



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE INHIBIDORES MITOCONDRIALES SOBRE LA INVASIÓN DE CÉLULAS

CON FENOTIPO TRONCAL DE CÁNCER DE MAMA MCF7

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ADÁN LADRÓN DE GUEVARA ALHELÍ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. FLORIA JOSEFINA LIZÁRRAGA SÁNCHEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

CD. MX., MAYO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

OFICIO CPCB/527/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 18 de febrero de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ÁDAN LADRÓN DE GUEVARA ALHELÍ** con número de cuenta **307070757**, con la tesis titulada **"EFECTO DE INHIBIDORES MITOCONDRIALES SOBRE LA INVASIÓN DE CÉLULAS CON FENOTIPO TRONCAL DE CÁNCER DE MAMA MCF7"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ**:

Presidente: DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO
Vocal: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
Secretario: DRA. FLORIA JOSEFINA LIZÁRRAGA SÁNCHEZ
Suplente: DRA. KARLA ITZEL VÁZQUEZ SANTILLÁN
Suplente: DR. DIDDIER GIOVANNI PRADA ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 03 de mayo de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

A CONACyT por el apoyo económico que me brindó estos dos años el cual me permitió realizar mis estudios de maestría (No. CVU 816782).

Al Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez quien fungió como mi tutor durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Leticia Rocha y a la Dra. Floria Lizárraga quienes formaron parte de mi comité tutor.

Agradecimientos personales

Agradezco a mi amada UNAM por acercarme a la ciencia, arte, cultura y deporte ¡Muchas gracias!

Agradezco al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por todas las facilidades que me brindaron para realizar mi trabajo experimental en sus instalaciones, por el albergue que me asignaron para hacer más fácil la movilidad y así poder dar el 100% en mis estudios de maestría.

Al Dr. Rafael Moreno, Dra. Sara Rodríguez y Dra. Emma Saavedra por todos los conocimientos que adquirí en mi estancia en el departamento de Bioquímica del IN-CICh, gracias por su guía y por sus comentarios para enriquecer este proyecto.

Al Dr. Juan Carlos Gallardo por ser mi guía y mentor estos dos años, por permitirme aprender a su lado y por compartir conmigo su experiencia en la ciencia.

A la Dra. Leticia Rocha, en la parte profesional, por todas sus observaciones al proyecto y por impulsarme a ser crítica, en la parte personal, por siempre ser comprensible y cálida en cada situación.

A la Dra. Floria Lizárraga le agradezco siempre estar dispuesta a ayudarme, a enseñarme una técnica nueva y por siempre tener propuestas para el proyecto. Le agradezco su entusiasmo y dedicación en estos dos años.

A la Dra. Edna Mandujano sus comentarios y observaciones no sólo enriquecieron el proyecto, también mi formación profesional. Muchas Gracias por aceptar estar como invitada en mis tutorales

A la Dra. Josefina Herrera S., Dra. Aliesha González A., Dra. Karla Vázquez S. y al Dr. Diddier Prada O., quienes conformaron mi jurado, gracias por sus observaciones y comentarios los cuales ayudaron a enriquecer esta tesis.

Al CONACyT por los recursos asignados a los proyectos: 243249 (Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez) y 239930 (Dr. Rafael Moreno Sánchez, jefe del Departamento de Bioquímica) en Ciencia Básica; y al proyecto No. 281428 de Infraestructura al Dr. Rafael Moreno Sánchez.

Agradecimientos personales

Definitivamente esto no podría ser posible sin el apoyo de mi mamá, papá y hermano. Siempre están para alentarme a seguir adelante, para guiarme cuando parece que todo es un lío y para brindarme su amor en todo momento. Ustedes son mis más grandes amores en esta vida y estoy agradecida con la vida por tenerlos conmigo.

A Wilman por todas las veces que me ayudaste a repasar una presentación, a aprenderme mi speech. Gracias por ayudarme a relacionar mi conocimiento biológico con conocimiento médico pero sobre todo gracias por todas nuestras pláticas de ciencia, medicina, política, deporte, economía, cultura y mil cosas más. Gracias por los viajes juntos, las risas y por descubrir el mundo juntos.

A Irais que estás siempre para apoyarme, escucharme y aconsejarme en todo momento. Gracias por tantas risas y por hacer más feliz mi viaje por esta vida. Gracias porque me enseñas a ser más paciente y a querer a las personas como son sin esperar algo a cambio ¡Gracias!

Al Dr. Javier Belmont, mi máspreciado químico puro. Tengo tanto que agradezco. En la parte académica, siempre he admirado tu capacidad de análisis, quiero agradecer por ayudarme en el análisis de datos, de artículos y de teorías. Gracias por siempre estar dispuesto a explicarme cosas y por ayudarme a ser más crítica. En la parte personal te agradezco por brindarme tu amistad, eres una persona maravillosa en todos los aspectos y me llevo en mi corazón y mente nuestras pláticas versátiles.

A Zabdi porque hiciste mis días en el laboratorio más divertidos, porque es difícil encontrar verdaderos amigos y tú eres uno de ellos. Gracias por las risas escondidas y las que retumbaban por todos lados. Gracias por siempre estar pendiente de mi en los momentos difíciles y por compartir conmigo un pedacito de tu vida. Te quiero con todo mi corazón.

A Mina y Ferran que siempre que llegaba a casa cansada no faltaban las vueltas de felicidad de Mina o los maullidos de exigencia de comida de Ferran. A ellos que aunque son dos pequeños seres de cuatro patas, llenan de amor mi corazón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	6
2. CÁNCER	6
2.1 CÁNCER DE MAMA	7
2.2 CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER (CSC).....	11
2.3 RESISTENCIA DE CSC A TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS.....	14
2.4 MICROAMBIENTE Y CSC.....	16
2.5 METÁSTASIS.....	17
2.6 METABOLISMO ENERGÉTICO	20
2.7 INHIBIDORES MITOCONDRIALES.....	22
2.8 REPOSICIONAMIENTO Y COMBINACIÓN DE FÁRMACOS.....	23
CAPÍTULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
CAPÍTULO IV. JUSTIFICACIÓN.....	25
CAPÍTULO V. HIPÓTESIS.....	25
CAPÍTULO VI. OBJETIVOS.....	26
6. GENERAL	26
6.1 PARTICULARES	26
CAPÍTULO VII. METODOLOGÍA	27
7. CULTIVO CELULAR.....	27
7.1 ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS BCSC-LIKE	27
7.2 WESTERN BLOT.....	27
7.3 ENSAYO DE INVASIÓN.....	28
7.4 DETERMINACIÓN DE IC50 DE VIABILIDAD	28
7.5 DETERMINACIÓN DE IC50 DE INVASIÓN.....	29
7.6 DETERMINACIÓN DE SINERGISMOS.....	29
7.7 DETERMINACIÓN DE GLUCÓLISIS Y OXPHOS	30

7.8 DETERMINACIÓN DE ROS	31
7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
CAPÍTULO VIII. RESULTADOS	33
8. FENOTIPO TRONCAL DE LAS BCSC-LIKE	33
8.1 EFECTO DE INHIBIDORES MITOCONDRIALES, GLUCOLÍTICOS Y FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE LA VIABILIDAD DE BCSC-LIKE	34
8.2 EFECTO DE LOS INHIBIDORES MITOCONDRIALES SOBRE LA INVASIÓN DE BCSC-LIKE.....	36
8.3 EFECTO TÓXICO EN CÉLULAS NO TUMORALES	36
8.4 SINERGISMO EN RELACIÓN A LA VIABILIDAD EN LAS CÉLULAS BCSC-LIKE	37
8.5 SINERGISMO EN INVASIÓN DE BCSC-LIKE.....	40
8.6 SINERGISMO SUPRA ADITIVO DE CELECOXIB CON PACLITAXEL EN LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.....	42
8.7 DETERMINACIÓN DE ROS	43
8.9 DETERMINACIÓN DE GLUCÓLISIS.....	45
CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN.....	45
CAPÍTULO X. CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA	52

ABREVIATURAS

2OGDH	2-oxoglutarato deshidrogenasa
5-FU	5-fluorouracilo
ABC	ATP-binding cassette
AdSC	Adult stem cell (célula troncal de adulto)
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
APC	Adenomatous polyposis coli (gen)
ATB	Aditivismo tipo Bliss
ATM	Ataxia telangiectasia mutada (gen)
BCSC	Breast Cancer Stem Cells (Células troncales de cáncer de mama)
<i>BRCA1</i>	Breast Cancer 1 (gen)
CaMa	Cáncer de mama
Cas-IIgly	Casiopeína-IIgly
CD133	Cluster of differentiation 133 (Grupo de diferenciación 133)
CD24	Cluster of differentiation 24 (Grupo de diferenciación 24)
CD44	Cluster of differentiation 44 (Grupo de diferenciación 44)
CSC	Cancer Stem Cells (Células troncales de cáncer)
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (Motivo C-X-C Ligandode Quimiocina 12)
DHE	Dihidroetidio
DMC	Dimetil-celecoxib

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
EMT	Epithelial mesenchymal transition (Transición epitelio mesénquima)
ESA	Epithelial specific antigen (antígeno específico epitelial)
ESC	Embryonic stem cell (célula troncal embrionaria)
FGF	Fibroblast growth factor (Factor de crecimiento de fibroblastos)
GCO	Global cancer observatory (Observatorio global del cáncer)
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2 (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano)
HprogC	Hematopoietic progenitor cell (célula progenitora hematopoyética)
HSC	Hematopoietic stem cell (célula troncal hematopoyética)
IAA	Yodo acetate (Yodo acetato)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IGF	Insulin growth factor (Factor de crecimiento insulínico)
IL	Interleucinas
MDR	Multi Drug Resistance (Resistencia a múltiples fármacos)
MMP	Matrix metalloproteinase (Metaloproteinasas de matriz)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
NK	Natural Killer
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/ severe combined immunodeficiency
Oct 4	Factor 4 de transcripción de unión a octámero
OxPhos	Oxidative phosphorylation

PDH	Piruvato deshidrogenasa
PET	Positron emission tomography (Tomografía por emisión de positrones)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Receptor de estrógenos
RIPA	Buffer de lisis (Radioimmunoprecipitation assay)
RM	Resonancia magnética
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas de oxígeno)
RP	Receptor de progesterona
SDF-1	Stromal-cell derived factor-1 (Factor derivado de estroma 1)
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
TGF β	Transforming growth factor beta (Factor de crecimiento transformante beta)
US	Ultrasonido
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor (Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular)
α -TEA	alpha-tocopherol ether linked acetic acid analog (Alfa tocoferol éter unido a un análogo de ácido acético)

RESUMEN

Antecedentes.

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres.

La metástasis y la recurrencia del cáncer de mama son las principales causas de muerte en pacientes con esta enfermedad, La metástasis es responsable de aproximadamente el 90% de las muertes por cáncer.

Recientemente se identificó una pequeña subpoblación tumoral responsable de estos procesos, a la cual se denominó células troncales de cáncer (*cancer stem cells*, CSC). Actualmente, las terapias convencionales que se utilizan en la clínica no son eficaces para prevenir la metástasis o erradicar a las CSC, por lo que es necesario buscar nuevas estrategias terapéuticas.

La reprogramación del metabolismo energético es un sello distintivo de las células cancerosas que se puede usar como un posible blanco terapéutico. Anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se determinó que la fosforilación oxidativa es la vía energética que suministra la mayor cantidad de ATP en las células troncales de cáncer de mama provenientes de la línea celular MCF7, las cuales denominamos *breast cancer stem cells like* (*BCSC-like*). Lo anterior sugirió la necesidad de evaluar una terapia anti-mitocondrial para erradicar a las *BCSC-like*

Metodología.

Para demostrar la potencial utilidad del metabolismo energético como posible blanco para erradicar a las *BCSC-like*, en este trabajo, evaluamos inhibidores mitocondriales (oligomicina, casiopeina-Ilgly, alfa TEA, sulindac, celecoxib y dimetilcelecoxib), glucolíticos (yodo acetato y gosipol) y fármacos antineoplásicos (paclitaxel, doxorubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino) en diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M) para determinar su efecto sobre la viabilidad y la invasión de las *BCSC-like* provenientes de MCF7.

Resultados.

Los inhibidores mitocondriales (casiopeina-Ilgly, alfa tea, sulindac, celecoxib y dimetilcelecoxib) fueron más potentes (de 5 a 100 veces) para inhibir la viabilidad a

bajas concentraciones (0.8 - 30 μM) en comparación con los fármacos antineoplásicos y los inhibidores glucolíticos (> 100 μM). Cuando combinamos paclitaxel (un fármaco antineoplásico) con inhibidores mitocondriales como el celecoxib, hay un aumento en el efecto para inhibir la viabilidad (62%) y la invasividad (87%) de las *BCSC-like* de MCF7.

Evaluamos el efecto en la fosforilación oxidativa en presencia de esta combinación y observamos un aumento en el consumo total de oxígeno, pero no en la fosforilación oxidativa, lo que nos sugirió que podría haber un aumento en la producción de ROS. La combinación de celecoxib (0.6 μM) y paclitaxel (10 μM) aumenta la concentración de ROS en las células *BCSC-like*.

Evaluamos la viabilidad en células de fibroblastos de ratón 3T3 (no tumorales) y esta se mantuvo en presencia de la combinación de paclitaxel con celecoxib en un 80%.

Conclusiones.

Estos resultados indican que una terapia combinatoria con celecoxib puede potenciar el efecto de paclitaxel repercutiendo en la función mitocondrial, aumentando la velocidad de producción de ROS y así disminuir la viabilidad y la capacidad invasiva de las *BCSC-like*, a dosis clínicamente relevantes y que no tienen efecto aparente sobre la viabilidad de células no tumorales. Esto es una estrategia novedosa que pudiera dar las bases para una nueva terapia combinatoria.

ABSTRACT

Background.

Breast cancer is the neoplasm with the highest incidence and mortality in women. Metastasis and recurrence of breast cancer are the main causes of death in patients with this disease. Metastasis is responsible for approximately 90% of cancer deaths.

Recently, a small tumor subpopulation responsible for these processes was identified, which was called cancer stem cells (CSC). Currently, conventional therapies used in the clinic are not effective to prevent metastasis or eradicating CSCs, so it is necessary to search for new therapeutic strategies.

The reprogramming of energy metabolism is a hallmark of cancer cells that can be used as a possible therapeutic target. Previously, in our working group it was determined that oxidative phosphorylation is the energy pathway that provides the highest amount of ATP (80%) in breast cancer stem cells from the MCF7 cell line, which we call breast cancer stem cells like (BCSC-like). The above suggested the need to evaluate an anti-mitochondrial therapy to eradicate the BCSC-like

Methodology.

To demonstrate the potential utility of energy metabolism as a possible target to eradicate BCSC-like, in this work, we evaluate mitochondrial drugs (oligomycin, casiopein-IIgly, alpha TEA, sulindac, celecoxib and dimetilcelecoxib), glycolytics (iodine acetate and gossypol) and antineoplastics (paclitaxel, doxorubicin, 5-fluorouracil and cisplatin) in different concentrations (0.1, 1, 10, 100, 1000 μM) to determine their effect on the viability and invasion of BCSC-like from MCF7.

Results.

Mitochondrial inhibitors (casiopein-IIgly, alpha tea, sulindac, celecoxib, and dimethylcolecib) were more potent (5-100 fold) to inhibit viability at low concentrations (0.8-30 μM) compared to antineoplastic drugs and glycolytic inhibitors (> 100 μM). When we combine paclitaxel (an antineoplastic drug) with mitochondrial inhibitors

such as celecoxib, there is an increase in the effect to inhibit the viability (62%) and the invasiveness (87%) of the BCSC-like BCF7.

