



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación *in vitro* de compuestos con posible actividad antagonista
de CD44 en células de cáncer de mama**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GUERRERO RODRÍGUEZ SANDRA LUCÍA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Guerrero
Rodríguez
Sandra Lucía
55 27 37 12 60
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307628059

2. Datos del tutor

Dr.
Marco Antonio
Velasco
Velázquez

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Aliesha Araceli
González
Arenas

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Miguel Angel
Santibáñez
Andrade

6. Datos del sinodal 4

Biol.
Marco Alonso
Andonegui
Elguera

7. Datos del trabajo escrito.

Evaluación *in vitro* de compuestos con posible actividad antagonista de CD44 en células de cáncer de mama

58 p
2015

AGRADECIMIENTOS

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

Al proyecto PAPIIT IN219613 del cual fui becaria durante la realización de este trabajo.

A la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos (UDIBI) de la ENCB, IPN. Por el préstamo de sus instalaciones para la realización de algunos de los experimentos de este trabajo. Además por la asesoría de las personas expertas en los diferentes rubros cuyas aportaciones enriquecieron el proyecto.

A los miembros del sínodo que con sus comentarios y observaciones permitieron que este trabajo se viera fortalecido.

Agradecimientos Personales

Al Dr. Marco Velasco por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia y por su valioso conocimiento compartido.

A la Dra. Charmina Aguirre por siempre poder contar con su apoyo incondicional, por compartirme su valioso conocimiento.

A Angel Ruiz que ha sido un buen amigo y compañero de trabajo que ha permitido que el trabajo en el laboratorio sea productivo y muy ameno.

A la Dra. Wendy Xolalpa por sus enseñanzas tanto en el laboratorio como personales.

A las personitas de UDIBI (Ana, Ale, Ilse, Naye, Mike) y del laboratorio de Farmacología Molecular. Por permitirme realizar este trabajo de la mejor manera posible, por brindarme su conocimiento y ayuda cuando la necesite. A la Dra. Mayra Pérez, a la Dra. Nohemí, M. en C. Emiliano Hisaki, M. en C. Antonio Ortega por permitirme aprender de ustedes y brindarme las herramientas que me permitieron realizar este trabajo.

Le agradezco enormemente a mi mamá que siempre ha estado de manera incondicional a bordo de este viaje, por su comprensión y paciencia. Sobre todo por siempre alentarme a seguir en mi formación y siempre buscar que lo pueda hacer de la mejor manera. Por su enorme fortaleza que me ha permitido llegar a este punto y alcanzar una de mis metas.

A mi hermana por contar con su apoyo, cariño y comprensión. Pero sobre todo por su sonrisa a pesar que la vida no nos ponga su mejor cara. Por sus valiosos consejos y siempre hacer que mire el lado positivo de las cosas.

A Miguel por su comprensión durante este proceso, por alentarme a mantenerme enfocada en cada paso que doy y por darme su apoyo incondicional. Por enseñarme que el silencio puede disfrutarse cuando se tiene la mejor compañía.

A Rocío por cuidar de mi mamá y de mi hermana. Por ser una persona cuya fortaleza me ha inspirado a seguir por este camino a pesar de lo complejo que puede llegar a ser.

A mis amigos de Ciencias que aunque el tiempo sea limitado para vernos, siempre ha estado su apoyo para culminar este proceso. Por sus consejos pero sobre todo por su amistad durante toda la universidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por mi formación académica.

Dedico este trabajo a mi pequeña que aunque ya no estés con nosotros, siempre tu compañía hacia más amena las noches en vela. Por tu fortaleza, por tu cariño y por la felicidad que siempre te caracterizo.

También dedico este trabajo en memoria de mi padre que a pesar de su ausencia no voluntaria siempre está presente impulsándome a ser una mejor persona y en cumplir las metas que me propongo.

ABREVIATURAS

GST	Genes Supresores de Tumor
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
PI3K	Familia del fosfatidilinositol-3-cinasas
AKT	Proteína serina-treonina cinasa o cinasa B
MCM7	Miembro de los Micromosomas de Proteínas de Mantenimiento
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
TGF α	Factor de Crecimiento Tumoral- α
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
TERT	Telomerasa Reversa Transcriptasa
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
VEGF-A	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
PHD2	Prolina Hidroxilasa 2
EMT	Transición Epitelio – Mesénquima
CSF-1	Factor Estimulante de Colonias 1
CCL-2	Ligando a la quimiocina dos del subtipo C-C
TAMs	Macrófagos Asociados a Tumor
SPARC	Proteína Ácida Secretada Rica en Cisteínas

ER	Receptor a Estrógenos
PgR	Receptor a Progesterona
HER2	Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2
MDR1	Receptor de Resistencia a Múltiples Fármacos
P-gp	P-glicoproteína
ATP	Adenosin Trifosfato
CTT	Células Troncales Tumorales
CTTM	Células Troncales Tumorales de Cáncer de Mama
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
HA	Ácido Hialurónico
MMP-9	Metaloproteasa 9
MMP-7	Metaloproteasa 7
PDCD4	Proteína del Programa de Muerte Celular
PDB	Protein Data Bank
FDA	Food and Drug Administration
SFB	Suero Fetal Bovino
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difenil tetrazolio
DMSO	Dimetil Sulfóxido
IC50	Concentración Inhibitoria 50

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Definición de cáncer	3
2.2 Tipos de cáncer	3
2.3 Generalidades del cáncer	4
2.4 Epidemiología del cáncer	11
2.5 Subtipos de cáncer de mama	13
2.6 Tratamientos actuales contra el cáncer de mama	14
2.7 Células troncales tumorales	17
2.8 Células troncales tumorales en cáncer de mama	18
2.9 Receptor CD44	19
2.10 Isoformas de CD44	21
2.11 Interacción CD44 con HA	23
3. Antecedentes del proyecto	24
4. Justificación	25
5. Objetivos	26
6. Hipótesis	26
7. Metodología	27
7.1 Líneas celulares	27

7.2 Citometría de Flujo	27
7.3 Ensayos de citotoxicidad	28
7.4 Ensayos de formación de mamoesferas	29
7.5 Análisis estadístico	30
8. Resultados	31
8.1 Expresión de CD44	31
8.2 Ensayos de citotoxicidad	32
8.3 Ensayos de Mamoesferas	35
8.3.1.1 Compuesto 9805 en MDA-MB-231	35
8.3.1.2 Compuesto 9805 en MCF-7	37
8.3.2.1 Compuesto 1276 en MDA-MB-231	38
8.3.2.2 Compuesto 1276 en MCF-7	40
8.3.3.1 Compuesto 4867 en MDA-MB-231	42
8.3.3.2 Compuesto 4867 en MCF-7	43
9. Discusión y conclusiones	45
10. Referencias	50

1. Resumen

El cáncer de mama para 2012 se encontró en el primer lugar a nivel mundial en incidencia y mortalidad. Lo anterior se ha visto relacionado con el descubrimiento de una pequeña subpoblación en los tumores mamarios, las células troncales tumorales de mama (CTTM).

Las CTTM tienen la capacidad de autorenovarse y de dar paso a células de diferente linaje; al igual que las células troncales normales, sin embargo, al ser células tumorales tienen la capacidad de repoblar el tumor y de generar células tumorales de diferentes linajes. También se les adjudica la capacidad de quimio-resistencia, así como la capacidad de realizar metástasis e invasión hacia otros tejidos. Las CTTM tienen marcadores para su identificación, entre los más estudiados se encuentran CD44, ALDH, CD49f.

Actualmente no existe una terapia específicamente dirigida a células troncales tumorales. El receptor CD44 unido a su ligando el ácido hialurónico (HA), está implicado en funciones biológicas en cáncer de mama, como la autorenovación, metástasis, e invasión; las cuales son características de las CTTM.

Con anterioridad el grupo de trabajo del laboratorio de Farmacología Molecular de la Facultad de Medicina realizó una búsqueda de compuestos a partir de una base aprobada por la FDA, con los cuales se hizo un cribado virtual, en el que se simuló la unión de los compuestos al receptor CD44 en el sitio de unión a HA.

En la presente investigación se evaluó la citotoxicidad en condiciones adherentes y la formación de mamoesferas en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y

MCF-7; así como de tres compuestos, resultado de la simulación *in silico*. Se observó que el compuesto 9805 presentó citotoxicidad a bajas concentraciones en cultivos adherentes e inhibió la formación de mamoesferas en ambas líneas celulares. El compuesto 1276 en ambas líneas celulares, no presentó un efecto inhibitorio en la formación de mamoesferas ni citotoxicidad en cultivos adherentes. En el caso del compuesto 4867 no presentó citotoxicidad en las condiciones evaluadas en cultivos adherentes de ambas líneas celulares, sin embargo se observó que desde bajas concentraciones de 0.1 μM se observa el efecto inhibitorio en la formación de mamoesferas en la línea celular MDA-MB-231 y en menor magnitud en la línea celular MCF-7.

Palabras clave: cáncer de mama, células troncales tumorales, CD44, citotoxicidad, mamoesferas.

2. Introducción

2.1 Definición de cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades, con la característica común de que las células del individuo sufren mutagénesis (cambios en las secuencias de DNA) resultando en: i) una división celular anormal incontrolada; ii) la capacidad de invadir otros tejidos a través del sistema sanguíneo y/o linfático (NCI, 2014). En conjunto, estos cambios de expresión de genes y evolución de la enfermedad sin un tratamiento, puede resultar en la muerte del individuo que lo padece (Ruddon, 1995, 2007).

2.2 Tipos de cáncer

El cáncer se puede clasificar de acuerdo al tipo de tejido del cual se origina (Ruddon, 2007; SEER, 2015) en:

- Carcinoma.- Su origen se encuentra en células epiteliales que cubren las superficies internas y externas de los tejidos. Se subdivide en:
 - i) Adenocarcinoma.- Proviene de las células epiteliales que producen fluidos o mucosa. Por ejemplo las glándulas mamarias o los pulmones.
 - ii) Carcinoma basal.- Las células epiteliales se encuentran en la capa basal de la epidermis.
 - iii) Carcinoma escamoso.- Las células epiteliales se encuentran en la superficie exterior de la piel.
 - iv) Carcinoma transicional.- Las células epiteliales suelen formar varias capas.

- Sarcoma.- Se forman en tejido conectivo y de soporte. Incluye huesos, músculos, tejido fibroso, vasos sanguíneos y linfáticos.
- Mieloma.- Se origina en células plasmáticas y en otras células del sistema inmune.
- Leucemia.- Se origina en médula ósea, dando como resultado células anormales inmaduras.
- Linfoma.- Se origina en glándulas o nodos del sistema linfático.

2.3 Generalidades del cáncer

Los diferentes tipos de tumores, a pesar de provenir de distintos tejidos de origen, las células que los conforman, sufren un proceso llamado carcinogénesis. Las células normales cambian su fenotipo hacia células neoplásicas debido a cambios en el genoma (mutaciones), así como exposición a carcinógenos (que pueden ser agentes químicos, biológicos y/o físicos) e incluso influencia el estilo de vida (consumo de alcohol, tabaco, etc.) Los hábitos y exposición a carcinógenos, incrementan la probabilidad de incidencia y/o predisposición a padecer cáncer.

El proceso es dividido en tres etapas (Devi, 2004; Ruddon, 1995, 2007):

Iniciación.- Las células sufren alteraciones genéticas irreversibles ya sea por una o por varias mutaciones creando un potencial de desarrollo neoplásico en células subsecuentes. Los proto-oncogenes, genes activos en células normales, pueden llegar a sufrir modificaciones que resultan en la sobreexpresión o en la alteración de la estructura de la proteína del oncogen. Por tanto pasan a ser oncogenes sobre-

expresados o alterados estructuralmente, responsables de la transformación neoplásica (por ejemplo *RAS*, *MYC*). Los genes supresores de tumor (GST), genes reguladores negativos de la proliferación durante el ciclo celular (genes como *RB*, *P53*) se ven suprimidos o mutados lo que resulta en la pérdida de su función. Los cambios en estos oncogenes y GST llevan a las células normales a una desregulación de genes involucrados en rutas de señalización como vías de proliferación celular.

Promoción.- Aquellas células transformadas que sufrieron cambios genéticos en la primera etapa siguen siendo estimuladas por los agentes o factores carcinogénicos y por factores intracelulares como citocinas, metabolitos lipídicos y otros factores que cambian la expresión de genes lo que provoca que la expansión clonal y que la proliferación sea descontrolada y autónoma.

Progresión.- Es una etapa irreversible que da paso a subpoblaciones heterogéneas malignas en incremento, caracterizadas por inestabilidad cromosómica y proliferación alterada, resultando en el aumento del tamaño del tumor. Este incremento del tumor depende de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, por lo que se desarrollan nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para que aquellos tumores de más de un diámetro de 1-2 mm³ tengan un suministro suficiente que sustente la proliferación de las células cancerosas dentro del tumor (Nishida, Yano, Nishida, Kamura, & Kojiro, 2006). Durante esta etapa ocurre la metástasis, donde las células cancerosas pierden la propiedad de adhesión y pueden desprenderse de la masa tumoral e invadir tejidos vecinos al entrar a la circulación sanguínea y/o linfática.

Durante el proceso de carcinogénesis ocurren mutaciones en genes *gatekeeper* o genes *portero* que regulan la proliferación y la diferenciación celular; en genes

caretaker o genes *cuidadores del genoma* encargados de mantener la integridad del genoma y en genes *landscaper* o genes *paisajistas* que al sufrir mutaciones generan un ambiente anormal propicio para el tumor (Rajagopalan & Lengauer, 2004). Las células cancerosas adquieren los 6 *hallmarks* o sellos *distintivos* del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011):

- 1. Sostenimiento de señales de proliferación.** Las células cancerosas pueden producir autocrinamente ligandos de receptores a factores de crecimiento. Por ejemplo el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) que al unirse fosforila y activa a su receptor (EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico) por lo que las rutas de Ras/MAPK(Cinasas activadas por mitógenos)/PI3K(familia del fosfatidilinositol-3-cinasas)/AKT(proteína serina-treonina cinasa, también llamada cinasa B), fosfolipasa C y Src se activan, sosteniendo la transcripción de genes de proliferación y de supervivencia (Jia, Zhang, Shen, & Yang, 2014). Por otra parte el receptor EGFR activado puede unirse a la isoforma Lyn de p56, una tirosina cinasa que fosforila MCM7 (miembro de los minicromosomas de proteínas de mantenimiento), factor necesario para la replicación del DNA y la proliferación. Otros factores de crecimiento que se producen autocrinamente involucrados en el sostenimiento de la proliferación son: i) el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés); ii) el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés); iii) el factor de crecimiento tumoral- α (TGF α , por sus siglas en inglés) (Hanahan & Weinberg, 2000).

