



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE POSIBLES ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR CD44  
SOBRE LA CITOTOXICIDAD Y LA ADHESIÓN A ÁCIDO HIALURÓNICO DE  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA”.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Ruiz Moreno Angel Jonathan**



**MÉXICO, D.F.**

**2015**



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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                      **Profesor: Atonatiu Edmundo Gómez Martínez**

**VOCAL:**                                **Profesor: Francisco Hernández Luis**

**SECRETARIO:**                      **Profesor: Marco Antonio Velasco Velázquez**

**1er. SUPLENTE:**                      **Profesor: María Eva González Trujano**

**2° SUPLENTE:**                      **Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez**

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Laboratorio de Farmacología Molecular, Torre de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM.

Este proyecto fue apoyado por CONACYT CB-2013-01 221103.

### **Agradecimientos**

A la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI), ENCB, IPN. Por prestar asesorías e instalaciones para la realización de algunos ensayos presentados en este trabajo.

A la Dra. Charmina Aguirre Alvarado quien diseñó y realizó los ensayos de acoplamiento y dinámica molecular de los fármacos estudiados en este proyecto.

A Red Farmed – CONACYT

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez

### **SUSTENTANTE**

Ruiz Moreno Angel Jonathan

DEDICADA A:

MI SIEMPRE AMADO HERMANO CRIS

Y

A MI AMIGO JULIO;

AUNQUE YA NO ESTAS CONMIGO, SIMPRE TE RECUERDO

## **Agradecimientos Personales**

Agradezco a mi siempre amada Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por proporcionarme las instalaciones y los profesores para enseñarme a ser un profesionista.

Al Dr Marco Velasco y la Dra Charmina Aguirre, por compartirme sus conocimientos y experiencia, además por su paciencia para enseñarme.

A Sandy por su apoyo, compañerismo y amistad, porque aprender y trabajar juntos siempre fue agradable y cordial.

A mis padres por su apoyo incondicional que me fortaleció en mis momentos de incertidumbre. Por sus palabras de aliento que me impulsaron siempre a llegar hasta el final. Por sus regaños que me pusieron los pies en la tierra cuando deseaba rendirme.

A mis hermanas Ana y Gely por apoyarme y motivarme a continuar ante cualquier adversidad. Por la amistad y cariño que siempre me han tenido (y espero siempre me tengan).

A mi hermano Cris porque ser mi gran amigo y cómplice desde siempre.

A mi amada Kate porque en los fastidios, enojos, frustraciones y decepciones siempre me alentó a continuar. Y porque estuvo conmigo para compartir las alegrías, risas, logros y diversiones.

A mi toda mi familia: tíos, primos y sobrinos porque siempre estuvieron al pendiente de mi y se interesaron en mi desarrollo.

A mis "Panas" Ale e Ilse, porque me aguataron toda la carrera, me apoyaron siempre, compartieron conmigo su tiempo y sobre todo su amistad.

בְּרֵאשִׁית ...

# Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>2</b>
1.1 Generalidades del Cáncer .....	2
1.2 Epidemiología del cáncer.....	2
1.3 El inicio del cáncer.....	3
1.4 Carcinogénesis.....	9
1.5 Cáncer de mama .....	13
<b>II. Antecedentes.....</b>	<b>24</b>
<b>III. Hipótesis .....</b>	<b>26</b>
<b>IV. Objetivo.....</b>	<b>26</b>
<b>V. Metodología.....</b>	<b>26</b>
5.1 Compuestos .....	26
5.2 Material Biológico .....	27
5.3 Detección del receptor CD44 en la línea celular Hs578T .....	27
5.4 Prueba de viabilidad por reducción del MTT .....	28
5.5 Ensayos de Adhesión a Ácido Hialurónico.....	29
<b>VI. Resultados.....</b>	<b>31</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>44</b>

## Resumen

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia con mayor morbilidad y mortalidad en mujeres a nivel mundial. Las terapias actuales aún son deficientes para el tratamiento de esta enfermedad, ya que éste padecimiento presenta una alta tasa de reincidencia y de fracaso al tratamiento. Se ha descrito que la población de células troncales tumorales (CTT) podría estar directamente involucrada en la iniciación y mantenimiento del CaMa, así como en la quimioresistencia y la reincidencia de la enfermedad. Las CTT presentan como marcadores específicos de superficie el fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>. La activación del receptor CD44 por su ligando el ácido hialurónico (HA) promueve la malignidad de la célula tumoral. Se sabe que al bloquear la unión de CD44-HA se inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis, lo que sugiere el desarrollo de fármacos dirigidos contra este receptor pudieran ser efectivos para el tratamiento del CaMa. En éste trabajo se evalúa el efecto de la citotoxicidad y la adhesión celular a HA utilizando compuestos seleccionados mediante cribado virtual dirigidos contra el receptor CD44 con el objetivo de conocer el efecto de estos fármacos sobre una línea celular de CaMa con alta expresión del receptor CD44 y su posible aplicación terapéutica como adyuvante a los actuales tratamientos en contra del CaMa. Los resultados obtenidos demuestran que los fármacos seleccionados tienen un efecto en la adhesión celular a HA, lo que sugiere que estos compuestos pueden servir como adyuvantes para el tratamiento del CaMa si se demuestra que tienen efecto reduciendo la invasividad, la migración y proliferación de las células tumorales.

# **I. Introducción**

## **1.1 Generalidades del Cáncer**

Cáncer es un nombre general para un grupo de más de 100 enfermedades. El cáncer comienza cuando células de alguna parte del cuerpo comienzan a proliferar fuera de control. Estas células en lugar de morir continúan proliferando para formar nuevas células cancerosas, las cuales tienen la capacidad de invadir otros tejidos. La proliferación sin control y la capacidad de invadir a otros tejidos es lo que define a una célula cancerosa [1].

## **1.2 Epidemiología del cáncer**

Se estima que en 2005 murieron de cáncer 7.6 millones de personas, lo que representa el 13% de las defunciones en todo el mundo. Si no se toman medidas urgentes, para el 2015 morirán 84 millones de personas más. El cáncer no es un problema exclusivo de los países desarrollados ya que más del 70% de las muertes por cáncer suceden en países de ingresos bajos y medianos [2].

En el mundo hay anualmente 14.1 millones de nuevos casos de personas con cáncer, 8.2 millones de muertes y 32.6 millones de personas que viven con cáncer (dentro de los 5 primeros años a partir del diagnóstico). En el año 2012 en todo el mundo, del 57% (8 000 000) de los nuevos casos de cáncer, el 65% (5.3 millones) de las muertes por cáncer y el 48% ( 15,6 millones ) de los casos de cáncer prevalentes de 5 años se produjeron en las regiones menos desarrolladas del mundo [3].



### **1.3 El inicio del cáncer.**

La proliferación celular está cuidadosamente regulada y responde a las necesidades específicas del cuerpo. En un animal joven la proliferación excede a la muerte celular, cuando el animal aumenta de tamaño; en adulto, el proceso de muerte y surgimiento de nuevas células se equilibra [4].

Ocasionalmente, los controles que estabilizan la replicación celular se rompen. Cuando esto ocurre, la célula comienza dividirse y proliferar de una manera desregulada, sin considerar las necesidades que tienen el organismo. Las células provenientes de ella heredan la propensión de proliferar sin responder a la regulación, el resultado es una clona de células no requeridas con la capacidad de replicarse indefinidamente hasta formar una masa de células llamada tumor [4].

#### **1.3.1 Tumores benignos y malignos**

Los tumores surgen con gran frecuencia, especialmente en animales y humanos viejos, pero la mayoría presentan poco riesgo para su hospedero, ya que están localizados y son de tamaño pequeño. A estos tumores se les llama *benignos*, un ejemplo son las verrugas. Cuando un tumor es benigno contiene células que se parecen y funcionan como las células normales. Las moléculas de interacción de superficie que mantienen juntos los tejidos de las células tumorales benignas, las mantienen localizadas en los tejidos apropiados de igual forma como sucede en las células normales [4].

En contraste, las células que componen los *tumores malignos*, o cáncer, expresan algunas proteínas características dependiendo del tipo celular del cual surgieron, y

una alta fracción de estas células se divide más rápido de lo normal. Algunos tumores malignos permanecen localizados y encapsulados, por lo menos durante un tiempo; un ejemplo es el carcinoma de ovario o de mama. Sin embargo, algunas células no permanecen en su sitio original, ya que invaden tejidos circundantes, entran en el sistema circulatorio del cuerpo y se establecen en zonas de proliferación lejos del sitio original. La propagación de las células tumorales y su establecimiento en áreas secundarias de crecimiento es llamada *metástasis*; la mayoría de las células malignas pueden adquirir dicha capacidad. Así, la principal característica que diferencia los tumores malignos de los benignos es la invasividad y la diseminación [4].

### **1.3.2 Oncogenes y genes supresores de tumores**

Como se dijo anteriormente, las células tumorales difieren de las células normales principalmente a nivel genético. Las diferencias genéticas tienen como consecuencia cambios en la proliferación celular, la morfología, interacciones célula-célula, propiedades de membrana, estructura del citoesqueleto y secreción de proteínas. En este sentido, hay dos clases de genes que están involucrados en la iniciación del cáncer, estos son: los *protooncogenes* y los *genes supresores de tumores* (GST) los cuales codifican para varios tipos de proteínas que participan en el ciclo celular y la proliferación; las mutaciones en estos genes pueden contribuir al desarrollo de cáncer [5].

La mayoría de los *oncogenes* conocidos provienen de genes celulares normales (protooncogenes) cuyos productos proteicos participan en las vías de señalización relacionadas con el control de la proliferación celular. Por ejemplo, el gen *ras* es un

protooncogen que codifica una proteína intracelular de trasducción de señales; el gen mutante que deriva del gen ras es un oncogén cuyo producto es una *oncoproteína* que promueve una señalización descontrolada de proliferación celular.

La conversión o activación de protooncogen a oncogen generalmente involucra una mutación de ganancia de función. Existen al menos tres mecanismos que pueden producir oncogenes a partir de protooncogenes:

- Mutaciones puntuales en protooncogenes que resultan en la activación constitutiva de una proteína.
- Duplicación localizada (amplificación de genes) de un segmento que contiene un protooncogen, lo que lleva a la sobreexpresión de la proteína codificada.
- Translocación cromosómica que produce que un gen regulatorio del crecimiento celular este bajo el control de un promotor diferente, lo que ocasiona una inapropiada expresión del gen.

Un oncogen formado por el primer mecanismo codifica a una oncoproteína que difiere ligeramente de la proteína normal codificada por su correspondiente protooncogen. En contraste, los siguientes dos mecanismos generan oncogenes cuyos productos proteicos son idénticos a las proteínas normales; su efecto oncogénico se basa en su tasa de expresión mayor que en células normales. Sin embargo, las mutaciones para obtener una ganancia en la función actúan

dominantemente, es decir, las mutaciones en uno sólo de los alelos son suficientes para la indicción del cáncer [5].

Los GST generalmente codifican para proteínas que de una forma u otra inhiben la proliferación celular. La pérdida de uno o más de estos “frenos” contribuye al desarrollo del cáncer. Se reconocen al menos 5 clases de proteínas que son codificadas por GST.

- Proteínas intracelulares como el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p16 (CDKI p16). Que regulan o inhiben la progresión a través de una etapa específica del ciclo celular [5]. Las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) son enzimas esenciales con actividades estrechamente reguladas por fosforilación y asociación con otras enzimas, particularmente las ciclinas [6,7]. La activación secuencial de complejos ciclina-CDK produce la transición ordenada a través del ciclo celular. La activación anormal de las CDK es una de las bases de la proliferación celular incontrolada que caracteriza al cáncer [8]. El gen p16 codifica una proteína con capacidad de inhibir a CDK4 y CDK6 [9]. La secuencia de CDK4 y CDK6 está estrechamente relacionada y ambas son activadas por ciclinas tipo D durante la fase G1 del ciclo celular [10]. Por lo que mutaciones o deleciones del gen p16 se han relacionado con la aparición de diversos tumores primarios, principalmente melanoma [11-13].
- Factores de crecimiento (e.g. Factor de crecimiento derivado de tumor (TGF- $\beta$ )) cuya función es inhibir la proliferación celular [14]. En los mamíferos existen tres diferentes variantes de TGF- $\beta$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 los cuales están

codificados en diferentes genes pero ejercen sus funciones a través del mismo receptor [15]. De estos, el TGF- $\beta$ 1 frecuentemente se encuentra sobre expresado en células tumorales [16,17]. El TGF- $\beta$  tiene importantes funciones en la modulación de la proliferación, la maduración y diferenciación celular, en la formación de matriz extracelular, la homeostasis, inmunomodulación, apoptosis, angiogénesis y progresión del cáncer [18-20]. Es frecuente encontrar niveles altos de TGF- $\beta$  en plasma de pacientes con CaMa [21]. Estos niveles correlacionan con el estadio de la enfermedad y disminuyen después de la extirpación del tumor. Variantes de la familia de TGF- $\beta$  en carcinomas son predictores de una baja respuesta a quimioterapia en pacientes con CaMa [22].