We evaluated the effect on oxidative phosphorylation in the presence of this combination and observed an increase in total oxygen consumption, but not in oxidative phosphorylation, which suggested that there could be an increase in ROS production. The combination of celecoxib (0.6 μM) and paclitaxel (10 μM) increases the concentration of ROS in BCSC-like.

We evaluated the viability in 3T3 mouse fibroblast cells (non-tumor cells) and this was maintained in the presence of the combination of paclitaxel with celecoxib in 80%.

Conclusions.

These results indicate that a combinatorial therapy with celecoxib can potentiate the effect of paclitaxel having an impact on mitochondrial function, increasing the ROS production rate and thus decreasing viability and invasion process of BCSC-like, at clinical relevant doses and which have no apparent effect on the viability of non-tumor cells. This is a novel strategy that could provide the basis for a new combinatorial therapy.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el primer tipo de cáncer en mujeres en México y a nivel mundial, además es el cáncer con mayor mortalidad en mujeres (GCO. IARC, 2018). El tiempo de sobrevida libre de enfermedad es de 5 a 10 años después de haber recibido quimioterapia, radioterapia, cirugía o la combinación de éstos y la recurrencia representa más del 40% de las pacientes previamente diagnosticadas (Arce et al., 2011).

En años recientes se demostró la presencia de una subpoblación tumoral que presentaba características clínicas de gran relevancia, a esta subpoblación se le denominó *cancer stem cells (CSC)* (Kwon y Shin, 2013). Algunas de estas características son la sobreexpresión de proteínas involucradas en el desarrollo del fenotipo de (a) transición epitelio-mesénquima (un paso involucrado en la preogresión de la metástasis que consiste en la disminución en la expresión de E-cadherina, sobreexpresión de Snail, beta catenina, fibronectina, vimentina); (b) invasión (expresión de metaloproteinasas de matriz); (c) resistencia a agentes quimioterapéuticos (por sobreexpresión de P-glicoproteína, citocromos CYP) y a radiación (por actividad de ALDH); (d) autorrenovación y (e) potencial metastásico (Alison et al., 2012; Chen et al., 2016; Myung et al., 2012; Velasco-Velázquez et al., 2012).

La metástasis y la recurrencia del cáncer de mama representa la principal causa de muerte en mujeres con esta enfermedad (Li et al., 2007; Yang et al., 2017); actualmente no existe una terapia efectiva para evitar la recurrencia del cáncer o prevenir la metástasis en la cual están involucradas las CSC. Además, las terapias clínicas actuales tienen efectos secundarios en las pacientes, deteriorando su calidad de vida.

La metástasis es un proceso celular altamente demandante de energía por lo que la inhibición del metabolismo energético prevalente en las CSC podría ser un blanco efectivo para inhibir este proceso ya que recientemente se demostró que la inhibición de *OxPhos* podría ser un objetivo potencial para tratar los cánceres.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2. CÁNCER

La transformación de una célula sana en una célula tumoral conlleva diversas modificaciones genéticas y metabólicas que tienen repercusión sobre los procesos de proliferación, muerte celular, invasión y metástasis, los cuales en el 2011 Hanahan y Weinberg incluyeron como sellos característicos del cáncer.

Dependiendo del tejido de origen los tumores se pueden clasificar en distintos grupos:

Epiteliales: El 80% de los tumores son de este origen y se les denomina **carcinomas** (Rogalla y Contag, 2015; Cooper, 2009; Frank, 2007; Tanner, 2012), están compuestos de células epiteliales pero no mantienen el arreglo estructural característico de los tejidos epiteliales sanos. Dentro de los carcinomas hay dos subgrupos, los carcinomas de células escamosas que son los epitelios que forman capas protectoras como piel, cérvix, orofaríngeo, pulmonar, entre otros. El segundo subgrupo es el de los **adenocarcinomas** los cuales consisten en células epiteliales especializadas para secretar sustancias en los ductos o cavidades como el adenocarcinoma mamario (Wang et al., 2012; Phesse y Clarke, 2009)..

Sarcomas: Derivan de células mesenquimales como fibroblastos, tejido conectivo (hueso, cartílago, músculo), adipocitos, osteoblastos, etc (Frank, 2007).

Hematopoyéticos: Compuestos por células del sistema inmune y de células destinadas para formar eritrocitos. Existe un subgrupo denominado linfoma el cual está constituido por linfocitos T y B y generalmente son encontrados en ganglios linfáticos (Cazzola, 2016).

Sistema Nervioso central: los tumores neuroectodérmicos pueden proceder de células de la glía (gliomas), células de Schwann (Schwannomas), astrocitos (astrocitomas), entre otros (Zhuge et al., 2017).

Uno de los procesos mejor estudiados de la transformación maligna de las células es en el cáncer colorectal (Nowell, 1976; Fearon y Vogelstein, 1990). Este proceso

es conocido como secuencia adeno-carcinoma y cada uno de los pasos es inducido por alteraciones genéticas. El primer paso ocurre cuando una célula normal pierde los “candados” (mecanismos de control como inhibición del ciclo celular) que detienen la proliferación y, por lo tanto, incrementa su capacidad proliferativa y puede hacerlo indeterminadamente (expansión clonal), esto a causa de una mutación génica (Vogelstein et al., 2013; Hanahan and Weinberg, 2011). Esta mutación le confiere una ventaja selectiva sobre las células epiteliales normales y a este crecimiento acelerado se le conoce como neoplasia. Particularmente en el cáncer colorectal la mutación usualmente se presenta en el gen *APC* (adenomatous polyposis coli) (Fodde, 2002) y esta primera mutación forma un adenoma (benigno) pequeño que, seguido de una mutación en el gen *KRAS* promueve una expansión clonal acelerada y al ir acumulando más mutaciones como en *TP53* y *SMAD4*, eventualmente dará origen al adenocarcinoma (progresión tumoral) el cual presentará la capacidad de invadir y hacer metástasis.

Los procesos anteriores se conocen como carcinogenesis y se generalizan para todos los tipos de cáncer, sin embargo, dependiendo del órgano o tejido donde se encuentre localizado el tumor, será el tipo de mutaciones que presentará (Vogelstein and Kinzler 2004; Bozic et al., 2010). En cáncer de mama puede presentarse una predisposición genética si existe mutación en el gen *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* y/o *TP53* (Feng et al., 2018; Draga et al., 2015).

2.1 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres, a nivel mundial y en México. El observatorio global del cáncer (GCO) en el 2018 reportó 2,088,849 (11.5%) casos a nivel mundial (con un total de 18,078,957 casos de todos los tipos de cáncer) y 626,679 (6.5%) muertes por éste tipo de cáncer (con un total de 9,555,027 muertes por cáncer) (GCO. IARC, 2018).

En México el CaMa representa el 26% de incidencia de cáncer en mujeres con un total de 27,283 casos reportados en el 2018 y 6,884 (16%) muertes por este tipo de cáncer (con un total de 42,967 muertes por cáncer) (GCO. IARC, 2018).

Existen diversos métodos para la detección del cáncer de mama, un diagnóstico temprano de la enfermedad representa un buen pronóstico de la misma. Los métodos diagnósticos constan de estudios de tamizaje (autoexploración mamaria) y estudios de imagen como la mastografía, el ultrasonido mamario (US), la resonancia magnética (RM) y la tomografía por emisión de positrones (PET), si se presentan lesiones sospechosas se realizan biopsias y estudios histopatológicos (Bever et al., 2009).

Existen cuatro subtipos moleculares del carcinoma mamario que involucran la expresión o ausencia de marcadores como el receptor de progesterona (RP), receptor de estrógeno (RE), HER-2. Con base en estos marcadores se clasifican de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama.

Subtipo de carcinoma mamarios	Receptores por inmunohistoquímica
Luminal A	RE+, RP+, Ki67 y HER-2-
Luminal B	RE+, RP+, Ki67 y HER-2 +/-
HER-2	HER-2+, RE-, RP-
Triple negativo	RE-, RP-, HER-2-

En México el 60% de los casos de carcinoma mamario tienen receptores hormonales positivo (Luminales A o B), HER-2 positivo representa el 17% y los carcinomas triples negativos representan el 23% (NOM-041-SSA2-2002).

Los tratamientos para el cáncer de mama constan de cirugía conservadora (reseción del tumor y tejido sano circundante), se utiliza cuando se presentan tumores primarios localizados; cirugía radical (mastectomía radical); se realizan cuando el

cáncer se localiza en más de un sitio en la mama (Morrow et al., 2016); quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica y radioterapia las cuales pueden ser de manera adyuvante lo que significa que se administra en pacientes que ya recibieron un tratamiento quirúrgico y lo que busca es aumentar el tiempo libre de enfermedad para así evitar una recurrencia tumoral (Sparano et al., 2015), o neoadyuvante que es cuando se administran antes de un tratamiento quirúrgico para reducir el tamaño del tumor y así sea más fácil su resección. La cirugía y la radioterapia tienen una acción local, la quimioterapia, hormonoterapia y la terapia biológica tienen una acción sistémica (Gradishar et al., 2016).

Los fármacos antineoplásicos pueden tener como blanco el DNA, los receptores hormonales, receptores de tirosin-cinasas o proteínas del citoesqueleto para evitar la división celular. Dependiendo del estado hormonal de las pacientes es el tratamiento terapéutico que se selecciona (Bruce et al., 2007).

Para las pacientes premenopáusicas con carcinoma *in situ*, positivo a receptor de estrógenos y que se les realizó cirugía conservadora, se les administra Tamoxifen (20mg/día) durante 5 años como una terapia reductora de riesgo de recurrencia. Pero para las pacientes posmenopáusicas se utilizan inhibidores de aromatasas por 5 años (Arce et al., 2011).

Tratamiento para metástasis

Actualmente no existe ninguna terapia efectiva para evitar o curar este proceso celular. Los tratamientos que se administran actualmente en la clínica utilizan de referencia los subtipos moleculares y el estado hormonal de la paciente. Cuando el cáncer es altamente metastásico se administra una combinación de agentes quimioterapéuticos ya que produce un mayor porcentaje de respuesta.

El uso de poliquimioterapia únicamente se utiliza en pacientes que presenten crisis visceral (metástasis visceral y de progresión rápida), pacientes en las que se busque una respuesta rápida, paliación de síntomas rápidos o en los casos en que la expectativa de vida sólo permita una posibilidad de tratamiento aunque éste sea muy agresivo (NOM-041-SSA2-2002).

Por último la terapia endócrina puede ser adyuvante o neoadyuvante, se utilizan como adyuvantes a los tamoxifenos (para mujeres pre-menopáusicas) reduciendo el riesgo de recurrencia en un 40%, e inhibidores de aromatasas como anastrozol, letrozol y exemestane (para mujeres postmenopáusicas que expresan RE o RP), disminuyendo el riesgo de recurrencia en un 3% (Arce et al., 2011; Morales-Vásquez, 2006).

Más del 40% de las pacientes que recibieron un tratamiento para el cáncer de mama presentan una recurrencia tumoral de 5 a 10 años después del tratamiento. Los estudios han demostrado que en tumores sólidos y en leucemias existe una subpoblación tumoral que es la responsable de la recurrencia del cáncer, a estas células se le denomina células troncales de cáncer o *cancer stem cells (CSC)* (Kwon y Shin, 2013). Los tratamientos actuales no son efectivos para erradicar las CSC por lo que la búsqueda de nuevas terapias antineoplásicas, es necesaria.

2.2 CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER (CSC)

La autorrenovación es la característica que define a las células troncales (*stem cells*) y a las células troncales de cáncer (*Cancer Stem Cells*), cuando una célula tiene la capacidad de autorrenovarse se refiere a que puede dar origen a una célula diferenciada y a otra célula no diferenciada. A este tipo de división se le conoce como división asimétrica (Velasco-Velázquez et al., 2012). La autorrenovación requiere del control del ciclo celular ya que las células troncales, en condiciones fisiológicas se encuentran en estado de quiescencia, lo que significa que están en arresto del ciclo celular en la fase G0, por lo que esta subpoblación celular mantiene una baja tasa de proliferación (Wang et al., 2016). El mantenerse en un estado de quiescencia es un mecanismo de reservorio de las células troncales. Cuando existe un daño tisular y se necesita reparar el tejido dañado las células troncales salen de su estado de quiescencia y empiezan a proliferar para reparar el daño. Existen muchos factores de crecimiento involucrados en mantener la quiescencia de las células troncales o para estimularlas para que prosigan su ciclo celular (TGF β , Wnt, BMP, FGFs), proteínas inhibidoras del ciclo celular como inhibidores de cinasas dependiente de ciclinas (CDKs) p57 y p21 (Velasco-Velázquez et al., 2009). El microambiente influye en la permanencia del estado de quiescencia y en la activación del ciclo celular (véase página 14).

El control correcto de la proliferación, la diferenciación celular y el reemplazo celular ayuda a mantener la homeostasis de los tejidos, para mantener esta homeostasis se requiere de las células troncales.

Las *stem cells* (SC) pueden clasificarse en dos grupos, células troncales embrionarias (*embryonic stem cells, ESC*) que derivan de la masa celular interna, y células troncales de adulto (*adult stem cells, AdSC*) las cuales se encuentran en diferentes tejidos y órganos como médula ósea, músculo esquelético, piel o sangre, y ayudan a la homeostasis de éstos (Sobhani et al., 2017). Las SC tienen una potencialidad, una capacidad de poder formar tejidos, órganos o dar origen a todos los tipos de células de un individuo y se clasifican en pluripotentes (capacidad de producir células de las 3 capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo); totipotentes,

(capacidad de producir todos los tipos de células de un organismo); multipotentes (se pueden diferenciar sólo en un número limitado de tipos celulares especializados) y unipotentes (sólo se pueden diferenciar en un linaje determinado) (Bacakova et al., 2018; Sobhani et al., 2017).

Las CSC tienen la capacidad de autorrenovarse como una célula troncal sana embrionaria o de adulto, además de esta característica también comparten la capacidad de migrar, invadir tejidos, tener una maquinaria que le permita protegerse de agentes citotóxicos, tienen una baja tasa de proliferación y representan una pequeña fracción del total de la masa heterogénea de tumor (0.01 - 2.5%) (Fillmore y Kupperwaser, 2008; Guo et al., 2006; Han et al., 2013).

En el 2003 Al-Hajj reportó la presencia de CSC en biopsias de cáncer de mama, identificó a esta subpoblación celular con los marcadores de superficie CD44⁺/CD24⁻/ESA⁺ por citometría de flujo. Al-Hajj observó que las células que presentaban estos marcadores eran 50 veces más eficientes para formar tumores en ratones NOD/SCID que las células tumorales que no presentaban este fenotipo troncal, además de que formaban tumores con bajo número de células (100 células), mientras que las células que no presentaban estos marcadores se requerían cientos e inclusive miles de células.

Actualmente se ha descrito la presencia de CSC en diversos órganos y dependiendo de su tejido de origen son los marcadores que se emplean para identificarlas (Tabla 2). Algunos de estos marcadores son también representativos de células troncales sanas.

Tabla 2. Marcadores de troncalidad en diferentes CSC.