Las células del estroma asociadas al tumor también producen factores para mantener las señales de proliferación, tal es el caso de las células epiteliales y fibroblasto que sobre-expresan citocinas como CXCL14, CXCL12 que se unen a receptores de células epiteliales y promueven la proliferación de las células cancerosas (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004).

Algunos receptores sufren cambios estructurales por mutaciones que los hacen independientes de unión a su ligando, de tal manera que siempre se encuentra activa la proliferación; tal es el caso de EGFR que por alteraciones genéticas pierde el dominio citoplasmático, lo que ocasiona que siempre se mantenga activa la proliferación celular (Hanahan & Weinberg, 2000). Otro mecanismo para mantener señales de proliferación constantes es mediante la activación constitutiva de componentes de vías de señalización implicadas en la proliferación, por ejemplo la vía de señalización de SOS-Ras-Raf-MAPK, donde las proteínas Ras están alteradas estructuralmente lo que les permite el flujo de señales mitogénicas a las células de manera constitutiva y sin necesidad de que se estimule mediante sus reguladores río arriba (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

- 2. Pérdida de la sensibilidad de señales de antiproliferación.** Principalmente ocurre a través de la inactivación de GST que controlan el ciclo celular. La adecuada división celular requiere de la replicación del Ácido Desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) en fase S y que se distribuyan equitativamente los cromosomas durante la fase de la mitosis. El

ciclo celular tiene dos mecanismos que lo mantienen funcionando adecuadamente i) mediante la expresión de ciclinas que se asocian con cinasas dependientes de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés) formando un complejo catalíticamente activo, lo que permite que el ciclo celular se regule, asegurando una transición adecuada entre etapas; ii) mediante “checkpoints” que pueden retrasar la progresión del ciclo hasta que sea necesario; por ejemplo, si el DNA tiene daño no se permita la continuidad del ciclo hasta que sea reparado (Collins, Jacks, & Pavletich, 1997). Tal es el caso de *TP53*, un GST que codifica para la proteína p53, la cual responde al daño del genoma. En caso de que el daño al DNA sea excesivo activa señales para que la célula deje de proliferar e inicie programas de apoptosis. En células cancerosas, p53 en más del 50% de los pacientes se encuentra inactivado y no se recibe la señal de inicio de la apoptosis (Bieging, Mello, & Attardi, 2014; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

Las células cancerosas evaden el mecanismo de inhibición de la proliferación por contacto, lo que limita el número de células y asegura una homeostasis normal en tejidos sanos. Por ejemplo el gen *NF2* que produce la proteína Merlin (la cual regula la inhibición por contacto limitando la emisión efectiva de señales de proliferación mediadas por EGFR), se encuentra inactivado en células cancerosas por lo que no se limita su proliferación (Curto, Cole, Lallemand, Liu, & McClatchey, 2007).

3. **Evasión de la apoptosis.** En células cancerosas se da la activación incrementada de proteínas regulatorias antiapoptóticas de la familia Bcl-2. Las

células cancerosas regulan negativamente la expresión de factores proapoptóticos, por ejemplo Bax/Bim que al evitar la función de estas proteínas las células cancerosas sobreviven a pesar de las mutaciones adquiridas (Adams & Cory, 2007). Las células cancerosas estimulan las señales que bloquean la apoptosis mediante cinasas de las rutas PI3K/AKT y mTOR (Levine & Kroemer, 2008). Las células cancerosas tratadas con alguna terapia son capaces de inducir autofagia, la cual ocurre en respuesta a estrés o deficiencia de nutrientes, la célula rompe sus organelos para que los catabolitos sean reciclados mediante autofagosomas y ser llevados a lisosomas para posteriormente ser utilizados en biosíntesis o para energía metabólica. Al entrar en autofagia las células cancerosas son capaces de entrar en un estado reversible de latencia o quiescencia de tal manera que pueden persistir y proliferar después del tratamiento. *TP53* al estar inactivado en las células cancerosas permite la evasión de la apoptosis aun cuando la célula tenga daño en su DNA o a pesar de los niveles sub-óptimos de glucosa, oxigenación o de señales de crecimiento (Hanahan & Weinberg, 2011).

4. **Desarrollo del potencial replicativo.** Las células cancerosas con malfuncionamiento en genes *gatekeeper* de la progresión celular permiten que la proliferación sea constante. Otro mecanismo utilizado por las células cancerosas es por la actividad incrementada de la telomerasa reversa transcriptasa (TERT, por sus siglas en inglés) que adiciona segmentos repetidos de telomero a los

extremos del DNA evitando la apoptosis o al inactivar *TP53* que aunque haya erosión de los telómeros no se induce apoptosis (Artandi & DePinho, 2010).

5. **Inducción de la angiogénesis.** En un tumor se forman nuevos vasos sanguíneos para la obtención de nutrientes y oxígeno en respuesta a hipoxia (bajos niveles de oxígeno). Se induce la producción de los factores inducibles por hipoxia (HIF, por sus siglas en inglés); HIF1 α en su forma activa se transloca al núcleo conformando un heterodímero con la subunidad HIF1 β , permitiendo la transcripción del FGF (Polet & Feron, 2013) y del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-A, por sus siglas en inglés). En células cancerosas, VEGF-A se encuentra sobre regulado (Carmeliet, 2005) para sustentar el crecimiento del tumor mediante la vasculogénesis (Hanahan & Folkman, 1996).

6. **Invasión y metástasis.** En las células cancerosas el mecanismo mejor caracterizado es el de la pérdida de la expresión de E-caderina que es importante en la adhesión célula-célula, haciendo a las células más agresivas e invasivas. En células cancerosas epiteliales se lleva a cabo la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) que las lleva a adquirir habilidades para invadir, evadir la apoptosis y poderse diseminar (Cavallaro & Christofori, 2004). Las células cancerosas sobreexpresan factores de transcripción como Snail, Slug, Twist y Zeb; los cuales están implicados en la regulación de la migración (Yang & Weinberg, 2008).

Por otra parte se da el reclutamiento de monocitos por el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1, por sus siglas en inglés) y por el ligando a la quimiocina dos con motivo C-C (CCL-2) hacia el tumor, que en respuesta al estímulo hace que los monocitos se diferencien a macrófagos que participan en la angiogénesis y en la metástasis. Los macrófagos asociados al tumor (TAMs, por sus siglas en inglés) producen factores y proteasas, como la proteína ácida secretada rica en cisteínas (SPARC, por sus siglas en inglés), osteonectina, catepsinas y metaloproteasas que son requeridas para la metástasis pues facilitan el escape de las células cancerosas. Los macrófagos participan en la intravasación hacia el torrente sanguíneo al formar grupos o clústeres de macrófagos en el que las células cancerosas egresan, además de suprimir la respuesta de células T citotóxicas hacia células cancerosas invasoras, lo que facilita la intravasación al sistema circulatorio y la diseminación a otros tejidos (Qian & Pollard, 2010).

2.4 Epidemiología del cáncer

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial. Como se muestra en la (Fig. 1), el cáncer de mama en mujeres a nivel mundial es el de mayor incidencia y mortalidad. Su incidencia anual tiene una tasa de 25.2 por cada 100,000 mujeres y una mortalidad de 14.7 por cada 100,000 mujeres. Su incidencia se encuentra por arriba del cáncer colorectal, cérvico-uterino y de pulmón. En mortalidad también se encuentra por arriba del cáncer de pulmón, colorectal y cérvico-uterino (Ferlay et al., 2012).

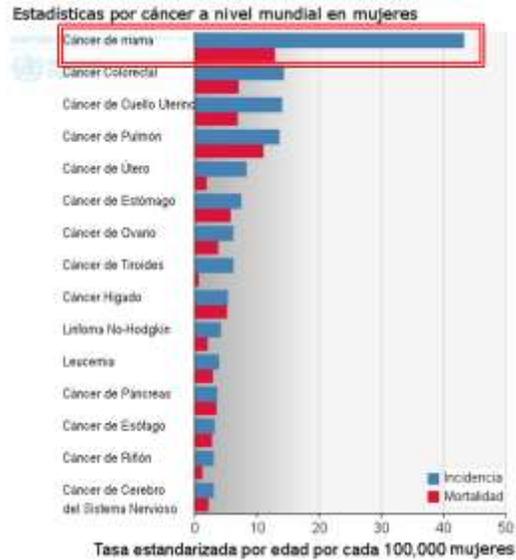


Fig. 1. Estadísticas de incidencia (azul) y mortalidad (rojo) de las principales neoplasias a nivel mundial [Modificada de (Ferlay et al., 2012).]

En México, de acuerdo con las estadísticas de la Secretaría de Salud a 2010, los tumores malignos se encuentran dentro de las primeras causas de muerte. En 2012 se reportan 78,352 defunciones por cáncer, siendo 38,706 defunciones en hombres y 39,645 en mujeres (INEGI, 2012).

En mujeres el cáncer de mama es la principal causa de muerte teniendo una tasa de 9.2 por cada 100, 000 habitantes en contraste con otros tipos de neoplasias (Tabla 1).

La mayor tasa de mortalidad debido a ésta neoplasia ocurre en mujeres 45 a 65 años con 2,421 defunciones, seguido por mujeres de 65 a más años con 1, 754 defunciones (SINAVE, 2012).

Tabla 1. Tasa de mortalidad debido a tumores malignos en México por género en 2010.

TUMORES MALIGNOS	TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
	DEF.	TASA*	DEF.	TASA*	DEF.	TASA*
Tráquea, bronquios y pulmón	6,795	6.3	4,413	8.3	2,381	4.3
Estómago	5,599	5.2	3,003	5.6	2,596	4.7
Próstata	5,508	5.1	5,508	10.3	-	-
Hígado	5,393	5.0	2,593	4.9	2,800	5.1
Mama	5,094	4.7	32	0.1	5,062	9.2
Cervicouterino	3,959	3.7	-	-	3,959	7.2
Leucemia	3,953	3.6	2,106	4.0	1,847	3.3

Fuente: (SINAVE, 2012). * Tasa por cada 100,000 habitantes.

2.5 Subtipos de cáncer de mama

El cáncer de mama tiene diferentes subtipos por lo que se han debido generar diferentes estrategias terapéuticas para su tratamiento. A continuación se presenta la clasificación por su perfil molecular, es decir por su expresión genética analizada mediante la técnica de microarreglos de DNA (Munirah et al., 2011; Reddy, 2011; Schnitt, 2010):

1. Luminales. Se originan dentro de la línea de los ductos mamarios (Fig. 2.) Expresan el receptor a estrógenos (ER, por sus siglas en inglés) o el receptor a progesterona (PgR, por sus siglas en inglés), aunque pueden llegar a expresar ambos. Se han reportado casos que expresan al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, por sus siglas en inglés).
2. Basales. Se originan en la membrana basal de los ductos mamarios (Fig. 2.). Suelen presentar mutaciones en el gen *BRCA1* en la línea germinal o de manera esporádica. Son considerados agresivos y aquellos con un peor pronóstico ya que dentro de éste subtipo caen los triples negativos que no expresan ER, PgR

ni HER2, haciendo difícil que pacientes con este subtipo puedan recibir una terapia dirigida. Son positivos para citoqueratinas 5, 6, 14 y 17 que se asocian a citoqueratinas expresadas en el epitelio basal.

3. HER2. Expresan HER2 pero son negativos para ER y PgR. Se ha reportado que algunos tumores tienen una baja expresión para ER.
4. Parecidos a tejido normal. Aquellos que no caen bajo la expresión de receptores ni de las citoqueratinas mencionadas. Expresan las citoqueratinas 8/18.

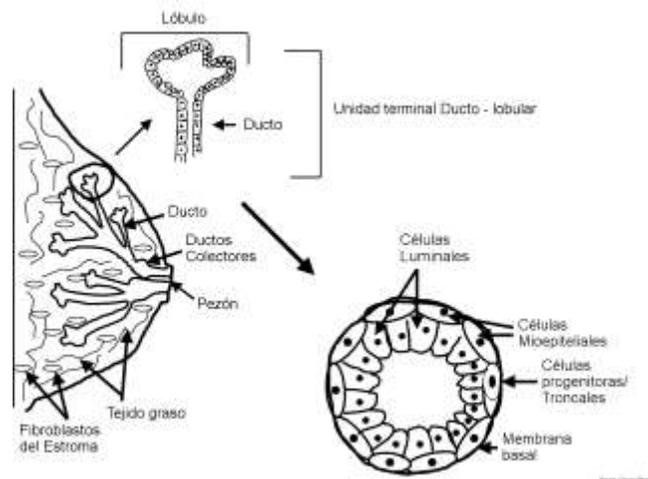


Fig. 2. Estructura anatómica de la glándula mamaria humana [Modificada de (Dimri, Band, & Band, 2005).]

2.6 Tratamientos actuales contra el cáncer de mama

Los tratamientos contra el cáncer de mama dependen del tipo, tamaño y grado de expansión del tumor. Los tratamientos incluyen: cirugía, radio y quimioterapia, terapia hormonal.

Cirugía o terapia primaria

Se extirpa el tumor por completo, algunas veces también se remueve parte de tejido sano e incluso se remueve algún nodo linfático como el axilar, en busca que las células cancerosas no se hayan diseminado hacia el sistema linfático (NCI, 2009).

