMed Central PMCID: PMCPMC2740918.
13. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. Advances in cancer research. 2009;102:19-65. doi: 10.1016/S0065-230X(09)02002-8. PubMed PMID: 19595306; PubMed Central PMCID: PMCPMC2933405.
14. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene. 2008;27(41):5497-510. doi: 10.1038/onc.2008.245. PubMed PMID: 18794884; PubMed Central PMCID: PMCPMC3398461.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70. PubMed PMID: 10647931.
16. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. Nature reviews Cancer. 2008;8(9):671-82. doi: 10.1038/nrc2399. PubMed PMID: 18650841.
17. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. Oncogene. 2005;24(17):2909-15. doi: 10.1038/sj.onc.1208618. PubMed PMID: 15838524.
18. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell. 2002;2(2):103-12. PubMed PMID: 12204530.
19. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. Nature reviews Cancer. 2014;14(5):359-70. doi: 10.1038/nrc3711. PubMed PMID: 24739573; PubMed Central PMCID: PMCPMC4049238.

20. Curto M, Cole BK, Lallemand D, Liu CH, McClatchey AI. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *The Journal of cell biology*. 2007;177(5):893-903. Epub 2007/06/06. doi: 10.1083/jcb.200703010. PubMed PMID: 17548515; PubMed Central PMCID: PMC2064288.
21. Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(29):11930-5. doi: 10.1073/pnas.1103345108. PubMed PMID: 21730131; PubMed Central PMCID: PMC3141988.
22. Junttila MR, Evan GI. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(11):821-9. doi: 10.1038/nrc2728. PubMed PMID: 19776747.
23. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432(7015):307-15. doi: 10.1038/nature03098. PubMed PMID: 15549092.
24. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37. doi: 10.1038/sj.onc.1210220. PubMed PMID: 17322918; PubMed Central PMCID: PMC2930981.
25. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(6):617-25. doi: 10.1016/j.ceb.2005.10.001. PubMed PMID: 16243507; PubMed Central PMCID: PMC2930980.
26. Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*. 2008;27 Suppl 1:S137-48. doi: 10.1038/onc.2009.51. PubMed PMID: 19641499; PubMed Central PMCID: PMC2731580.
27. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5308-16. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5023. PubMed PMID: 19706824; PubMed Central PMCID: PMC2737083.
28. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3917-29. doi: 10.1172/JCI35512. PubMed PMID: 19033662; PubMed Central PMCID: PMC2582930.
29. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42. Epub 2008/01/15. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018. PubMed PMID: 18191218; PubMed Central PMCID: PMC2696814.
30. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(12):961-7. doi: 10.1038/nrc2254. PubMed PMID: 17972889; PubMed Central PMCID: PMC2866167.
31. Grivnennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025. PubMed PMID: 20303878; PubMed Central PMCID: PMC2866629.
32. White E, Karp C, Strohecker AM, Guo Y, Mathew R. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):212-7. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.008. PubMed PMID: 20056400; PubMed Central PMCID: PMC2857707.
33. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008;135(7):1161-3. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.004. PubMed PMID: 19109884.
34. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(1):72-6. doi: 10.1038/35036093. PubMed PMID: 11413492.
35. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):611-22. doi: 10.1038/nrg1656. PubMed PMID: 16136653.
36. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(3):321-31. doi: 10.1055/s-0030-1253454. PubMed PMID: 20490982; PubMed Central PMCID: PMC3278036.

37. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(1):102-11. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.005. PubMed PMID: 15661540.
38. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-64. Epub 1996/08/09. PubMed PMID: 8756718.
39. Polet F, Feron O. Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force. *Journal of internal medicine.* 2013;273(2):156-65. Epub 2012/12/12. doi: 10.1111/joim.12016. PubMed PMID: 23216817.
40. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(1):21-6. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.003. PubMed PMID: 20005148.
41. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(6):789-91. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179663. PubMed PMID: 19164810.
42. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005;438(7070):932-6. Epub 2005/12/16. doi: 10.1038/nature04478. PubMed PMID: 16355210.
43. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research.* 2010;70(14):5649-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040. PubMed PMID: 20610625; PubMed Central PMCID: PMCPMC4037932.
44. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews Cancer.* 2003;3(6):453-8. doi: 10.1038/nrc1098. PubMed PMID: 12778135.
45. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1588-93. doi: 10.2353/ajpath.2009.080545. PubMed PMID: 19342369; PubMed Central PMCID: PMCPMC2671246.
46. Thiery JP, Aclouque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90. Epub 2009/12/01. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007. PubMed PMID: 19945376.
47. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* 2010;15(2):117-34. doi: 10.1007/s10911-010-9178-9. PubMed PMID: 20490631; PubMed Central PMCID: PMCPMC2886089.
48. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell.* 2008;14(6):818-29. Epub 2008/06/10. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.009. PubMed PMID: 18539112.
49. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010;141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015. PubMed PMID: 20371345; PubMed Central PMCID: PMCPMC2862057.
50. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews Cancer.* 2009;9(4):239-52. doi: 10.1038/nrc2618. PubMed PMID: 19279573; PubMed Central PMCID: PMCPMC3251309.
51. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39-51. Epub 2010/04/08. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014. PubMed PMID: 20371344.
52. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer research.* 2007;67(6):2649-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1823. PubMed PMID: 17363585.
53. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of cellular physiology.* 2007;213(2):374-83. doi: 10.1002/jcp.21223. PubMed PMID: 17680632.

54. Kenific CM, Thorburn A, Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):241-5. doi: 10.1016/j.ceb.2009.10.008. PubMed PMID: 19945838; PubMed Central PMCID: PMCPMC2854304.
55. Andor N, Maley CC, Ji HP. Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. *Cancer research.* 2017;77(9):2179-85. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1553. PubMed PMID: 28432052; PubMed Central PMCID: PMCPMC5413432.
56. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128(4):683-92. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.029. PubMed PMID: WOS:000245098600011.
57. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental cell.* 2010;19(5):698-711. doi: 10.1016/j.devcel.2010.10.005. PubMed PMID: WOS:000284516300011.
58. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809. PubMed PMID: 19460998; PubMed Central PMCID: PMCPMC2849637.
59. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development.* 2009;23(5):537-48. doi: 10.1101/gad.1756509. PubMed PMID: WOS:000263918500001.
60. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008;134(5):703-7. doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021. PubMed PMID: WOS:000258947500006.
61. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2010;29(49):6409-17. doi: 10.1038/onc.2010.444. PubMed PMID: 20972461.
62. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *Journal of the National Cancer Institute.* 2010;102(13):932-41. doi: 10.1093/jnci/djq187. PubMed PMID: 20513808; PubMed Central PMCID: PMCPMC2897878.
63. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 2008;224:166-82. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x. PubMed PMID: 18759926.
64. Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(8):1161-71. doi: 10.1007/s00262-011-1012-8. PubMed PMID: 21626032.
65. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(1):98-106. doi: 10.1097/COC.0000000000000239. PubMed PMID: 26558876; PubMed Central PMCID: PMCPMC4892769.
66. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(2):309-16. doi: 10.1007/s10555-010-9223-6. PubMed PMID: 20405169; PubMed Central PMCID: PMCPMC2865635.
67. Coffelt SB, Lewis CE, Naldini L, Brown JM, Ferrara N, De Palma M. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *Am J Pathol.* 2010;176(4):1564-76. doi: 10.2353/ajpath.2010.090786. PubMed PMID: 20167863; PubMed Central PMCID: PMCPMC2843445.
68. Johansson M, Denardo DG, Coussens LM. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol Rev.* 2008;222:145-54. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00600.x. PubMed PMID: 18363999; PubMed Central PMCID: PMCPMC2494984.

69. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(8):618-31. doi: 10.1038/nrc2444. PubMed PMID: 18633355.
70. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 2009;182(8):4499-506. doi: 10.4049/jimmunol.0802740. PubMed PMID: 19342621; PubMed Central PMCID: PMCPMC2810498.
71. OMS OMdIS. Cáncer. Nota descriptiva No. 297 2017 [cited 2017 15 de Mayo]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
72. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2013. Available from: http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_pop.asp?selection=224900&title=World&statistic=1&number=10&window=1&grid=1&color1=2&color1e=&color2=28&color2e=&submit=%C2%A0Execute.
73. INEGI. Mortalidad general. Lista de tabulación 1 para mortalidad de la CIE : Tumores (neoplasias). Consulta de: Defunciones generales. Por: Año de registro. Según: Sexo 2012.
74. INEGI. "Estadísticas a propósito del... Día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de Octubre)" 2015 [cited 2017 June 13]. Available from: <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>.
75. Board CNE. Breast Cancer - Introduction: American Society of Clinical Oncology (ASCO) - Cancer.Net; 2012 [cited 2017 July 11]. Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/introduction>.
76. Board CNE. Breast Cancer - Stages: American Society of Clinical Oncology (ASCO) - Cancer.Net; 2012 [cited 2017 July 12]. Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/stages>.