- Proteínas de control que detienen el ciclo celular en caso de daño al DNA o si los cromosomas son anormales [5]. Por ejemplo, la proteína p53 se une al DNA cuando se encuentra dañado, lo que produce un estímulo para generar la proteína p21 la cual puede unirse a la ciclina dependiente de cinasa 2 (CDK2) cuyo efecto es la inducción de la división celular. Cuando p21 forma un complejo con CDK2 la célula no puede avanzar a la siguiente etapa de la división celular. Entonces una P53 mutante ya no se une al DNA de una manera eficaz, y como consecuencia no se produce P21 para realizar la "señal de parada" para la división celular. Así, las células se dividen sin control y forman tumores [23].
- Proteínas que promueven la apoptosis. En los vertebrados la apoptosis puede ser iniciada por dos diferentes vías de señalización, aunque

eventualmente ambas convergen [24]. La primera es regulada por BCL-2 (intrínseca, mitocondrial, inducida por estrés) [25] y la segunda por “receptores de muerte” [26]. En ambas vías de señalización, la muerte celular es mediada por una familia de proteínas denominadas caspasas, que proteolizan cientos de proteínas celulares diferentes [27]. La familia de proteínas BCL-2 está compuesta por un subgrupo de proteínas antiapoptóticas y 2 subgrupos proapoptóticos que regulan de manera conjunta la muerte celular a través de interacciones proteína-proteína [28]. Una sobreexpresión de las proteínas BCL-2 de supervivencia celular promueve la tumorigénesis por el mantenimiento de la viabilidad de las células a una transformación neoplásica, facilitando de ese modo la adquisición de mutaciones oncogénicas adicionales [29].

- Enzimas que participan en la reparación del DNA. Aunque las enzimas que participan en la reparación del DNA no tienen un efecto directo sobre el control de la proliferación celular, las células que pierden la habilidad de reparar su DNA acumulan mutaciones en varios genes, incluyendo aquellos que son críticos en el control del crecimiento y la proliferación celular. Por lo tanto, mutaciones de pérdida de función en genes que codifican enzimas de reparación de DNA promueven la inactivación de otros GST y la activación de oncogenes [5]. Por ejemplo, pérdida de los genes codificantes para la proteína de susceptibilidad a CaMa tipo 2 (BRCA2 por sus siglas en inglés) que está implicada en la reparación del daño cromosómico, evita la

reparación ante el daño genético ocasionado por radiaciones lo que promueve el desarrollo del cáncer [30,31].

Generalmente una sola copia los GST es suficiente para controlar la proliferación celular, por lo que ambos alelos de un GST deben ser perdidos o inactivados para promover el desarrollo tumoral. Entonces, las mutaciones oncogénicas de pérdida de función actúan de forma recesiva. Los GST en muchos tipos de cáncer tienen mutaciones o deleciones puntuales que evitan la producción de su proteína o conllevan la formación de una proteína no funcional [5].

#### **1.4 Carcinogénesis**

La carcinogénesis (proceso de generación del cáncer) puede ser dividida conceptualmente dentro de cuatro etapas: *iniciación del tumor*, *promoción del tumor*, *conversión maligna* y *progresión tumoral* (fig. 1). La distinción entre la iniciación y la promoción fue reconocida a través de estudios que incluían carcinógenos químicos y virales [32,33]. Esta distinción fue formalmente definida en ratones tratados tópicamente con una sola dosis de un hidrocarburo aromático policíclico (3,4-benzopireno, 1,2,5,6-dibenzantraceno o 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno) como *agente iniciador*, seguido de dosis repetidas de aceite de croton (*agente promotor*). Cuando el tratamiento con el agente promotor se mantuvo constante pero utilizando los agentes iniciadores antes mencionados, en diferentes concentraciones, sólo hubo variación en la incidencia de los tumores de cada grupo, pero el período de latencia promedio siguió siendo el mismo, lo que demostró la diferencia entre un cambio neoplásico irreversible en las células normales (iniciación) convirtiéndolas a células tumorales latentes (promoción) [32].

### **1.4.1 Iniciación del tumor**

El concepto de *iniciación* indica que los primeros cambios en el material genético en la carcinogénesis química son irreversibles. Para que las mutaciones se acumulen, estas deben surgir en células que proliferen y sobrevivan en el organismo por algún tiempo. Un carcinógeno químico causa errores genéticos por que modifica la estructura del ADN lo que lleva a mutaciones durante la síntesis del ADN. Con mayor frecuencia, estos cambios ocurren por la formación de un aducto entre el carcinógeno o uno de sus grupos funcionales y los nucleótidos del ADN [34]. La formación aductos carcinógeno-ADN es una de las teorías centrales de la carcinogénesis química, y puede ser necesaria, pero no suficiente, prerequisite para la iniciación tumoral [35].

La formación de estos aductos causa la activación de protooncogenes o la inactivación de los GST, cualquiera de estas dos opciones puede ser categorizada como un evento iniciador de tumor [35]. Adicionalmente, estudios moleculares de tejidos preneoplásicos de pulmón y de colon demuestran que hay cambios epigenéticos como eventos tempranos de la carcinogénesis a través de metilación de regiones promotoras en el ADN lo que genera el silenciamiento transcripcional de GST como evento iniciador de la carcinogénesis [36].

### **1.4.2 Promoción del tumor**

La *promoción del tumor* comprende la expansión clonal selectiva de las células iniciadas. Dado que la tasa de acumulación de mutaciones es proporcional a la tasa de la división celular, la expansión clonal de las células produce una gran población celular que está en riesgo de adquirir futuros cambios genéticos y conversión



maligna [37,38]. Dichos cambios pueden ser potenciados por los promotores tumorales que en general son no mutagénicos. Estos agentes se caracterizan por su capacidad de reducir el periodo de latencia para la formación del tumor después de la exposición de un tejido a un iniciador tumoral, o de incrementar el número de tumores formados en ese tejido. Los agentes promotores inducen la formación de tumores en combinación con una dosis de un iniciador que es demasiado baja para ser carcinogénica por si sola [32,39].

### **1.4.3 Conversión maligna**

La conversión maligna es la transformación de una célula preneoplásica a una que expresa un fenotipo maligno. Este proceso requiere cambios genéticos adicionales. La dosis total de un promotor tumoral tiene menor impacto en la formación del tumor que la frecuencia de la administración, y si el promotor tumoral es retirado una vez que la conversión maligna ha ocurrido, las lesiones premalignas o benignas pueden revertirse. La promoción tumoral contribuye al proceso de carcinogénesis por la expansión de la población de las células iniciadas que están en riesgo de llegar a una conversión maligna. La conversión de una fracción de estas células puede ser acelerada en proporción a la tasa de la división celular y de la cantidad de células que se dividen en el tumor benigno o la lesión preneoplásica. En parte, estos cambios genéticos adicionales pueden resultar de la infidelidad en la síntesis del ADN [40]. La probabilidad de la conversión maligna puede estar incrementada sustancialmente por la exposición de las células neoplásicas a los agentes que pueden dañar el ADN, y este proceso puede ser mediado a través de la activación de protooncogenes y la inactivación de GST [34].

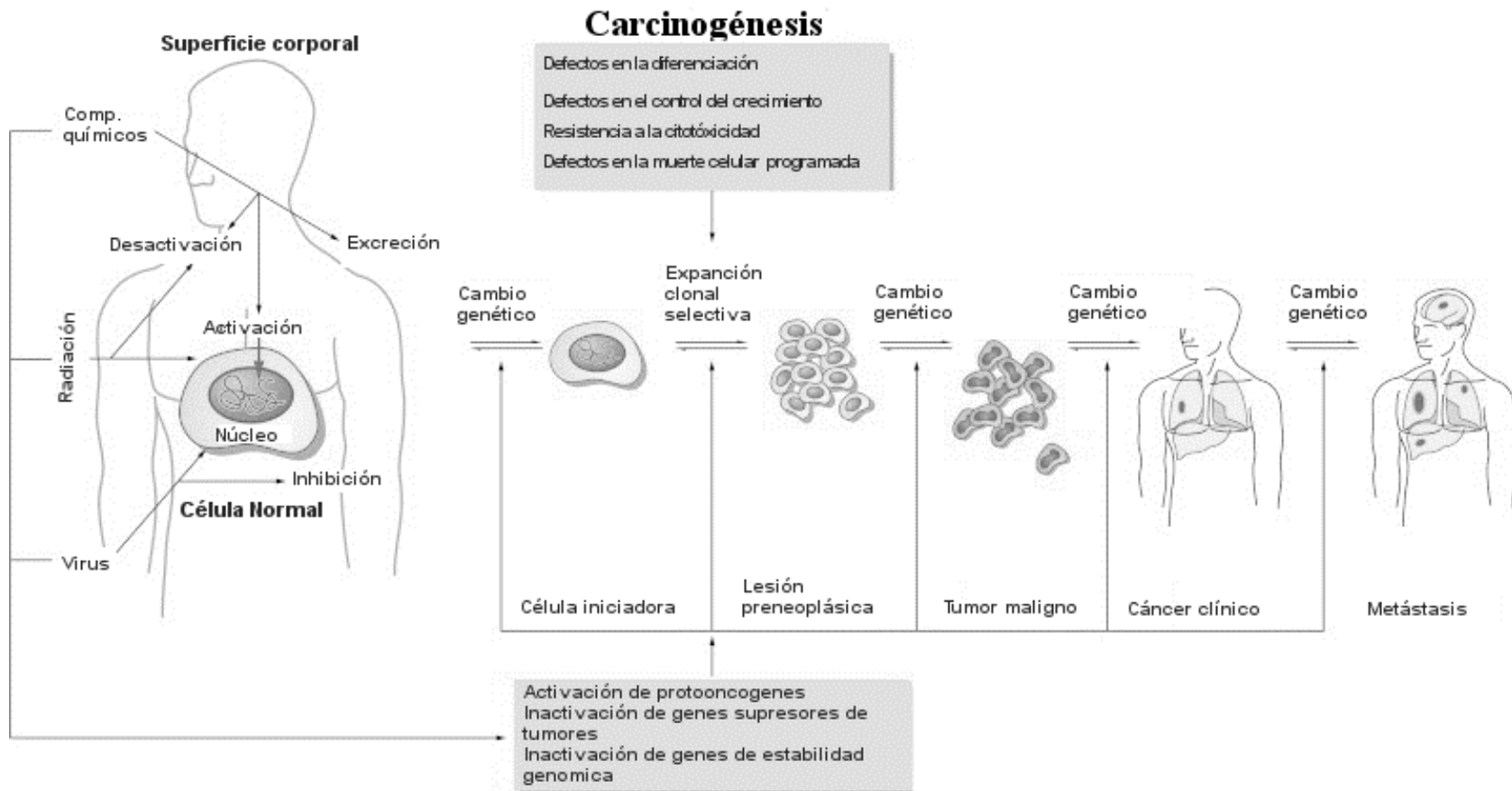


Fig. 1. El proceso de la carcinogénesis puede ser conceptualizado dividiéndolo en cuatro etapas: la iniciación tumoral, la promoción del tumor, la conversión maligna y la progresión tumoral. La activación de protooncogénes y la inactivación de genes supresores de tumores son eventos de mutación que resultan en daño al ADN causado por la exposición a agentes químicos. La acumulación de mutaciones (no necesariamente en el orden que ocurren), constituye la base del proceso de carcinogénesis [41] (modificado de [35]).