Marcador	Función normal	Células troncales sanas (SC)	Células troncales de cáncer (CSC)	Referencia
CD44	Receptor al ácido hialurónico y proteína de adhesión	HSC HprogC PSC	Mama Páncreas Ovario Próstata	Al-Hajj et al., 2003. Heiler et al., 2016. Parte et al., 2017. Kalantari et al., 2017.
CD133	Glucoproteína transmembranal Prominin 1. Regula diferenciación y pluripotencia celular	HSC AdSC	Glioblastoma Melanoma Colon Páncreas Pulmón Próstata Endometrio	Kim et al., 2017. Heiler et al., 2016. Sun et al., 2017. Kalantari et al., 2017.
Oct 4	Proteína de unión de octámero. Factor transcripcional que regula la capacidad de autorrenovación y pluripotencia	ESC	Mama Pulmón Tiroides	Wang et al., 2014. Phiboonchaiyanan et al., 2017. Carina et al., 2013.
ALDH1	Aldehído deshidrogenasa. Desintoxicación celular	AdSC	Mama Glioblastoma Páncreas Cabeza y cuello	Tomita et al., 2015. Marcato et al., 2015.

HSC, hematopoietic stem cell (célula troncal hematopoyética)
HprogC, hematopoietic progenitor cell (célula progenitora hematopoyética)
AdSC, adult stem cell (célula troncal de adulto)
ESC, embryonic stem cell (célula troncal embrionaria)

Los marcadores de troncalidad están involucrado con quimio y radio resistencia (Singer et al., 2018) y con un fenotipo más agresivo del cáncer como metástasis (Maugeri-Saccá et al., 2011; Joseph et al., 2018).

La metastasis y la recurrencia del cáncer de mama son las principales causas de muerte en pacientes con esta enfermedad y en los últimos años se demostró que las células troncales de cáncer de mama (*Breast Cancer Stem Cells, BCSC*) son las responsables de estos dos procesos (Luo et al., 2015).

Conocer las características de las *BCSC* y entender sus procesos celulares puede ayudar a buscar blancos para erradicar a esta subpoblación tumoral. Algunas de estas características es su capacidad de autorrenovación, la capacidad de resistir a las terapias clínicas actuales como quimioterapia y radioterapia, tienen una baja tasa de proliferación, llevan a cabo transición epitelio-mesénquima (EMT), invasión, y tienen capacidad para realizar o promover la metástasis y su capacidad de formar nuevos tumores, por lo que también son llamadas células iniciadoras de tumor (Mimeault y Batra, 2013).

2.3 RESISTENCIA DE CSC A TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS

Las terapias actuales son efectivas para eliminar a las células que no son troncales pero no son efectivas para erradicar a las *CSC*. Algunas de las estrategias que tienen las *CSC* para resistir a las terapias clínicas actuales se mencionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a fármacos de las CSC.

Mecanismo de resistencia	Proteínas involucradas	Mecanismo de acción	Referencia
Transportadores ABC	P-glicoproteína (PGP)/MDR1	Expulsa agentes quimioterapéuticos lo que dificulta la efectividad de las terapias y favorece la resistencia tumoral.	Chen et al., 2016
Enzimas desintoxicantes	ALDH1	Proteger a las células de aldehídos tóxicos producidos por la radio y quimioterapia	Peitzsch et al., 2013 Kim et al., 2013
Vías de señalización	Oct 4, Sox2, Nanog, Wnt/ β -catenina, Notch, Sonic hedgehog	Mantenimiento del fenotipo troncal e implicadas en su capacidad invasiva así como quimioresistencia	Maugeri-Saccá et al., 2011 Velasco-Velázquez et al., 2012
Reparación de daño al DNA	BRCA1, ATM, PCNA.	Repara el daño causado por la radiación o por los agentes alquilantes de DNA por lo que genera radio y quimio resistencia	Zentella et al., 2007 Wang, 2015 Kim et al., 2013

2.4 MICROAMBIENTE Y CSC

Los tumores son heterogéneos, están constituidos de más de un tipo de células como pueden ser fibroblastos, adipocitos, células mesenquimales, células del sistema inmune, células endoteliales, células tumorales y CSC (Hanahan y Weinberg, 2011; Schwarz-Cruz et al., 2016). Cuando el tumor sólido va incrementando su tamaño se forman diferentes gradientes de oxígeno y de nutrientes dentro de éste. Está reportado que las células que están más cercanas a los vasos sanguíneos tienen una concentración de O_2 de 30 μM sin embargo, las células que se encuentran más alejadas de los vasos sanguíneos (a una distancia de 500 μm) tienen una concentración de 7 a 3 μM (Rodríguez-Enríquez et al., 2014). El gradiente de glucosa a través del tumor también es importante para el crecimiento del mismo. Las células más cercanas a vasos sanguíneos presentan una concentración de glucosa de 5-10 mM y las células más alejadas tienen una concentración de 0.5 mM (Rodríguez-Enríquez et al., 2014).

Todas estas interacciones con los diferentes tipos celulares y los diferentes gradientes de oxígeno, nutrientes y la secreción al medio de diferentes citocinas, metabolitos y factores de crecimiento son los que constituyen al microambiente tumoral el cual ayuda al crecimiento y mantenimiento del tumor así como a promover la migración y la invasión e inclusive, a promover la resistencia a fármacos y activar la autorrenovación (Borovski et al., 2011).

Las bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia 1 a 0.1 % de O_2) inducen la activación de vías de señalización relacionadas con el fenotipo troncal como lo son Notch, sonic Hedgehog y WNT en células tumorales de mama, colon y cerebro (Karamboulas y Ailles, 2013; Li et al., 2013).

Estas condiciones del microambiente pueden generar estrés oxidativo en las células tumorales el cual puede tener un mecanismo dual, puede activar diferentes mecanismos para sobrevivir a este estrés microambiental o dañar y matar a las células (Ralph et al., 2015). Dicho estrés favorece la inducción y mantenimiento del fenotipo

troncal. La hipoxia, la hipoglucemia o el tratamiento con fármacos incrementa aproximadamente 8 veces los marcadores de células troncales CD44, Oct4 y Nanog (vía de señalización en células troncales) (Flavahan et al., 2013; Covello et al., 2006; Krishnamachary et al., 2012; Li et al., 2013). En nuestro laboratorio hemos estandarizado un protocolo de selección e inducción del fenotipo “CSC-like” (tipo-CSC) mediante el uso de combinaciones de drogas antineoplásicas, hipoxia severa e hipoglucemia, condiciones que mimetizan el microambiente tumoral y que inducen a las células de cáncer a comportarse de una manera parecida a las CSC (Gallardo-Pérez et al., 2017).

Además de promover un fenotipo troncal, el microambiente tiene un papel muy importante en la resistencia a las terapias clínicas convencionales mediante la sobreexpresión de P-glicoproteína, transportadores ABC y la activación de citocromos p450 (Alison et al., 2012; Myung et al., 2012).

2.5 METÁSTASIS

La metástasis es la diseminación de células neoplásicas de un tumor primario a un órgano secundario (Gupta y Massagué, 2006). Es un proceso con diferentes etapas secuenciales que involucran: 1) la salida de las células del tumor primario por la pérdida de adhesión celular, 2) aumento en la motilidad e invasión celular (fenotipo mesenquimal) 3) la capacidad para realizar intravasación a torrente sanguíneo o sistema linfático y sobrevivir al microambiente en circulación, 4) hacer extravasación y 5) proliferar en un órgano secundario (colonizar) (Figura 1) (Chambers et al., 2002). La invasión es crucial para la progresión maligna de la enfermedad, en este proceso las células tumorales secretan metaloproteinasas (MMPs) para poder degradar matriz extracelular y así poder invadir tejidos adyacentes (De Wever y Mareel, 2003).

El microambiente tumoral también está involucrado en la progresión de la metástasis pues diversas citocinas, metabolitos y los diferentes gradientes de oxígeno y

nutrientes pueden ayudar a promover la metástasis. Entre los factores que promueven la metástasis se encuentran Snail, Twist, ZEB 1 y 2 y TGF- β (Lamouille et al., 2014).

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es cuando una célula epitelial pierde características de epitelio como las uniones de adhesión célula-célula (por la pérdida de E-cadherina y expresión de vimentina) y adquiere características mesenquimales para poder migrar e invadir (Scheel et al., 2011). Durante el proceso de metástasis las células están expuestas a todo el estrés microambiental como la hipoxia, el sistema inmune, fármacos antineoplásicos, por lo que existe una selección de células que sobreviven a todo este estrés microambiental (Zhang et al., 2013).

Para llevar a cabo la invasión, las células tumorales secretan metaloproteinasas de matriz las cuales ayudan a romper a las proteínas de uniones celulares (como la E-cadherina o la integrina- β 1) y esta pérdida del contacto célula-célula facilita la migración e invasión celular a tejido circundante y a vasos sanguíneos. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado que las metaloproteinasas no sólo ayudan a degradar proteínas de matriz extracelular, sino que también tienen una función como señalización celular como en la activación de factores de crecimiento, liberación de citocinas y metabolitos (Van Damme et al., 2004).

Las células adyacentes al tumor ayudan a las células tumorales a sobrevivir, por ejemplo, las células tumorales en circulación reclutan plaquetas para protegerse de las células del sistema inmune (principalmente las *natural killer*, *NK*) y además de la protección contra la lisis las plaquetas ayudan a las células tumorales mediante un mecanismo de señalización independiente acoplado a la protrombina circulante (Palumbo et al., 2007).

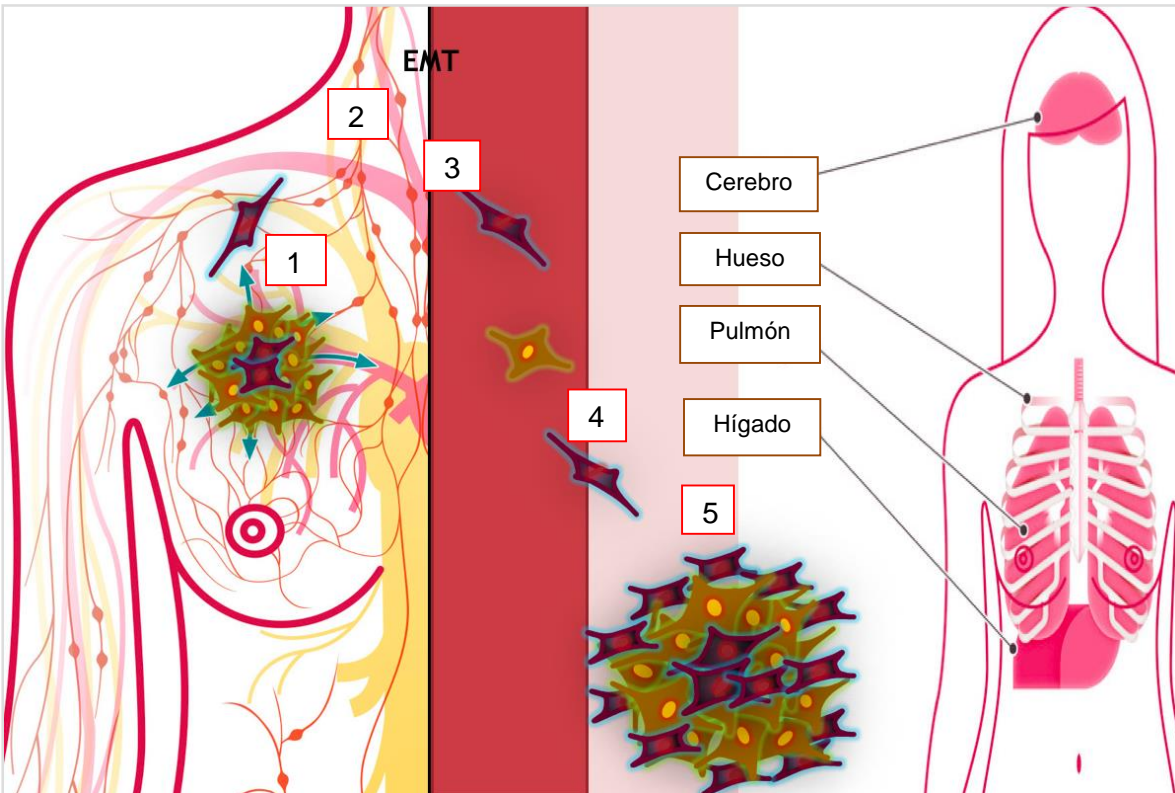


Figura 1. Pasos de la metástasis. 1) Desprendimiento de la masa tumoral (pérdida de proteínas de adhesión). 2) Adquisición de un fenotipo mesenquimal (Transición Epitelio Mesénquima, EMT). 3) Intravasación, sobrevivir al torrente sanguíneo y circular por éste. 4) Extravasación. 5) Colonización.

Existe una teoría llamada “*seed and soil*” la cual fue propuesta por Stephen Paget en 1889 y trata de explicar el trofismo de las células tumorales. Propone que las células metastásicas (ejemplificándolas como una semilla) sólo pueden colonizar ciertos órganos compatibles (haciendo referencia al suelo), estos órganos tienen un microambiente propicio para que las células metastásicas puedan desarrollar un nuevo tumor (Ribatti et al., 2006). Explicando así que el proceso de metástasis no es aleatorio, sino que se necesitan interacciones favorables para que se lleve a cabo (Psaila y Lyden, 2009; Langle y Fidler, 2011).

Estudios previos demuestran la existencia de un nicho premetastásico en el cual el órgano blanco proporciona condiciones para facilitar la supervivencia de las células

metastásicas y que éstas puedan colonizar y proliferar en este órgano secundario (Guise, 2010). Anteriormente se propuso que algunos mecanismos para la formación de este nicho premetastásico es la movilización de células progenitoras hematopoyéticas desde la médula ósea pre-acondicionando los sitios de metástasis antes de que lleguen las células tumorales metastásicas (Gupta y Massagué, 2006). Por ejemplo, VEGFR1 está implicado en el pre-acondicionamiento del pulmón, promoviendo la expresión de MMP9 en células endoteliales de pulmón y en macrófagos por medio de células del tumor primario (Hiratsuka et al., 2002), otro ejemplo es el factor derivado de estroma 1 (SDF-1) y CXCL12 que son quimiocinas derivadas de hueso y están involucradas en la metástasis de cáncer de mama y próstata a hueso. CXCL12 se expresa en órganos blanco para la metástasis de cáncer de mama como hueso, hígado, pulmón y cerebro y ayuda al establecimiento de las células en este órgano secundario (Langley y Fidler, 2011).

Las células tumorales también son capaces de secretar diversos factores que promueven su sobrevivencia y proliferación en el microambiente del órgano secundario como son las metaloproteinasas (MMPs) para la remodelación de la matriz extracelular, IGFs, TGF- β como factores de proliferación, VEGF para la inducción de angiogénesis y de interleucinas (IL-6, 8 y 11) (Guise, 2010).

La metástasis tiene una gran relevancia clínica ya que representa el 90% de las muertes por cáncer, dejando así, solo un 10% de muertes por tumores primarios (Li et al., 2007). Las CSC al resistir a las terapias clínicas actuales son las que pueden llevar a cabo el proceso de metástasis y recurrencia tumoral (Yang et al., 2017), por lo que es de gran interés clínico la búsqueda de terapias para evitar la metástasis o para erradicar a las CSC.

2.6 METABOLISMO ENERGÉTICO

Todas las funciones celulares requieren energía y esta energía puede provenir únicamente de dos vías metabólicas, la glucólisis y la fosforilación oxidativa (*OxPhos*). En 1956 Otto Warburg demostró que la glucólisis se encontraba aumentada (2 a 17 veces) en células tumorales, comparada con la glucólisis de células normales, esto aún en presencia de oxígeno, sin embargo no se evaluó la función mitocondrial.