77. NCI. Tumor grade 2013 [cited 2017 September 3]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet>.
78. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res*. 2015;5(10):2929-43. PubMed PMID: 26693050; PubMed Central PMCID: PMCPMC4656721.
79. Nevins JR, Potti A. Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes. *Nat Rev Genet*. 2007;8(8):601-9. doi: 10.1038/nrg2137. PubMed PMID: 17607306.
80. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74. doi: 10.1073/pnas.191367098. PubMed PMID: 11553815; PubMed Central PMCID: PMCPMC58566.
81. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52. doi: 10.1038/35021093. PubMed PMID: 10963602.
82. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96. doi: 10.1186/1471-2164-7-96. PubMed PMID: 16643655; PubMed Central PMCID: PMCPMC1468408.
83. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1160-7. doi:

- 10.1200/JCO.2008.18.1370. PubMed PMID: 19204204; PubMed Central PMCID: PMC2667820.
84. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(18):10393-8. doi: 10.1073/pnas.1732912100. PubMed PMID: 12917485; PubMed Central PMCID: PMC193572.
85. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*. 2005;116(3):340-50. doi: 10.1002/ijc.21004. PubMed PMID: 15818618.
86. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(29):7350-60. doi: 10.1200/JCO.2005.03.3845. PubMed PMID: 16145060.
87. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 2004;6(2):117-27. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.022. PubMed PMID: 15324695.
88. NCI. Breast cancer treatment (PDQ) - Health professional version: National Cancer Institute 2017 [cited 2017 05 June 2017]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq#section/all>.
89. ACS. Chemotherapy for breast cancer American Cancer Society 2016 [cited 2017 07 June 2017]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>.
90. ACS. Radiation for breast cancer American Cancer Society 2016 [cited 2017 07 June 2017]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/radiation-for-breast-cancer.html>.
91. Lin SX, Chen J, Mazumdar M, Poirier D, Wang C, Azzi A, et al. Molecular therapy of breast cancer: progress and future directions. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(9):485-93. doi: 10.1038/nrendo.2010.92. PubMed PMID: 20644568.
92. Yin W, Jiang Y, Shen Z, Shao Z, Lu J. Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. *PLoS one*. 2011;6(6):e21030. doi: 10.1371/journal.pone.0021030. PubMed PMID: 21695277; PubMed Central PMCID: PMC3111470.
93. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer research*. 2006;66(3):1630-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1182. PubMed PMID: 16452222.
94. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434(7035):917-21. doi: 10.1038/nature03445. PubMed PMID: 15829967.
95. Carey LA, Sharpless NE. PARP and cancer--if it's broke, don't fix it. *The New England journal of medicine*. 2011;364(3):277-9. doi: 10.1056/NEJMe1012546. PubMed PMID: 21208102; PubMed Central PMCID: PMC3712751.
96. Baker EK, El-Osta A. MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling. *Cancer biology & therapy*. 2004;3(9):819-24. PubMed PMID: 15326379.
97. Whenham N, D'Hondt V, Piccart MJ. HER2-positive breast cancer: from trastuzumab to innovative anti-HER2 strategies. *Clinical breast cancer*. 2008;8(1):38-49. Epub 2008/05/27. doi: 10.3816/CBC.2008.n.002. PubMed PMID: 18501058.

98. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.038. PubMed PMID: 18295578; PubMed Central PMCID: PMC4505728.
99. Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(11):832-44. doi: 10.1038/nrc1212. PubMed PMID: 14668814.
100. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567-82. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.015. PubMed PMID: 18295576; PubMed Central PMCID: PMC4142810.
101. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947-56. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.020. PubMed PMID: 16153702; PubMed Central PMCID: PMC3006442.
102. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(11):899-904. doi: 10.1038/nrc1740. PubMed PMID: 16327766.
103. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(10):727-38. Epub 2013/09/26. doi: 10.1038/nrc3597. PubMed PMID: 24060864.
104. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(17):2813-20. Epub 2008/06/10. doi: 10.1200/jco.2008.16.3931. PubMed PMID: 18539959; PubMed Central PMCID: PMC2789399.
105. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11. doi: 10.1038/35102167. PubMed PMID: 11689955.
106. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003;36 Suppl 1:59-72. PubMed PMID: 14521516.
107. Mitra SS, He JQ, Esparza R, Hutter G, Cheshier SH, Weissman I. Chapter 1 - Introduction: Cancer Stem Cells A2 - Liu, Huiping. In: Lathia JD, editor. *Cancer Stem Cells*. Boston: Academic Press; 2016. p. 3-24.
108. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8. doi: 10.1073/pnas.0530291100. PubMed PMID: 12629218; PubMed Central PMCID: PMC153034.
109. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research*. 2005;65(13):5506-11. Epub 2005/07/05. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-0626. PubMed PMID: 15994920.
110. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(2):R25. doi: 10.1186/bcr1982. PubMed PMID: 18366788; PubMed Central PMCID: PMC2397524.
111. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development*. 2003;17(10):1253-70. Epub 2003/05/21. doi: 10.1101/gad.1061803. PubMed PMID: 12756227; PubMed Central PMCID: PMC196056.
112. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast cancer research : BCR*. 2004;6(6):R605-15. doi: 10.1186/bcr920. PubMed PMID: 15535842; PubMed Central PMCID: PMC1064073.

113. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(7):497-512. doi: 10.1038/nrd4253. PubMed PMID: 24981363; PubMed Central PMCID: PMC4234172.
114. Herrera-Gayol A, Jothy S. CD44 modulates Hs578T human breast cancer cell adhesion, migration, and invasiveness. *Experimental and molecular pathology.* 1999;66(1):99-108. doi: 10.1006/exmp.1999.2236. PubMed PMID: 10331969.
115. Schabath H, Runz S, Joumaa S, Altevogt P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *Journal of cell science.* 2006;119(Pt 2):314-25. doi: 10.1242/jcs.02741. PubMed PMID: 16390867.
116. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell.* 2007;1(5):555-67. Epub 2008/03/29. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014. PubMed PMID: 18371393; PubMed Central PMCID: PMC4234172.
117. Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med.* 2013;56:89-101. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010. PubMed PMID: 23195683; PubMed Central PMCID: PMC3631350.
118. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2236-52. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x. PubMed PMID: 18681906.
119. Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochimica et biophysica acta.* 2013;1830(2):2481-95. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.008. PubMed PMID: 23196196.
120. Gaiano N, Fishell G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci.* 2002;25:471-90. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.030702.130823. PubMed PMID: 12052917.
121. Soriano JV, Uyttendaele H, Kitajewski J, Montesano R. Expression of an activated Notch4(int-3) oncoprotein disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells in vitro. *Int J Cancer.* 2000;86(5):652-9. PubMed PMID: 10797286.
122. Schroeder JA, Adriance MC, McConnell EJ, Thompson MC, Pockaj B, Gendler SJ. ErbB-beta-catenin complexes are associated with human infiltrating ductal breast and murine mammary tumor virus (MMTV)-Wnt-1 and MMTV-c-Neu transgenic carcinomas. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(25):22692-8. doi: 10.1074/jbc.M201975200. PubMed PMID: 11950845.
123. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell.* 1996;85(6):841-51. PubMed PMID: 8681379.
124. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, et al. Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene.* 2014;33(5):643-52. doi: 10.1038/onc.2012.614. PubMed PMID: 23318426; PubMed Central PMCID: PMC4697746.
125. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one.* 2008;3(8):e2888. doi: 10.1371/journal.pone.0002888. PubMed PMID: 18682804; PubMed Central PMCID: PMC4234172.
126. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-15. Epub 2008/05/20. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027. PubMed PMID: 18485877; PubMed Central PMCID: PMC4234172.

127. Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJ, Salomon DS, Strizzi L. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2010;15(2):191-9. doi: 10.1007/s10911-010-9172-2. PubMed PMID: 20369376; PubMed Central PMCID: PMCPMC2889136.
128. Liu H, Patel MR, Prescher JA, Patsialou A, Qian D, Lin J, et al. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(42):18115-20. doi: 10.1073/pnas.1006732107. PubMed PMID: 20921380; PubMed Central PMCID: PMCPMC2964232.
129. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer research*. 2009;69(4):1302-13. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2741. PubMed PMID: 19190339; PubMed Central PMCID: PMCPMC2819227.
130. Wang Z, Banerjee S, Li Y, Rahman KM, Zhang Y, Sarkar FH. Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer research*. 2006;66(5):2778-84. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4281. PubMed PMID: 16510599.
131. Massague J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001. PubMed PMID: 18662538; PubMed Central PMCID: PMCPMC3512574.
132. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). *Int J Mol Med*. 2008;22(3):271-5. PubMed PMID: 18698484.
133. Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Molecular cell*. 2012;47(4):570-84. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.014. PubMed PMID: 22819326; PubMed Central PMCID: PMCPMC3432419.
134. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22(10):1067-8. doi: 10.1089/107999002760624305. PubMed PMID: 12433287.
135. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(1):145-76. PubMed PMID: 10699158.
136. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(2):139-47. doi: 10.1038/nrc2067. PubMed PMID: 17218951.
137. Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *J Pathol*. 2012;226(2):148-57. doi: 10.1002/path.3029. PubMed PMID: 21989643.
138. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today*. 1999;20(6):254-7. PubMed PMID: 10354549.
139. Moser B, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*. 2004;63 Suppl 2:ii84-ii9. doi: 10.1136/ard.2004.028316. PubMed PMID: 15479880; PubMed Central PMCID: PMCPMC1766778.
140. Lacalle RA, Blanco R, Carmona-Rodriguez L, Martin-Leal A, Mira E, Manes S. Chemokine Receptor Signaling and the Hallmarks of Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017;331:181-244. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.011. PubMed PMID: 28325212.
141. Sharma B, Singh RK. Emerging candidates in breast cancer stem cell maintenance, therapy resistance and relapse. *J Carcinog*. 2011;10:36. doi: 10.4103/1477-3163.91119. PubMed PMID: 22279421; PubMed Central PMCID: PMCPMC3263158.
142. Velasco-Velazquez MA, Popov VM, Lisanti MP, Pestell RG. The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 2011;179(1):2-11. doi:

- 10.1016/j.ajpath.2011.03.005. PubMed PMID: 21640330; PubMed Central PMCID: PMC3123864.
143. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest.* 2010;120(2):485-97. doi: 10.1172/JCI39397. PubMed PMID: 20051626; PubMed Central PMCID: PMC3123864.
144. Bholra NE, Balko JM, Dugger TC, Kuba MG, Sanchez V, Sanders M, et al. TGF-beta inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1348-58. doi: 10.1172/JCI65416. PubMed PMID: 23391723; PubMed Central PMCID: PMC3582135.
145. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410(6824):50-6. doi: 10.1038/35065016. PubMed PMID: 11242036.
146. Li J, Sun R, Tao K, Wang G. The CCL21/CCR7 pathway plays a key role in human colon cancer metastasis through regulation of matrix metalloproteinase-9. *Dig Liver Dis.* 2011;43(1):40-7. doi: 10.1016/j.dld.2010.05.013. PubMed PMID: 20609636.
147. Kochetkova M, Kumar S, McColl SR. Chemokine receptors CXCR4 and CCR7 promote metastasis by preventing anoikis in cancer cells. *Cell Death Differ.* 2009;16(5):664-73. doi: 10.1038/cdd.2008.190. PubMed PMID: 19136936.
148. Cassier PA, Treilleux I, Bachelot T, Ray-Coquard I, Bendriss-Vermare N, Menetrier-Caux C, et al. Prognostic value of the expression of C-Chemokine Receptor 6 and 7 and their ligands in non-metastatic breast cancer. *BMC cancer.* 2011;11:213. doi: 10.1186/1471-2407-11-213. PubMed PMID: 21624121; PubMed Central PMCID: PMC3130701.
149. Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE, et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5686-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0014. PubMed PMID: 16115904.
150. Boyle ST, Ingman WV, Poltavets V, Faulkner JW, Whitfield RJ, McColl SR, et al. The chemokine receptor CCR7 promotes mammary tumorigenesis through amplification of stem-like cells. *Oncogene.* 2016;35(1):105-15. doi: 10.1038/onc.2015.66. PubMed PMID: 25772241.
151. Dubrovskaya A, Hartung A, Bouchez LC, Walker JR, Reddy VA, Cho CY, et al. CXCR4 activation maintains a stem cell population in tamoxifen-resistant breast cancer cells through AhR signalling. *Br J Cancer.* 2012;107(1):43-52. doi: 10.1038/bjc.2012.105. PubMed PMID: 22644306; PubMed Central PMCID: PMC3389396.
152. Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular signalling.* 2004;16(11):1201-10. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.04.007. PubMed PMID: 15337520.
153. Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001;22(2):83-7. PubMed PMID: 11286708.
154. Levy JA. The unexpected pleiotropic activities of RANTES. *J Immunol.* 2009;182(7):3945-6. doi: 10.4049/jimmunol.0990015. PubMed PMID: 19299688.
155. Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer letters.* 2008;267(2):271-85. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.018. PubMed PMID: 18439751.
156. Pakianathan DR, Kuta EG, Artis DR, Skelton NJ, Hebert CA. Distinct but overlapping epitopes for the interaction of a CC-chemokine with CCR1, CCR3 and CCR5. *Biochemistry.* 1997;36(32):9642-8. doi: 10.1021/bi970593z. PubMed PMID: 9289016.