#### **1.4.4 Progresión tumoral**

La progresión tumoral comprende la expresión del fenotipo maligno y la tendencia de las células a adquirir esta característica u otras más agresivas durante el tiempo. Además, la metástasis puede proveer la capacidad a las células tumorales de secretar proteasas que permiten la invasión más allá de la localización inmediata del tumor. Una característica prominente del fenotipo maligno es la propensión al crecimiento descontrolado que es generado por la inestabilidad genómica [42]. Durante este proceso pueden ocurrir aún más cambios genéticos y epigenéticos, incluyendo la activación de protooncogenes y la pérdida de función de los GST. Estos fenómenos le confieren a las células ventajas en el crecimiento como la capacidad de la invasión regional, y en última instancia, la propagación metastásica. A pesar de la evidencia de la programación de ciertos eventos mutacionales, el factor que parece ser determinante es la acumulación de mutaciones y no el orden o la fase de la tumorigénesis en que se producen [43,44].

#### **1.5 Cáncer de mama**

##### **1.5.1 Epidemiología del CaMa**

La organización panamericana de la salud (OPS), señala que el CaMa es el más frecuente en mujeres de América Latina y el Caribe; se estima que en 2008 se diagnosticaron poco más de 320 mil mujeres con este padecimiento y se calcula que para el 2030 se incrementará en un 60 por ciento [45].

En México, el CaMa ocupa el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en mujeres. Representa 11.34% de todos los casos de cáncer. El grupo de edad más afectado se encuentra entre los 40 y los 59 años de edad mientras que la

mortalidad por CaMa se ha incrementado un 10.9% relativo en los últimos años (de 13.06 en 2000 a 14.49 en el año 2010) [46].

### **1.5.2 Bases de la clasificación del CaMa**

Aunque la morfología tumoral permanece como la piedra angular del diagnóstico del CaMa, la clasificación molecular de los carcinomas mamarios es utilizada para determinar subconjuntos tumorales y sus implicaciones en el pronóstico y la terapia. Estudios auxiliares como inmunohistoquímica (IHC) de marcadores para receptores de hormonas (HR) como el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor humano de crecimiento epidermal 2 (HER2), pueden fungir como indicadores de pronóstico y por tal motivo son los más utilizados [47].

Los carcinomas mamarios presentan una alta heterogeneidad a nivel clínico y molecular. Por lo tanto, es útil separarlos en diferentes subconjuntos basados en su biología y respuesta terapéutica [48]. ER y PR son dos marcadores utilizados para el pronóstico clínico y la predicción de respuesta a la terapia endócrina respectivamente [49,50]. El PR sirve como un indicador de la vía de señalización de ER, lo que refleja la dependencia entre estos dos receptores, y sirve para predecir a aquellos pacientes que responderán a la terapia hormonal, ya que se requieren niveles adecuados de estrógeno para que PR sea transcrito [51]. Por lo tanto, la expresión de PR generalmente es reportada en conjunto con la expresión de ER. Los pacientes con tumores PR<sup>+</sup> tienden a tener un periodo sin enfermedad significativamente más largo y una tasa de supervivencia mayor que los pacientes cuyos tumores son PR<sup>-</sup> [52]. El receptor epidermal humano 2 (HER2 por sus siglas

en inglés) es una oncoproteína asociada a la familia del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). HER2 se expresa en niveles bajos en epitelio ductal de la mama [49]. Aproximadamente de 10 a 30% de los tumores mamarios presentan una sobreexpresión de la proteína HER2. La expresión de HER2 es un marcador independiente del pronóstico de los resultados clínicos con o sin involucramiento de los nódulos linfáticos, además el receptor está involucrado como factor predictivo para las terapias basadas en la administración de taxano o antraciclina [49]. Los tumores HER2<sup>+</sup> generalmente exhiben resistencia al tamoxifen a través de receptores moduladores del sistema endocrino y su resistencia es menor a las terapias de restricción de estrógeno que se basan en el uso los inhibidores de aromatasas [53].

### **1.5.3 Clasificación molecular de los carcinomas mamarios.**

Perou y colaboradores propusieron la primera clasificación molecular de los tumores mamarios usando un análisis de expresión de genes con microarreglos de ADN [54]. Analizaron 115 carcinomas mamarios y con base a la expresión de varios grupos de genes se clasificaron en 5 categorías, tipo basal, carcinomas con sobre expresión de HER2, luminal A, luminal B y el tipo subtipo parecido a normal [55,56]. A su vez, estos tumores pueden ser separados en ER<sup>+</sup> y ER<sup>-</sup> [57,58].

**Subtipos Luminal.** La sobreexpresión de genes asociados al epitelio luminal en carcinomas mamarios da nombre a este grupo. Los tumores luminales expresan CK8/18, GATA3 y ER. El receptor de estrógeno se encuentra altamente expresado en tumores de tipo luminal A los cuales presentan bajas tasas de expresión de genes que modulan la proliferación y un excelente pronóstico. En el caso de tumores

tipo luminal B, ER se encuentra pobremente expresado y se presenta una exacerbación de genes relacionados con la proliferación, usualmente resultan en un mayor grado histológico y peor pronóstico que el tipo luminal A [54-56,58].

**Subtipo HER2.** Los tumores en este grupo se caracterizan por tener los genes ERBB2 (formalmente HER2) amplificados en la banda 17q12 [47]. En estos tumores se presenta la expresión de HER2 y frecuentemente son negativos para PR y ER [59]. Los carcinomas que expresan HER2 y son ER<sup>+</sup> se agrupan mejor en el subtipo luminal B. Los tumores del subtipo HER2 tienden a tener un curso clínico más agresivo respecto a los de subtipo luminal [60].

**Subtipo Basal.** Estos tumores expresan genes característicos de células mioepiteliales. Como CK5, CK14, CK17, caveolinas 1 y 2, nestina, P-cadherina, CD44 y EGFR [47,60]. Adicionalmente, estos tumores generalmente son conocidos como “triple negativos” ya que son negativos para ER, PR y HER2 [61]. Los carcinomas con este subtipo presentan un curso clínico agresivo con altas tasas de proliferación y un grado histológico avanzado, presentan zonas metaplásicas, necrosis central, bordes invasivos hacia el tejido circundante y una prominente infiltración de linfocitos [60-63].

**Subtipo parecido a normal.** Estos tumores frecuentemente expresan genes de tejido adiposo y de células no epiteliales, incluyendo a células basales del mioepitelio; además de manera típica suelen agruparse con células normales del seno y fibroadenomas [60,64]. La importancia clínica de los tumores de este grupo aún no está bien determinada [60,65]. Sin embargo, algunos investigadores han

propuesto que esté subtipo está sobrevalorado ya que la mala toma de muestra puede estar creando una categoría falsa [64,66].

#### **1.5.4 Terapias contra el cáncer de mama**

**Cirugía.** La cirugía ha cambiado dramáticamente durante los últimos 20 años con la aparición de terapias de conservación del seno (TCS), muchas mujeres tienen la opción de preservar un seno cosméticamente aceptable sin sacrificar su supervivencia [67]. Las TCS se basan en la extirpación del tumor sin la remoción excesiva del tejido normal circundante, con el objetivo de proveer una cirugía equivalente a la mastectomía con una baja tasa de reincidencia del cáncer [68].

**Redioterapia postquirúrgica.** Se sabe que la radioterapia después de la operación reduce sustancialmente el riesgo de la reincidencia y reduce la mortalidad en las pacientes con CaMa. Sin embargo, el uso de la radioterapia está limitado debido a su toxicidad a largo plazo [69].

**Quimioterapia adyuvante.** La quimioterapia adyuvante se refiere a la administración de quimioterapia, terapia hormonal y/o trastuzumab (un anticuerpo monoclonal dirigido contra HER2) después de la cirugía para el tumor primario. Su propósito es eliminar o retardar la aparición subsecuente de micrometastásis. El principal estándar para determinar el tipo de quimioterapia adyuvante que se administrará se basa en la expresión de ER y PR. La terapia hormonal beneficia a pacientes que tienen carcinomas con expresión positiva a los HR, pero no para aquellos cuya expresión de dichos receptores es negativa [70].

**Quimioterapia neoadyuvante.** Es una terapia que se administra antes de realizar la cirugía. Se utiliza en el caso de carcinomas avanzados los cuales son inoperables o ya presentan un proceso inflamatorio [71]. Aunque la terapia neoadyuvante y la quimioterapia adyuvante son consideradas equivalentes en términos de supervivencia de los pacientes. La quimioterapia neoadyuvante presenta la ventaja de que brinda la oportunidad de reducir el tamaño del tumor lo que favorece la realización de TCS [72].

### **1.5.5 Pronostico del cáncer de mama**

A pesar en los avances del tratamiento para esta enfermedad, 20 a 30 % de los pacientes con CaMa temprano, experimentaran una recaída y/o metástasis [73]. En estos pacientes, la metástasis es la principal causa de muerte [74]. Los pacientes con tumores basales tienen un alto riesgo de metástasis y una baja tasa de supervivencia [75]. Kennecke y colaboradores estudiaron 3,726 pacientes con CaMa y reportaron que los tumores basales tienen una mayor frecuencia de presentar metástasis y un tiempo reducido desde la identificación de la metástasis hasta la muerte que los pacientes con tumores de tipo luminal A o B [75]. Actualmente, la quimioterapia, radiación y la cirugía son las únicas elecciones para pacientes con CaMa, pero estos tratamientos presentan resultados pobres [76]. Con lo cual surge la necesidad de terapias específicas para el CaMa [77].

### **1.5.6 Células troncales tumorales de cáncer de mama**

Durante la última década se han identificado y caracterizado células de CaMa que poseen características de troncalidad. Existe mucho interés alrededor de la función que tienen estas células troncales tumorales de CaMa (CTTM) en la enfermedad y

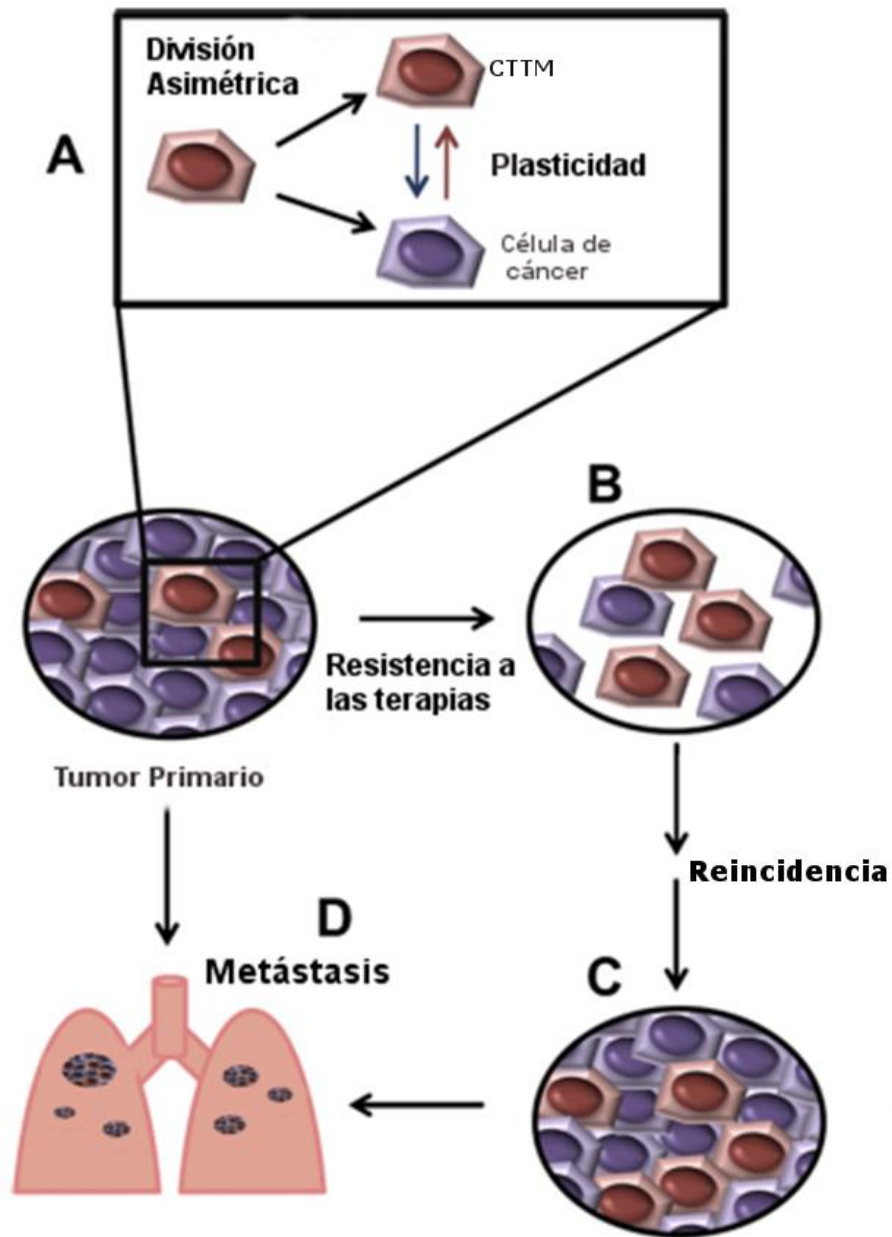


si proporcionan la llave para abrir una nueva comprensión de los mecanismos que conducen a la progresión, la resistencia a los medicamentos y recurrencia del CaMa [78].