Terapias adyuvantes/neoadyuvantes

La terapia adyuvante se le da al paciente después de la terapia primaria con el objetivo de aumentar la tasa de supervivencia a largo plazo. En caso de la terapia neoadyuvante se da antes de la terapia primaria, por ejemplo para tratar de reducir el tamaño del tumor y éste sea removido mediante cirugía. Tanto las terapias adyuvantes como las neoadyuvantes incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, fármacos dirigidos, o combinaciones de tratamientos (NCI, 2009).

Quimioterapia: Es la administración de uno o varios agentes quimioterapéuticos en intervalos de tres semanas ya que dañan a las células en proliferación, por ejemplo a precursores hematopoyéticos de la médula espinal. Los intervalos entre los tratamientos permiten la repoblación de células en tejidos normales que ocurre de manera similar en tumores mediante células cancerosas quimio-resistentes (Kim & Tannock, 2005).

Ejemplos de éstos agentes son doxorubicina que se une al DNA produciendo radicales libres como mecanismo para inducir citotoxicidad en células cancerosas (Gewirtz, 1999). El paclitaxel que al interactuar con las subunidades α y β tubulina promueve el ensamble de los microtúbulos en el citoesqueleto, genera células multipolares que

debido a la mala disgregación de los cromosomas las células mueren o bien que queden arrestadas en metafase (Bhalla, 2003; Weaver, 2014).

La resistencia a agentes quimioterapéuticos como doxorubicina y paclitaxel está asociada a la sobreexpresión de genes de resistencia a múltiples fármacos como *MDR1* (por sus siglas en inglés) o por la sobreexpresión de la P-glicoproteína (P-gp), producto del gen *MDR1* que es un transportador transmembranal ABCB1 dependiente de ATP (adenosin trifosfato), cuyo rol es crítico para reducir la concentración intracelular de fármacos y agentes quimioterapéuticos por bombas de eflujo y por ende a la resistencia a la quimioterapia (Baker & El-Osta, 2004).

Radioterapia: Se administran pequeñas dosis de radiación ionizante que van de acuerdo a la sensibilidad de tejidos normales de alrededor (Begg, Stewart, & Vens, 2011). Se utiliza para controlar la proliferación e inducción de la apoptosis de células cancerosas, es subletal para células de tejidos normales. De igual manera en el periodo de recuperación, las células cancerosas repueblan el tumor (Kim & Tannock, 2005).

Terapia hormonal: Administrada a pacientes con subtipo luminal ya que los tumores son ER⁺, se priva de estrógenos al paciente y además se administran fármacos como tamoxifen que bloquea la actividad estrogénica del receptor (necesaria para el crecimiento del tumor), o se utilizan inhibidores de aromatasa para el bloqueo de la producción de estrógenos. Sin embargo se ha observado resistencia a estos fármacos (Whenham, D'Hondt, & Piccart, 2008) principalmente por: i) formas truncadas y activas

de los receptores donde los fármacos no se pueden unir en el dominio extracelular; ii) activación de elementos río abajo de las rutas de activación independientes de los receptores.

Las terapias funcionan en algunos pacientes, sin embargo se ha visto que los tumores adquieren resistencia a las terapias hormonales, radioterapia y quimioterapia. Por ende resulta en la reincidencia del cáncer (Whenham et al., 2008).

2.7 Células troncales tumorales

Existe una subpoblación celular remanente después de algún tratamiento con la capacidad de autoreplicarse y de generar un nuevo tumor, las células troncales tumorales (CTT).

Las CTT tienen características similares a las células troncales normales como la autorenovación y la capacidad de generar células con un linaje distinto. A las CTT se les implica en el mantenimiento y crecimiento del tumor contribuyendo a la heterogeneidad de éste (Beck & Blanpain, 2013). Las CTT están asociadas a invasión, metástasis y resistencia a agentes citotóxicos, radiación y/o quimioterapia (Kakarala & Wicha, 2008). El concepto de CTT es importante en la clínica debido a que están involucradas en la reincidencia del cáncer y en la resistencia a terapias actuales, además no se cuenta con un tratamiento específico por lo que se enfatiza la necesidad de crear terapias dirigidas (Valent et al., 2012).

2.8 Células troncales tumorales en cáncer de mama

En cáncer de mama se ha encontrado que existe una subpoblación celular que es altamente tumorigénica. En ratones inmunodeficientes, se necesitan inyectar solo 200 CTT de cáncer de mama humano para la formación de un tumor que recapitula la jerarquía y heterogeneidad del tumor de origen. Ésta subpoblación se identifica por el fenotipo $CD44^+$, $EpCAM^+$ y $CD24^{-/low}$. Si se inyectan 20,000 células con fenotipo $CD44^-/CD24^+$ fallan en generar el tumor y si se inyectan 50,000 células sin un fenotipo en específico, solo un 25% de los ratones forman un tumor. Debido a que las células $CD44^+ CD24^-$ son capaces de autorenovarse, diferenciarse y son altamente tumorigénicas, se les clasificó como células troncales tumorales de cáncer de mama (CTTM) (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003).

Se plantean dos posibles orígenes de las CTTM: (Fig. 3.) 1) células troncales normales de mama con rutas de señalización asociadas a la autorenovación y diferenciación desreguladas. Las células troncales normales debido a su largo tiempo de vida son susceptibles a mutaciones, 2) células epiteliales mamarias que han sufrido EMT que se encuentran susceptibles a transformaciones oncogénicas. Las CTTM expresan genes asociados a EMT (Velasco-Velazquez, Homsí, De La Fuente, & Pestell, 2012).



Fig. 3. Posible origen de las células troncales tumorales de cáncer de mama (Adaptada de (Velasco-Velazquez et al., 2012)).

Las CTTM sobreexpresan Twist1/Twist2, que son factores de transcripción asociados a genes responsables de EMT, causan pérdida de adhesión celular y adquisición de propiedades migratorias que promueven la progresión y metástasis (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Twist1/Twist2 también regulan propiedades de las células troncales normales, ya que son requeridos en el desarrollo embrionario (Mani et al., 2008). Las CTTM sobreexpresan Twist1/Twist2 en conjunto con otros factores como Snail1/Snail2 y con el receptor CD44, regulando la capacidad de formar esferas *in vitro*, así como la capacidad de recapitular la jerarquía del tumor original cuando se realizan xenotransplantes a través de pases seriados en ratones inmunodeficientes (Hollier et al., 2013).

Las CTTM pueden también identificarse por otros marcadores celulares de superficie como CD133 (Wright et al., 2008); por la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Ginestier et al., 2007); por la presencia de transportadores transmembranales como son las bombas de exclusión de fármacos tal como ABCG2/BCRP1 de la familia de los transportadores ABC (Patrawala et al., 2005); ó por la expresión de genes asociados a troncalidad como son *OCT4*, *NOTCH1*, *ALDH1*, *FGFR1* y *SOX1* (Wright et al., 2008).

2.9 Receptor CD44

La expresión del receptor CD44 se asocia al fenotipo de las CTTM. CD44 es una glicoproteína transmembranal de 85 – 90 kDa en su forma estándar, mientras que en sus formas variables puede llegar a los 250 kDa (Prochazka, Tesarik, & Turanek, 2014). El gen que codifica para CD44 consta de veinte exones y diecinueve intrones,

que se encuentra en el cromosoma 11 en humanos (Fig. 4A.). Comúnmente se expresa en células embrionarias, hematopoyéticas, mesénquimales, epiteliales y en las CTT de otros orígenes (Williams, Motiani, Giridhar, & Kasper, 2013).

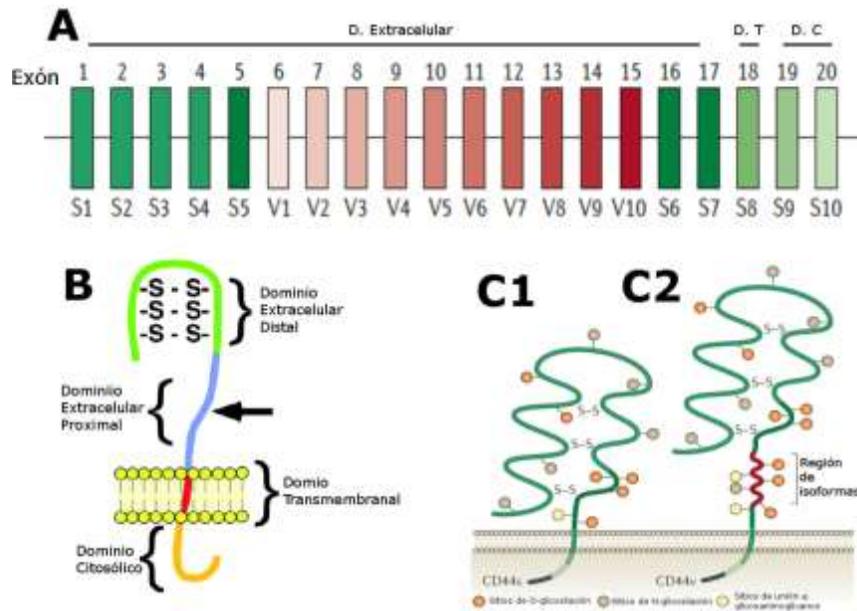


Fig. 4. **A.** Estructura del gen para el receptor CD44, los exones 1-5 y del 16-20 generan CD44s, mientras que los exones 6-15 forman 10 diferentes isoformas CD44v. D. T. (Dominio Transmembranal). D.C. (Dominio Citosólico) [Modificado de (Zoller, 2011)]. **B.** Dominios funcionales del receptor CD44 [Modificado de (Tolg, Hofmann, Herrlich, & Ponta, 1993)], la flecha indica el sitio variable de las isoformas de CD44. **C.** Estructura del receptor CD44. **C1** es la forma CD44s y **C2** corresponde a CD44v. Por ejemplo la isoforma CD44v2-v10 se forma incluyendo los exones 8 al 15 que corresponden de V2 a V10 [Modificado de (Zoller, 2011)].

El receptor CD44 cuenta con cuatro sitios funcionales (Afify, Purnell, & Nguyen, 2009) (Fig. 4B.):

Dominio extracelular distal.- Sitio donde principalmente se une el ácido hialurónico (HA, por sus siglas en inglés).

Dominio extracelular proximal.- Sitio variable entre las isoformas que se generan por splicing alternativo (Tolg et al., 1993).

Dominio transmembranal (D. T.)

Dominio citosólico (D. C.).- Interactúa con proteínas del citoesqueleto y de señalización intracelular (ezrina, radixina, meosina, cinasas de la familia SRC, anquirina) (Van Pham, Nguyen, Phan, & Phan, 2013)

La forma estándar se genera a partir de los exones 1-5 y de los exones 16 al 20 (Prochazka et al., 2014; Zoller, 2011). La forma estándar CD44s (Fig. 4-C1.) al unirse con HA, un glicosaminoglicano de alto peso molecular cargado negativamente que se encuentra predominantemente en la matriz extracelular (Harada & Takahashi, 2007), participa en la migración de células de carcinoma mamario. CD44 incrementa la invasividad de las células cancerosas al asociarse con la metaloproteasa 9 (MMP-9) para actuar sobre la superficie celular (Yu & Stamenkovic, 1999). CD44 se asocia con la metaloproteasa 7 (MMP-7) para mediar la degradación de proteínas de membrana como fibronectina, colágena tipo IV, laminina y elastina en células cancerosas (Bourguignon et al., 1998).

2.10 Isoformas de CD44

Para la formación de las diez variantes de CD44 ocurre *splicing alternativo* (corte y empalme, término en español) entre el exón cinco y el dieciséis. La estructura de las isoformas se diferencia de CD44s por tener una región propia en el dominio proximal distal (Fig. 4-C2.) Dentro de las diez isoformas existentes en cáncer de mama se encuentran asociadas las siguientes:

Isoforma	Función asociada en Cáncer de Mama
CD44v2-10	Asociada a pacientes con tumores del subtipo luminal y en pacientes con tumores del subtipo basal (Olsson et al., 2011).
CD44v3	Se asocia a la MMP-9 para formar la estructura que degrada la matriz extracelular, de tal manera que las células puedan invadir a otros

	tejidos. CD44v3 se une con la anquirina, por tanto al sistema contráctil de la membrana, requerido en células cancerosas para tener un comportamiento metastásico y promoviendo angiogénesis durante la progresión del cáncer de mama (Bourguignon et al., 1998).
CD44v3,8-10	Asociada al fenotipo agresivo, metástasis (Bourguignon et al., 1998).
CD44v3-10	Asociada a pacientes con tumores de subtipo luminal (Olsson et al., 2011).
CD44v4	Adhesión a células epiteliales de la monocapa a través de la unión a E-selectina (Zen et al., 2008). Al expresarse en conjunto con MMP-9, se relaciona con un fenotipo invasivo (Thanakit, Sampatanukul, Ruangvejvorachai, & Keelawat, 2005).
CD44v6	Existe controversia al asociarse en el desarrollo de un fenotipo metastásico (Ma, Deng, & Zhou, 2005; S. F. Morris et al., 2001). Implicado en la movilidad celular (Afify et al., 2009). Implicada en la progresión tumoral y asociado a un pronóstico pobre en pacientes (Li et al., 2008). Existe la correlación entre HIF-1/2 α y esta isoforma contribuyendo a la radio y quimioresistencia, así como a un fenotipo agresivo en un ambiente hipóxico (Krishnamachary et al., 2012).
CD44v8	En ambiente hipóxico, existe la correlación de la expresión de ésta isoforma con HIF-1/2 α contribuyendo a quimio y radioresistencia, así como a un fenotipo agresivo (Krishnamachary et al., 2012)
CD44v8-10	Asociada a pacientes con tumores del subtipo basal y al subtipo parecido al tejido normal. Se asocia a la ruta de señalización de EGFR y a la proliferación celular (Olsson et al., 2011).