157. Juremalm M, Olsson N, Nilsson G. Selective CCL5/RANTES-induced mast cell migration through interactions with chemokine receptors CCR1 and CCR4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(3):480-5. PubMed PMID: 12270118.

158. Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(2):306-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.146. PubMed PMID: 15358176.
159. Mira E, Lacalle RA, Gonzalez MA, Gomez-Mouton C, Abad JL, Bernad A, et al. A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep.* 2001;2(2):151-6. doi: 10.1093/embo-reports/kve027. PubMed PMID: 11258708; PubMed Central PMCID: PMC1083823.
160. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(4):595-601. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.017. PubMed PMID: 23773801.
161. Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, et al. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer research.* 2002;62(4):1093-102. PubMed PMID: 11861388.
162. Kershaw MH, Westwood JA, Darcy PK. Gene-engineered T cells for cancer therapy. *Nature reviews Cancer.* 2013;13(8):525-41. doi: 10.1038/nrc3565. PubMed PMID: 23880905.
163. Huang CY, Fong YC, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, et al. CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochemical pharmacology.* 2009;77(5):794-803. doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.014. PubMed PMID: 19073147.
164. Kato T, Fujita Y, Nakane K, Mizutani K, Terazawa R, Ehara H, et al. CCR1/CCL5 interaction promotes invasion of taxane-resistant PC3 prostate cancer cells by increasing secretion of MMPs 2/9 and by activating ERK and Rac signaling. *Cytokine.* 2013;64(1):251-7. doi: 10.1016/j.cyto.2013.06.313. PubMed PMID: 23876400.
165. Kim JE, Kim HS, Shin YJ, Lee CS, Won C, Lee SA, et al. LYR71, a derivative of trimeric resveratrol, inhibits tumorigenesis by blocking STAT3-mediated matrix metalloproteinase 9 expression. *Exp Mol Med.* 2008;40(5):514-22. doi: 10.3858/emm.2008.40.5.514. PubMed PMID: 18985009; PubMed Central PMCID: PMC2679359.
166. Wang SW, Wu HH, Liu SC, Wang PC, Ou WC, Chou WY, et al. CCL5 and CCR5 interaction promotes cell motility in human osteosarcoma. *PloS one.* 2012;7(4):e35101. doi: 10.1371/journal.pone.0035101. PubMed PMID: 22506069; PubMed Central PMCID: PMC3323659.
167. Yi EH, Lee CS, Lee JK, Lee YJ, Shin MK, Cho CH, et al. STAT3-RANTES autocrine signaling is essential for tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2013;11(1):31-42. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0217. PubMed PMID: 23074171.
168. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007;449(7162):557-63. doi: 10.1038/nature06188. PubMed PMID: 17914389.
169. Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, et al. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer research.* 1999;59(18):4681-7. PubMed PMID: 10493525.
170. Mi Z, Bhattacharya SD, Kim VM, Guo H, Talbot LJ, Kuo PC. Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 2011;32(4):477-87. doi: 10.1093/carcin/bgr009. PubMed PMID: 21252118; PubMed Central PMCID: PMC3105582.
171. Lin S, Wan S, Sun L, Hu J, Fang D, Zhao R, et al. Chemokine C-C motif receptor 5 and C-C motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia. *Cancer Sci.* 2012;103(5):904-12. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02259.x. PubMed PMID: 22380870.
172. Jiao X, Katiyar S, Willmarth NE, Liu M, Ma X, Flomenberg N, et al. c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(11):8218-26. doi: 10.1074/jbc.M110.100792. PubMed PMID: 20053993; PubMed Central PMCID: PMC2832973.

173. Velasco-Velazquez M, Jiao X, De La Fuente M, Pestell TG, Ertel A, Lisanti MP, et al. CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer research*. 2012;72(15):3839-50. Epub 2012/05/29. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-3917. PubMed PMID: 22637726.
174. Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, Isagawa T, Tsuji S, Kobayashi S, et al. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2009;102(1):206-12. doi: <http://www.nature.com/bjc/journal/v102/n1/supinfo/6605468s1.html>.
175. Gungor BO, P.; Moses, H. . Uncovering the Role of TGF β and BMP in Triple Negative Breast Cancer Stem Cells. *Young Scientists Journal*. 2013.
176. Gould J. Available from: <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/>.
177. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 2000;25(1):25-9. Epub 2000/05/10. doi: 10.1038/75556. PubMed PMID: 10802651; PubMed Central PMCID: PMC3037419.
178. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211. PubMed PMID: 19131956.