Las células troncales tumorales (CTT) son células cancerosas con una mayor capacidad para generar tumores que las células cancerosas promedio. Las CTT poseen varios atributos importantes similares a las células troncales normales (CT). Estas células son capaces de dividirse asimétricamente para producir una CT, lo que permite la capacidad de autorenovación, y una célula progenitora, que les permite producir células cancerosas fenotípicamente diversas que constituyen los tumores [79].

Al-Hajj y colaboradores describieron una población celular en tumores de CaMa humanos caracterizadas por los marcadores de la superficie  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$  y que se encontraban desprovistas de los marcadores de linaje celular CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 y CD140b (Lin-). Ellos encontraron que la subpoblación de células  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$  era altamente tumorigénica en el modelo de xenotrasplante primario y secundario [80].

Además de las propiedades tumorigénicas y la resistencia a la quimioterapia, las CTTM han sido implicadas en la reincidencia del CaMa. La aplicación de las terapias actuales en contra del CaMa ejercen una presión selectiva sobre las CTTM ya que estas células son poco sensibles a los tratamientos actuales, además las CTTM pueden heredar la resistencia a las terapias a su progenie, promoviendo la reincidencia de la enfermedad con una evolución tumoral más agresiva y en menor tiempo [79] (Fig 2).



**Figura 2.** Funciones clave de las CTTM en la progresión de la enfermedad. La pequeña fracción de CTTM dentro de los tumores se mantiene por la autorenovación de las células cancerosas (A). Las CTTM son más resistente a la radiación y a la quimioterapia que el resto de las células tumorales (B). Las CTTM supervivientes son capaces de repoblar tumores previamente tratados y producir una recaída en la enfermedad (C). CTTM pueden ser el origen de lesiones metastásicas (D) (modificado de [79]).

El papel de las CTTM en el cuadro clínico de los pacientes con CaMa se ha analizado utilizando diferentes estrategias. El perfil de expresión genético de la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> comparado con células normales del epitelio mamario en el cual se han identificado firmas genéticas asociadas a la supervivencia celular [81]. El análisis inmunohistoquímico en muestras de tumores mamarios se identificó una correlación entre el alto porcentaje de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup> en tumores primarios y la presencia de metástasis distante, particularmente metástasis ósea [82]. La metástasis pleural de pacientes con cáncer de mama que recibieron quimioterapia se encontró enriquecida en la subpoblación CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>, lo que sugiere que la quimioresistencia de las CTTM puede estar asociada a la formación de metástasis [83].

Aunque la presencia de marcadores de las CTTM correlaciona con un pronóstico pobre en las muestras clínicas, la contribución de las células tumorales no troncales no debe ser subestimada. Por ejemplo, células cancerosas diferentes a las CTTM pueden formar metástasis *in vivo* en modelos experimentales, lo que indica que células con un fenotipo invasivo pueden encontrarse fuera del pool de CTTM. Adicionalmente, es desconocido si la población de CTTM puede dividirse y si esas subpoblaciones poseen una única propiedad tumorigénica, metastásica o de resistencia al tratamiento. Finalmente las propiedades de troncalidad asociadas a las células de cáncer pueden cambiar en diferentes microambientes, lo que sugiere que los modelos usados para el estudio de las CTTM pueden no reflejar el efecto del tratamiento clínico [79].

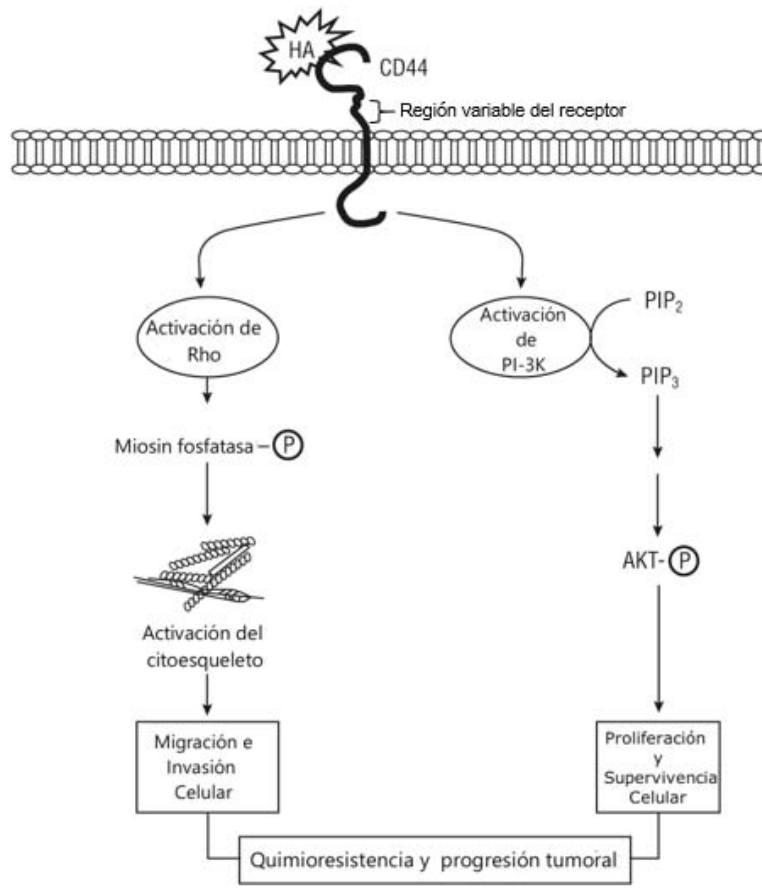
Desde la asociación entre la prevalencia de las CTTM, los resultados clínicos y la evidencia presentada que soporta las funciones clave de las CTTM en la biología del cáncer, se ha propuesto que estas células podrían ser blancos terapéuticos. Por tanto, se han evaluado diferentes estrategias, incluyendo elegir como objetivo marcadores celulares o transportadores de membrana, la interrupción de cascadas de señalización intracelulares y la alteración del microambiente de las CTTM [79].

A pesar del éxito de algunos de estos tratamientos en modelos preclínicos, los estudios toxicológicos y farmacológicos sugieren que aún se requieren pruebas antes de realizar ensayos en humanos [79].

#### **1.5.7 Ácido Hialurónico y CD44**

El ácido hialurónico (HA) se une específicamente a CD44, una familia multifuncional de glicoproteínas transmembranales expresadas en numerosas células y tejidos, incluyendo células tumorales y varios tejidos de carcinomas [84-86]. CD44 generalmente es expresado en una variedad de isoformas que se generan a partir de un sólo gen por splicing alternativo [87]. El receptor CD44 también se encuentra expresado en CTT que tienen la habilidad única de iniciar tumores [80]. CD44 es propuesto como un marcador de superficie en CTT [80]. La unión CD44-HA produce una cascada de señalización que lleva a la progresión tumoral, la invasión y la metástasis [88]. El receptor CD44 normalmente se encuentra asociado a la interacción célula-célula y en la adhesión de la célula a la matriz extracelular, además de intervenir en la migración celular. CD44 une principalmente ácido hialurónico, aunque también es receptor en su región variable para colágeno, fibronectina, laminina y sulfato de condroitina, los cuales son importantes

componentes de la matriz extracelular [89]. Muchos tipos de células cancerosas del tumor primario o bien las células provenientes de metástasis expresan altos niveles de CD44 o variantes de este receptor. Dado que el bloqueo de la interacción CD44-HA inhibe el crecimiento local del tumor y la diseminación metastásica, el CD44 puede conferir una ventaja de crecimiento a las células de CaMa [90]. Por este motivo, se ha propuesto a CD44 como un blanco farmacológico para la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos contra el CaMa [91] (Fig. 3).



**Figura 3.** La activación de CD44 al por el HA produce cascadas de señalización que regulan la migración, invasión, proliferación y supervivencia de células cancerosas. Lo que conlleva a la progresión tumoral y la quimioresistencia [88] (modificado de [92]).

## II. Antecedentes

La búsqueda de antagonistas al receptor CD44 se realizó mediante cribado virtual. El cribado virtual es una metodología computacional que permite predecir la interacción de una proteína contra una base de datos de fármacos mediante acoplamiento molecular (AM) [93]. El AM es una herramienta computacional ampliamente usada que predice el modo y la afinidad de unión entre dos moléculas con estructura conocida [94]

Este cribado virtual consistió en descargar la estructura del dominio de CD44 humano que reconoce HA de la base de datos Protein Data Bank (PDB, NCBI USA) con número de acceso 1UUH [95]. Para los fármacos, se utilizó la base de datos ZINC<sup>12</sup> que compila las estructuras de fármacos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de América (FDA) para su uso clínico en humanos [96]. Se incluyeron compuestos tanto sintéticos como naturales, lo que produjo una biblioteca virtual de 13066 compuestos. Para determinar la región del dominio de unión a HA a donde se realizaría el AM, se evaluó la probabilidad de unión de fármacos a dominios específicos, utilizando el servidor DogSiteScorer [97]. Lo que permitió seleccionar dentro del dominio de unión a HA una región conocida como módulo de unión a ácido hialurónico, en donde se realizó el acoplamiento molecular de los más de 13 mil compuestos utilizando los programas AutoDock 4.2, AutoDock Vina 1.1.2 y DSX\_089 [98-100].

La evaluación del AM fue estimada mediante el valor de energía libre de unión ligando-receptor en el caso de AutoDock y AutoDock Vina, mientras que en el caso de DSX\_089, el programa reevalúa el acoplamiento molecular AutoDock y

AutoDock Vina arrojando un valor arbitrario de unión ligando-receptor. Para poder comparar los resultados obtenidos para los diferentes métodos, se obtuvo un Zscore que es una normalización para cada uno de los métodos y que considera el promedio y la desviación estándar de los resultados de todos los compuestos. Finalmente se obtuvo un Zscore consenso, que considera los Zscore obtenidos por las diferentes programas de AM [101]. Basados en el Zscore consenso se seleccionaron 10 compuestos como posibles antagonistas para CD44.

Se procedió entonces, a refinar del AM mediante simulaciones de dinámica molecular (DM) y cálculo de cambio de energía libre total del complejo ligando-receptor con respecto al tiempo. La DM se realizó utilizando el programa AMBER 11 [102]. Para este fin se optimizó tanto la estructura del ligando, como de la proteína y el complejo ligando-proteína mediante el programa Antechamber y se equilibraron los sistemas mediante la minimización y el calentamiento gradual. Finalmente se realizó la simulación durante 100 ns utilizando un ensamble a temperatura y presión estándar. El cálculo de la energía libre se realizó para 2500 poses obtenidas de los últimos 25 ns de simulación en equilibrio mediante el método MMPBSA implementado por el programa AMBER 11. Para los compuestos seleccionados el cálculo de la constante de afinidad se encuentra en el rango de -14 a -12 Kcal/mol. A pesar de que se seleccionaron al menos 10 fármacos mediante AM, en el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad y la inhibición en la adhesión celular a HA de 4 de ellos.