En muchos tipos de células tumorales la mitocondria es funcional y además aporta la mayor cantidad de ATP (Moreno-Sánchez et al., 2007; Zu y Guppy, 2004). Las mitocondrias tumorales tienen diferencias fisicoquímicas con las mitocondrias de células normales. Las mitocondrias tumorales tienen un mayor potencial electronegativo de membrana (180mV) (Nicholls et al., 1999), una mayor cantidad de cardiolipina y de colesterol en sus membranas (Pedersen, 1978) lo cual provoca una mayor cantidad de cargas negativas en la matriz mitocondrial. Para demostrar lo anterior se realizaron experimentos con cationes lipofílicos y se determinó que éstos se acumulaban más (68%) en las mitocondrias tumorales que en mitocondrias sanas (Dietzen y Davis, 1994).

Por lo anterior, se propone al metabolismo energético como un posible blanco terapéutico, más selectivo, para erradicar las células tumorales.

En nuestro grupo de trabajo se determinó el aporte de ATP resultante de los flujos de la glucólisis y *OxPhos* en las células provenientes de MCF7 seleccionadas con el protocolo de estrés microambiental (*BCSC-like*), encontrando que en general existe una disminución del metabolismo energético tanto del flujo de la *OxPhos* como de la glucólisis (Adán-Ladrón de Guevara et al., manuscrito en preparación). No obstante, con esta disminución en el metabolismo energético, la *OxPhos* es la vía que aporta un 87% del ATP mientras que la glucólisis contribuye solamente con un 13%, siendo la mitocondria la que aporta mayor energía para las funciones celulares de las *BCSC-like*.

La mitocondria, además de suministrar la mayor cantidad de ATP en la población heterogénea y en las *BCSC-like*, también está involucrada en otras funciones celulares como la generación de metabolitos para otras vías metabólicas, muerte celular (apoptosis), migración y metástasis (Neuzil y Moreno-Sánchez, 2013; Rodríguez-Enríquez, et al., 2011).

Pacheco-Velazquez (2018) reportó que las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y MDA-MB-648 dependen energéticamente de la *OxPhos* en mayor proporción (62 y 75% respectivamente) y que estas células fueron más sensibles a inhibidores mitocondriales para inhibir su proliferación, comparado

con inhibidores glucolíticos. Además demostró que los inhibidores mitocondriales también fueron eficaces para disminuir el proceso de migración, implicado en la progresión de la metástasis (de 25 a 70% dependiendo el inhibidor) en estas dos líneas celulares de CaMa.

Lo anterior indica la necesidad de realizar una terapia anti-mitocondrial en las CSC de mama para dirigir esa estrategia hacia las células de cáncer cuyo fenotipo maligno favorecen la progresión tumoral.

2.7 INHIBIDORES MITOCONDRIALES

Existen inhibidores de los complejos de la cadena transportadora de electrones, estos son sólo de uso experimental ya que tienen efectos tóxicos en el organismo, sin embargo se han reportado diferentes compuestos que podrían ser utilizados como inhibidores mitocondriales, aunque éste no sea su blanco canónico, y que estos no sean tóxicos para las células sanas (Tabla 4).

Tabla 4. Inhibidores canónicos y no canónicos mitocondriales.

Inhibidor	Blanco	Referencia
Canónicos mitocondriales		
Rotenona	Inhibe complejo I	Moreno-Sánchez, Torres-Márquez, 1991
Malonato	Inhibe complejo II	Wojtovich y Brookes, 2008
Antimicina A	Inhibe complejo III	Ma et al., 2011
Cianuro	Inhibe complejo IV	Delhumeau et al., 1994
Oligomicina	Inhibe ATP sintasa	Moreno-Sánchez, Torres-Márquez, 1991
No canónicos mitocondriales		
Alfa-Tea		Neuzil et al., 2001

Inhibidor	Blanco	Referencia
	Análogo de Vit. E, antioxidante. Inhibe complejo II	Rodríguez-Enríquez et al., 2012
Cas-Ilgly	Inhibe a la PDH, 2OGDH y SDH (complejo II)	Marín-Hernández et al., 2003
Celecoxib	AINEs Inhibe complejo II produce ROS y desacoplamiento mitocondria	Pritchard et al., 2018 Pacheco-Velázquez et al., 2018.

Las células tumorales al estar sometidas a condiciones de estrés tienen la capacidad de activar mecanismos compensatorios por lo que en este trabajo evaluamos también inhibidores glucolíticos como yodo acetato y gosipol, para dilucidar el efecto que podrían tener sobre esta subpoblación.

Recientemente, se demostró el efecto antiproliferativo del celecoxib en varios tipos de cáncer y CSC (Jacoby et al., 2000; Waskewich et al., 2002; Ralph et al., 2018). Aunque sus efectos antitumorales están relacionados con la inhibición de la COX (Kismet et al., 2004; Ralph et al., 2015; Huang et al., 2017), varios estudios indican que el celecoxib también inhibe la función mitocondrial promoviendo un incremento en la producción de ROS (Pritchard et al., 2018) y apoptosis (Song et al., 2002; Ralph et al., 2015). En este estudio, el efecto potencial de la combinación de inhibidores mitocondriales se evaluó sobre la función mitocondrial (*OxPhos*) y la invasión de las *BCSC-like*.

Los inhibidores de los complejos de la cadena transportadora de electrones pueden producir ROS ya que al disminuir el flujo de electrones, el oxígeno podría más fácilmente tomar uno de éstos y formar superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Por una dismutación el superóxido puede formar H_2O_2 (Murphy, 2008).

2.8 REPOSICIONAMIENTO Y COMBINACIÓN DE FÁRMACOS

El reposicionamiento de fármacos se refiere al uso de un medicamento para fines distintos a los que fue diseñado originalmente. Celecoxib, inhibe la COX-2, (Cho et

al., 2007; Mao et al., 2011; Mehar et al., 2008) pero también se ha utilizado como adyuvante en la terapia del cáncer (North, 2001).

La combinación de fármacos es una estrategia terapéutica que busca la potenciación de los efectos de los fármacos y disminuir las concentraciones de éstos para así evitar efectos secundarios (Keith et al., 2005).

Lehàr y colaboradores (2009) evaluaron el efecto sinérgico antiinflamatorio de un glucocorticoide, la prednisolona y de un anti-depresivo, la nortriptilina en un modelo murino. Ellos reportaron un efecto antiinflamatorio sinérgico de éstos dos fármacos en el modelo de dolor de rata y al evaluar los efectos de esta combinación (0.3 + 10 mg/kg de prednisolona y nortriptilina respectivamente) en hepatotoxicidad no encontraron efectos adversos como se mostraban sólo a altas dosis del glucocorticoide (5 mg/kg).

Con estos antecedentes proponemos que el reposicionamiento del celecoxib en combinación con fármacos antineoplásicos podría ser una buena estrategia para inhibir el proceso de invasión de las *BCSC-like* repercutiendo en su función mitocondrial.

La mitocondria es un organelo con múltiples funciones celulares, la más importante de ellas es proveer la energía necesaria para que se lleven a cabo procesos como la división celular, la migración, invasión, síntesis de proteínas, etc. Al tener diferencias fisicoquímicas las mitocondrias de células sanas respecto a las mitocondrias de células tumorales, se propone que podrían ser un buen blanco terapéutico para no dañar a las células sanas. Hasta el momento no existe una terapia anti-mitocondrial dirigida para erradicar a las *BCSC* ni para evitar el proceso de invasión por lo que en este trabajo abordamos estos dos problemas de gran interés clínico.

CAPÍTULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial y en nuestro país. Actualmente se sabe que la primera causa de muerte por cáncer es la metástasis representando un 90% dejando así solo un 10% de muertes por tumores primarios. Anteriormente se ha demostrado que la presencia de CSC en los tumores representa un mal pronóstico de la enfermedad y que esta subpoblación tumoral es responsable de la metástasis y la recurrencia tumoral. A la fecha, no existe una terapia efectiva para erradicar a las CSC ni para evitar el proceso de metástasis.

CAPÍTULO IV. JUSTIFICACIÓN

El metabolismo energético se ha propuesto como posible blanco terapéutico de las células tumorales por sus diferencias fisicoquímicas con el de las células sanas. Previamente se ha demostrado que las *BCSC-like* dependen en mayor proporción de la fosforilación oxidativa para el aporte de ATP por lo que la evaluación de inhibidores mitocondriales en combinación con los fármacos antineoplásicos podría ser una buena estrategia terapéutica.

CAPÍTULO V. HIPÓTESIS

La combinación de inhibidores mitocondriales, como por ejemplo casiopeina-IIgly y celecoxib con fármacos antineoplásicos, como paclitaxel y cisplatino, disminuirá la invasión de células *BCSC-like* provenientes de MCF7.

CAPÍTULO VI. OBJETIVOS

6 GENERAL

Evaluar el efecto sinérgico de inhibidores mitocondriales con fármacos antineoplásicos sobre la invasión de las *BCSC-like*.

6.1 PARTICULARES

1. Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de viabilidad de las *BCSC-like* con inhibidores mitocondriales, glucolíticos y antineoplásicos.
2. Determinar la IC_{50} de invasión de las *BCSC-like* con los inhibidores mitocondriales.
3. Evaluar la sinergia de las combinaciones de inhibidores mitocondriales con fármacos antineoplásicos en el proceso de viabilidad.
4. Evaluar el efecto de la combinación de inhibidores mitocondriales con fármacos antineoplásicos en el proceso de invasión.
5. Evaluar el efecto de la combinación en el flujo de la fosforilación oxidativa y en la glucólisis
6. Medir la velocidad de producción de ROS en presencia de la combinación de fármacos.

CAPÍTULO VII. METODOLOGÍA

7 CULTIVO CELULAR

Las células tumorales humanas de mama MCF7 (Luminal A) (1×10^6 células / ml) y MDA-MB-231 (Triple negativo) (1×10^6 células / ml) fueron cultivadas en medio Dulbecco-MEM (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO; Rockville, MD, EE. UU.) y 10,000 U de penicilina / estreptomina (Sigma; Steinheim, Alemania) e incubados en 5% de CO₂, 95% de aire a 37 ° C durante 3-4 días hasta alcanzar una confluencia de 80-90%. La línea celular MCF7 fue genotipificada en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN, México) mostrando que la línea celular comparte 14 alelos marcadores de los 14 reportados por la ATCC.

7.1 ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS BCSC-LIKE

La fracción enriquecida de células *BCSC-like* se obtuvo mediante el uso de un protocolo previamente establecido (Gallardo-Pérez et al., 2017). MCF7 fue cultivada (1×10^7 células / ml) en medio DMEM con 2.5 mM de glucosa más taxol (100 nM) en condiciones de normoxia por 12h. Posteriormente se cultivaron en medio DMEM con glucosa 25 mM más doxorubicina (100 nM) en condiciones hipóxicas (0.1% de O₂) utilizando una cámara de control de oxígeno (Coy Laboratory, Grass Lake, MI) por 12 h. Para mantener fenotipo troncal de las *BCSC-like* se cultivó en DMEM sin suero con glucosa 25 mM y se incubó en CO₂ al 5%, aire al 95% a 37 ° C durante 24 h adicionales.

7.2 WESTERN BLOT

Tanto las células *BCSC-like* como las MCF7 (5×10^6 células / ml) se resuspendieron en buffer de lisis RIPA (1x PBS pH 7.2, 1% de IGEPAL NP40, SDS al 0.1% y desoxicolato de sodio al 0.05%) más fluoruro de fenilmetanosulfonilo 2.5 mM y 1 tableta de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania). Las muestras de proteína (40 µg) se resuspendieron en buffer de carga más β-mercaptoetanol al 5% y se colocaron en gel de poliacrilamida al 10 ó 12.5% en condiciones de desnaturali-

zación para llevar a cabo una electroforesis. La transferencia electroforética a membranas de PVDF (BioRad; Hercules, CA, EE. UU.) fue seguida de una incubación durante la noche con anticuerpos contra CD44 y α -tubulina con dilución 1:500 (Biotecnología de Santa Cruz; Santa Cruz, CA, EE. UU.) a 4° C. Las bandas de hibridación se revelaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (Santa Cruz). La señal se detectó por quimioluminiscencia utilizando el sistema de detección ECL-Plus (Amersham Bioscience; Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). El análisis de densitometría se realizó con el software de imagen Scion (Scion; Bethesda MD, EE. UU.) y se normalizó frente a su control de carga respectivo (Gallardo-Pérez et al., 2017). El porcentaje de cada banda representa la media \pm S.D. de al menos tres experimentos independientes.

7.3 ENSAYO DE INVASIÓN

BCSC-like y MCF7 (5×10^4 células / ml) se suspendieron en 0.1 ml de DMEM sin suero y se sembraron en el compartimento superior de las cámaras de Boyden (96 pozos) (Trevigen Inc., Helgerman, EE. UU.). El compartimento inferior se llenó con DMEM 25 mM de glucosa y 10% de SFB. Después de 24 horas a 37°C, las células invasoras en el compartimento inferior se cargaron con calceína AM 60 nM (acetometiléster) durante 15 minutos. La fluorescencia de calceína se detectó a 485 nm de excitación y 520 nm en un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La línea celular de cáncer MDA-MB-231 se usó como control de células metastásicas.

7.4 DETERMINACIÓN DE IC50 DE VIABILIDAD

MCF7 y *BCSC-like* (2×10^4 células / pozo) se cultivaron en placas de 96 pozos a 37 ° C. Después de 24 h inhibidores glicolíticos (yodoacetato, IA; gosipol); mitocondriales (Cas-Ilgly: casiopeina-II gly; oligomicina, α -TEA: ácido α -tocoferil oxiacético); fármacos clínicos (5-fluorouracilo: 5FU; paclitaxel; doxorubicina; cisplatino) o AINEs (Sulindac, Celecoxib y DMC: Dimetil-celecoxib). Los compuestos se agregaron a concentraciones logarítmicas 0.1, 1, 10 y 100 μ M, se cultivaron las células durante

24 h adicionales. Los inhibidores metabólicos, AINEs y los fármacos clínicos se disolvieron en etanol al 70% / DMSO al 30%. La cantidad máxima de etanol / DMSO utilizada fue inferior al 10% del volumen final en el pozo y no afectó la viabilidad celular (> 90%). CasII-gly fue amablemente donada por la Dra. Lena Ruiz del Instituto de Química, UNAM-México. α -TEA y α -TOS fueron amablemente donados por el Dr. Emmanuel T. Akporiaye de Providence Portland Medical Center, Portland, OR, EE. UU. El efecto de los inhibidores sobre la viabilidad de las células cancerosas se determinó mediante el ensayo MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio) tal como lo describe Pacheco-Velazquez et al., 2018.