Se ha observado que la capacidad de unión de HA es mayor en las isoformas que de la forma estándar (Sleeman et al., 1996). En el caso de la isoforma V6 en el dominio extracelular proximal se unen: al receptor tirosina cinasa c-Met, al factor de crecimiento a hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés) y VEGFR-2 promoviendo la migración y la invasión. Para la isoforma V3 se ha encontrado que une heparin sulfato que permite la función de correceptor de los receptores de tirosina cinasa (RTK, por sus siglas en inglés) y así el reclutamiento de metaloproteinasas para facilitar la invasión. A pesar de que son capaces de unir otros ligandos, su principal función depende de la unión a HA (Orlan-Rousseau & Sleeman, 2014).

2.11 Interacción CD44 con HA

CD44 al unirse con HA, interactúa con la proteína Tiam1 activando la ruta de Rac1, la cual modifica el rearrreglo del citoesqueleto e incrementa la movilidad de células cancerosas (Bourguignon, 2001). La interacción de CD44s/CD44v con HA tiene un rol central en la activación de RTKs involucrados en la supervivencia de células tumorales y CTT mediante las rutas de señalización de ErbB2 y de PI3K/AKT involucradas en supervivencia y resistencia a quimioterapia (Misra, Ghatak, Zoltan-Jones, & Toole, 2003). La interacción de CD44 con HA se encuentra involucrada en la resistencia a fármacos y agentes quimioterapéuticos en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, mediante la expresión de *MDR1* (Bourguignon, Peyrollier, Xia, & Gilad, 2008). También la interacción de CD44 con HA se encuentra involucrada en la señalización de Nanog/Stat-3, así como en la expresión del miR-21, cuyo rol se asocia en la inhibición de proteínas supresoras de tumor como la proteína del programa de muerte celular (PDCD4, por sus siglas en inglés). La sobreexpresión de miR-21 lleva a la sobreexpresión de proteínas asociadas a supervivencia, la familia de IAP (cIAP-1, cIAP-2 and XIAP) por lo que resulta en un aumento de la proliferación, la supervivencia y quimioresistencia de células cancerosas (Bourguignon, Spevak, Wong, Xia, & Gilad, 2009).

De igual manera la vía de señalización de Nanog/Stat-3 se encuentra involucrada en la progresión tumoral y en el mantenimiento de las CTT, dada la interacción de CD44 con HA se unen a Nanog en un complejo lo que provoca haya un incremento de Nanog en el núcleo causando por una parte la unión a Stat-3 que activa genes de proliferación y

de resistencia a fármacos y por otra parte la activación transcripcional de genes como *Rex1* y *Sox2* relacionados con el mantenimiento de las CTT (Bourguignon et al., 2008). En cuanto a la migración, la interacción de CD44 con HA se apoya en la unión de proteínas del citoesqueleto en el dominio citoplasmático como la anquirina que llevan a la fosforilación de un canal Na^+/H^+ , resultando en degradación de la matriz extracelular y así estimula la movilidad celular (Van Pham et al., 2013).

3. Antecedentes del proyecto

En el laboratorio de Farmacología Molecular, FM se realizó previamente la búsqueda de posibles antagonistas del receptor CD44 mediante cribado virtual. El cribado virtual es una herramienta virtual que permite la predicción, en este caso la unión del receptor con moléculas pequeñas de una base de datos de fármacos por acoplamiento molecular (Alvarez & Shoichet, 2005). El acoplamiento molecular se utiliza para predecir la afinidad con la que se podrían unir dos moléculas, mientras se conozca su estructura (Huang & Zou, 2010).

La estructura del receptor CD44 ya es conocida e incluso se encuentra disponible en la base PDB (Protein data bank, por sus siglas en inglés). La interacción de CD44 con HA se involucra en funciones características de las CTT por lo que el cribado virtual se realizó con la estructura de CD44 específicamente con el dominio de unión a HA, cuyo número de acceso a PDB es 1UUH (Teriete et al., 2004).

La base que se utilizó para la búsqueda de posibles antagonistas fue ZINC¹², la cual contiene fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para su evaluación clínica en humanos (Irwin & Shoichet, 2005). El cribado

virtual realizado consistió de 13066 compuestos vs. CD44, a los que se les realizó el acoplamiento molecular utilizando el servidor DogSiteScorer (Volkamer, Kuhn, Grombacher, Rippmann, & Rarey, 2012). Se seleccionó un subdominio dentro de la región de unión HA. Posteriormente se realizó un screening utilizando programas como AutoDock 4.2, AutoDock Vina 1.1.2 y DSX_089, con distinto algoritmo para calcular la afinidad de unión (G. M. Morris et al., 2009; Neudert & Klebe, 2011; Trott & Olson, 2010). Lo anterior permitió obtener un score consenso (Zscore) de todos los programas y así seleccionar compuestos como posibles antagonistas para CD44 (Liu, Fu, Zhou, & Chen, 2012).

Se refinó la selección de compuestos mediante dinámicas moleculares del receptor – ligando. Se calculó el cambio de energía libre a través del tiempo en un sistema flexible que permite el movimiento del complejo receptor - ligando en el programa AMBER11 (Salomon-Ferrer, 2012) durante una simulación de 100 ns bajo presión y temperatura estándar. El cambio de la energía libre se realizó para 2500 poses que se obtuvieron en los últimos 25 ns de la simulación. El cambio de energía libre de los compuestos seleccionados va desde -14 a -12 Kcal/mol. En el presente trabajo se seleccionaron tres compuestos para ser evaluados *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama.

4. Justificación

Actualmente no se tienen terapias dirigidas contra las CTT. Esto tiene implicaciones clínicas en la reincidencia de pacientes que han recibido radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento contra el cáncer de mama. La combinación de tratamientos con agentes que tengan una actividad contra las CTT en conjunto con alguna otra terapia

puede resultar en erradicar en los tumores las subpoblaciones troncales y no troncales (Hirsch, Iliopoulos, Tsihliis, & Struhl, 2009). Se busca evaluar el efecto de compuestos, seleccionados por acoplamiento virtual contra el receptor CD44, en líneas celulares de cáncer de mama. Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 expresan el receptor CD44, fenotipo asociado a las CTTM.

5. Objetivos

- Evaluar la citotoxicidad de tres posibles antagonistas de CD44 (9805, 1276, 4867) en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 de cáncer de mama.
- Estandarizar el método de obtención de mamoesferas en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.
- Evaluar el efecto de los tres compuestos elegidos en la formación de mamoesferas en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

6. Hipótesis

Si se tienen identificados compuestos candidatos a antagonizar la actividad del receptor CD44, expresado en células troncales tumorales de cáncer mama. Estos compuestos podrían presentar un efecto significativo sobre la reducción en la formación de mamoesferas; función biológica implicada al receptor en cáncer de mama.

7. Metodología

7.1 Líneas celulares

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, es del subtipo basal, triple negativo (Shimo et al., 2014). La línea MDA-MB-231 tiene un fenotipo ALDH⁺; CD44⁺, E-caderina⁻expresan CD24 en baja proporción. Las células se cultivaron en medio L-15 (Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, por sus siglas en inglés) (Gibco) a 37 ° C. La línea celular MCF-7, es del subtipo luminal (Engelmann, Shen, & Finn, 2008). La línea MCF-7 tiene un fenotipo ALDH⁺, CD44^{low}, E-caderina⁺ (Chekhun, Bezdenezhnykh, Shvets, & Lukianova, 2013). Se cultivaron en medio DMEM de alta glucosa (4.5 g/l, Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco) a 37 ° C y 5% de CO₂. Para experimentos posteriores las células se despegaron del plástico donde se encontraban adheridas con el agente proteolítico tripsina 0.05% EDTA (Gibco).

7.2 Citometría de Flujo

Para los ensayos de citometría de flujo se despegaron las células con tripsina 0.05% EDTA (Gibco) diluida 1:1 con PBS (Gibco) de la superficie donde se encontraban adheridas, para evitar la eliminación artificial de los receptores de superficie. Se contó el número de células mediante el método de exclusión del colorante azul tripán al 0.4% (Sigma) en hematocitometro, realizándose el ensayo con una viabilidad celular del 95%. Se realizó una suspensión celular de 1×10^5 células en 100 μ l de buffer de tinción (PBS al 10% de SFB inactivado por calor) para la autofluorescencia y para la tinción del receptor CD44 se utilizó el anticuerpo APC mouse anti-human CD44 clona G44-26 (BD Bioscience) 1/50. Se incubaron a 4 ° C en oscuridad por 20 minutos. Posteriormente se

centrifugó a 800 g por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionó 100 µl de buffer de lavado (PBS al 1% de SFB inactivado por calor y 0.09% de Azida de Sodio) y se centrifugó a 800 g por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de PBS. Se adquirió en el citómetro de flujo FACS Aria III (BD Bioscience). El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo 7.6. (Tree Star, Ashland, OR).

7.3 Ensayos de citotoxicidad

Para la evaluación de la citotoxicidad en las líneas celulares de los compuestos seleccionados se realizaron ensayos de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difenil tetrazolio) para la línea celular MCF-7 para determinar el número de células viables a través de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (Slater, Sawyer, & Straeuli, 1963) que reduce las sales de tetrazolio en cristales de formazan (Mosmann, 1983). Para la línea celular MDA-MB-231 se utilizó MTS (Promega) análogo del MTT, esto debido a que con el MTT se obtenían lecturas negativas.

Se utilizaron placas de 96 pozos (Nunc) en las que se sembraron 7.5×10^3 células por quintuplicado en 100 µl de medio correspondiente. Después de 24 h para dejar adherir, se dio el tratamiento con los compuestos seleccionados a diferentes concentraciones y las células se incubaron por 48 h adicionales.

Para los compuestos 9805 y 1276, su control fue con medio correspondiente, debido a que su solubilidad lo permitía. Para el compuesto 4865, por su poca solubilidad en medio se debió solubilizar en DMSO, por lo que el control fue medio correspondiente al 0.4% de DMSO (porcentaje conservado en las diluciones del compuesto).

Posteriormente se adicionó MTT (Sigma) al 0.5% o MTS (Promega) a (20 µg/ml) y se incubó cada placa por 4 h a 37°C, se retiró el medio en caso del MTT y se disolvieron los cristales de formazan con 100 µl de DMSO (Dimetil sulfóxido, Sigma); para el MTS no se realizó este paso por ser las sales solubles en el medio. Finalmente se cuantificó la absorbancia a 570 nm en el lector de placas EPOCH (BioTek).

Se obtuvo el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀, por sus siglas en inglés) que es la concentración del compuesto que reduce la actividad bioquímica o celular al 50% del valor normal en ausencia del inhibidor (Schwab, 2011); mediante la aplicación de regresión no lineal con el modelo de ecuaciones dosis – respuesta de inhibición (log (inhibidor) vs. respuesta de 3 parámetros, con un intervalo de confianza de 95%.) (GraphPad Prism 6 para Windows, versión 6.01, La Jolla California USA).

7.4 Ensayos de formación de mamoesferas

Para la evaluación del posible efecto sobre las CTT por los compuestos seleccionados se realizaron ensayos de formación de mamoesferas para cada línea celular durante siete días. Se utilizaron placas de 6 pozos de ultra-baja adherencia (Corning COSTAR) sembrando 20,000 células (se aseguró que la suspensión fuera unicelular al pasarla tres veces a través de una jeringa con aguja de 25G) en 2 ml de medio MammoCult (StemCell Technologies) complementado con suplementos de proliferación 1:10 (StemCell Technologies), heparina a 4 µg/ml (StemCell Technologies) e hidrocortisona a 0.48 µg/ml (Sigma).

Las concentraciones de fármacos evaluadas fueron de 0.1 µM a 100 µM. Cada tercer día se reconstituyó con 500 µl de medio. Para los pozos control de los compuestos

9805 y 1276 se utilizó medio MammoCult, mientras que para el compuesto 4867 se utilizó MammoCult suplementado al 0.4% de DMSO.

Después de 7 días de incubación, se documentó cada pozo con el software CellSense (Olympus). Se tomaron fotografías de cada pozo con el microscopio invertido (Olympus, modelo IX-51), mediante el objetivo 4x calibrado. Se reconstruyeron las imágenes tomadas de cada pozo en el software GIMP 2.8.10 (Image manipulation program para Windows) conservando las dimensiones con que fueron tomadas las fotos en un lienzo de 8400 x 7200 pixeles.

Posteriormente se analizaron en el software NIS Elements Basic Research (Nikon) cuantificando el número y tamaño de las mamoesferas obtenidas en cada condición experimental. Para ambos parámetros se consideró un corte de 80 μm de diámetro, dado que las mamoesferas de MDA-MB-231 no son esféricas se consideró pertinente que para ambas líneas celulares se realizará el corte en el área de 4932.2 μm^2 que es lo equivalente a 80 μm de diámetro de las mamoesferas de MCF-7 (Gungor, 2013). Se consideró mamoesfera a una colonia de células proliferando de manera compacta en una superficie de baja adherencia (Maguer-Satta, Chapellier, Delay, & Bachelard-Cascales, 2011).

7.5 Análisis estadístico

Se analizaron los datos de los ensayos de citotoxicidad y mamoesferas en el software GraphPad Prism 6. Para los ensayos de citotoxicidad se realizaron pruebas de ANOVA de una vía y la prueba de Dunnet para comparaciones múltiples vs. Control. Los datos de los ensayos de mamoesferas se les realizaron pruebas de normalidad para ver si los

datos seguían una distribución normal o no, con la prueba de D'Agostino & Pearson. En caso de que la prueba de normalidad arrojara que se comporta como una distribución no normal, se realizaron pruebas de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. En caso que la distribución fuera normal se realizó una ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Dunnett. En todos los casos el nivel de significancia (α) fue del 0.05%.

8. Resultados

8.1 Expresión de CD44

Se utilizó citometría de flujo para medir la expresión del receptor CD44 en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. La línea celular MDA-MB-231 tiene una población del 98.3% positiva para CD44 (Fig. 5A), mientras que la línea celular MCF-7 tiene una población del 79.7% positiva para CD44 (Fig. 5B).