### **III. Hipótesis**

Los compuestos seleccionados mediante cribado virtual dirigido contra la fracción del receptor CD44 que une HA tendrán un efecto sobre la adhesión a HA de células con alta expresión del marcador CD44 como lo es la línea Hs578T

### **IV. Objetivo**

Analizar el efecto *in vitro* de compuestos seleccionados mediante cribado virtual en contra del receptor CD44 sobre la viabilidad y adhesión a HA de células Hs578T provenientes de carcinoma mamario.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Analizar el efecto de cuatro compuestos seleccionados mediante cribado virtual sobre la viabilidad celular.
- Evaluar la capacidad de adhesión a HA de las células de carcinoma mamario Hs578T en presencia de los compuestos seleccionados.

### **V. Metodología**

#### **5.1 Compuestos**

Los compuestos fueron seleccionados mediante ensayos *in silico* de Acoplamiento y Dinámica Molecular contra del dominio de unión a HA del receptor CD44, el cual, ha sido descrito como un marcador de CTT [80], a partir de una biblioteca virtual de más de 13 mil fármacos. Dado que los experimentos se han realizado bajo un convenio de confidencialidad los fármacos evaluados se han identificado con los números 1632, 9805, 4807 y 1276.



## **5.2 Material Biológico**

La línea celular humana utilizada para realizar estos ensayos fue la Hs578T (ATCC), obtenida de carcinoma de glándula mamaria humana y con características de carcinoma de tipo basal, el cual es el tipo más agresivo de CaMa [60]. Además la línea celular tiene una expresión reportada del marcador CD44 superior al 96 % [103]. El mantenimiento de la línea celular se llevo a cabo con medio DMEM Glucosado (Gibco, 4.5 g/L glucosa), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células se incubaron a temperatura constante de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se cosecharon con Tripsina TripLe Express (Gibco), se contaron en un hematocitometro donde se evaluó la viabilidad por exclusión de azul tripán.

## **5.3 Detección del receptor CD44 en la línea celular Hs578T**

Se cosecharon células con tripsina TrypLe Express, se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X suplementada con 10% de SFB, se les realizó un conteo por medio de exclusión de azul tripan y se preparó una suspensión celular con  $1 \times 10^6$  cel/mL, de la cual se tomaron alícuotas de 0.1 mL para el control de autofluorescencia (AF), el cual es el valor de fluorescencia intrínseco de las células en cultivo celular. Adicionalmente se tomaron 0.1 mL para aquellas células que se tiñeron con el anticuerpo anti-CD44. Al tubo de AF se le añadieron 2  $\mu$ L de PBS 1X y al de tinción de CD44 se agregaron 2  $\mu$ L del anticuerpo APC Mouse Anti-Human CD44 (BD Pharmigen). Los tubos se dejaron en agitación a 150rpm a 4°C y en ausencia de luz durante 30 minutos. Después se centrifugaron a 500 g durante 5 min y se les eliminó el sobrenadante. El contenido de ambos tubos se resuspendió en 300  $\mu$ L de PBS 1X y se leyeron mediante citometría de flujo

(FACS Aria III), el tubo de AF se utilizó como control de ensayo considerando positivas para el receptor CD44 a todas aquellas células con una intensidad de fluorescencia superior a la AF, además dicho control se utilizó para seleccionar una población homogénea en tamaño y granularidad, además de seleccionar los eventos singuletes a partir de 10 000 eventos.

#### **5.4 Prueba de viabilidad por reducción del MTT**

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de  $5.0 \times 10^3$  células/pozo en medio DMEM glucosado suplementado con SFB (10%). Las placas se incubaron durante 12 horas a temperatura constante de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión de las células. Después se le añadieron 100 µL de medio DMEM glucosado suplementado con 10% de SFB conteniendo el compuesto a evaluar en las siguientes concentraciones: 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µM. Además se destinaron pozos para el control adecuado: en el caso de los compuestos 1632 y 1276 se utilizó medio suplementado; para el compuesto 9805 se usó medio suplementado con 2.0% de etanol y para el compuesto 4867 el control se componía de medio suplementado con 0.25 % de dimetil sulfoxido (DMSO). Cada tratamiento se realizó por quintuplicado y se evaluó la citotoxicidad a las 24 y 48 horas con cada fármaco.

Al final de la exposición se evaluó la viabilidad de las células tratadas mediante el ensayo colorimétrico de reducción de bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol -2-il) 3-3-5-difenil tetrazolio (MTT). Este método se basa en la capacidad de las células vivas para reducir el MTT soluble en agua y de color amarillo, a formazan de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 3-3-5-difenil formazan), de color púrpura, mediante la acción de la succinil-deshidrogenasa mitocondrial. Para realizar esta prueba se adicionaron 20

$\mu\text{L}$  de solución de MTT al 0.05% al medio existente en cada pozo. Se procedió a incubar durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  y posteriormente se retiró el medio. Enseguida, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfoxido (DMSO) para disolver los cristales de formazan de MTT. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek Epoch microplate reader) siendo la absorbancia una media proporcional al número de células vivas en el pozo [104]. La comparación estadística se realizó tomando como 100% de viabilidad a los respectivos controles mediante la prueba estadística de ANOVA con corrección Dunett con una confianza del 95% usando el programa computacional GraphPad Prism 6.0.

### **5.5 Ensayos de Adhesión a Ácido Hialurónico**

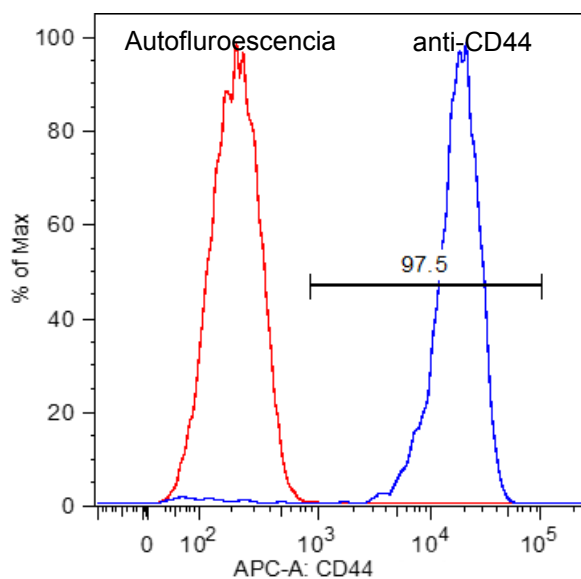
El ensayo se realizó según el protocolo descrito por Humphries [105]. Placas de 96 pozos se recubrieron con 6.25  $\mu\text{g}$ /pozo de HA. Se les añadieron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de una solución de albúmina (Amresco) a 10 mg/mL y se dejaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 1 hora. Mientras tanto, se prepararon diluciones seriadas de cada fármaco en concentraciones 2X en medio DMEM glucosado con 1% de SFB. Las concentraciones finales evaluadas de cada fármaco fueron: 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ . Para evaluar la mayor inhibición de la adhesión celular a HA mediada por CD44, se utilizó un anticuerpo dirigido selectivamente en contra de la fracción del receptor CD44 que un HA y que se ha reportado como un antagonista selectivo de dicho receptor [106]. Este anticuerpo, conocido con el nombre de IM7 se utilizó en una proporción 1:10 en relación al volumen final utilizado. Adicionalmente, la células Hs578T usadas para el ensayo se cosecharon usando tripsina (TrypLE

Express, Gibco), se contaron por el método de azul tripan y se preparó una suspensión celular de trabajo  $4 \times 10^5$  células/mL en medio DMEM glucosado con 1% de SFB. La suspensión celular se mezcló en volúmenes iguales con cada una de las concentraciones de fármaco a evaluar o con el anticuerpo bloqueador. Las suspensiones celulares con los fármacos y el anticuerpo se incubaron a 37°C en agitación a 300 rpm durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo y el de bloqueo de las placas de 96 pozos, se retiró la solución de albúmina de las placas recubiertas y se colocaron 100  $\mu$ L/pozo (20 000cel/pozo) de cada suspensión celular con fármaco o anticuerpo IM7, las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. Como controles, se incluyeron células tratadas con medio DMEM glucosado con 1% de SFB adicionado con el solvente adecuado (PBS o DMSO para el compuesto 9805 y 4807 respectivamente). Además se incluyó el control de bloqueo que contenía células Hs578T en medio sin tratar en pozos previamente recubiertos con albúmina al 1%. Al finalizar el tiempo del ensayo se fijaron las células con una solución de paraformaldehído al 4% y se tiñeron las células con cristal violeta 0.1 % durante 1 hora y se cuantificó la absorbancia de cada pozo mediante un lector de microplacas a 570nm (Bio-Tek Epoch microplate reader). En ensayos homólogos se comprobó que la cuantificación podía realizarse mediante tinción con MTT obteniéndose resultados comparables entre sí. La comparación estadística se realizó tomando como 100% de adhesión a los respectivos controles mediante la prueba estadística de ANOVA con corrección Dunett con una confianza del 95% usando el programa computacional GraphPad Prism 6.0.

## VI. Resultados

### Detección del receptor CD44 en la línea celular Hs578T

Se determinó la presencia del marcador CD44 en la línea celular Hs578T mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico contra CD44. Se observó que el 97.5% de la población celular evaluada presentó la marca positiva para CD44. Este resultado validó el uso de esta línea celular como modelo para ensayos que evalúen características o funciones asociadas a la expresión de dicho receptor. De esta forma, se justifica el uso de la línea celular Hs578T en los ensayos de caracterización de potenciales antagonistas de CD44 realizados en este trabajo.



**Figura 4.** Detección del receptor CD44 en la línea celular Hs578T mediante anticuerpo dirigido contra el receptor CD44.

### Viabilidad celular

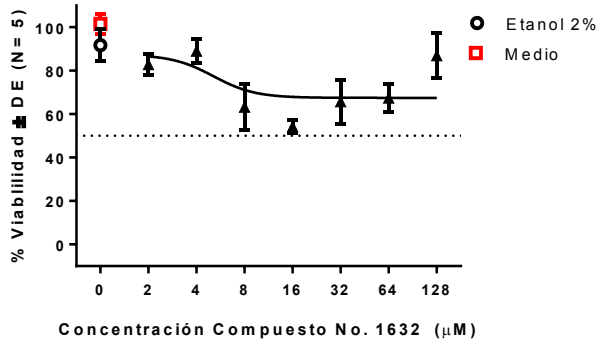
La viabilidad se evaluó por la técnica de reducción de MTT. Con la finalidad de conocer si los compuestos seleccionados mediante el cribado virtual tenían un

efecto citotóxico en la línea celular Hs578T y poder establecer una correlación entre cambios en la viabilidad y efecto sobre la adhesión de las células a HA. En la figura 5.a y 5.b se muestra que el fármaco 1632 no es citotóxico a las 24h y presentó un efecto citotóxico estadísticamente significativo a las 48h de exposición al fármaco en comparación con su respectivo control a todas las concentraciones evaluadas, sin rebasar el 30 % de citotoxicidad. Por esto, no fue posible calcular su IC50. El compuesto 9805 es citotóxico para las células aún por debajo de la concentración 2  $\mu\text{M}$ . Se puede observar que a concentraciones mayores a 8  $\mu\text{M}$  a 24 horas (Fig 5.c) de y 4 $\mu\text{M}$  a 48 horas (Fig 5.d) de exposición al fármaco se presenta el 100% de efecto citotóxico. El valor de IC50 tanto a 24 como a 48 horas de tratamiento fue menor a 2  $\mu\text{M}$ , siendo este compuesto el más citotóxico de los cuatro estudiados. El fármaco 4807 presentó efecto sobre la viabilidad celular estadísticamente significativo a 24 horas en las concentraciones de 32  $\mu\text{M}$ , 64 $\mu\text{M}$  y 128  $\mu\text{M}$  disminuyendo la viabilidad de 30 a 50 % (Fig 5.e). Para este fármaco el valor de IC50 a 24h de exposición fue superior a 128  $\mu\text{M}$ . A 48h el efecto citotóxico fue mayor, ya que se presentó una disminución en la viabilidad en todas las concentraciones estudiadas en un rango de 20 a 80 % respecto al control (Fig 5.f) y se obtuvo una IC50 de 22.88 $\mu\text{M}$  mediante el cálculo realizado por el método gráfico. Finalmente el fármaco 1276 no presentó ningún efecto citotóxico estadísticamente significativo en comparación con su control en ninguna de las concentraciones y tiempos evaluados (Fig 5.g y 5.h). Las IC50 estimadas para este fármaco fueron mayores a 128 $\mu\text{M}$ . Lo que indica que de los 4 fármacos seleccionados al menos tres son pobremente citotóxicos.