7.5 DETERMINACIÓN DE IC₅₀ DE INVASIÓN

BCSC-like (5×10^4 células / ml) se suspendieron en 0.1 ml de DMEM sin suero añadiendo concentraciones sub IC₅₀ (de viabilidad) de los inhibidores mitocondriales Cas-IIgly, α -TEA y los AINEs Sulindac y Celecoxib. Estos se sembraron en el compartimento superior de las cámaras de Boyden (96 pozos) (Trevigen Inc., Helgerman, EE. UU.). El compartimento inferior se llenó con DMEM 25 mM de glucosa y 10% de SFB. Después de 24 horas a 37°C, las células invasoras en el compartimento inferior se cargaron con calceína AM 60 nM (acetometiléster) durante 15 minutos. La fluorescencia de calceína se detectó a 485 nm de excitación y 520 nm en un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

7.6 DETERMINACIÓN DE SINERGISMOS

El efecto sinérgico de los inhibidores mitocondriales (celecoxib y cas-IIgly) más los diferentes fármacos antineoplásicos (cisplatino y paclitaxel) y los inhibidores gluco-líticos (gosipol y yodoactato) se realizó empleando el ensayo MTT en microplacas de 96 pozos (para efectos sobre la viabilidad) y cámaras Boyden (para efectos sobre la invasividad). El rango de las dosis probadas fue inferior al IC₅₀ individual (para la viabilidad o la invasividad) y se utilizó el modelo de aditivismo tipo Bliss para caracterizar el efecto de la combinación. El modelo de aditivismo de Bliss (Borisov et al., 2003) predice la respuesta combinada C para dos compuestos individuales con

efectos A y B es $C = A + B (A * B)$ donde C es el efecto sinérgico de los fármacos que eliminan el efecto de monoterapia, A y B. En este modelo, se identificaron tres resultados: a) el efecto infra-aditivo en el que ambos fármacos ejercían una respuesta nula sobre el crecimiento celular; b) el efecto aditivo en el que el efecto combinado producido por dos o más fármacos es la suma algebraica de sus efectos separados; y c) el efecto supra-aditivo en el cual el efecto combinado producido por dos o más medicamentos es mayor que la suma de sus efectos separados (Borisy et al., 2003; Davila-Manzanilla et al., 2017).

7.7 DETERMINACIÓN DE GLUCÓLISIS Y OXPHOS

Para el flujo de glucólisis, se incubaron MCF7 y *BCSC-like* (1mg de proteína / ml) en buffer Ringer Krebs (NaCl 125 mM, KCl 5 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 1,4 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4) previamente incubadas por 24 h con la combinación de fármacos. La glucólisis se inició añadiendo glucosa 5 mM. Las muestras celulares se incubaron a 37 ° C bajo agitación orbital suave. Después de 0, 10, 20 y 30 minutos, las células se mezclaron rápidamente con ácido perclórico frío al 3% (p / v) y se centrifugaron. Los sobrenadantes se neutralizaron con KOH 1N / Tris 100 mM. Para descartar la producción de lactato por glutaminólisis, las células también se incubaron con 2-desoxiglucosa (2-DG, 20 mM). El lactato se determinó mediante un método estándar mediante el uso de lactato deshidrogenasa después de la formación de NADH a 340 nm.

Para el consumo de oxígeno total y la determinación del flujo de OxPhos, se incubaron MCF7 y *BCSC-like*, previamente incubadas por 24 h con la combinación de fármacos, (1 mg de proteína / ml) en medio Krebs-Ringer saturado de aire a 37 ° C en un electrodo de tipo Clark o en un respirómetro de alta resolución (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) a 37 ° C. Para revelar el consumo de oxígeno mitocondrial, las células se incubaron con el inhibidor de la ATP sintasa oligomicina (5 μM)

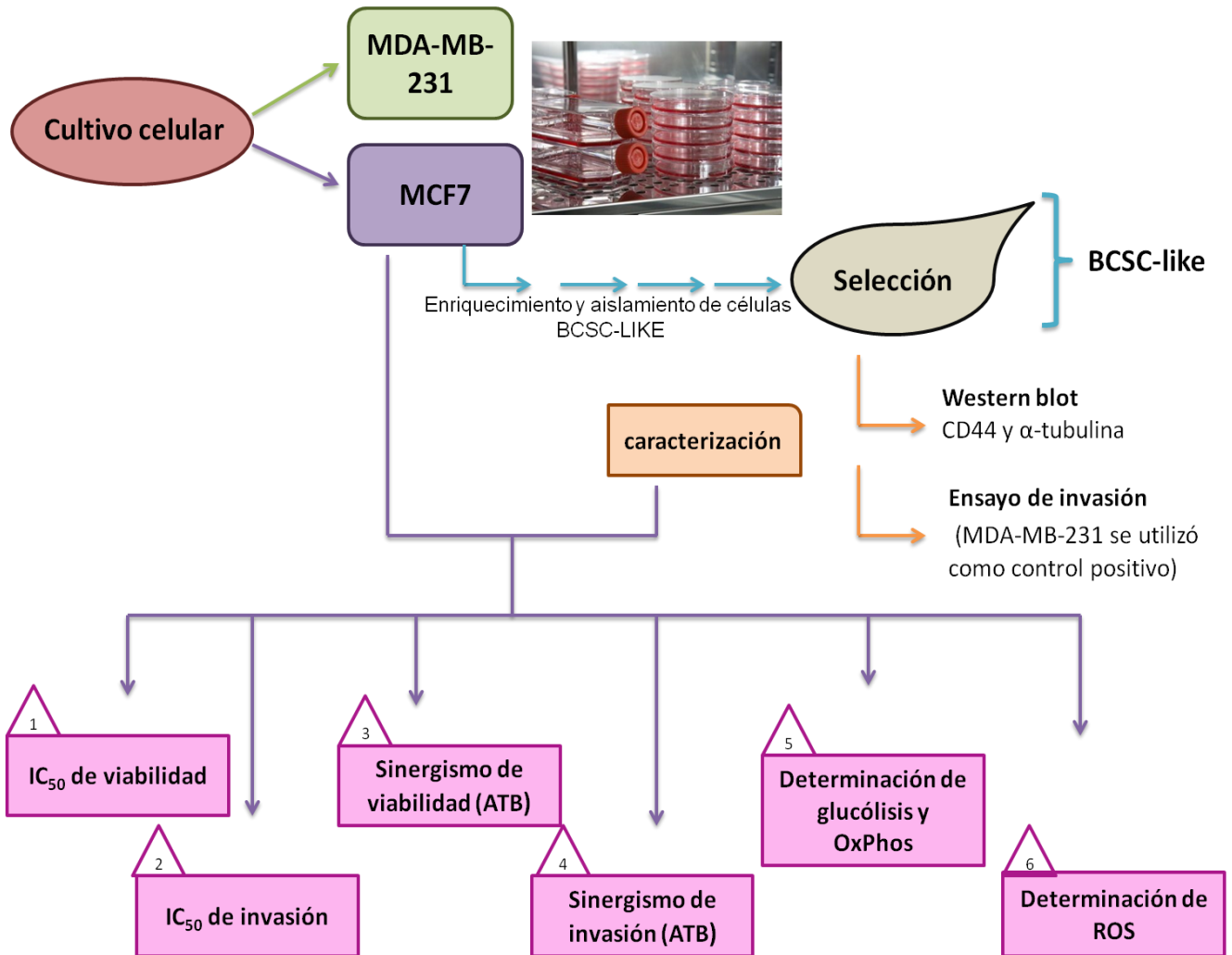
7.8 DETERMINACIÓN DE ROS

Para determinar el efecto de la monoterapia y la terapia combinatoria con paclitaxel y celecoxib en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), MCF7 y *BCSC-like* se cultivaron en una placa de 96 pozos con 20,000 células en 0,1 ml. Después de 24 h, las células se expusieron a cada fármaco y a la combinación, se incubaron con 10 μ M de dihidroetidio (DHE) y la fluorescencia se midió a una excitación de 518 nm, una emisión de 605 nm en un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA , USA) cada minuto por 1 hora. El DHE reacciona con el radical superóxido formando un compuesto llamado 2-hidroxi-etidio (2-OH-E) el cual es altamente fluorescente.

7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron de tres a cuatro preparaciones celulares independientes (n). Los datos mostrados representan la media \pm desviación estándar (D.E.) se utilizó el análisis de la prueba *t* de Student con valores de $p < 0.05$ o menores para determinar la significancia estadística. Para la determinación de diferencias entre dos o más grupos experimentales se utilizó el análisis ANOVA/post hoc Scheffé con valores de $p < 0.05$ para determinar significancia estadística.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO VIII. RESULTADOS

8 FENOTIPO TRONCAL DE LAS *BCSC-LIKE*

El protocolo de enriquecimiento de células con fenotipo troncal, reportado por Gallardo-Pérez et al. (2017), proporcionó una densidad celular alta de *BCSC-like* con una viabilidad superior al $25\% \pm 3.5\%$. Las *BCSC-like* mostraron una sobreexpresión (7 veces) en el marcador de troncalidad CD44 (Fig. 2A) y adquirió una capacidad de invasión aumentada (25 veces) en comparación con su línea parental MCF7 (Fig. 2B), como se reportó anteriormente (Gallardo-Pérez et al., 2017).

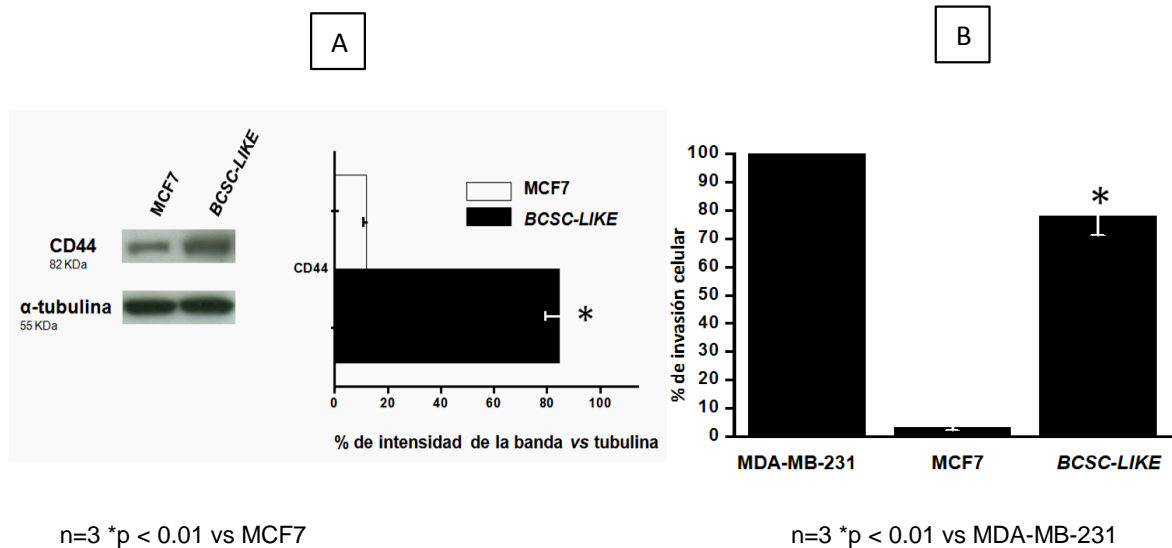


Figura 2. Caracterización del fenotipo troncal de las *BCSC-like* provenientes de la línea celular MCF7. (A) Western Blot representativo del contenido de proteína del marcador de troncalidad CD44 después del protocolo de selección. (B) Capacidad de invasión adquirida después del protocolo de selección. El ensayo se realizó en cámaras de Boyden con matrigel por 24 h. se comparó con la línea celular metastásica de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231.

8.1 EFECTO DE INHIBIDORES MITOCONDRIALES, GLUCOLÍTICOS Y FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS SOBRE LA VIABILIDAD DE *BCSC-LIKE*

Las *BCSC-like* fueron más sensibles a los inhibidores mitocondriales como oligomicina, cas-11gly y α -TEA (IC_{50} 0.8-18 μ M) para inhibir su viabilidad que los inhibidores glucolíticos como yodo acetato, y gossipol (IC_{50} >100 μ M) (Tabla 5). Las CSC son resistentes a las terapias convencionales de la clínica por lo que también se evaluaron los fármacos antineoplásicos (cisplatino, paclitaxel, doxorubicina, 5-FU) en las *BCSC-like* y tampoco tuvieron repercusión sobre la viabilidad de estas células (IC_{50} >100 μ M) sin embargo estos fármacos si afectaron la viabilidad de la población parental MCF7 (Tabla 5). Interesantemente los AINEs sulindac, celecoxib y DMC también tuvieron repercusión sobre la viabilidad de las *BCSC-like* (IC_{50} 1-36 μ M) (Tabla 5).

Previamente se ha reportado (Pacheco-Velázquez et al., 2018) que los AINEs pueden tener efecto sobre características de malignidad de las células tumorales como la proliferación, invasión y migración. Recientemente se demostró que el Celecoxib y el DMC actúan como inhibidores mitocondriales. Por lo que en este trabajo los utilizamos como inhibidores mitocondriales.

Tabla 5. IC₅₀ de inhibidores mitocondriales, glucolíticos y fármacos antineoplásicos sobre la viabilidad de MCF7 y BCSC-like.

Inhibidor	IC ₅₀ MCF7 μM	IC ₅₀ BCSC-like μM
Mitocondriales		
Cas-Ilgly	1 ± 0.5	0.8 ± 0.05*
α-TEA	35 ± 8	8 ± 0.8*
Sulindac	220 ± 36	36 ± 8*
Celecoxib	2 ± 0.4	1 ± 0.2*
Dimetil-celecoxib	76 ± 10	21 ± 6*
Fármacos antineoplásicos		
Paclitaxel	5 ± 1	≥500
Doxorubicina	9 ± 1	>100
5-fluorouracilo	>100	>100
Cisplatino	51 ± 37	>100
Glucolíticos		
Yodo acetato	38 ± 12	181 ± 16*
Gosipol	>100	>100

n= 3-4, * p <0.05 vs MCF7

8.2 EFECTO DE LOS INHIBIDORES MITOCONDRIALES SOBRE LA INVASIÓN DE *BCSC-LIKE*.

A continuación, se evaluaron los fármacos con menor efecto sobre la viabilidad de *BCSC-like* (cas-Ilgly, α -TEA, sulindac y celecoxib) en la capacidad de invasión. Los valores de IC_{50} de invasión con fármacos individuales se representan en la Tabla 6. Celecoxib y cas-Ilgly fueron los fármacos más potentes para inhibir la invasividad durante 24 horas en *BCSC-like*.

Tabla 6. IC_{50} de invasión en células *BCSC-like* con inhibidores mitocondriales y el fármaco antineoplásico paclitaxel.

Inhibidor	IC_{50} de invasión (μ M)
Cas-Ilgly	0.5 ± 0.2
α -TEA	6.6 ± 2
Sulindac	17 ± 5
Celecoxib	0.6 ± 0.25
Paclitaxel	≥ 500

n=3

8.3 EFECTO TÓXICO EN CÉLULAS NO TUMORALES

Determinamos la IC_{50} de cas-Ilgly, α -TEA, sulindac y celecoxib en células endoteliales de cordón umbilical de humano (HUVEC) y en fibroblastos de ratón (3T3). A excepción de cas-Ilgly que si repercutió en la viabilidad de las HUVEC (IC_{50} 4 ± 2 μ M) y en 3T3 (9μ M ± 3), todos los demás fármacos no mostraron tener un efecto citotóxico ($IC_{50} > 90 \mu$ M) (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto sobre la viabilidad de inhibidores mitocondriales y el fármaco antineoplásico paclitaxel en células no tumorales

Inhibidor	HUVEC (μM)	3T3 (μM)
CasII-gly	4 \pm 2	9 \pm 3
α -TEA	> 200	>200
Sulindac	> 200	>200
Celecoxib	100 \pm 4	92 \pm 10
Paclitaxel	N.D.	80 \pm 7

n=3

8.4 SINERGISMO EN RELACIÓN A LA VIABILIDAD EN LAS CÉLULAS *BCSC-like*

Debido a que cas-IIgly y celecoxib fueron los más potentes para inhibir la viabilidad en *BCSC-like*, evaluamos el efecto de su combinación con inhibidores glucolíticos y con fármacos antineoplásicos sobre la viabilidad de ambos tipos de células cancerosas y no tumorales.