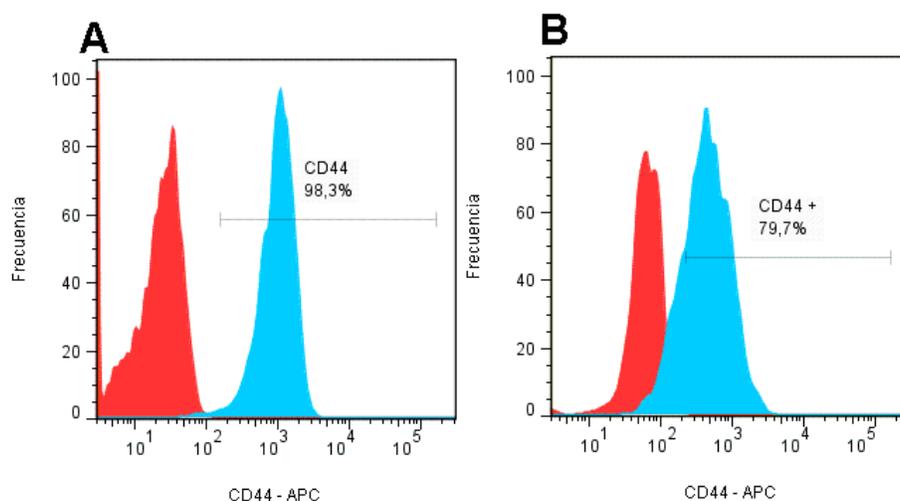


Fig. 5. Análisis de la expresión de CD44 en las líneas celulares A) MDA-MB-231 y B) MCF-7 por citometría de flujo. En rojo se encuentra la autofluorescencia de las células en ausencia de anticuerpo y en azul la población positiva para CD44.

8.2 Ensayos de citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de cada compuesto mediante los ensayos de MTT/MTS a diferentes concentraciones desde 0.5 a 128 μM para los compuestos 9805 y 4865 mientras que para el compuesto 1278 se evaluaron concentraciones desde 0.03 hasta 100 μM . A continuación se muestra la evaluación de la citotoxicidad a 48 h, donde se observa un efecto citotóxico en al menos uno de los tres compuestos evaluados en ambas líneas celulares.

Para el compuesto 9805 a 48 h, se observó un efecto citotóxico en ambas líneas celulares. En la línea celular MDA-MB-231 (Fig. 6A) se observa que el compuesto empieza a ser citotóxico alrededor de 1 μM alcanzando una concentración inhibitoria 50 (IC50) de 0.73 μM (tabla 2). Para la línea celular MCF-7 desde la concentración más baja evaluada, se observó citotoxicidad (Fig. 6B) y tras el análisis de datos se calcula una IC50 aproximada de 0.22 μM (tabla 2).

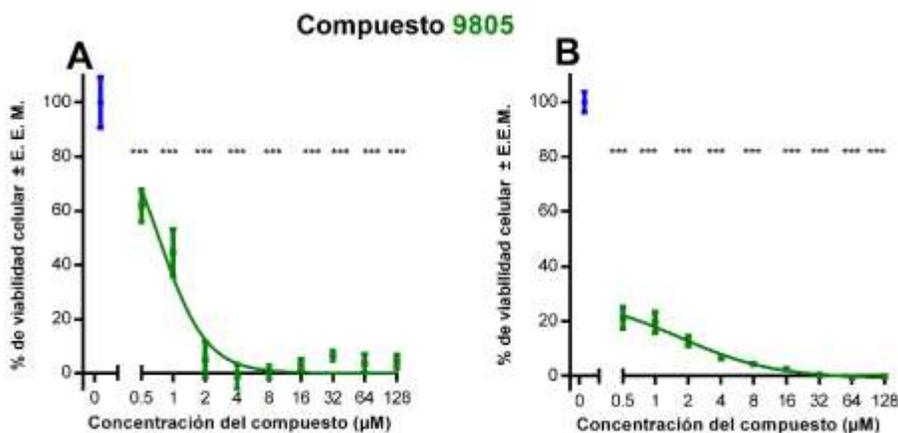


Fig. 6. Citotoxicidad del compuesto 9805 en las líneas celulares A) MDA-MB-231 y en B) MCF-7 a 48 h de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control (medio correspondiente) = 0 (Prueba estadística de Dunnet). Experimento representativo de una $n=3$, cada punto representa la media de quintuplicados \pm el error estándar.

Para el compuesto 1276 se observó que a 48 h, no alcanza la IC50 en ninguna de las líneas celulares al menos en las condiciones evaluadas (Fig. 7), también se calculó el valor de la IC50 aproximada, siendo de 139.4 μM para la línea celular MDA-MB-231 y de 171 μM para línea celular MCF-7 (tabla 2). Por lo que se descarta que el efecto en ensayos posteriores se deba a la citotoxicidad del compuesto.

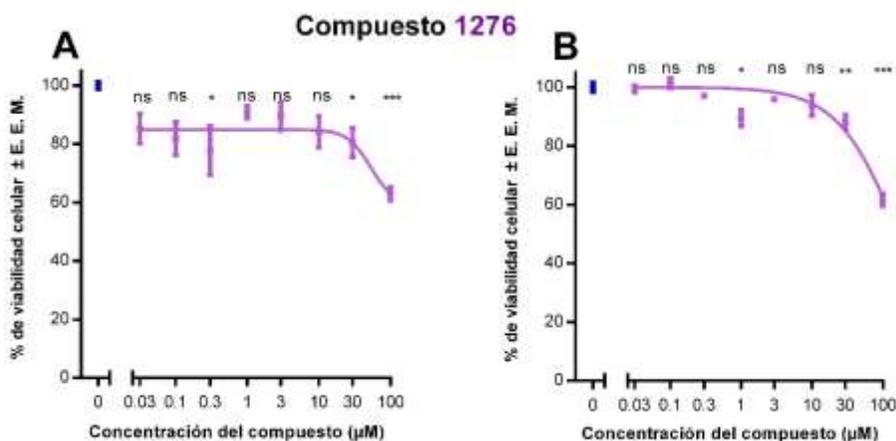


Fig. 7. Citotoxicidad del compuesto 1276 en las líneas celulares A) MDA-MB-231 y en B) MCF-7 a 48 h de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control (medio correspondiente) = 0 (Prueba estadística de Dunnet). Experimento representativo de una $n=3$, cada punto representa la media de quintuplicados \pm el error estándar.

Para el compuesto 4867 a 48 h, no alcanza la IC50 a las concentraciones evaluadas (Fig. 8). El control de DMSO al 0.4% para la línea MCF-7 tiene un efecto en la proliferación y no así para MDA-MB-231. En la línea celular MDA-MB-231 para las concentraciones de 0.5 a 8 μM , el compuesto 4867 tiene un efecto proliferativo con respecto al control de DMSO. La línea celular MDA-MB-231 es más sensible al compuesto, teniendo una IC50 calculada de 137.5 μM , mientras que para MCF-7 fue de 212.3 μM (tabla 2).

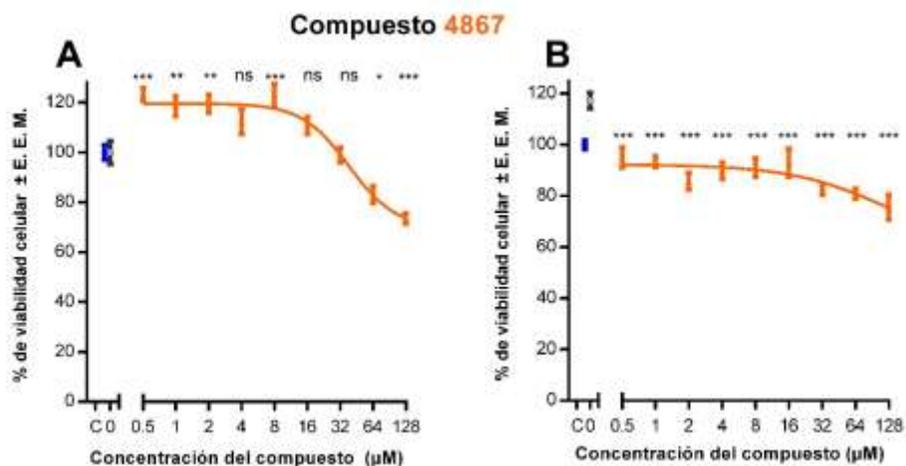


Fig. 8. Citotoxicidad del compuesto 4867 en las líneas celulares A) MDA-MB-231 y en B) MCF-7 a 48 h de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control de DMSO (al 0.4%) = 0. (Prueba estadística de Dunnet). C = Control (medio correspondiente). Experimento representativo de una $n=3$, cada punto representa la media de quintuplicados \pm el error estándar.

En la tabla 2 se compilaron los datos de las IC50 de los tres compuestos evaluados en ambas líneas celulares. El compuesto 9805 es citotóxico en ambas líneas celulares a concentraciones bajas, mientras que en las concentraciones evaluadas los compuestos 1276 y 4867 no presentan citotoxicidad.

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias 50 (IC50) a 48 h de exposición de los compuestos evaluados (IC50 estimadas por GraphPad Prism 6):

	9805	1276	4867
MDA-MB- 231	0.73 μ M	> 100 μ M (\approx 139.4 μ M)	> 128 μ M (\approx 137.5 μ M)
MCF-7	<0.5 μ M (\approx 0.22 μ M)	> 100 μ M (\approx 171 μ M)	> 128 μ M (\approx 212.3 μ M)

8.3 Ensayos de formación de Mamoesferas

Se tiene diferentes ensayos *in vitro* para conocer la heterogeneidad, proliferación, autorenovación y diferenciación de distintas poblaciones celulares de las células troncales al igual para el estudio de las CTT. Uno de ellos es el sistema de cultivo en condiciones de baja adherencia y en presencia de factores de crecimiento que permita aislar y caracterizar las CTTM, las cuales forman colonias esféricas a partir de una sola célula con fenotipo parecido al troncal o de progenitor temprano, a estas colonias se les llama mamoesferas. Si se mantiene este sistema a lo largo de pases seriados permite evaluar la autorenovación (Dontu et al., 2003). El fenotipo CD44⁺/CD24⁻ tiene propiedades de células con fenotipo troncal o de progenitor, como la capacidad de proliferar *in vitro* como mamoesferas en cultivo no adherente (Ponti et al., 2005).

8.3.1.1 Compuesto 9805 en MDA-MB-231

Se observó que en el control del compuesto se forman mamoesferas de diferentes tamaños (Fig. 9). Se determinó que después de 7 días de exposición al compuesto a partir de una concentración de 0.1 μM hasta 100 μM se tiene un efecto dosis dependiente en la reducción de la formación de mamoesferas, tanto en el tamaño como en el número de las mismas (Figs. 9 y 10). Además se percibe que desde 0.1 μM las mamoesferas formadas presentan daño celular aparente (Fig. 9).

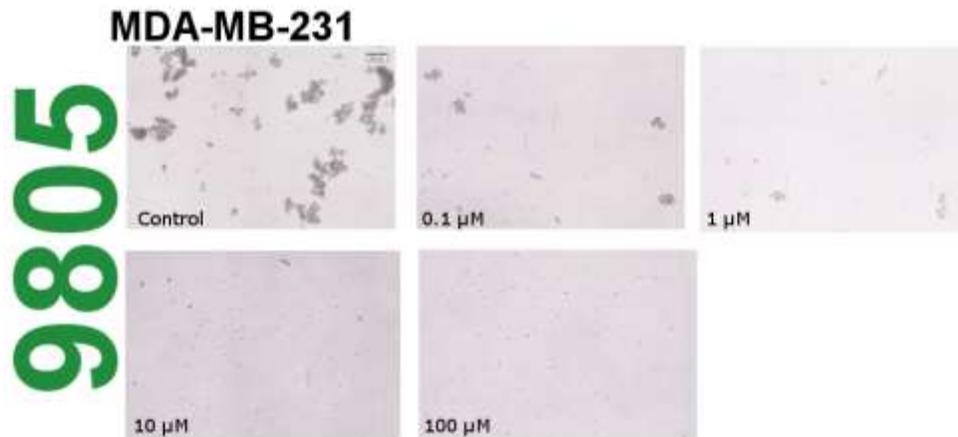


Fig. 9. Mamoferas de células MDA-MB-231 tras 7 días de exposición al compuesto 9805. La barra corresponde a 200 μm .

Dicho efecto pudiera deberse a la citotoxicidad del compuesto a partir de la concentración de 1 μM .

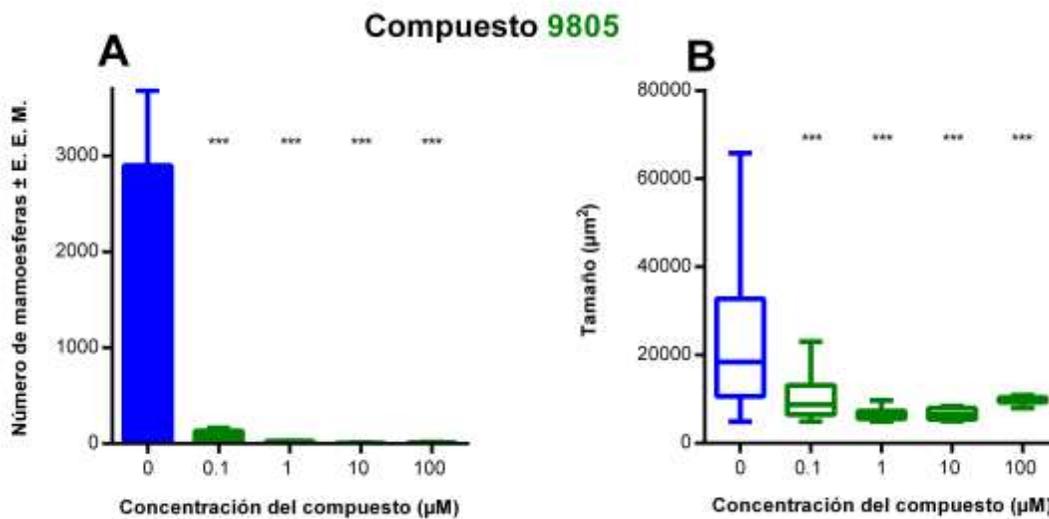


Fig. 10. Efecto del compuesto 9805 en la línea celular MDA-MB-231 en el número (A) y en el tamaño (B) de mamoferas formadas tras 7 días de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control = C. (Prueba estadística de Dunnet para A y prueba estadística de Dunn para B). Las barras representan la media \pm el error estándar de la misma ($n=2$).