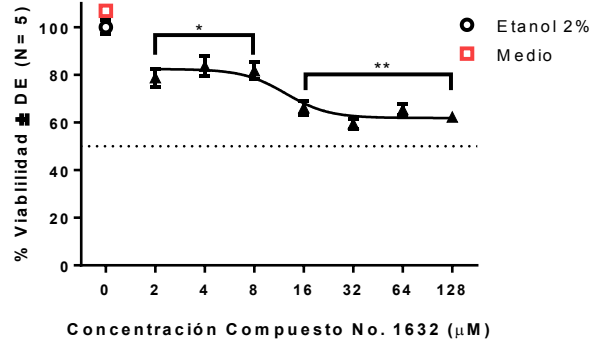
24h

48h

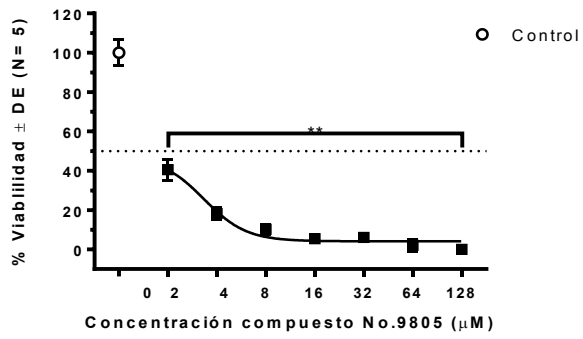
a



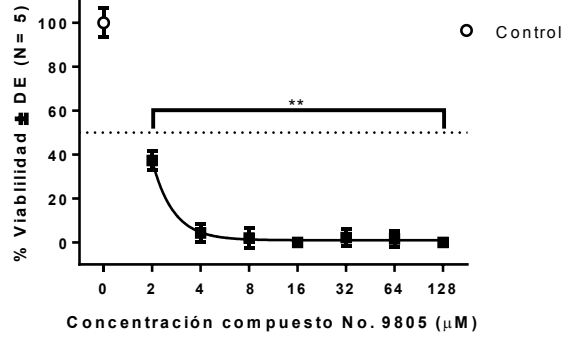
b



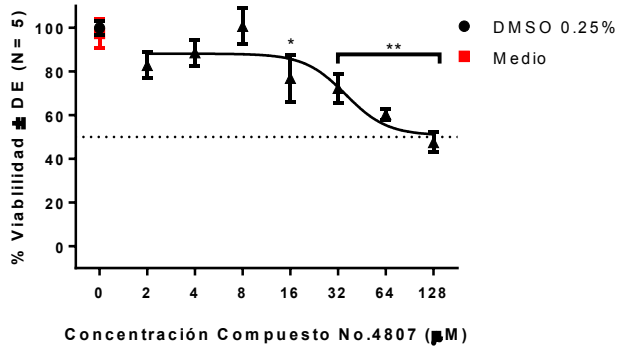
c



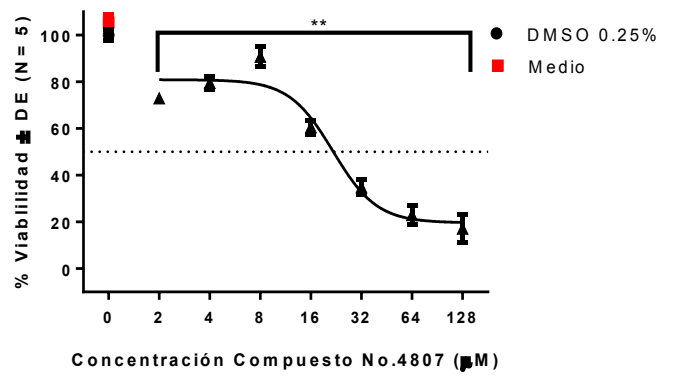
d

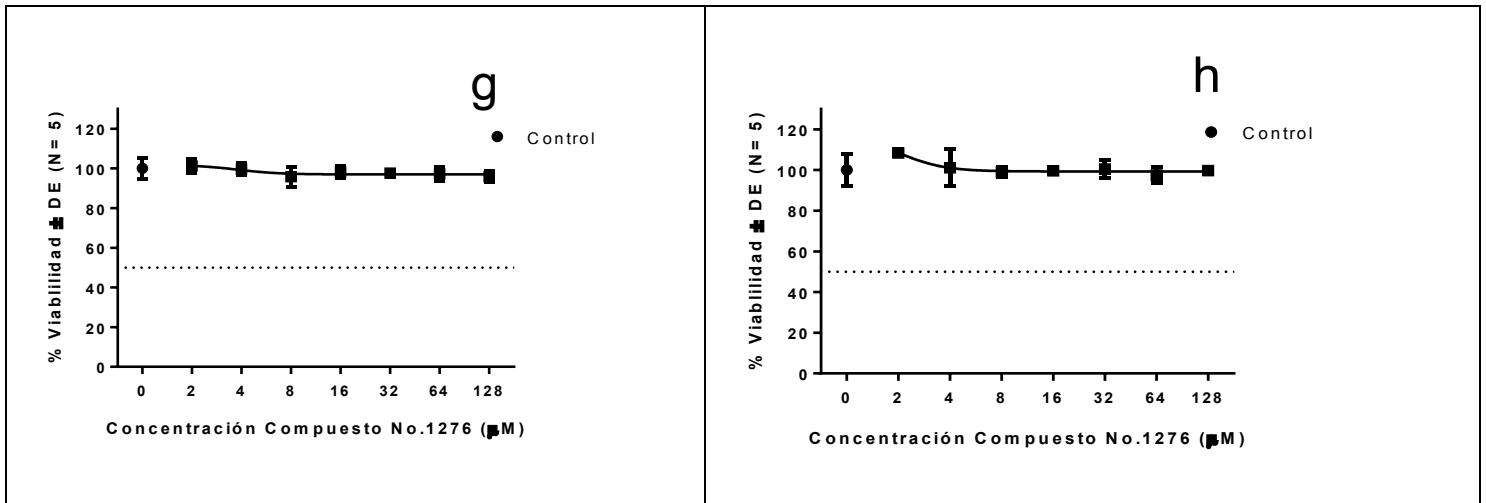


e



f





**Figura 5.** Viabilidad de las células Hs578T con los diferentes fármacos a 24 y 48 horas de exposición a los fármacos. \*P< 0.05; \*\* P< 0.0001 Vs Control sin tratamiento.

**Tabla 1.** Estimación de IC50 de los compuestos evaluados.

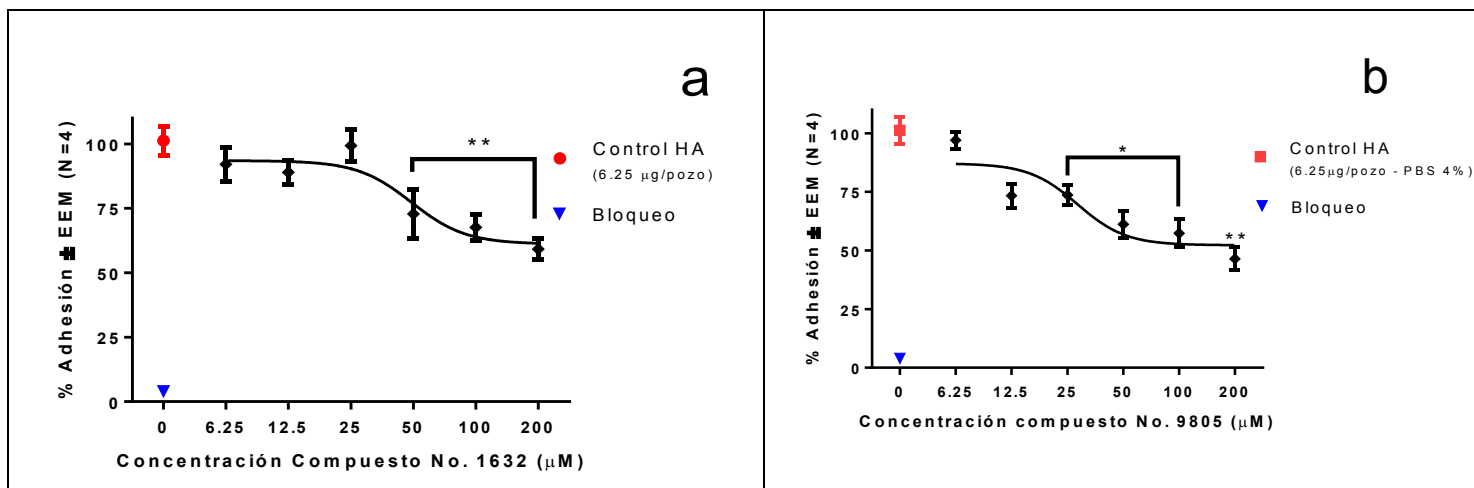
	<b>IC50 de los Fármacos (μM)</b>			
<b>Tiempo (h)</b>	<b>1632</b>	<b>9805</b>	<b>4807</b>	<b>1276</b>
<b>24</b>	<b>&gt;128</b>	<b>&lt;2</b>	<b>&gt;128</b>	<b>&gt;128</b>
<b>48</b>	<b>&gt;128</b>	<b>&lt;2</b>	<b>22.88</b>	<b>&gt;128</b>

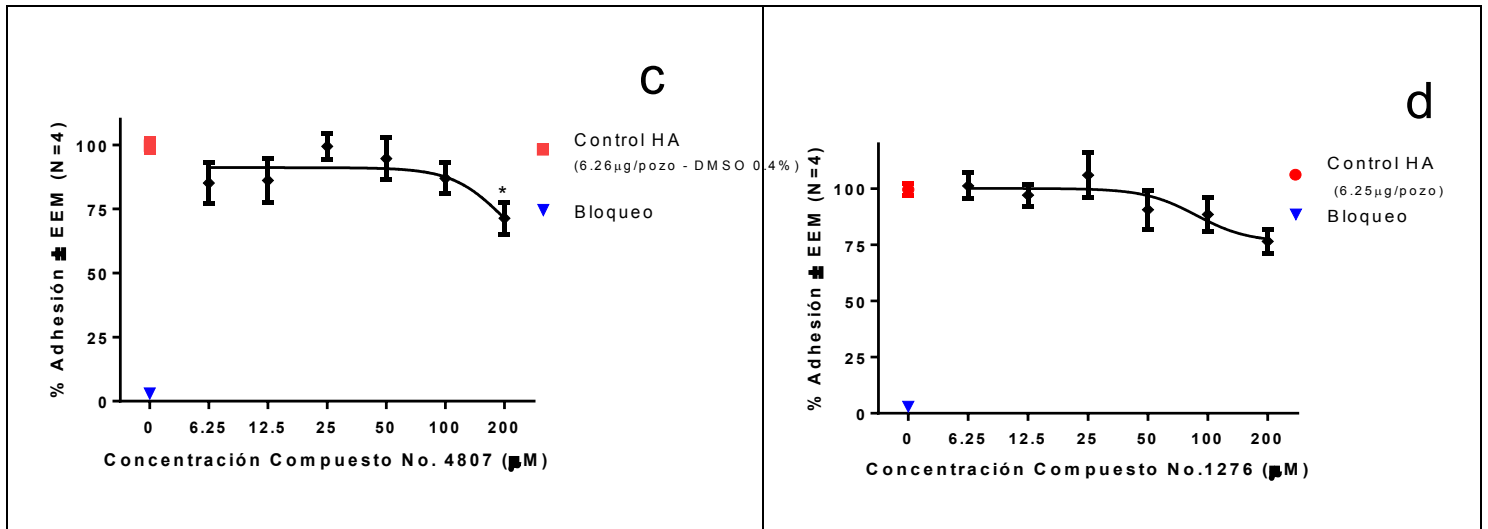
### **Adhesión celular**

Con la finalidad de evaluar si los fármacos seleccionados por su capacidad teórica de unirse al dominio de CD44 que permite el reconocimiento de HA son capaces de bloquear la unión entre CD44 y HA se diseñó un experimento para evaluar dicha interacción de manera funcional. Sí los fármacos bloquean al receptor CD44 entonces la adhesión al HA se vería modificada. Los resultados obtenidos se