El AINE celecoxib mostró un valor de IC_{50} de viabilidad muy bajo en *BCSC-like* sin efecto aparente en células normales (IC_{50} 100 \pm 4 μM en HUVEC; Tabla 7). Además, se ha documentado que celecoxib aumenta la toxicidad de varios fármacos. Celecoxib y cas-IIgly se combinaron con los fármacos antineoplásicos paclitaxel y cisplatino y con los inhibidores glucolíticos yodo acetato y gosispol y se verificó la viabilidad en *BCSC-like* y en MCF7. Cuando combinamos los inhibidores anteriores con cas-IIgly en MCF7 hubo un efecto sinérgico con todos los compuestos, resultados similares se obtuvieron con las *BCSC-like* a excepción de gosispol que no tuvo un efecto sinérgico (Tabla 8). El sinergismo fue mayor con celecoxib. En *BCSC-like*, de todos los fármacos ensayados con celecoxib, se observó sinergia (analizada con el

enfoque de aditivismo de tipo Bliss) con los fármacos clínicos paclitaxel, cisplatino y el inhibidor glucolítico IAA (ATB = 62, 21 y 46, respectivamente) Individualmente, celecoxib y cas-Ilgly tienen valores IC₅₀ similares en *BCSC-like* y MCF7 (Tabla 5) curiosamente, celecoxib presenta valores ATB más altos (Tabla 9) en comparación con cas-Ilgly (Tabla 8) en un rango de 2 a 3 veces.

Tabla 7. Efecto en la viabilidad de cas-Ilgly combinada con fármacos antineoplásicos (cisplatino y paclitaxel) y glucolíticos (gosipol y yodo acetato) en MCF7 y *BCSC-like*

Inhibidores	MCF7			<i>BCSC-like</i>		
	Inhibidor [μM]	Cas-Ilgly [nM]	ATB (%)	Inhibidor [μM]	Cas-Ilgly [nM]	ATB (%)
Cisplatino	0.1 – 10	1-800	0.5 - 14	0.1 - 10	1 – 100	2 – 5
Paclitaxel	0.1 – 5	1-100	17 - 28	0.1 - 10	1 – 800	3 -24
Gosipol	0.1 – 10	10-100	6 – 15	0.1 - 10	1 - 800	-(3-10)
IAA	5 – 38	1	18 - 22	100 - 181	1	10 – 26

Tabla 8. Efecto de la combinación de celecoxib con fármacos antineoplásicos (cisplatino y celecoxib) y glucolíticos (gospol y yodo acetato) en la viabilidad de MCF7 y *BCSC-like*.

Inhibidores	MCF7			<i>BCSC-like</i>		
	Inhibidor [μM]	Celecoxib [nM]	ATB (%)	Inhibidor [μM]	Celecoxib [nM]	ATB (%)
Cisplatino	10 - 50	10 - 1000	29 - 64	10 - 50	1 - 1000	3 - 21
Paclitaxel	0.1 - 5	10 - 1000	2 - 36	0.1 - 10	1 - 1000	15 - 62
Gospol	0.1 - 10	10 - 1000	-(2-15)	0.1 - 10	1 - 1000	-(2-27)
IAA	10 - 181	1 - 100	14 - 22	50 - 181	1	12 - 46

8.5 SINERGISMO EN INVASIÓN DE *BCSC-LIKE*

Debido a que cas-Ilgly tuvo efectos citotóxicos en células no tumorales, solo la combinación de celecoxib con paclitaxel (la mejor combinación en viabilidad) se evaluó en la invasión. La mejor combinación para inhibir la invasividad de *BCSC-like*, celecoxib 0.6 μM más paclitaxel 10 μM con un ATB de 87% (Tabla 9). Paclitaxel no tiene la capacidad de inhibir el proceso de invasión ya que con 500 μM (una alta concentración que no alcanza la IC_{50}) solamente se inhibe un 40% y la invasión es inhibida al 50% en presencia de celecoxib con una IC_{50} de 0.6 μM (Figura 3). Evaluamos la viabilidad en células no tumorales 3T3 con la combinación de celecoxib 0.6 μM + paclitaxel 10 μM y su viabilidad se mantuvo en un 80% (Figura 4) indicando el escaso efecto citotóxico de esta combinación en células no tumorales.

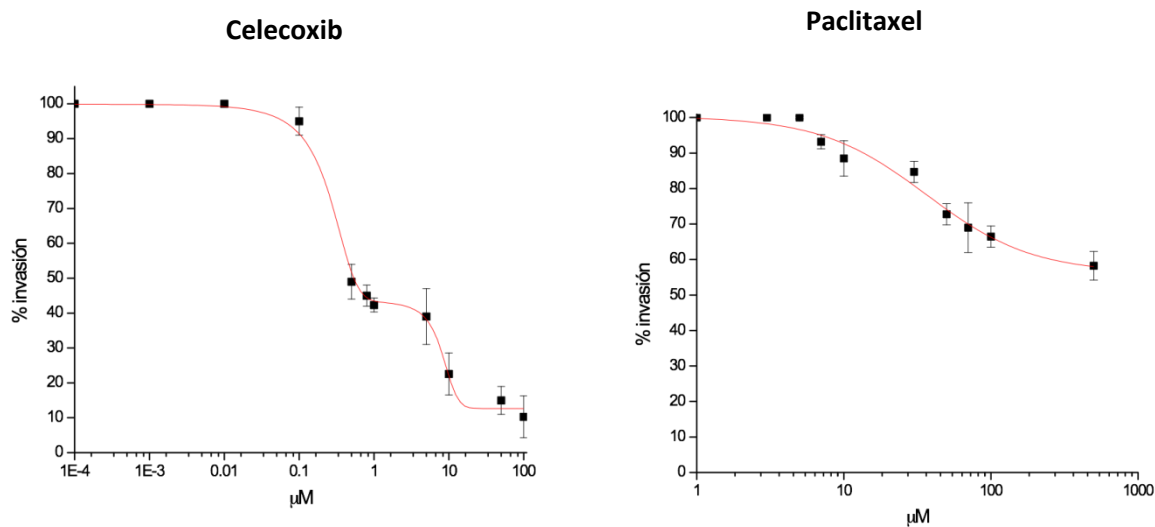


Figura 3. El efecto de celecoxib y paclitaxel fue evaluado sobre la invasión de *BCSC-like* en cámaras de Boyden con matrigel en concentraciones logarítmicas por 24 h. n=3

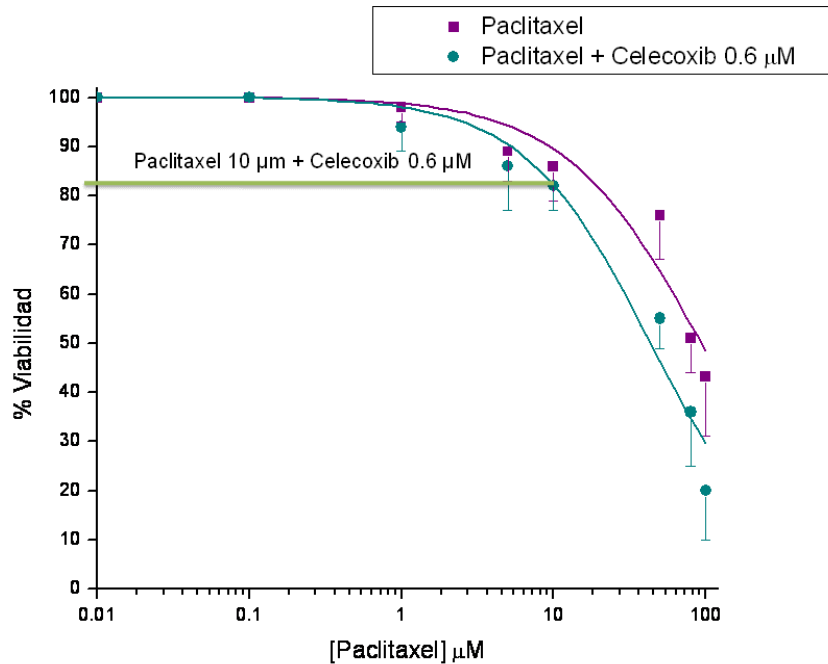


Figura 4. Efecto de la combinación de celecoxib 0.6 μM más paclitaxel 10 μM en células no tumorales de fibroblasto de ratón 3T3 (la línea verde indica que con la combinación se mantiene la viabilidad en un 80%). Asimismo, se evaluó la IC_{50} sobre la viabilidad de las células 3T3 con el fármaco antineoplásico paclitaxel en monoterapia (línea morada) y en combinación con celecoxib (línea azul). La determinación se realizó después de 24 h de exposición a los fármacos e inhibidores.

Tabla 9. Sinergismo supra aditivo de celecoxib con paclitaxel en invasión de *BCSC-like*

<i>BCSC-like</i>		
Paclitaxel [μM]	Celecoxib [nM]	ATB (%)
0.1 – 10	600	87

8.6 SINERGISMO SUPRA ADITIVO DE CELECOXIB CON PACLITAXEL EN LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA.

A continuación, evaluamos el efecto en *OxPhos* en las concentraciones con mayor ATB para inhibir la invasión (0.6 μ M de celecoxib + 10 μ M de paclitaxel). La combinación de estos dos fármacos no cambió la *OxPhos*; sin embargo, el consumo total de oxígeno aumentó 5 veces en el *BCSC-like* (Tabla 10). El aumento en el consumo total de oxígeno es consistente con el desacoplamiento mitocondrial, evidencia de esto, es el colapso en el potencial mitocondrial transmembranal ($\Delta\Psi_m$) (Tabla 10.)

Tabla 10. *OxPhos* y $\Delta\Psi_m$ de *BCSC-like* expuestas a la combinación de celecoxib y paclitaxel

Consumo total de O ₂	<i>OxPhos</i>	KCN [10mM]	$\Delta\Psi_m$
ngAO/min/mg			UAF
MCF7			
14 \pm 4	8 \pm 3	3 \pm 1	145 \pm 11
<i>BCSC-like</i>			
7 \pm 0.9*	4 \pm 1*	3 \pm 1	58 \pm 5*
<i>BCSC-like</i> + Celecoxib 0.6μM + paclitaxel 10μM			
33 \pm 2*	5 \pm 1	16 \pm 2*	9 \pm 2*

UAF= Unidades Arbitrarias de Fluorescencia. *P < 0.05 vs MCF7 (ANOVA/post hoc Scheffé)

8.7 Determinación de ROS

La disminución en el potencial electroquímico transmembranal mitocondrial muestra un desacoplamiento mitocondrial, lo que nos llevó a dilucidar el mecanismo por el cual las mitocondrias no estaban acopladas. Anteriormente se informó que el celecoxib produce ROS, evaluamos la producción de ROS en las *BCSC-like*. Observamos que las *BCSC-like* tienen una producción basal más alta de ROS comparado con las MCF7 y cuando se exponen a paclitaxel 10 μM y celecoxib 0.6 μM individualmente, esta producción de ROS aumenta. Cuando exponemos la combinación (paclitaxel 10 μM más celecoxib 0.6 μM) observamos un efecto aditivo para la producción de ROS en el *BCSC-like* (Figura 5).

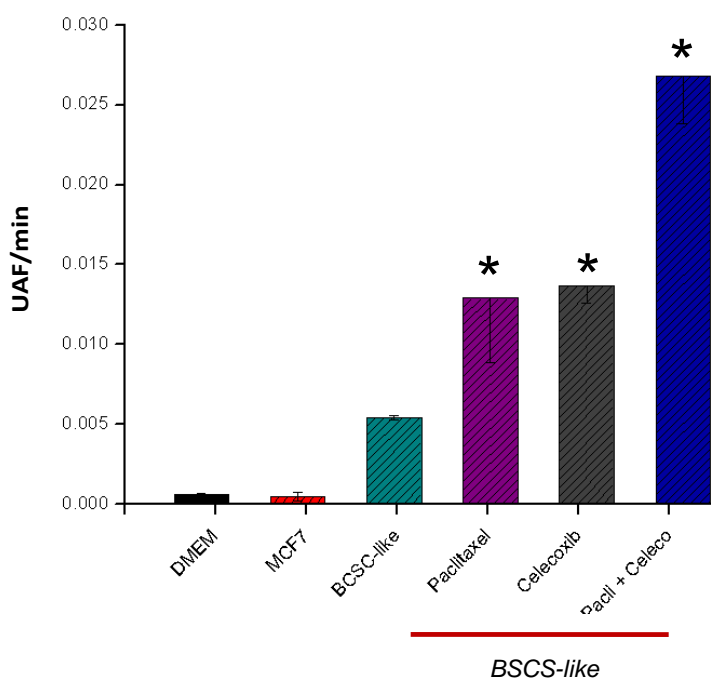


Figura 5. Velocidad de producción de ROS en *BCSC-like* expuesta a la combinación de celecoxib y paclitaxel. La producción de ROS se midió con dihidroetidio después de 24 h de exposición a los fármacos. UAF= Unidades Arbitrarias de Fluorescencia n=3, *P < 0.05 vs *BCSC-like*.

8.7 Determinación de glucólisis

Evaluamos la glucólisis por la detección del lactato producido, utilizamos 2-desoxi-glucosa como inhibidor de la glucólisis y determinar el lactato que se produce por la glutaminólisis. Podemos observar que la glucólisis disminuye un 50% en las *BCSC-like* respecto a las MCF7 sin embargo cuando las *BCSC-like* están expuestas a celecoxib y al fármaco antineoplásico paclitaxel, no existe un cambio significativo en el flujo glucolítico. La glutaminólisis en las tres condiciones se mantuvo constante.

Tabla 11. Producción total de lactato, flujo glucolítico y glutaminólisis de *BCSC-like* expuestas a la combinación de celecoxib y paclitaxel

	MCF7	<i>BCSC-like</i>	<i>BCSC-like</i> + Celecoxib 0.6µM + Paclitaxel 10µM
nmol/min/mg de proteína			
Lactato total	17 ± 5	10 ± 3	11 ± 2
Glutaminólisis	3 ± 1	3 ± 1	2 ± 1
Glucólisis	14 ± 4	6 ± 2*	9 ± 2

*P < 0.05 vs MCF7

CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN

Los tratamientos actuales contra el cáncer metastásico no tienen éxito debido a la presencia de células troncales de cáncer (CSC) (Prieto-Vila et al., 2017). Aunque la población de CSC constituye menos del 10% de la masa tumoral total, éstas confieren resistencia a los fármacos antineoplásicos convencionales y adquieren un fenotipo metastásico (Perona et al., 2011). La radioterapia ha sido uno de los enfoques más importantes en el tratamiento de tumores sólidos; sin embargo, la activación de la autorrenovación, la reparación del ADN y las vías antioxidantes confieren radioresistencia a las CSC, lo que hace que los tumores reíncidan después de la radioterapia (Ogawa et al., 2013). En lo que respecta a la resistencia a la quimioterapia, está bien descrito que las CSC expresan transportadores ABC que bombean fármacos citotóxicos, lo que resulta en resistencia a múltiples fármacos (Dean, 2009). En los últimos años, la reprogramación del metabolismo energético se ha considerado como una característica de las células de cáncer que podría ser un buen blanco terapéutico. Recientemente se ha demostrado que la inhibición de *OxPhos* podría ser un objetivo potencial para tratar los cánceres metastásicos (Ralph et al., 2010; Rodríguez-Enríquez et al., 2014; Pacheco-Velázquez et al., 2018).