8.3.1.2 Compuesto 9805 en MCF-7

Se observa que en el control existe formación de mamoesferas. A la concentración de 0.1 μM del compuesto hay formación de mamoesferas similares en tamaño con respecto al control a los 7 días del experimento las cuales se muestran a continuación:

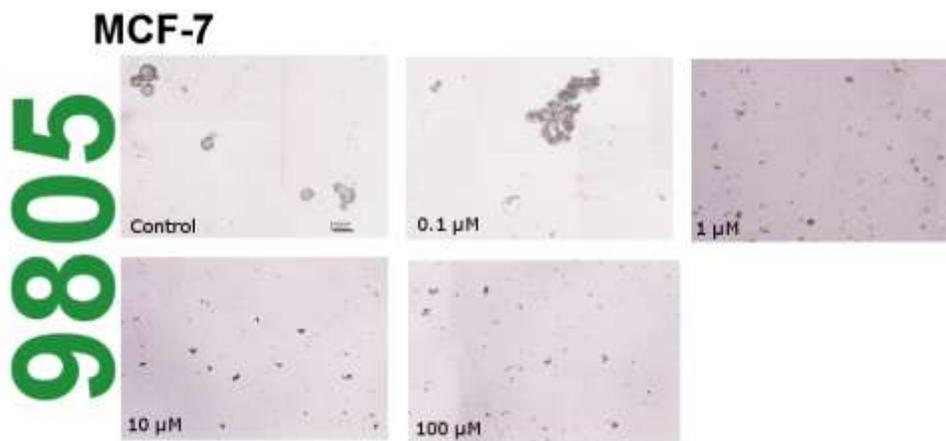


Fig. 11. Mamoesferas de células MCF-7 tras 7 días de exposición al compuesto 9805. La barra corresponde a 200 μm .

Desde la concentración 1 μM hasta 100 μM se ve disminuida la formación de mamoesferas tanto en el tamaño como en el número (Fig. 11).

Al realizar el análisis estadístico se obtuvo que el compuesto reduce el número de mamoesferas formadas de manera dosis dependiente desde la concentración de 0.1 μM hasta 100 μM (Fig. 12A). En cuanto al tamaño de las mamoesferas no hubo cambios significativos entre la concentración 0.1 μM y el control, mientras que a concentraciones mayores se obtuvo una reducción estadísticamente significativa (Fig. 12B).

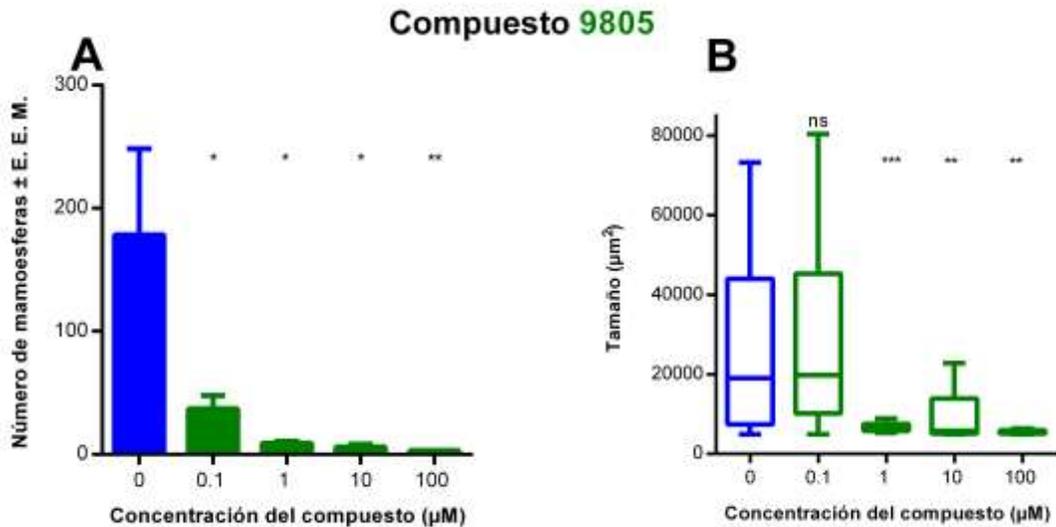


Fig. 12. Efecto del compuesto 9805 en la línea celular MCF-7 en el número (A) y en el tamaño (B) de mamoesferas formadas tras 7 días de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control = C. (Prueba estadística de Dunnet para A y prueba estadística de Dunn para B). Las barras representan la media \pm el error estándar de la misma (n=2).

8.3.2.1 Compuesto 1276 en MDA-MB-231

En la condición control se observó la formación de mamoesferas. Después del tratamiento con el compuesto 1276 a 7 días no se observó cambio aparente con respecto al control en el tamaño, ni en el número de mamoesferas formadas a ninguna concentración (Fig. 13).

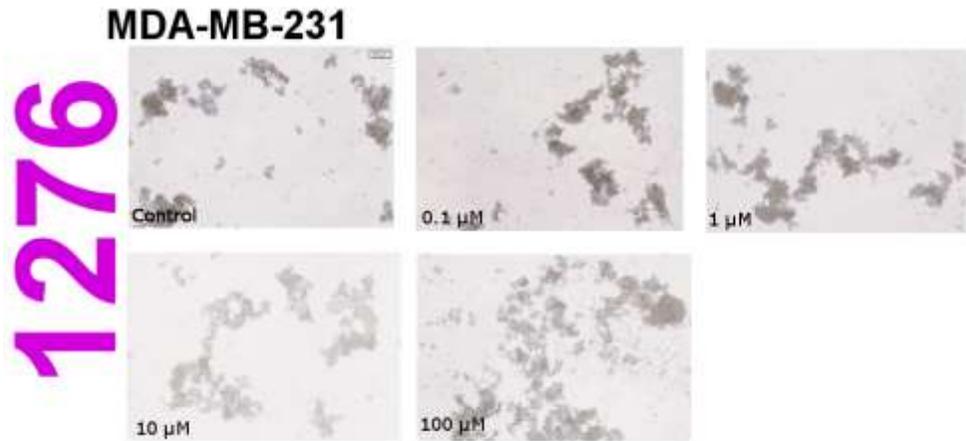


Fig. 13 Mamoeferas de células MDA-MB-231 tras 7 días de exposición al compuesto 1276. La barra corresponde a 200 μm.

De acuerdo al análisis estadístico el tratamiento con el compuesto 1276 no tuvo efecto significativo en el número de mamoeferas en ninguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 14A). Sin embargo, para el tamaño se observa que desde 0.1 μM hasta 100 μM hay un incremento en el tamaño que en las mamoeferas formadas en el control (Fig. 14B).

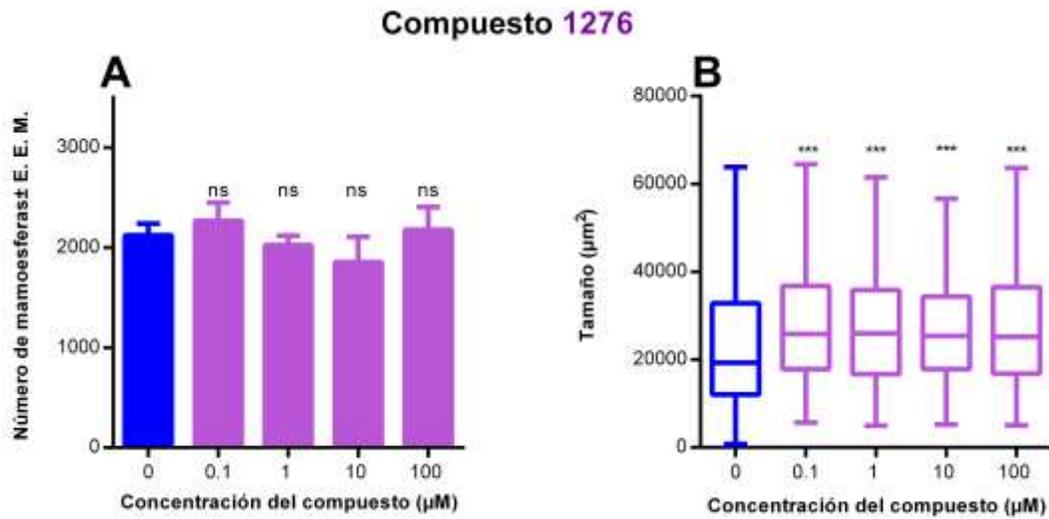


Fig. 14. Efecto del compuesto 1276 en la línea celular MDA-MB-231 en el número (A) y en el tamaño (B) de mamoesferas formadas tras 7 días de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control = C. (Prueba estadística de Dunnet para A y prueba estadística de Dunn para B). Las barras representan la media \pm el error estándar de la misma (n=2).

8.3.2.2 Compuesto 1276 en MCF-7

En condiciones control, se forman mamoesferas. A simple vista pareciera que las mamoesferas formadas después del tratamiento con el compuesto son similares a las condiciones control (Fig. 15.)

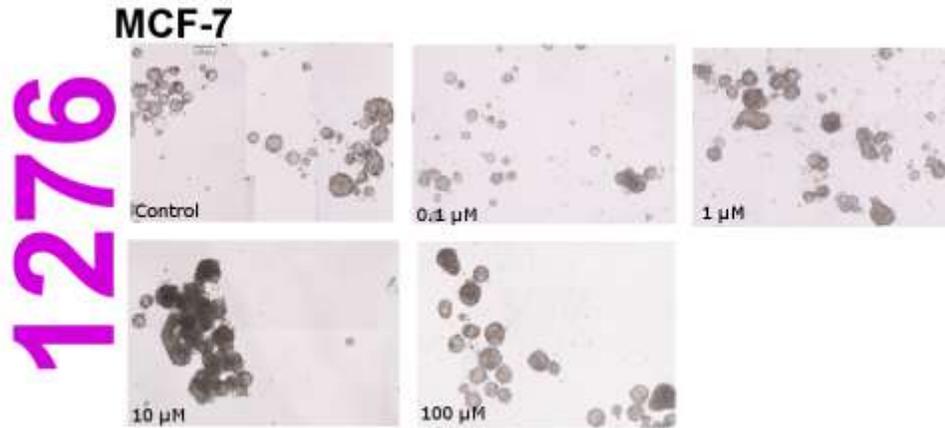


Fig. 15 Mamoeferas de células MCF-7 tras 7 días de exposición al compuesto 1276. La barra corresponde a 200 μm .

En la línea MCF-7 parece que no hay un efecto estadísticamente significativo a las condiciones evaluadas, ni en el número, ni en el tamaño de las mamoeferas formadas (Fig. 16).

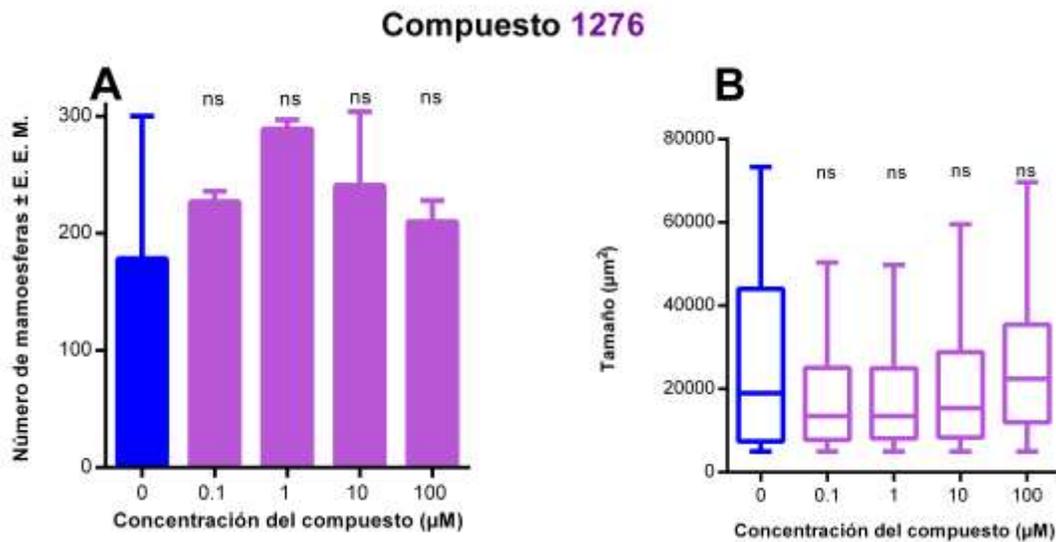


Fig. 16. Efecto del compuesto 1276 en la línea celular MCF-7 en el número (A) y en el tamaño (B) de mamoeferas formadas tras 7 días de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control = C. (Prueba estadística de Dunnet para A y prueba estadística de Dunn para B). Las barras representan la media \pm el error estándar de la misma (n=2).

8.3.3.1 Compuesto 4867 en MDA-MB-231

En este compuesto, hay formación de mamoesferas de manera similar, tanto en el control de DMSO al 0.4% como para el control de solo medio (se contempló este control para descartar el efecto del DMSO en la formación de mamoesferas). A partir de la concentración de 0.1 μM hay un efecto inhibitorio en el número de mamoesferas. En cuanto al tamaño de las mamoesferas se observa un efecto inhibitorio dosis dependiente a partir de la concentración 1 μM (Fig. 17).