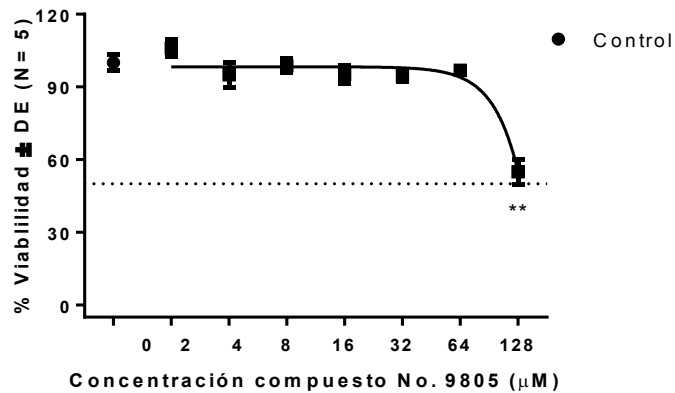
presentan en la figura 6. Se observa que para el compuesto 1632 sólo reduce significativamente (43 %) la adhesión a la concentración más alta evaluada (200 $\mu$ M) (Fig.6.a, Tabla 2). El fármaco 9805 mostró diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu$ M con una disminución máxima de la adhesión respecto al control de 55 % (Fig. 6.b, Tabla 2). Para el fármaco 4807 sólo a la concentración de 200 $\mu$ M disminuyó la adhesión (38.6 %) (Fig 6.c, Tabla 2). Finalmente el fármaco 1276 no mostró diferencias significativas, aunque la tendencia sugiere una ligera disminución a partir de 50 $\mu$ M hasta presentar la mayor reducción a 200 $\mu$ M de 32 % (Fig 6.d, Tabla 2). Los resultados demuestran que la presencia de los fármacos 1632, 9805 y 4807 afecta la adhesión de las células a HA. Sin embargo, para los fármacos 9805 y 4807 no puede descartarse que la reducción en la adhesión a HA sea consecuencia de la citotoxicidad.





**Figura 6.** Adhesión de células Hs578T a HA (6.25 µg/pozo) en presencia de los diferentes fármacos en células Hs578t. \*P< 0.05; \*\* P< 0.0001 Vs Control sin tratamiento.

Dado que el fármaco 9805 es altamente citotóxico a 24 y 48 horas. Fue necesario evaluar la citotoxicidad del fármaco en las condiciones de los ensayos de adhesión. Los resultados muestran que solamente a la concentración de 128µM a 1.5 horas de exposición al fármaco se reduce significativamente la viabilidad (45.1% en comparación con el control) (Fig. 7). Lo que sugiere que la disminución en la adhesión a HA observada en concentraciones cercanas a 128 µM del fármaco 9805 puede producirse por el efecto citotóxico del fármaco y no necesariamente a la inhibición de la interacción CD44-HA. Sin embargo, los resultados muestran que el fármaco induce una inhibición en la adhesión a HA estadísticamente significativa y dependiente de la dosis a partir de la concentración 25µM. Lo cual sugiere que la reducción en la adhesión a HA puede deberse a una respuesta combinada del efecto citotóxico y la inhibición CD44.

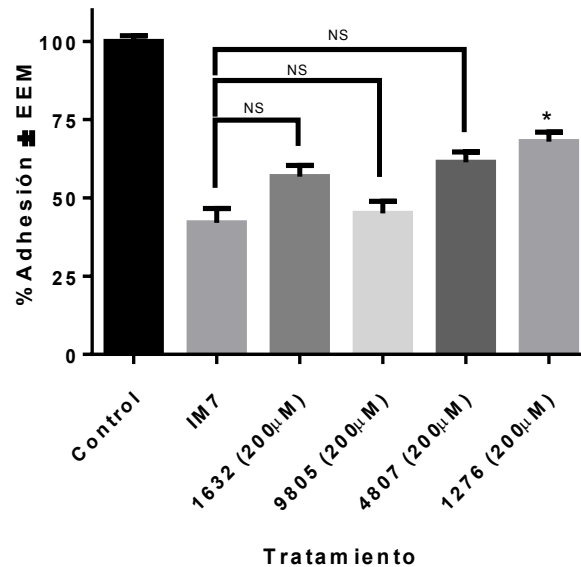


**Figura 7.** Viabilidad de las células Hs578T con el fármaco 9805 a 1.5 horas de exposición al fármaco.

\*P < 0.05; \*\* P < 0.0001 Vs Control.

La disminución en la adhesión celular a HA en presencia de los fármacos seleccionados se comparó con la reducción en la adhesión ocasionada por un anticuerpo con la capacidad de bloquear específicamente la interacción CD44-HA. El ensayo se realizó con la finalidad de evaluar la inhibición máxima de la adhesión de las células a HA cuando se presenta un bloqueo completo del receptor CD44 en su fracción que reconoce HA [106]. En la figura 8 y la tabla 2 se presenta la comparación entre las concentraciones más altas evaluadas (200 µM) de los fármacos seleccionados y la disminución ocasionada por el anticuerpo bloqueador IM7. La reducción máxima esperada en la adhesión celular al utilizar el anticuerpo bloqueador de CD44 es del 58 % (Tabla 2), similar a la que presentó el fármaco 9805 (55 %) aunque la reducción puede deberse en parte a la citotoxicidad del fármaco. El fármaco 1632 disminuyó la adhesión en 43 %; a la misma concentración el fármaco 4807 disminuyó la adhesión celular en 38.6 % sin que estos tres fármacos presentaran diferencias estadísticamente significativas en comparación

con la disminución de la adhesión presentada por el anticuerpo IM7. Finalmente el fármaco 1276 redujo la adhesión en un porcentaje de 32 %, valor al cual existe diferencia significativa respecto al la inhibición ocasionada por el anticuerpo bloqueador. Lo cual sugiere que el efecto (bloqueo) es pobre, ya sea por un antagonismo parcial o por una afinidad menor que los otros fármacos. Los compuestos 1632, 9805 y 4807 a 200  $\mu$ M son los más efectivos para el bloqueo de la adhesión celular ya que no existe diferencia estadísticamente significativa en comparación a cuando se bloquea específicamente al receptor CD44. Además, en el caso del fármaco 1632 no se presenta efecto citotóxico en al menos 24 horas de exposición.



**Figura 8.** Comparación de adhesión de células Hs578T a HA (6.25  $\mu$ g/pozo) en presencia de los diferentes fármacos. \*P< 0.05 Vs IM7.

**Tabla 2.** Porcentaje de reducción en la adhesión a HA con los diferentes tratamientos evaluados.

Tratamiento	IM7	1632 (200µM)	9805 (200µM)	4807 (200µM)	1276 (200µM)
% Reducción de la Adhesión Vs Control	58	43	55	38.6	32

## VIII. Discusión

A fin de conocer la proporción de la línea celular Hs578T que expresaba CD44 se evaluó dicho marcador mediante citometría de flujo. Se descubrió que 97.5% de células son positivas para CD44. Lo cual justifica el uso de esta línea celular para los ensayos realizados posteriormente. Reportes previos indican que la línea celular Hs578T proviene de un carcinoma mamario de tipo basal y tiene una expresión del receptor CD44 superior al 96 % [103]. Los carcinomas mamario de tipo basal presentan un cuadro clínico más agresivo y una marcada resistencia a la quimioterapia [62]. La subpoblación celular en tumores de CaMa con fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low</sup> se conoce como CTTM y es altamente tumorigénica [80]. Además de las propiedades tumorigénicas y la resistencia a la radio y quimioterapia, las CTTM han sido implicadas en la reincidencia del CaMa [79]. Debido a estas características se decidió utilizar dicha línea celular como modelo para los ensayos de citotoxicidad y adhesión a HA pues la hipótesis de este trabajo considera que los fármacos seleccionados mediante cribado virtual bloquean CD44.

Lo ensayos de viabilidad celular fueron utilizados para evaluar la citotoxicidad de los fármacos seleccionados a fin de conocer si el efecto en la adhesión celular a HA era

consecuencia de la inhibición de la interacción CD44-HA o a causa de una reducción en la viabilidad. El fármaco 9805 presentó el mayor efecto citotóxico respecto a todos los fármacos probados tanto a 24 como a 48 horas, seguido del fármaco 4807, 1632 y finalmente el fármaco 1276 el cual no presentó reducción significativa a la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones y tiempos estudiados. En ensayos posteriores se demostró que a las condiciones en que se realizaron los ensayos de adhesión se presentaba el efecto citotóxico del compuesto solamente para las concentraciones mayores a 64  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, en la evaluación de la adhesión con ese fármaco se descubrió que se presentaba una reducción de la adhesión estadísticamente significativa a partir de la concentración de 25  $\mu\text{M}$  y dicho efecto aumentó conforme la dosis se incrementaba. Esto sugiere que los resultados obtenidos en cuanto a la disminución de la adhesión son independientes al efecto citotóxico del fármaco o bien, a partir de concentraciones superiores a 64  $\mu\text{M}$  el efecto de disminución de adhesión se ve potencializado por la citotoxicidad generada por el fármaco. En los ensayos de adhesión, la interacción con HA de receptores CD44 libres en la membrana celular pudiera proporcionar a las células protección a la citotoxicidad. Lo anterior se justifica en que la interacción CD44-HA se ha demostrado que inhibe vías de señalización relacionadas con la apoptosis y que promueve la quimioresistencia [107]. Si bien los fármacos probados se unen al CD44, no necesariamente su efecto es antagónico al efecto que causa el HA. Ya que como se demostró, el fármaco 1276 presentó un antagonismo parcial hacia el receptor CD44. El antagonismo de los fármacos hacia CD44 se demostraría con ensayos de unión a ligando, que evalúan experimentalmente la afinidad de los fármacos por el CD44 [108] o mediante la evaluación de las vías de señalización

promovidas por la interacción CD44-HA en presencia y ausencia de los fármacos. Adicionalmente, no se demostró que la citotoxicidad de los fármacos esté relacionada a su interacción con CD44. El efecto puede deberse a que los fármacos probados presentan otros blancos en las células, ya que como se mencionó, provienen de una librería de fármacos con usos terapéuticos conocidos, por ejemplo, uno de los fármacos evaluados tiene como blanco conocido la Topoisomerasa II, a la cual bloquea impidiendo la replicación del ADN, que finalmente conduce a la muerte de las células [109].

Los ensayos de adhesión se realizaron como una evaluación funcional de la interacción del CD44 con su principal ligando HA en presencia de los fármacos seleccionados. En estos ensayos se descubrió una reducción de la adhesión estadísticamente significativa para tres de los cuatro compuestos probados. Lo que demuestra que al menos 3 de los 4 fármacos evaluados afectan la interacción entre el CD44 y su ligando. La importancia de esto radica en que se sabe que la interacción CD44-HA promueve la proliferación celular, la migración y la invasión [110]. Por tanto, una inhibición aunque sea parcial por algún agente podría reducir la tasa de proliferación celular, la migración y la invasión o retrasar dichos fenómenos. Adicionalmente, se demostró que la reducción en la adhesión celular a HA ocasionada por tres fármacos es similar a la disminución ocasionada cuando se bloquea específicamente la interacción CD44-HA. Los resultados sugieren que es posible bloquear la interacción CD44-HA utilizando agentes químicos. Lo cual proporciona información y justificación para el estudio de estos fármacos como agentes terapéuticos con una posible aplicación adyuvante a los tratamientos

actuales para el CaMa. Sin embargo, aunque los resultados sugieren una disminución de la interacción del CD44 con HA la evaluación de los fármacos como posibles agentes terapéuticos para el CaMa requiere que se realicen más ensayos para evaluar el efecto que tienen sobre la proliferación celular, la migración, la invasión además de probarse en modelos *in vivo*.