10.1 Las células *BCSC-like* dependen principalmente de *OxPhos* para el suministro de ATP

Varios tipos de células metastásicas dependen principalmente del suministro de ATP mitocondrial (50%) para los procesos de migración y proliferación (Pacheco-Velazquez et al., 2018 Ralph et al., 2015). Estudios previos demuestran que las *BCSC-like* dependen más del metabolismo de la *OxPhos* para el suministro de ATP a pesar de que ambas vías energéticas disminuyen en un 50-80% en comparación con su línea parental MCF7 (Adán-Ladrón de Guevara et al., manuscrito en preparación).

En la literatura encontramos reportes donde demuestran que células troncales de cáncer dependen en mayor proporción de la vía glucolítica, por ejemplo, Ciavardelli

et al., 2014 reporta que varias células troncales de cáncer derivadas de osteosarcoma, glioblastoma, mama, pulmón, ovario y colon muestran un incremento en el contenido de ARN mensajero (2 veces) en las enzimas glucolíticas piruvato cinasa M2 (PKM2) y la lactato deshidrogenasa A (LDH-A) respecto a células tumorales no troncales de cada tejido, sin embargo no evaluaron el flujo total de la vía. Palorini y colaboradores (2014) reportan una alta producción de lactato extracelular (2 veces mayor) respecto a células tumorales no troncales de los dos reportes anteriores concluyen de manera general que las células troncales de cáncer mantienen un metabolismo de tipo glucolítico, sin embargo el flujo de glucólisis no se analizó experimentalmente. Por otro lado, Vlashi y colaboradores (2014) reportaron que en CSC de mama y ovario la respiración total celular aumentó dos veces correlacionando con lo reportado por otros autores que existe un ligero incremento en los niveles de ARN mensajero de la ATP sintasa (4 veces), citocromo *c* oxidasa (9,4 veces) y piruvato deshidrogenasa (20 veces) enzimas de la *OxPhos* (Lamb et al. 2014; Pastó et 2014; De Luca et al. 2015). Desafortunadamente, la respiración celular no revela realmente el flujo de *OxPhos*. Para esto, se debe agregar oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa (Rodríguez-Enríquez et al., 2010).

Previamente se reportó que dependiendo de los requerimientos energéticos de las células tumorales, éstas pueden modificar su metabolismo. Algunas células de rápida proliferación tienen un mayor flujo glucolítico y las células quiescentes obtienen su mayor contribución de energía de *OxPhos* (Sancho et al., 2016). El microambiente juega un papel importante ya que la hipoxia puede inducir un metabolismo más glucolítico por la estabilización de HIF-1 alfa (Liu et al., 2015). Las CSC tienen una baja tasa de proliferación, este estado de quiescencia es inducido por la sobreexpresión de varios genes asociados con la troncalidad y ésta podría ser una explicación de la disminución del metabolismo energético que nosotros encontramos en las *BCSC-like* como se ha reportado previamente (Corbet, 2018).

10.2 Estrategias antimitocondriales para erradicar a las *BCSC-like*.

Estudios previos han utilizado inhibidores del proveedor principal de ATP en células metastásicas MDA-MB-231 y estos ayudaron a disminuir su alto potencial metastásico (Pacheco-Velázquez 2018). La estrategia antimitocondrial mediante el uso de oligomicina, casII-gly, M-TEA disminuyó el proceso de migración del 25-70% y la expresión de varias proteínas de transición epitelio-mesenquima (EMT) como fibronectina, E-cadherina y vimentina en MDA-MB-231 y MDA-MB-468 células de cáncer de mama metastásicas triple negativas (más del 60%) (Pacheco-Velázquez 2018). Además, la inhibición mitocondrial ha sido útil para disminuir la proliferación (50%) de varias células metastásicas (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) en varios modelos que incluyen la unidad básica de formación de tumores sólidos, los esferoides multicelulares (MCF7) (Mandujano-Tinoco et al., 2013). Por lo tanto, al haber identificado que las *BCSC-like* dependen en mayor proporción de la *OxPhos*, se evaluaron inhibidores mitocondriales como oligomicina, cas-IIgly, alfa-TEA, celecoxib y sulindac. Todos los inhibidores mitocondriales ensayados disminuyeron la viabilidad de las *BCSC-like* más de 2 veces. Lamb y colaboradores observaron resultados similares con células troncales de cáncer enriquecidas (en mamoesferas), provenientes de MCF7 en las que la inhibición de los transportadores de monocarboxilatos (MCT1 / 2) con AR-C155858 a una concentración de 1 μ M disminuyó significativamente el crecimiento de las mamoesferas (50%) (Lamb et al., 2014).

Nuestros resultados demuestran que los inhibidores mitocondriales son más potentes para inhibir la viabilidad de las *BCSC-like* (1.25 - 4 veces) que su línea celular de origen MCF7. Una posible explicación es la proporción de dependencia energética ya que MCF7 depende 70% y las *BCSC-like* dependen 90% de la *OxPhos*. Esto lo podemos corroborar cuando expusimos a las *BCSC-like* a inhibidores glucolíticos y estos no tuvieron repercusión sobre la viabilidad de esta subpoblación tumoral ya que BCSC dependen solo 10% de la producción de ATP.

10.3 Inhibidores mitocondriales como posible estrategia para inhibir la invasión de las *BCSC-like*.

La metástasis es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer de mama (Li et al., 2007), Al-Hajj reportó que las CSC son más eficientes para formar tumores que las células tumorales que no presentan este fenotipo por lo que buscar una terapia contra las CSC podría evitar el proceso de metástasis.

La metástasis es un proceso con múltiples pasos celulares, los cuales cada uno de ellos podría ser un potencial blanco para intentar evitar este proceso de gran interés clínico. La invasión es un proceso celular que requiere gran demanda de energía por lo que inhibir el metabolismo mitocondrial podría ser una estrategia terapéutica.

Estudios como el de Zhao J et al., 2012 muestran una relación entre la mitocondria y la capacidad de invasión y migración en líneas celulares metastásicas. La primera evidencia que muestran es un cambio morfológico en la mitocondria, siendo más alargada en células no metastásicas de cáncer de mama (MCF7) y con menor longitud las líneas celulares metastásicas de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MDA-MB 436). Ellos observaron que la dinámica mitocondrial también está implicada en el potencial metastásico de las células pues la proteína Drp1, proteína involucrada en la fisión mitocondrial, se encuentra incrementada 2.5 veces en MDA-MB 231 y 5 veces en MDA-MB 436 en comparación con MCF7 no metastásica. Silenciaron el RNAm de ésta proteína y mostraron que las líneas celulares metastásicas perdieron su potencial de invasión y migración.

Zhao y colaboradores (2012) evaluaron el efecto de un desacoplante mitocondrial, el CCCP, el cual disipa el gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial, afectando así la respiración acoplada a la síntesis de ATP, la Oxphos. Cuando ellos añaden el CCCP (100 μ M) impide que se formen los lamelipodios inducida con quimioatrayentes en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama y disminuyó la capacidad de polimerizar los filamentos de actinas, al no formarse los lamelipodios, estas células perdieron su capacidad de migrar e invadir. Utilizaron el inhibidor de la ATP sintasa, la oligomicina (1 μ g/ml) y observaron que también disminuye en un 40% la polimerización de los filamentos de actina y disminuye en igual porcentaje la migración e invasión. Los autores concluyen que en las líneas

metastásicas la mitocondria tiene un papel importante para que se lleven a cabo la migración e invasión.

El desacoplante mitocondrial CCCP al igual que el inhibidor canónico mitocondrial oligomicina son altamente tóxicos para células sanas y células tumorales, por lo que utilizar los inhibidores mitocondriales no clásicos, los cuales parecen no tener repercusión en células no tumorales (Tabla 7), podría ser una buena estrategia para inhibir el proceso de invasión.

Cuando nosotros evaluamos los inhibidores mitocondriales cas-IIgly, α -TEA, celecoxib y el AINE sulindac, fueron efectivos a bajas concentraciones (0.5-17 μ M) para inhibir el 50% de la invasión de las *BCSC-like*, en comparación con el fármaco canónico paclitaxel que su IC_{50} de invasión fue $\geq 500 \mu$ M.

Lo anterior indica que la energía proveniente de la mitocondria es esencial para los procesos de malignidad incrementada como la invasión y metástasis.

10.4 Terapia combinatoria como posible estrategia terapéutica contra las *BCSC-like*

La estrategia de combinación de fármacos busca que los fármacos o inhibidores que se utilizan tengan blancos terapéuticos distintos para así potenciar el efecto deseado (Keith et al., 2005). Nuestros resultados demuestran que cuando combinamos celecoxib a concentraciones que se han reportado que tiene efecto como inhibidor del complejo II de la cadena transportadora de electrones y como inductor de ROS (Pritchard et al., 2018), en combinación con el fármaco antineoplásico paclitaxel, el cual inhibe la despolimerización de microtubulos, muestra un efecto supra aditivo para inhibir la viabilidad y la invasión de las *BCSC-like*.

Para dilucidar el mecanismo de acción de esta combinación evaluamos si realmente estaba repercutiendo en la *OxPhos*. Dicha combinación aumentó el consumo total de oxígeno, disipó el potencial transmembranal pero no observamos una disminución en la *OxPhos*. Estos resultados nos indicaron que había un desacoplamiento mitocondrial pero que no se estaban afectando la ATP sintasa.

Uno de los mecanismos para explicar el desacoplamiento mitocondrial es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que se determinó la velocidad de producción de ROS en presencia de la combinación. Pudimos observar que las *BCSC-like* tienen una velocidad de producción de ROS mayor que su célula de origen MCF7, cuando les añadimos celecoxib o paclitaxel la velocidad en la producción de ROS aumenta más de 2 veces y cuando ponemos los dos inhibidores en combinación hay un efecto aditivo en la velocidad de producción de ROS. Esto nos indica que los ROS están provocando el desacoplamiento mitocondrial y esto está repercutiendo en la capacidad de invasión que tienen las *BCSC-like*.

Al utilizar inhibidores mitocondriales las células *BCSC-like* pudieran acelerar su flujo glucolítico como mecanismo compensatorio para la producción de energía y así poder sobrevivir. Cuando evaluamos el flujo glucolítico en presencia de la combinación de celecoxib y paclitaxel no hubo una diferencia significativa respecto a las *BCSC-like* control por lo que estos fármacos no están teniendo repercusión en la glucólisis.

CAPÍTULO X. CONCLUSIONES

Una terapia combinatoria, con celecoxib puede potenciar el efecto de paclitaxel repercutiendo en la función mitocondrial, aumentando la velocidad de producción de ROS e inhibiendo el proceso de invasión en células troncales de cáncer de mama.

LITERATURA CITADA

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(7):3983-8.

Alison MR, Lin WR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev.* 2012; 38(6):589-598.

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

Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv.* 2018; 36(4):1111-1126.

Bevers TB, Anderson BO, Bonaccio E, Buys S, Daly MB, Dempsey PJ, Farrar WB, Fleming I, Garber JE, Harris RE, Heerdt AS, Helvie M, Huff JG, Khakpour N, Khan SA, Krontiras H, Lyman G, Rafferty E, Shaw S, Smith ML, Tsangaris TN, Williams C, Yankeelov T; National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer screening and diagnosis. *J Natl Compr Canc Netw.* 2009; 7(10):1060-96. Review.

Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, Serbedzija G, Zimmermann GR, Foley MA, Stockwell BR, Keith CT. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7977-82.

Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* 2011;71(3):634-9.

Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, Carter H, Kim D, Chen S, Karchin R, Kinzler KW, Vogelstein B, Nowak MA. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(43):18545-50.

Bruce A. Chabner, Philip C. Amrein, Brian J. Druker, M. Dror Michaelson, Constantine S. Mitsiades, Paul E. Goss, David P. Ryan, Sumant Ramachandra, Paul G. Richardson, Jeffrey G. Supko, Wyndham H. Wilson. Antineoplastic agents. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Eleventh edition. 2007. Section IX, Chapter 51.

Carina V, Zito G, Pizzolanti G, Richiusa P, Criscimanna A, Rodolico V, Tomasello L, Pitrone M, Arancio W, Giordano C. Multiple pluripotent stem cell markers in human

anaplastic thyroid cancer: the putative upstream role of SOX2. *Thyroid*. 2013; 23(7):829-37.

Cazzola M. Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood*. 2016;127(20):2361-2364.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):563-72. Review.

Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*. 2016; 370(1):153-64.

Cho SJ, Kim N, Kim JS, Jung HC, Song IS. The anti-cancer effect of COX-2 inhibitors on gastric cancer cells. *Digest. Dis. Sci*. 2007; 52(7):1713–1721. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>

Ciavardelli, D, C Rossi, D Barcaroli, S Volpe, A Consalvo, M Zucchelli, A De Cola, et al. 2014. “Breast Cancer Stem Cells Rely on Fermentative Glycolysis and Are Sensitive to 2-Deoxyglucose Treatment.” *Cell Death and Disease* 5: 1–12.

Corbet Cyril. Stem Cell Metabolism in Cancer and Healthy Tissues: Pyruvate in the Limelight. *Frontiers in pharmacology*.2018; 8: 1-7.

Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*. 2006; 20(5):557-70.

Davila-Manzanilla SG, Figueroa-de-Paz Y, Mejia C, Ruiz-Azuara L. Synergistic effects between a copper-based metal Casiopeína III-ia and cisplatin. *Eur J Med Chem*. 2017; 129:266-274.

Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009; 14(1):3-9.

Delhumeau G, Cruz-Mendoza AM, Gomez Lojero C. Protection of cytochrome c oxidase against cyanide inhibition by pyruvate and alpha-ketoglutarate: effect of aeration in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994; 126(2):345-51.

De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pagès M, Ozsvári B, Smith DL, Sanchez-Alvarez R, Martínez-Outschoorn UE, Cappello AR, Pezzi V, Lisanti MP, Sotgia F. Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget*. 2015 Jun 20; 6(17):14777-95.

De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*. 2003; 200(4):429-47. Review.

Dietzen DJ, Davis EJ. Excess membrane cholesterol is not responsible for metabolic and bioenergetic changes in AS30D hepatoma mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1994, 341-347.

Draga M, Madgett EB, Vandenberg CJ, du Plessis D, Kaufmann A, Werler P, Chakraborty P, Lowndes NF, Hiom K. BRCA1 Is Required for Maintenance of Phospho-Chk1 and G2/M Arrest during DNA Cross-Link Repair in DT40 Cells. *Mol Cell Biol*. 2015; 35(22):3829-40.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5):759-67.

Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppalapati A, Luu HH, Haydon RC, He TC, Ren G. Breast-cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018; 5(2):77-106.

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 Res*. 2008; 10(2):R25.

Flavahan WA, Wu Q, Hitomi M, Rahim N, Kim Y, Sloan AE, Weil RJ, Nakano I, Sarkaria JN, Stringer BW, Day BW, Li M, Lathia JD, Rich JN, Hjelmeland AB. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci*. 2013; 16(10):1373-82. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2002; 38(7):867-71. Review.