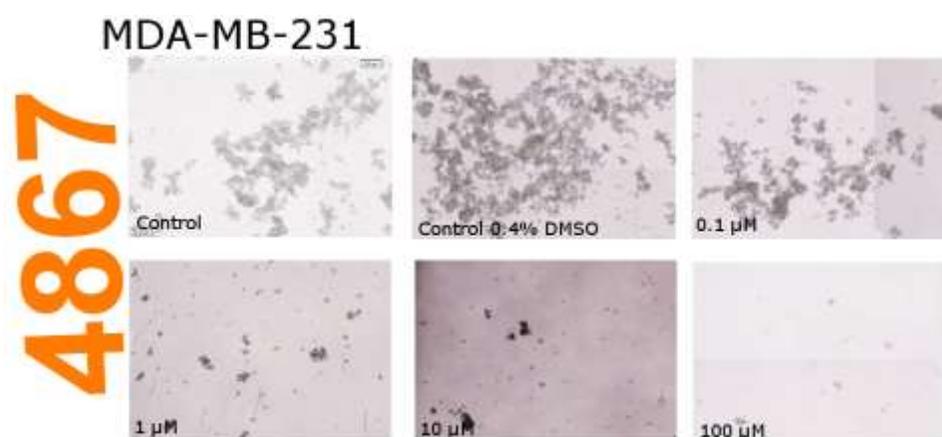


Fig. 17. Mamoesferas de células MDA-MB-231 tras 7 días de exposición al compuesto 4867. La barra corresponde a 200 μm .

Al analizar estadísticamente el compuesto 4867 se obtiene que este reduce el número de mamoesferas formadas desde 0.1 μM hasta 100 μM , la reducción es dosis dependiente (Fig. 18A). En cuanto al tamaño se ve reducida desde la concentración 0.1 μM y el efecto se pronuncia a dosis mayores (Fig. 18B).

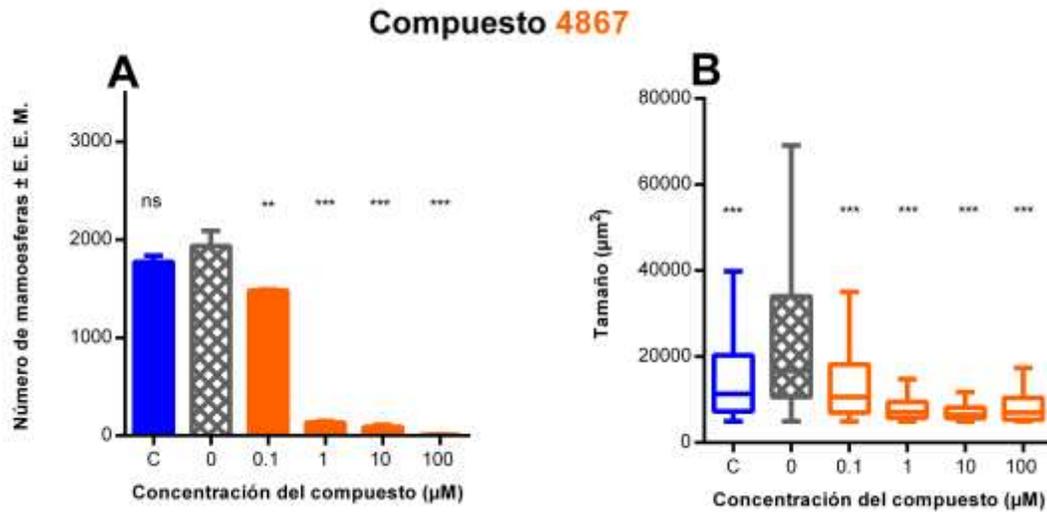


Fig. 18. Efecto del compuesto 4867 en la línea celular MDA-MB-231 en el número (A) y en el tamaño (B) de mamoesferas formadas tras 7 días de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control de DMSO = C DMSO. (Prueba estadística de Dunnett para A y prueba estadística de Dunn para B). Las barras representan la media ± el error estándar de la misma (n=2).

8.3.3.2 Compuesto 4867 en MCF-7

Para este compuesto hay formación similar de mamoesferas tanto en la condición control de solo medio, como en el control de medio al 0.4% de DMSO (dada la solubilidad del compuesto). Se observa que las mamoesferas formadas desde 1 µM se ven disminuidas en tamaño y en número, además de presentar un daño celular aparente (Fig. 19).

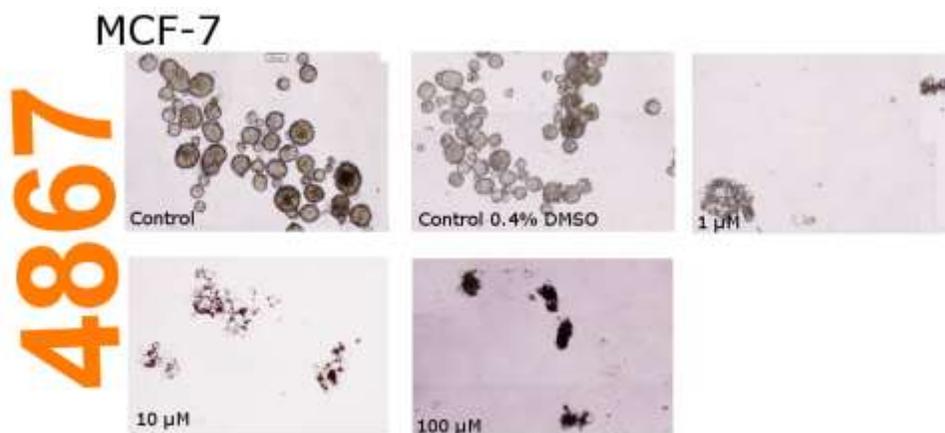


Fig. 19. Mamoferas de células MCF-7 tras 7 días de exposición al compuesto 4867. La barra corresponde a 200 μm .

Al realizar el análisis estadístico se tiene que en cuanto al efecto sobre el número de mamoferas formadas, el compuesto 4867 no tuvo un efecto estadísticamente significativo sino hasta la concentración de 100 μM (Fig. 20A). Sin embargo en cuanto al tamaño se ven reducidas las mamoferas formadas desde la concentración de 1 μM hasta 100 μM (Fig. 20B).

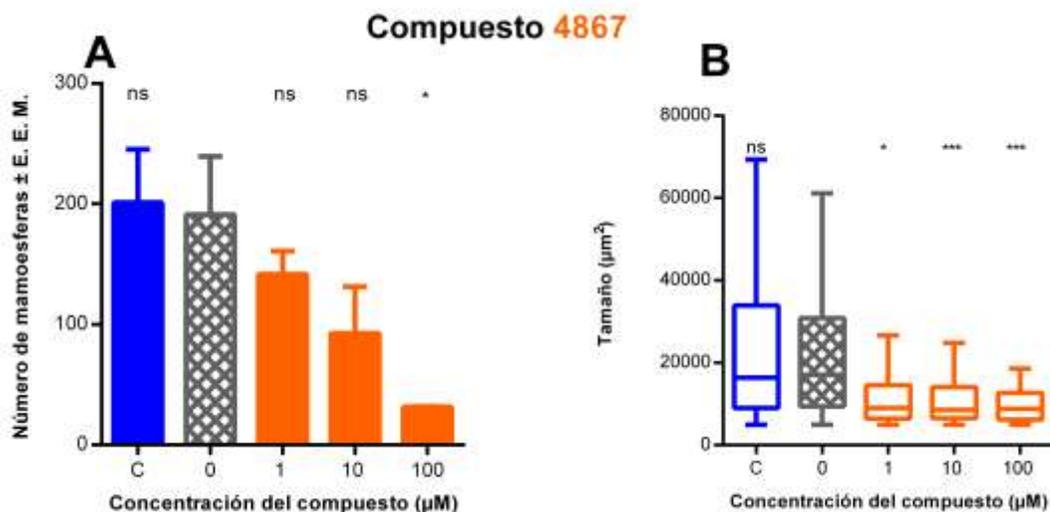


Fig. 20. Efecto del compuesto 4867 en la línea celular MCF-7 en el número (A) y en el tamaño (B) de mamoesferas formadas tras 7 días de exposición. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ contra el control de DMSO = C DMSO. (Prueba estadística de Dunnet para A y prueba estadística de Dunn para B). Las barras representan la media \pm el error estándar de la misma ($n=2$).

9. Discusión y conclusiones

El presente trabajo evalúa la relevancia funcional *in vitro* de tres compuestos seleccionados por cribado virtual dirigidos contra el receptor CD44. Dichos compuestos se evaluaron en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

Para validar el uso de las líneas celulares, la expresión de CD44 se comparó con lo ya reportado. Para la línea celular MDA-MB-231, se obtuvo una población positiva para el receptor CD44 del 98.3%. En la literatura se menciona que la fracción de células CD44⁺ varía de 92 a 99% (Murohashi et al., 2009). En contraste, para la línea celular MCF-7 el porcentaje de células CD44⁺ reportado varía desde 15 a un 80%. Nuestros resultados indican que la línea celular aquí utilizada es positiva a CD44 en un 79.7%, lo que

concuerta con el rango reportado. Estos resultados indican que la línea celular MCF-7 tiene niveles altos de expresión, pero en menor porcentaje que la línea celular MDA-MB-231 (Engelmann et al., 2008).

En los ensayos de citotoxicidad y formación de mamoesferas se encontró que los compuestos evaluados tienen diferente eficacia y potencia a pesar de que se seleccionaron para un blanco en específico. La simulación *in silico* es una herramienta de uso en el área de farmacología para el descubrimiento y desarrollo de compuestos con algún posible potencial terapéutico.

Dicha simulación brinda un buen acercamiento y estimación de la unión del receptor a su ligando pero aún existe la posibilidad de falsos positivos, a pesar de las correcciones que se ha implementado a las simulaciones, los sistemas vivos siguen siendo difíciles de predecir en su totalidad (Ekins, Mestres, & Testa, 2007). Los compuestos, al ser seleccionados de una base de datos de fármacos con aplicaciones clínicas, ya cuentan con otro uso y por ende otro blanco terapéutico que podría estar expresado en las líneas celulares evaluadas, lo que podría explicar porque se tienen compuestos con diferente potencia.

De los tres compuestos evaluados, el compuesto 9805 es el único que muestra alta citotoxicidad en cultivos adherentes de ambas líneas celulares bajo las condiciones evaluadas. Este fármaco es un inhibidor de la síntesis proteica a altas concentraciones, lo cual puede explicar su citotoxicidad (Grollman, 1975). El compuesto 9805 dada su

citotoxicidad, no es un compuesto que se tenga planeado seguir estudiando pues al ser tóxico en cultivos adherentes y por no ser selectivo para CTT, pudiera ser citotóxico para células normales.

El compuesto 1276, a pesar de que no presentó citotoxicidad en condiciones adherentes, es el único compuesto de los tres aquí evaluados que no tiene un efecto inhibitorio en la formación de mamoesferas. Esto pudiera deberse a que no se une al receptor CD44. Se esperaba que los compuestos inhibieran la formación de mamoesferas ya que existe evidencia de inhibición en la formación de mamoesferas al inhibir la expresión de CD44 (knockdown de CD44) (Hiraga, Ito, & Nakamura, 2013). No se seguirá estudiando este compuesto ya que no inhibe la formación de mamoesferas, ensayo que nos permite evaluar el efecto de los compuestos sobre la subpoblación con fenotipo parecido a CTT (Dontu et al., 2003).

El compuesto 4867 al no mostrar citotoxicidad pero si inhibición en la formación de mamoesferas, es el compuesto que muy probablemente nos interesa seguir estudiando. En este trabajo no se demuestra que dicho efecto sea específico por la unión a CD44, se deberá comprobar para ensayos posteriores que el compuesto antagoniza al receptor.

Dado que el receptor CD44, es uno de los marcadores para identificar a la subpoblación CTT, se esperaría que el compuesto 4867 tenga efecto sobre otras características funcionales de las CTT. Al realizar un knockdown de CD44, las células

cancerosas cambian el patrón de genes expresados asociados a la capacidad de migración y metástasis. Se esperaría por tanto que el compuesto 4867 pudiera tener un efecto inhibitorio de la migración y metástasis (Pham et al., 2011).

Aunado a las funciones a las que se le han asociado al receptor CD44 con las CTT, se encuentra la resistencia a fármacos, cuando se realiza un knockdown de CD44, las células cancerosas se vuelven más susceptibles a fármacos anticancerosos. Si el efecto del compuesto 4867 observado en este trabajo fuese específico por la unión al receptor CD44, se podría evaluar su efecto sobre la resistencia a fármacos (Van Phuc et al., 2011).

Al compuesto 4867 no solo se pueden evaluar otras funciones asociadas a las CTT *in vitro* sino también su efecto *in vivo*. Se ha asociado al fenotipo CD44+/CD24- como aquella subpoblación altamente tumorigénica *in vivo* mediante xenotransplantes en ratones inmunosuprimidos. Lo anterior permite que exista un mantenimiento del tumor, por lo que se podría evaluar el compuesto en un modelo animal, si se comprueba que el compuesto 4867 inhibe otras características de las CTT *in vitro* (Al-Hajj et al., 2003; Van Pham et al., 2013).

Si se estudia el compuesto 4867 para conocer su mecanismo de acción (como comprobar la unión del compuesto al receptor o inhibición de la ruta de señalización Nanog – STAT3 mediante: 1) Western Blot observando la inhibición de la fosforilación de proteínas río abajo o 2) mediante qRT PCR para ver si la expresión de genes

asociados a la vía o incluso a genes de troncalidad se ven disminuidos) y experimentalmente se comprueba que dicho compuesto inhibe o bloquea las funciones asociadas al receptor CD44 *in vitro* e *in vivo*, podría servir como posible terapia para pacientes con tumores del subtipo triple negativo, dado que la línea MDA-MB-231 es más sensible en los ensayos de mamoesferas. Al observarse también efecto en la línea MCF-7 pero en menor grado, podría buscar administrarse en combinación con otros compuestos en pacientes con tumores del subtipo luminal.

En conclusión la combinación de ensayos de mamoesferas y citotoxicidad en condiciones adherentes sirvió como tamiz para seleccionar compuestos con potencial para tratar el cáncer de mama. El compuesto 4867 muy posiblemente se estudiará a futuro para aclarar su mecanismo de acción. Esta estrategia de tamizaje puede servir para identificar otros compuestos que pudieran tener efecto sobre la subpoblación de CTT.

