



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis del metabolismo energético
en células MCF-7 de cáncer de mama
con fenotipo troncal**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARCO ANTONIO GARCÍA AMEZCUA

TUTOR:

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

García
Amezcu
Marco Antonio
55445168
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309530842

2. Datos del tutor

Dr.
Juan Carlos
Gallardo
Pérez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Lourdes Teresa
Agredano
Moreno

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Alvaro
Marín
Hernández

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Liliana
Sánchez
Estrada

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Silvia Cecilia
Pacheco
Velázquez

7. Datos del trabajo escrito

Análisis del metabolismo energético en células MCF-7 de cáncer de mama con fenotipo troncal
65 p.
2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, Lucero y Antonio, por apoyarme siempre, por sus enseñanzas, por impulsarme a cumplir mis objetivos y superarme día con día.

A mi hermana, por ser apoyo esencial en mi vida y estar a mi lado en cada decisión.

A la familia Islas Yépez, Muma, Ponchis, Ale y Óscar, por estar al pendiente de mis avances y sus buenos consejos en esta etapa y desde siempre.

A mis amigos de la carrera por todos los buenos recuerdos generados en estos años.

A la familia que elegí por ser apoyo, compañía y la mejor distracción.

En especial agradezco a mi tutor, Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez, por su guía y por la oportunidad de ser parte de este proyecto. Al departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, pero sobre todo al Laboratorio de tumores por la convivencia, consejos, críticas y las enseñanzas durante este tiempo.

A mis sinodales por sus comentarios y correcciones.

A todos ellos y los que se cruzaron por casualidad o causalidad, por la paciencia, apoyo y ánimo que me brindaron para finalizar con éxito esta etapa y este trabajo.

GRACIAS.

Este trabajo de investigación fue apoyado por el donativo de CONACyT-Ciencia Básica 243249 a nombre del Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez.

ÍNDICE

RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 CÁNCER	3
1.2 CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER	4
1.3 LA IMPORTANCIA DEL NICHOS TUMORAL EN LAS CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER	6
1.4 MICROAMBIENTE EN CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER	8
1.5 AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER	9
1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO EN CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER.....	10
CAPÍTULO II.	14
2.1 JUSTIFICACIÓN	14
2.2 HIPÓTESIS	15
2.3 OBJETIVOS	15
2.3.1 GENERAL	
2.3.2 PARTICULARES	
CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1 CULTIVO DE CÉLULAS EN MONOCAPA.....	16
3.2 PROTOCOLO DE SELECCIÓN DE CSC BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS MICROAMBIENTAL.....	16

3.3 GENERACIÓN DE ESFERAS CELULARES (MODELO EN 3D).....	17
3.4 ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS	17
3.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT.....	17
3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS, FLUJOS ENERGÉTICOS Y APORTE DE ATP	18
3.7 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y MICROSCOPIA CONFOCAL	21
3.8 SENSIBILIDAD A UN INHIBIDOR METABÓLICO	22
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	23
4.1 MARCADORES FENOTIPO TRONCAL	23
4.2 PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	29
4.3 ACTIVIDADES DE ENZIMAS GLUCOLÍTICAS Y MITOCONDRIALES	31
4.4 FLUJOS DE METABOLISMO ENERGÉTICO.....	32
4.5 CONTRIBUCIÓN DE LA GLUCÓLISIS Y DE LA OXPHOS EN LA SÍNTESIS DE ATP EN MCF-7 CSC.....	35
4.6 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	36
4.7 EFECTO DE UN INHIBIDOR MITOCONDRIAL SOBRE LA VIABILIDAD EN MCF-7 CSC.....	36
4.8 VISUALIZACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS EN MCF-7 CSC MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	37

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	40
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS.....	48