179. Shats I, Gatza ML, Chang JT, Mori S, Wang J, Rich J, et al. Using a stem cell-based signature to guide therapeutic selection in cancer. *Cancer research*. 2011;71(5):1772-80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1735. PubMed PMID: 21169407; PubMed Central PMCID: PMC3049992.
180. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *The New England journal of medicine*. 2007;356(3):217-26. Epub 2007/01/19. doi: 10.1056/NEJMoa063994. PubMed PMID: 17229949.
181. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-6. Epub 2007/12/25. doi: 10.1038/nature06534. PubMed PMID: 18157115.
182. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics*. 2003;34(3):267-73. doi: 10.1038/ng1180. PubMed PMID: 12808457.
183. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102. PubMed PMID: 16199517; PubMed Central PMCID: PMC1239896.
184. Murooka TT, Rahbar R, Fish EN. CCL5 promotes proliferation of MCF-7 cells through mTOR-dependent mRNA translation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(2):381-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.035. PubMed PMID: 19607806.
185. Wu K, Jiao X, Li Z, Katiyar S, Casimiro MC, Yang W, et al. Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(3):2132-42. doi: 10.1074/jbc.M110.148395. PubMed PMID: 20937839; PubMed Central PMCID: PMC3023510.
186. Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC, Willmarth NE, Quong AA, Ju X, et al. The canonical NF- κ B pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion. *Cancer research*. 2010;70(24):10464-73. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0732. PubMed PMID: 21159656; PubMed Central PMCID: PMC3010731.
187. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth*. 2012;9(7):671-5.

188. Ablett MP, O'Brien CS, Sims AH, Farnie G, Clarke RB. A differential role for CXCR4 in the regulation of normal versus malignant breast stem cell activity. *Oncotarget*. 2014;5(3):599-612. doi: 10.18632/oncotarget.1169. PubMed PMID: 24583601; PubMed Central PMCID: PMC3996659.
189. Liang S, Furuhashi M, Nakane R, Nakazawa S, Goudarzi H, Hamada J, et al. Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437(2):205-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.038. PubMed PMID: 23796710.
190. Sicoli D, Jiao X, Ju X, Velasco-Velazquez M, Ertel A, Addya S, et al. CCR5 receptor antagonists block metastasis to bone of v-Src oncogene-transformed metastatic prostate cancer cell lines. *Cancer research*. 2014;74(23):7103-14. Epub 2014/12/03. doi: 10.1158/0008-5472.can-14-0612. PubMed PMID: 25452256; PubMed Central PMCID: PMC4294544.
191. Thorenor N, Slaby O. Small nucleolar RNAs functioning and potential roles in cancer. *Tumour Biol*. 2015;36(1):41-53. doi: 10.1007/s13277-014-2818-8. PubMed PMID: 25420907.
192. Cavaille J, Hadjiolov AA, Bachellerie JP. Processing of mammalian rRNA precursors at the 3' end of 18S rRNA. Identification of cis-acting signals suggests the involvement of U13 small nucleolar RNA. *Eur J Biochem*. 1996;242(2):206-13. PubMed PMID: 8973634.
193. Enright CA, Maxwell ES, Eliceiri GL, Sollner-Webb B. 5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14, E3, U17, and U3. *RNA*. 1996;2(11):1094-9. PubMed PMID: 8903340; PubMed Central PMCID: PMC3996659.
194. Nicoloso M, Qu LH, Michot B, Bachellerie JP. Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs. *J Mol Biol*. 1996;260(2):178-95. doi: 10.1006/jmbi.1996.0391. PubMed PMID: 8764399.
195. Kiss T, Fayet-Lebaron E, Jady BE. Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Molecular cell*. 2010;37(5):597-606. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.032. PubMed PMID: 20227365.
196. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer*. 2011;104(7):1168-77. doi: 10.1038/sj.bjc.6606076. PubMed PMID: 21407217; PubMed Central PMCID: PMC3068486.
197. Liao J, Yu L, Mei Y, Guarnera M, Shen J, Li R, et al. Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2010;9:198. doi: 10.1186/1476-4598-9-198. PubMed PMID: 20663213; PubMed Central PMCID: PMC2919450.
198. Su H, Xu T, Ganapathy S, Shadfan M, Long M, Huang TH, et al. Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene*. 2014;33(11):1348-58. doi: 10.1038/onc.2013.89. PubMed PMID: 23542174.
199. Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*. 2011;147(4):789-802. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002. PubMed PMID: 22056041; PubMed Central PMCID: PMC3225288.
200. Sampath P, Pritchard DK, Pabon L, Reinecke H, Schwartz SM, Morris DR, et al. A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell stem cell*. 2008;2(5):448-60. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.013. PubMed PMID: 18462695.