Frank SA. *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*. Princeton (NJ): Princeton University Press; 2007. Chapter 12, Stem Cells: Tissue Renewal. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1566/>

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

Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, Elias AD, Farrar WB, Forero A, Giordano SH, Goetz M, Goldstein LJ, Hudis CA, Isakoff SJ, Marcom PK, Mayer IA, McCormick B, Moran M, Patel SA, Pierce LJ, Reed EC, Salter KE, Schwartzberg LS, Smith KL, Smith ML, Soliman H, Somlo G, Telli M, Ward JH, Shad DA, Kumar R. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2016; 14(3):324-54.

Guisse T. Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment. *Semin Oncol.* 2010; 37 Suppl 2:S2-14.

Guo W, Lasky JL 3rd, Wu H. Cancer stem cells. *Pediatr Res.* 2006; 59 (4 Pt 2):59R-64R.

Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006; 127(4):679-95. Review.

Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. Cancer stem cells: Therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *APSB.* 2013; 3 (2): 65-75.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-74. Review.

Heiler S, Wang Z, Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes -the incentive push. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(26):5971-6007.

Hernández-Reséndiz I, Román-Rosales A, García-Villa E, López-Macay A, Pineda E, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Alvarez-Ríos E, Gariglio P, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Dual regulation of energy metabolism by p53 in human cervix and breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(12):3266-78.

Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2002; 2(4):289-300.

Huang C, Chen Y, Liu H, Yang J, Song X, Zhao J, He N, Zhou CJ, Wang Y, Huang C, Dong Q. Celecoxib targets breast cancer stem cells by inhibiting the synthesis of prostaglandin E(2) and down-regulating the Wnt pathway activity. *Oncotarget.* 2017; 8(70):115254-115269.

Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 2000, 15;60(18):5040-4.

Joseph C, Arshad M, Kurozomi S, Althobiti M, Miligy IM, Al-Izzi S, Toss MS, Goh FQ, Johnston SJ, Martin SG, Ellis IO, Mongan NP, Green AR, Rakha EA. Overexpression of the cancer stem cell marker CD133 confers a poor prognosis in invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018.

Kalantari E, Asgari M, Nikpanah S, Salarieh N, Asadi Lari MH, Madjd Z. Co-Expression of Putative Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Prostate Carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2017; 23(4):793-802

Karamboulas C, Ailles L. Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830(2):2481-95.

Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(1):71-8. Review.

Kim JE, Kim SK, Shin J, Se YB, Choi SH, Park SH, Choi SA, Lee JY, Phi JH, Wang KC, Park CK, Kim SK. A subpopulation of cancer stem cells identifies radiographic characteristics in glioblastoma. *Oncol Lett.* 2017; 13(3):1175-1182.

Kim YS, Kang MJ, Cho YM. Low production of reactive oxygen species and high DNA repair: mechanism of radioresistance of prostate cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2013; 33(10):4469-74.

Kismet K, Akay MT, Abbasoglu O, Ercan A. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(2):127-142.

Krishnamachary B, Penet MF, Nimmagadda S, Mironchik Y, Raman V, Solaiyappan M, Semenza GL, Pomper MG, Bhujwalla ZM. Hypoxia regulates CD44 and its variant isoforms through HIF-1 α in triple negative breast cancer. *PLoS One.* 2012; 7(8):e44078.

Kwon MJ, Shin YK. Regulation of ovarian cancer stem cells or tumor-initiating cells. *Int J Mol Sci.* 2013; 25; 14(4):6624-48.

Lamb R, Harrison H, Hulit J, Smith DL, Lisanti MP, Sotgia F. Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition. *Oncotarget.* 2014;5(22):11029-11037.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(3):178-96.

Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer.* 2011; 128(11):2527-35.

Lehár J, Krueger AS, Avery W, et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat Biotechnol.* 2009; 27(7):659-66. Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cell in metastasis. *Cell Res,* 2007; 17: 3-14.

Li P, Zhou C, Xu L, Xiao H. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci.* 2013;10(4):399-407. Luo M, Clouthier SG, Deol Y, Liu S, Nagrath S, Azizi E, Wicha MS. Breast cancer stem cells: current advances and clinical implications. *Methods Mol Biol.* 2015;1293:1-49. Review.

Liu ZJ, Semenza GL, Zhang HF. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2015; 16(1):32-43.

Ma X, Jin M, Cai Y, et al. Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy. *Chem Biol.* 2011;18(11):1474-81.

Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multicellular spheroids. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(3):541-551

Mao JT, Roth MD, Fishbein MC, et al. Lung cancer chemoprevention with celecoxib in former smokers. *Cancer Prev. Res.* 2011; 4(7):984–993.

Marcato P, Dean CA, Liu RZ, Coyle KM, Bydoun M, Wallace M, Clements D, Turner C, Mathenge EG, Gujar SA, Giacomantonio CA, Mackey JR, Godbout R, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. *Mol Oncol.* 2015; 9(1):17-31.

Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65(12):1979-89.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, López-Ramírez SY, García-García JD, Rodríguez-Zavala JS, Ruiz-Ramírez L, Gracia-Mora I, Zentella-Dehesa A, Sosa-Garrocho M, Macías-Silva M, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation. *Arch Toxicol.* 2012;86(5):753-66.

Maugeri-Saccà M, Zeuner A, De Maria R. Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology.* 2011; 1:10.

Mehar A, Macanas-Pirard P, Mizokami A, Takahashi Y, Kass GE, Coley HM. The effects of cyclooxygenase-2 expression in prostate cancer cells: modulation of response to cytotoxic agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 324(3):1181–1187.

Mimeault M, Batra S. Molecular Biomarkers of Cancer Stem/Progenitor Cells Associated with Progression, Metastases, and Treatment Resistance of Aggressive Cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013; 23 (2): 234-254.

Morales-Vásquez F. Estrategias clínicas y desarrollo de las bases científicas en el empleo de hormonoterapia para cáncer de mama. *Cancerología.* 2006; 1. 163 – 175.

Moreno-Sánchez R, Torres-Márquez ME. Control of oxidative phosphorylation in mitochondria, cells and tissues. *Int J Biochem.* 1991;23(11):1163-74. Review.

Morrow M, Van Zee KJ, Solin LJ, Houssami N, Chavez-MacGregor M, Harris JR, Horton J, Hwang S, Johnson PL, Marinovich ML, Schnitt SJ, Wapnir I, Moran MS. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology-American Society of Clinical Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Ductal Carcinoma in Situ. *Pract Radiat Oncol.* 2016; 6(5):287-295.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2008; 417(1):1–13.

Myung SJ, Yoon JH, Yu SJ. STAT3 & Cytochrome P450 2C9: a novel signaling pathway in liver cancer stem cells. *Biomed Pharmacother.* 2012; 66(8):612-6.

Neuzil J, Moreno-Sánchez R. The Bioenergetics of Cancer, the Warburg Hypothesis and the Mitochondrial Function. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2013; 14: 249-250.

Neuzil J, Weber T, Gellert N, Weber C. Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate. *Br J Cancer*. 2001; 84(1):87-9.

Nicholls DG, Ferguson S, Smith JJ. Mitochondria at the crossroad of apoptotic cell death. *J. Bioenerg. Biomembra*. 1999, 31, 321-326.

Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002 para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/041ssa202.html>

North GL. Celecoxib as adjunctive therapy for treatment of colorectal cancer. *Ann Pharmacother*. 200; 35(12):1638-43. Review.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; 194(4260):23-8.

Ogawa K, Yoshioka Y, Isohashi F, Seo Y, Yoshida K, Yamazaki H. Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives. *Anticancer Res*. 2013; 33(3):747-754.

Pacheco-Velázquez SC, Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype. *Mol Pharm*. 2018 Jun 4;15(6):2151-2164.

Palorini Roberta, Giuseppina Votta, Chiara Balestrieri, Andrea Monestiroli, Sandro Olivieri, Renza Vento, and Ferdinando Chiaradonna. 2014. "Energy Metabolism Characterization of a Novel Cancer Stem Cell-like Line 3AB-OS." *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (2): 368–79.

Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Hu Z, Barney KA, Degen JL. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood*. 2007; 110(1):133-41.

Parte SC, Smolenkov A, Batra SK, Ratajczak MZ, Kakar SS. Ovarian Cancer Stem-Cells: Unraveling a Germline Connection. *Stem Cells Dev*. 2017; 26(24):1781-1803.

Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovskaja A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother Oncol.* 2013; 108(3):378-87.

Pedersen PL. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1978, 22, 190-1274.

Perona R, López-Ayllón BD, de Castro Carpeño J, Belda-Iniesta C. A role for cancer stem cells in drug resistance and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Clin Transl Oncol.* 2011; 13(5):289-293

Phesse TJ, Clarke AR. Normal stem cells in cancer prone epithelial tissues. *Br J Cancer.* 2009; 100(2):221-7.

Phiboonchaiyanan PP, Chanvorachote P. Suppression of a cancer stem-like phenotype mediated by alpha-lipoic acid in human lung cancer cells through down-regulation of β -catenin and Oct-4. *Cell Oncol.* 2017; 40(5):497-510.

Prieto-Vila, M.; Takahashi, R.-U.; Usuba, W.; Kohama, I.; Ochiya, T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2574.

Pritchard R, Rodríguez-Enríquez S, Pacheco-Velázquez SC, Bortnik V, Moreno-Sánchez R, Ralph S. Celecoxib inhibits mitochondrial O₂ consumption, promoting ROS dependent death of murine and human metastatic cancer cells via the apoptotic signalling pathway. *Biochem Pharmacol.* 2018; 154:318-334.

Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(4):285-93.

Ralph SJ, Pritchard R, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Ralph RK. Hitting the Bull's-Eye in Metastatic Cancers-NSAIDs Elevate ROS in Mitochondria, Inducing Malignant Cell Death. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015;8(1):62-106.

Ralph SJ, Nozuhur S, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Pritchard R. NSAID celecoxib: a potent mitochondrial pro-oxidant cytotoxic agent sensitizing metastatic cancers and cancer stem cells to chemotherapy. *J Cancer Metastasis Treat.* 2018;4:49.

Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med.* 2006; 6(4):145-9.

Rodríguez-Enríquez S., Carreño-Fuentes L., Gallardo-Pérez J.C., Saavedra E., Quezada H., Vega A., Marín-Hernández A., Olín-Sandoval V., Torres-Márquez M.E., Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010; 42 (10):1744–1751.

Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Marín-Hernández A, Pacheco-Velázquez SC, López-Ramírez SY, Rumjanek FD, Moreno-Sánchez R. Canonical and new generation anticancer drugs also target energy metabolism. *Arch Toxicol.* 2014;88(7):1327-50.

Rodríguez-Enríquez S, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Aguilar-Ponce JL, Mandujano-Tinoco EA, Meneses A, Moreno-Sánchez R. Oxidative phosphorylation as a target to arrest malignant neoplasias. *Curr Med Chem.* 2011;18(21):3156-67.

Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Dong LF, Akporiaye ET, Neuzil J, Ralph SJ, Moreno-Sánchez R. Molecular mechanism for the selective impairment of cancer mitochondrial function by a mitochondrially targeted vitamin E analogue. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1817(9):1597-607.

Rogalla S, Contag CH. Early Cancer Detection at the Epithelial Surface. *Cancer J.* 2015; 21(3):179-87.

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

Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell.* 2011; 145(6):926-40.

Schwarz-Cruz Y Celis A, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Advances in the knowledge of breast cancer stem cells. A review. *Histol Histopathol.* 2016; 31(6):601-12.

Singer D, Thamm K, Zhuang H, Karbanová J, Gao Y, Walker JV, Jin H, Wu X, Coveney CR, Marangoni P, Lu D, Grayson PRC, Gulsen T, Liu KJ, Ardu S, Wann AK, Luo S, Zambon AC, Jetten AM, Tredwin C, Klein OD, Attanasio M, Carmeliet P, Huttner WB, Corbeil D, Hu B. Prominin-1 controls stem cell activation by orchestrating ciliary dynamics. *EMBO J.* 2018. pii: e99845.

Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi-ani S, Sargolzaei Aval F. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta MedIran*. 2017; 55(1):6-23. Review.

Song X, Lin HP, Johnson AJ, Tseng PH, Yang YT, Kulp SK, Chen CS. Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94(8):585-591.

Sparano JA, Zhao F, Martino S, Ligibel JA, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge GW Jr, Wood WC, Davidson NE. Long-Term Follow-Up of the E1199 Phase III Trial Evaluating the Role of Taxane and Schedule in Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33(21):2353-60.

Sun Y, Yoshida T, Okabe M, Zhou K, Wang F, Soko C, Saito S, Nikaido T. Isolation of Stem-Like Cancer Cells in Primary Endometrial Cancer Using Cell Surface Markers CD133 and CXCR4. *Transl Oncol*. 2017; 10(6):976-987.

Tanner K. Regulation of the basement membrane by epithelia generated forces. *Phys Biol*. 2012; 9(6):065003.

Tomita Hiroyuki, Tanaka Kaori, Hisamatsu Kenji y Hara Akira. The role of aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer stem cells. *Can Cell Microenviron* 2015; 2: e1064.

Van Damme J, Struyf S, Opdenakker G. Chemokine-protease interactions in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2004; 14(3):201-8.

Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast Cancer Stem Cells. *Int J of Biochem Cell Biol*. 2012; 44(4):573-577.

Velasco-Velázquez MA, Yu Z, Jiao X, Pestell RG. Cancer stem cells and the cell cycle: targeting the drive behind breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009; 9(3):275-9.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339(6127):1546-58. Review.

Vogelstein B y Kinzler K. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004; 10 (8): 789-99.

Wang CC, Jamal L, Janes KA. Normal morphogenesis of epithelial tissues and progression of epithelial tumors. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012; 4(1):51-78.

Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, Gao J, Zhao Z, Liu C. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget.* 2014; 5(21):10803-15.

Wang J, Liu X, Jiang Z, et al. A novel method to limit breast cancer stem cells in states of quiescence, proliferation or differentiation: Use of gel stress in combination with stem cell growth factors. *Oncol Lett.* 2016; 12(2):1355-1360.

Wang Q-E. DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World Journal of Biological Chemistry.* 2015; 6(3):57-64.

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

Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM, Burton J. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res.* 2002;62(7):2029-2033.

Wojtovich AP, Brookes PS. The endogenous mitochondrial complex II inhibitor malonate regulates mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: implications for ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1777(7-8):882-889.

Yang Z, Li C, Fan Z, Liu H, Zhang X, Cai Z, Xu L, Luo J, Huang Y, He L, Liu C, Wu S. Single-cell Sequencing Reveals Variants in ARID1A, GPRC5A and MLL2 Driving Self-renewal of Human Bladder Cancer Stem Cells. *Eur Urol.* 2017; 71(1):8-12.

Zentella A, Frías S, Galicia G, Ruíz J, Córdova E, Ventura JL, Ramírez J, Castro N, Montes D, Ibarra M. Cáncer de glándula mamaria y metastasis: un creciente problema de salud pública en México. *Mensaje Bioquímico* 2007; 31:172-795.

Zhang XH, Jin X, Malladi S, Zou Y, Wen YH, Brogi E, Smid M, Foekens JA, Massagué J. Selection of bone metastasis seeds by mesenchymal signals in the primary tumor stroma. *Cell*. 2013; 154(5):1060-1073.

Zhao J, Zhang J, Yu M, Xie Y, Huang Y, Wolff DW, Abel PW, Tu Y. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2013; 32(40):4814-4824.

Zhuge Y, Krauze AV, Ning H, Cheng JY, Arora BC, Camphausen K, Miller RW. Brain tumor segmentation using holistically nested neural networks in MRI images. *Med Phys*. 2017;44(10):5234-5243.

Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(3):459-6