10. Referencias

- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. doi:10.1038/sj.onc.1210220
- Afify, A., Purnell, P., & Nguyen, L. (2009). Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Exp Mol Pathol*, 86(2), 95-100. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.003
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Alvarez, J., & Shoichet, B. (2005). *Virtual screening in drug discovery*. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9-18. doi:10.1093/carcin/bgp268
- Baker, E. K., & El-Osta, A. (2004). MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling. *Cancer Biol Ther*, 3(9), 819-824. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15326379>
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cbt.3.9.1101>
- Beck, B., & Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer*, 13(10), 727-738. doi:10.1038/nrc3597
- Begg, A. C., Stewart, F. A., & Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer*, 11(4), 239-253. doi:10.1038/nrc3007
- Bhalla, K. N. (2003). Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene*, 22(56), 9075-9086. doi:10.1038/sj.onc.1207233
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337. doi:10.1038/nature03096
- Bieging, K. T., Mello, S. S., & Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14(5), 359-370. doi:10.1038/nrc3711
- Bourguignon, L. Y. (2001). CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6(3), 287-297. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1011371523994>
- Bourguignon, L. Y., Gunja-Smith, Z., Iida, N., Zhu, H. B., Young, L. J., Muller, W. J., & Cardiff, R. D. (1998). CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor

- cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol*, 176(1), 206-215. doi:10.1002/(sici)1097-4652(199807)176:1<206::aid-jcp22>3.0.co;2-3
- Bourguignon, L. Y., Peyrollier, K., Xia, W., & Gilad, E. (2008). Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem*, 283(25), 17635-17651. doi:10.1074/jbc.M800109200
- Bourguignon, L. Y., Spevak, C. C., Wong, G., Xia, W., & Gilad, E. (2009). Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem*, 284(39), 26533-26546. doi:10.1074/jbc.M109.027466
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936. doi:10.1038/nature04478
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 118-132. doi:10.1038/nrc1276
- Collins, K., Jacks, T., & Pavletich, N. P. (1997). The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(7), 2776-2778. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096291>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC34145/pdf/pq002776.pdf>
- Curto, M., Cole, B. K., Lallemand, D., Liu, C. H., & McClatchey, A. I. (2007). Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol*, 177(5), 893-903. doi:10.1083/jcb.200703010
- Chekhun, S., Bezdenezhnykh, N., Shvets, J., & Lukianova, N. (2013). Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. *Exp Oncol*, 35(3), 174-179.
- Devi, P. (2004). Basics of carcinogenesis. *Health Administrator*, XVII(1), 16-24.
- Dimri, G., Band, H., & Band, V. (2005). Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res*, 7(4), 171-179. doi:10.1186/bcr1275
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., & Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, 17(10), 1253-1270. doi:10.1101/gad.1061803

- Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Br J Pharmacol*, 152(1), 21-37. doi:10.1038/sj.bjp.0707306
- Engelmann, K., Shen, H., & Finn, O. J. (2008). MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res*, 68(7), 2419-2426. doi:10.1158/0008-5472.can-07-2249
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. (2012). Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Retrieved from http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx?country=900
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57(7), 727-741. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075079>
http://ac.els-cdn.com/S0006295298003074/1-s2.0-S0006295298003074-main.pdf?_tid=0ed55a74-7fe2-11e4-813f-00000aab0f01&acdnat=1418157141_b2d68c7033fd1468755bd1afd9d8a86e
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., . . . Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555-567. doi:10.1016/j.stem.2007.08.014
- Grollman, A. (1975). Cytotoxic Inhibitors of Protein Synthesis. In A. Sartorelli & D. Johns (Eds.), *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents* (Vol. 38 / 2, pp. 554-570): Springer Berlin Heidelberg.
- Gungor, B., Owens, P., Moses, H.L. (2013). Uncovering the role of TGFB and BMP in triple negative breast cancer stem cells. *Young Scientists Journal*, 3.
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/S0092867400801087/1-s2.0-S0092867400801087-main.pdf?_tid=b438a8f6-7a59-11e4-8121-00000aacb35f&acdnat=1417548822_391278b9c87b1c54bc4a32e5d72b469b
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
http://ac.els-cdn.com/S0092867400816839/1-s2.0-S0092867400816839-main.pdf?_tid=ed21aa70-7ff2-11e4-a642-00000aab0f26&acdnat=1418164386_175db02fd7222ec1b25f576c4ad8a730
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

- Harada, H., & Takahashi, M. (2007). CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem*, 282(8), 5597-5607. doi:10.1074/jbc.M608358200
- Hiraga, T., Ito, S., & Nakamura, H. (2013). Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res*, 73(13), 4112-4122. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3801
- Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tsiachlis, P. N., & Struhl, K. (2009). Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res*, 69(19), 7507-7511. doi:10.1158/0008-5472.can-09-2994
- Hollier, B. G., Tinnirello, A. A., Werden, S. J., Evans, K. W., Taube, J. H., Sarkar, T. R., . . . Mani, S. A. (2013). FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer. *Cancer Res*, 73(6), 1981-1992. doi:10.1158/0008-5472.can-12-2962
- Huang, S. Y., & Zou, X. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int J Mol Sci*, 11(8), 3016-3034. doi:10.3390/ijms11083016
- INEGI. (2012). Mortalidad general. Lista de tabulación 1 para mortalidad de la CIE : Tumores (neoplasias). Consulta de: Defunciones generales. Por: Año de registro. Según: Sexo Retrieved from http://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/Proyectos/bd/continuas/mortalidad/MortalidadGeneral.asp?s=est&c=11144&proy=mortgral_mg
- Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, 45(1), 177-182. doi:10.1021/ci049714+
- Jia, L. T., Zhang, R., Shen, L., & Yang, A. G. (2014). Regulators of carcinogenesis: Emerging roles beyond their primary functions. *Cancer Lett*. doi:10.1016/j.canlet.2014.11.048
- Kakarala, M., & Wicha, M. S. (2008). Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol*, 26(17), 2813-2820. doi:10.1200/jco.2008.16.3931
- Kim, J. J., & Tannock, I. F. (2005). Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer*, 5(7), 516-525. doi:10.1038/nrc1650
- Krishnamachary, B., Penet, M. F., Nimmagadda, S., Mironchik, Y., Raman, V., Solaiyappan, M., . . . Bhujwalla, Z. M. (2012). Hypoxia regulates CD44 and its variant isoforms through HIF-1alpha in triple negative breast cancer. *PLoS One*, 7(8), e44078. doi:10.1371/journal.pone.0044078

- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M. F., . . . Chang, J. C. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 100(9), 672-679. doi:10.1093/jnci/djn123
- Liu, S., Fu, R., Zhou, L. H., & Chen, S. P. (2012). Application of consensus scoring and principal component analysis for virtual screening against beta-secretase (BACE-1). *PLoS One*, 7(6), e38086. doi:10.1371/journal.pone.0038086
- Ma, W., Deng, Y., & Zhou, L. (2005). The prognostic value of adhesion molecule CD44v6 in women with primary breast carcinoma: a clinicopathologic study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 17(4), 258-263. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15997921>
- Maguer-Satta, V., Chapellier, M., Delay, E., & Bachelard-Cascales, E. (2011). CD10: a tool to crack the role of stem cells in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(49), E1264; author reply E1265. doi:10.1073/pnas.1116567108
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., . . . Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- Misra, S., Ghatak, S., Zoltan-Jones, A., & Toole, B. P. (2003). Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem*, 278(28), 25285-25288. doi:10.1074/jbc.C300173200
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16), 2785-2791. doi:10.1002/jcc.21256
- Morris, S. F., O'Hanlon, D. M., McLaughlin, R., McHale, T., Connolly, G. E., & Given, H. F. (2001). The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in stage two breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg Oncol*, 27(6), 527-531. doi:10.1053/ejso.2001.1167
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034>
- Munirah, M. A., Siti-Aishah, M. A., Reena, M. Z., Sharifah, N. A., Rohaizak, M., Norlia, A., . . . Das, S. (2011). Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Rom J Morphol Embryol*, 52(2), 669-677.

- Murohashi, M., Hinohara, K., Kuroda, M., Isagawa, T., Tsuji, S., Kobayashi, S., . . . Gotoh, N. (2009). Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*, *102*(1), 206-212. doi:<http://www.nature.com/bjc/journal/v102/n1/supinfo/6605468s1.html>
- NCI. (2009). Adjuvant and Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer. Retrieved from <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/adjuvant-breast>
- NCI. (2014). What is cancer? Retrieved from <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
- Neudert, G., & Klebe, G. (2011). DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. *J Chem Inf Model*, *51*(10), 2731-2745. doi:10.1021/ci200274q
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*, *2*(3), 213-219. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17326328>
- Olsson, E., Honeth, G., Bendahl, P. O., Saal, L. H., Gruvberger-Saal, S., Ringner, M., . . . Hegardt, C. (2011). CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer*, *11*, 418. doi:10.1186/1471-2407-11-418
- Orian-Rousseau, V., & Sleeman, J. (2014). CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. *Adv Cancer Res*, *123*, 231-254. doi:10.1016/b978-0-12-800092-2.00009-5
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Zhou, J., Claypool, K., & Tang, D. G. (2005). Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res*, *65*(14), 6207-6219. doi:10.1158/0008-5472.can-05-0592
- Pham, P. V., Phan, N. L., Nguyen, N. T., Truong, N. H., Duong, T. T., Le, D. V., . . . Phan, N. K. (2011). Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. *Journal of Translational Medicine*, *9*(1), 209.
- Polet, F., & Feron, O. (2013). Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force. *J Intern Med*, *273*(2), 156-165. doi:10.1111/joim.12016
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., . . . Daidone, M. G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, *65*(13), 5506-5511. doi:10.1158/0008-5472.can-05-0626

- Prochazka, L., Tesarik, R., & Turanek, J. (2014). Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal*, 26(10), 2234-2239. doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.011
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014
- Rajagopalan, H., & Lengauer, C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432(7015), 338-341. doi:10.1038/nature03099
- Reddy, K. B. (2011). Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol*, 18(4), e173-179. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3149549/pdf/conc-18-e173.pdf>
- Ruddon, R. W. (1995). *Cancer biology* (3rd ed. ed.). New York ; Oxford: Oxford University Press.
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer Biology* (4th ed.). New York Oxford University Press.
- Salomon-Ferrer, R. (2012). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *WIREs Comput Mol Sci*, 13. doi:10.1002/wcms.1121
- Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*, 23 Suppl 2, S60-64. doi:10.1038/modpathol.2010.33
- Schwab, M. (2011). *Encyclopedia of Cancer*. Springer.
- SEER, T. M. (2015). Cancer Classification Retrieved from <http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Shimo, T., Kurebayashi, J., Kanomata, N., Yamashita, T., Kozuka, Y., Moriya, T., & Sonoo, H. (2014). Antitumor and anticancer stem cell activity of a poly ADP-ribose polymerase inhibitor olaparib in breast cancer cells. *Breast Cancer*, 21(1), 75-85. doi:10.1007/s12282-012-0356-z
- SINAVE. (2012). Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2010. *Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Subsecretaría de prevención y promoción de la Salud*.
- Slater, T. F., Sawyer, B., & Straeuli, U. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*, 77, 383-393.
- Sleeman, J., Rudy, W., Hofmann, M., Moll, J., Herrlich, P., & Ponta, H. (1996). Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol*, 135(4), 1139-1150. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922392>

- Teriete, P., Banerji, S., Noble, M., Blundell, C. D., Wright, A. J., Pickford, A. R., . . . Jackson, D. G. (2004). Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44. *Mol Cell*, 13(4), 483-496. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14992719>
- Thanakit, V., Sampatanukul, P., Ruangvejvorachai, P., & Keelawat, S. (2005). The association of co-expression of CD44v4/MMP-9 with different nodal status in high-grade breast carcinoma patients. *J Med Assoc Thai*, 88 Suppl 4, S30-35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622998>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Tolg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., & Ponta, H. (1993). Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res*, 21(5), 1225-1229. Retrieved from <http://nar.oxfordjournals.org/content/21/5/1225.full.pdf>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, 31(2), 455-461. doi:10.1002/jcc.21334
- Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., . . . Eaves, C. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*, 12(11), 767-775. doi:10.1038/nrc3368
- Van Pham, P., Nguyen, S. T., Phan, N. L.-C., & Phan, N. K. (2013). Roles of CD44 in stem cells and cancer stem cells.
- Van Phuc, P., Nhan, P. L., Nhung, T. H., Tam, N. T., Hoang, N. M., Tue, V. G., . . . Ngoc, P. K. (2011). Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44CD24 breast cancer cells. *Onco Targets Ther*, 4, 71-78. doi:10.2147/OTT.S21431
- Velasco-Velazquez, M. A., Homsí, N., De La Fuente, M., & Pestell, R. G. (2012). Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(4), 573-577. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.020
- 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(2), 360-372. doi:10.1021/ci200454v
- Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*, 25(18), 2677-2681. doi:10.1091/mbc.E14-04-0916
- Whenham, N., D'Hondt, V., & Piccart, M. J. (2008). HER2-positive breast cancer: from trastuzumab to innovative anti-HER2 strategies. *Clin Breast Cancer*, 8(1), 38-49. doi:10.3816/CBC.2008.n.002

- Williams, K., Motiani, K., Giridhar, P. V., & Kasper, S. (2013). CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238(3), 324-338. doi:10.1177/1535370213480714
- Wright, M. H., Calcagno, A. M., Salcido, C. D., Carlson, M. D., Ambudkar, S. V., & Varticovski, L. (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, 10(1), R10. doi:10.1186/bcr1855
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14(6), 818-829. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*, 13(1), 35-48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316376/pdf/x9.pdf>
- Zen, K., Liu, D. Q., Guo, Y. L., Wang, C., Shan, J., Fang, M., . . . Liu, Y. (2008). CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One*, 3(3), e1826. doi:10.1371/journal.pone.0001826
- Zoller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*, 11(4), 254-267. doi:10.1038/nrc3023