201. Vilchez D, Boyer L, Morante I, Lutz M, Merkwirth C, Joyce D, et al. Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature*. 2012;489(7415):304-8. doi: 10.1038/nature11468. PubMed PMID: 22972301; PubMed Central PMCID: PMC35215918.

202. Buszczak M, Signer RA, Morrison SJ. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. *Cell*. 2014;159(2):242-51. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.016. PubMed PMID: 25303523; PubMed Central PMCID: PMC4222182.
203. Blanco S, Bandiera R, Popis M, Hussain S, Lombard P, Aleksic J, et al. Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis. *Nature*. 2016;534(7607):335-40. doi: 10.1038/nature18282. PubMed PMID: 27306184; PubMed Central PMCID: PMC5040503.
204. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, et al. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell stem cell*. 2009;4(6):568-80. doi: 10.1016/j.stem.2009.03.014. PubMed PMID: 19497285.
205. Director's Challenge Consortium for the Molecular Classification of Lung A, Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, Tsao MS, Yeatman TJ, et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med*. 2008;14(8):822-7. doi: 10.1038/nm.1790. PubMed PMID: 18641660; PubMed Central PMCID: PMC2667337.
206. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature*. 2002;415(6870):436-42. doi: 10.1038/415436a. PubMed PMID: 11807556.
207. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(20):12877-82. doi: 10.1073/pnas.162488599. PubMed PMID: 12297622; PubMed Central PMCID: PMC130553.
208. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, et al. Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell stem cell*. 2010;7(2):249-57. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.015. PubMed PMID: WOS:000281107400016.
209. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell*. 2009;5(1):111-23. doi: 10.1016/j.stem.2009.06.008. PubMed PMID: 19570518; PubMed Central PMCID: PMC3448781.
210. Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, et al. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol*. 2011;13(5):541-9. doi: 10.1038/ncb2239. PubMed PMID: 21499256; PubMed Central PMCID: PMC3987913.
211. Ascutti S, Akiri G, Grumolato L, Vijayakumar S, Aaronson SA. Diverse mechanisms of Wnt activation and effects of pathway inhibition on proliferation of human gastric carcinoma cells. *Oncogene*. 2011;30(8):956-66. doi: 10.1038/onc.2010.475. PubMed PMID: 21042278; PubMed Central PMCID: PMC3965355.
212. Springael JY, Urizar E, Parmentier M. Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(6):611-23. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.005. PubMed PMID: 15979374.
213. Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Martinez AC. Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol*. 2001;22(11):612-7. PubMed PMID: 11698222.
214. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, et al. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J*. 2001;20(10):2497-507. doi: 10.1093/emboj/20.10.2497. PubMed PMID: 11350939; PubMed Central PMCID: PMC125458.
215. Decailot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *The Journal of*

- biological chemistry. 2011;286(37):32188-97. doi: 10.1074/jbc.M111.277038. PubMed PMID: 21730065; PubMed Central PMCID: PMC3173186.
216. El-Asmar L, Springael JY, Ballet S, Andrieu EU, Vassart G, Parmentier M. Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers. *Mol Pharmacol*. 2005;67(2):460-9. doi: 10.1124/mol.104.003624. PubMed PMID: 15509716.
217. Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez AC, et al. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol*. 2005;6(5):465-71. doi: 10.1038/ni1191. PubMed PMID: 15821738.
218. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*. 2014;2(1):78-91. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.009. PubMed PMID: 24511467; PubMed Central PMCID: PMC3916760.
219. Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer*. 2008;122(2):298-304. doi: 10.1002/ijc.23103. PubMed PMID: 17935134.
220. Hadjimichael C, Chanoumidou K, Papadopoulou N, Arampatzi P, Papamatheakis J, Kretsovali A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2015;7(9):1150-84. doi: 10.4252/wjsc.v7.i9.1150. PubMed PMID: 26516408; PubMed Central PMCID: PMC4620423.
221. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*. 2012;31(11):1354-65. doi: 10.1038/onc.2011.338. PubMed PMID: 21822303.
222. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(26):17969-78. doi: 10.1074/jbc.M802917200. PubMed PMID: 18456656.
223. Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2011;473(7347):337-42. doi: 10.1038/nature10098. PubMed PMID: 21593866.
224. Ge Y, Zhou F, Chen H, Cui C, Liu D, Li Q, et al. Sox2 is translationally activated by eukaryotic initiation factor 4E in human glioma-initiating cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(4):711-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.015. PubMed PMID: 20537983.