Finalmente, los resultados presentados en este trabajo validan el uso de la herramienta de cribado virtual para la selección de agentes químicos que puedan unirse al sitio específico de unión de receptores celulares, en este caso CD44. Además, sugieren que es posible encontrar agentes químicos que bloqueen al receptor CD44 el cual está descrito como un marcador de CTT no sólo de mama si no de varios otros tipos de cáncer [111], lo que representa un importante herramienta para la investigación y el desarrollo de agentes terapéuticos con mayor selectividad hacia las CTT, a fin de proporcionarles a los pacientes tratamientos más efectivos para el tratamiento del cáncer.

## **IX Conclusiones**

- Se presentó una disminución en la adhesión celular a HA con al menos tres de los cuatro fármacos estudiados. De los cuales en al menos uno la inhibición de la adhesión a HA no está relacionada con su efecto citotóxico.
- La reducción en la adhesión celular a HA de los fármacos 1632, 9805 y 4807 es de magnitud similar a la ocasionada por el anticuerpo bloqueador específico de la interacción CD44-HA. Lo cual sugiere que los fármacos se unen a la fracción del CD44 que une HA.



- Tres de los cuatro fármacos estudiados presentaron un efecto significativo en la disminución de adhesión celular a HA, lo que indica que tienen la capacidad para bloquear la interacción CD44-HA.
- Los resultados validan el uso del cribado virtual como herramienta de selección de fármacos con capacidad de unirse al receptor CD44.
- Se requieren evaluaciones más extensas de los fármacos seleccionados para determinar sus efectos sobre otros procesos en lo que interviene CD44 como la migración e invasión celular.
- Los ensayos presentados sugieren que los fármacos evaluados podrían generar tratamientos adyuvantes para el tratamiento del CaMa una vez realizada una evaluación más extensa de sus propiedades en contra de los carcinomas mamarios.

## Referencias

1. American Cancer Society (2014) What is Cancer?
2. Organización Mundial de la Salud (OMS) (2006) Cara a cara con la enfermedad crónica: el Cáncer.
3. Organización mundial de la Salud (OMS), GLOBOCAN (2012) Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
4. Lodish H, Berk A, Zipursky S (2000) Section 24.1, Tumor Cells and the Onset of Cancer In: Freeman WH, editor. Molecular Cell Biology. 4th ed. New York.
5. Lodish H, Berk A, Zipursky S (2000) Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. In: Freeman WH, editor. Molecular Cell Biology. 4th ed. New York.
6. Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. Cell 73: 1059-1065.
7. Norbury C, Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. Annu Rev Biochem 61: 441-470.
8. Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. Cell 71: 505-514.
9. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366: 704-707.
10. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, et al. (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. Cell 71: 323-334.
11. Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, et al. (1992) Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 10557-10561.
12. Diaz MO, Rubin CM, Harden A, Ziemin S, Larson RA, et al. (1990) Deletions of interferon genes in acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 322: 77-82.
13. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, et al. (1994) Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res 54: 3396-3397.
14. Massague J (2008) TGFbeta in Cancer. Cell 134: 215-230.
15. Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 67: 753-791.
16. Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, et al. (1987) Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. Cancer Res 47: 707-712.
17. Dickson RB, Kasid A, Huff KK, Bates SE, Knabbe C, et al. (1987) Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 beta-estradiol or v-Ha-ras oncogene. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 837-841.
18. Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A (2009) Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. Curr Opin Cell Biol 21: 166-176.

19. Ikushima H, Miyazono K (2011) Biology of transforming growth factor-beta signaling. *Curr Pharm Biotechnol* 12: 2099-2107.
20. Moses H, Barcellos-Hoff MH (2011) TGF-beta biology in mammary development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a003277.
21. Tan AR, Alexe G, Reiss M (2009) Transforming growth factor-beta signaling: emerging stem cell target in metastatic breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 115: 453-495.
22. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Aranome AM, Cecchini R (2013) Screening of circulating TGF-beta levels and its clinicopathological significance in human breast cancer. *Anticancer Res* 33: 737-742.
23. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708.
24. Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S (1995) Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J* 14: 6136-6147.
25. Chipuk JE, Green DR (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18: 157-164.
26. Strasser A, Jost PJ, Nagata S (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30: 180-192.
27. Timmer JC, Salvesen GS (2007) Caspase substrates. *Cell Death Differ* 14: 66-72.
28. Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59.
29. Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442.
30. Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, Argonza RH, Morrow JE, et al. (1997) BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet* 60: 1031-1040.
31. Takahashi H, Chiu HC, Bandera CA, Behbakht K, Liu PC, et al. (1996) Mutations of the BRCA2 gene in ovarian carcinomas. *Cancer Res* 56: 2738-2741.
32. Berenblum I, Shubik P (1947) A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse skin. *Br J Cancer* 1: 383-391.
33. Reddy A, Fialkow P (1983) Papillomas induced by initiation-promotion differ from those induced by carcinogen alone. *Nature* 304: 69-71.
34. Yuspa SH, Poirier MC (1988) Chemical carcinogenesis: from animal models to molecular models in one decade. *Adv Cancer Res* 50: 25-70.
35. Weston A, Harris C (2003) Holland-Frei Cancer Medicine. In: DW K, RE P, RR W, editors. *Multistage Carcinogenesis*. 6th edition ed. Hamilton (ON): BC Decker.
36. Jones P, Baylin S (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428.

37. Cairns J (1975) Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 255: 197–200.
38. Verma AK, Boutwell RK (1980) Effects of dose and duration of treatment with the tumor-promoting agent, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1: 271-276.
39. Yuspa SH, Dlugosz AA, Denning MF, Glick AB (1996) Multistage carcinogenesis in the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1: 147-150.
40. Loeb LA, Cheng KC (1990) Errors in DNA synthesis: a source of spontaneous mutations. *Mutat Res* 238: 297-304.
41. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
42. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
43. Sidransky D (1995) Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 7: 229-233.
44. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532.
45. Organización Panamericana de la Salud (OPS) ( 2012) El cáncer de mama en las Américas. .
46. Knaul F, López Carrillo L, Lazcano Ponce E, Gómez Dantés H, Romieu I, et al. (2009) Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *Salud Pública de México* 51: 135-137.
47. Andre F, Puzstai L (2006) Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3: 621-632.
48. Cornejo KM, Kandil D, Khan A, Cosar EF (2014) Theranostic and molecular classification of breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 138: 44-56.
49. Gown AM (2008) Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 21 Suppl 2: S8-S15.
50. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, et al. (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 134: 907-922.
51. Thakkar JP, Mehta DG (2011) A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative. *Oncologist* 16: 276-285.
52. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM (2003) Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21: 1973-1979.
53. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, et al. (2001) Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 19: 3808-3816.
54. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.

55. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10869-10874.
56. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, et al. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8418-8423.
57. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536.
58. Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, et al. (2001) Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 61: 5979-5984.
59. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, et al. (2005) Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 11: 5678-5685.
60. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS (2010) The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol* 220: 263-280.
61. Bhargava R, Dabbs DJ (2007) Use of immunohistochemistry in diagnosis of breast epithelial lesions. *Adv Anat Pathol* 14: 93-107.
62. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, et al. (2006) Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 49: 10-21.
63. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, et al. (2007) BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 26: 2126-2132.
64. Peppercorn J, Perou CM, Carey LA (2008) Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Invest* 26: 1-10.
65. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF (2006) Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist* 11: 868-877.
66. Sorlie T (2007) Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. *Methods Mol Biol* 360: 91-114.
67. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, et al. (2002) Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 347: 1227-1232.
68. Veronesi U, Banfi A, Salvadori B, Luini A, Saccozzi R, et al. (1990) Breast conservation is the treatment of choice in small breast cancer: long-term results of a randomized trial. *Eur J Cancer* 26: 668-670.
69. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, et al. (2005) Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366: 2087-2106.
70. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, et al. (2005) Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1784-1792.

71. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE, Jr., Mamounas EP, et al. (2006) Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 24: 2019-2027.
72. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, et al. (2014) Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 384: 164-172.
73. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365: 1687-1717.
74. Meyers MO, Klauber-Demore N, Ollila DW AK, Moore DT, Drobish AA (2011) Impact of breast cancer molecular subtypes on locoregional recurrence in patients treated with neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol* 18: 2851-2857.
75. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, et al. (2010) Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 28: 3271-3277.
76. Reis-Filho JS, Lakhani SR (2008) Breast cancer special types: why bother? *J Pathol* 216: 394-398.
77. Velasco-Velazquez M, Jiao X, De La Fuente M, Pestell TG, Ertel A, et al. (2012) CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells. *Cancer Res* 72: 3839-3850.
78. Van Keymeulen A, Rocha AS, Ousset M, Beck B, Bouvencourt G, et al. (2011) Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature* 479: 189-193.
79. Velasco-Velazquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG (2012) Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 573-577.
80. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988.
81. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, et al. (2007) The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 356: 217-226.
82. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, et al. (2005) Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res* 11: 1154-1159.
83. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, et al. (2007) let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131: 1109-1123.
84. Bourguignon LY (2008) Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol* 18: 251-259.
85. Bourguignon LY (2001) CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 287-297.

86. Kalish ED, Iida N, Moffat FL, Bourguignon LY (1999) A new CD44V3-containing isoform is involved in tumor cell growth and migration during human breast carcinoma progression. *Front Biosci* 4: A1-8.
87. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, et al. (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12160-12164.
88. Bourguignon LY, Zhu H, Chu A, Iida N, Zhang L, et al. (1997) Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J Biol Chem* 272: 27913-27918.
89. Orian-Rousseau V (2010) CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer* 46: 1271-1277.
90. Lorico A, Rappa G (2011) Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. *J Oncol* 2011: 135039.
91. Goodarzi N, Ghahremani MH, Dinarvand R (2011) Targeting CD44 by hyaluronic acid-based nano drug delivery systems may eradicate cancer stem cells in human breast cancer. *Iranian Journal of Medical Hypotheses & Ideas* 5.
92. Torre C, Wang SJ, Xia W, Bourguignon LY (2010) Reduction of hyaluronan-CD44-mediated growth, migration, and cisplatin resistance in head and neck cancer due to inhibition of Rho kinase and PI-3 kinase signaling. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 493-501.
93. Alvarez J, Shoichet B (2005) *Virtual screening in drug discovery*. Boca Raton: Taylor & Francis. 470 p. p.
94. Huang SY, Zou X (2010) Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int J Mol Sci* 11: 3016-3034.
95. Teriete P, Banerji S, Noble M, Blundell CD, Wright AJ, et al. (2004) Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44. *Mol Cell* 13: 483-496.
96. Irwin JJ, Shoichet BK (2005) ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* 45: 177-182.
97. Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, Rippmann F, Rarey M (2012) Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J Chem Inf Model* 52: 360-372.
98. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30: 2785-2791.
99. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31: 455-461.
100. Neudert G, Klebe G (2011) DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. *J Chem Inf Model* 51: 2731-2745.
101. Liu S, Fu R, Zhou LH, Chen SP (2012) Application of consensus scoring and principal component analysis for virtual screening against beta-secretase (BACE-1). *PLoS One* 7: e38086.
102. Romelia Salomon-Ferrer (2012) An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput Mol Sci*: 13.

103. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, et al. (2006) CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8: R59.
104. Mosman T (1983) Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
105. Humphries MJ (2009) Cell adhesion assays. *Methods Mol Biol* 522: 203-210.
106. Tanaka Y, Makiyama Y, Mitsui Y (2002) Anti-CD44 monoclonal antibody (IM7) induces murine systemic shock mediated by platelet activating factor. *J Autoimmun* 18: 9-15.
107. Chen L, Bourguignon LY (2014) Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer* 13: 52.
108. Harn HJ, Shen KL, Liu CA, Ho LI, Yang LS, et al. (1998) Hyaluronate binding assay study of transfected CD44 V4-V7 isoforms into the human gastric carcinoma cell line SC-M1. *J Pathol* 184: 291-296.
109. Smith NA, Byl JA, Mercer SL, Dewese JE, Osheroff N (2014) Etoposide quinone is a covalent poison of human topoisomerase IIbeta. *Biochemistry* 53: 3229-3236.
110. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY (2002) Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 277: 4589-4592.
111. Ju SY, Chiou SH, Su Y (2014) Maintenance of the stemness in CD44(+) HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. *Stem Cell Res* 12: 86-100.