ABREVIATURAS

2DOG	2-desoxiglucosa
2OGDH	2-oxoglutarato deshidrogenasa
ADP	Adenosín difosfato
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	ATP sintasa
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaMa	Cáncer de Mama
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CD24	Cluster of differentiation (grupo de diferenciación 24)
CD44	Cluster of differentiation (grupo de diferenciación 44)
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Citocromo c oxidasa
CPT1	Carnitina palmitoiltransferasa 1
CS	Citrato sintasa
CSC	Cancer stem cells (células troncales de cáncer)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5', 5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMT	Transición epitelio mesénquima

FAD	Flavín adenín dinucleótido
FADH	Flavín adenín dinucleótido, reducido
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
Glut1	Transportador de glucosa 1
Glut3	Transportador de glucosa 3
H ₂ O	Agua
HK	Hexocinasa
HKE	Buffer 20 mM HEPES, 140 mM KCl, 1 mM EGTA pH 7.4
HKI	Isoforma 1 de la hexocinasa
HKII	Isoforma 2 de la hexocinasa
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
KCl	Cloruro de potasio
KME	Buffer 120 mM KCl, 20 mM MOPS, 0.5 mM EGTA, pH 7.2
KOH	Hidróxido de potasio
LDH	Lactato deshidrogenasa
ME	Buffer 25 mM MOPS, 1 mM EGTA pH 7.4
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mRNA	RNA mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)

ND1	Subunidad 1 del complejo 1 de la cadena respiratoria
ngAO	Nanogramo átomo de oxígeno
ngAO/min/mg	Nanogramo átomo de oxígeno por minuto por miligramo de proteína
nm	nanómetro
nmol/min/mg	Nanomol por minuto por miligramo de proteína
NTB	4-nitrobenzenetiol
O ₂	Oxígeno
OAA	Oxaloacetato
Oct 3 / 4	Factor 3 y 4 de transcripción de unión a octámero
OMS	Organización Mundial de la Salud
OxPhos	Fosforilación oxidativa
PBS	Buffer fosfato salino
PFK-1	Fosfofructocinasa isoforma 1
Pi	Fosfato inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
RIPA	Buffer de lisis (Radioimmunoprecipitation Assay)
SCAD	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta
SDS	Dodecilsulfato sódico

RESUMEN

La subpoblación de células troncales de cáncer (CSC) corresponde aproximadamente al 0.1 - 1% del total de células del tumor y tiene la capacidad de formar nuevos tumores, auto-renovarse, adquirir resistencia a fármacos (por bombas funcionales de eflujo de drogas), son metastásicas e invasivas y presentan el fenotipo de transición epitelio-mesénquima. El ciclo celular de las CSC es más lento en comparación con las células tumorales no troncales lo cual permite que evadan la radioterapia y la quimioterapia. Las terapias actuales eliminan a la población no troncal sin afectar a las CSC favoreciendo así la recurrencia. Se puede identificar a esta subpoblación en cáncer de mama por los marcadores CD44+, CD24-, ALDH1A3+ y Oct 3/4. Las interacciones con el microambiente tumoral (hipoxia, baja concentración de glucosa y exposición a drogas) permiten la expresión de estos marcadores por lo que es posible realizar cultivos en monocapa exponiéndolos a estas condiciones y así enriquecer esta fracción de células CSC *in vitro*.

La reprogramación del metabolismo energético se ha establecido como un *hallmark* del cáncer, ya que ésta es la única manera de suministrar la energía para favorecer el crecimiento y proliferación de células cancerosas. Se pensaba que el aporte de ATP en la población completa de células tumorales sólo dependía de la glucólisis pero estudios revelaron que la fosforilación oxidativa (OxPhos) en células cancerosas es funcional y tiene un aporte importante de ATP en estas células. Sin embargo, la dependencia de ATP de cada vía no había sido medida en células con fenotipo troncal de cáncer de mama. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el flujo de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa para determinar el aporte de ATP proveniente de cada vía y determinar la vía predominante en la síntesis de ATP en las CSC de mama y así proponer una terapia dirigida a esta subpoblación tumoral.

Como resultado se obtuvo que las MCF-7 sometidas a condiciones de estrés microambiental presentan características de un fenotipo troncal. Las MCF-7 CSC tienen una disminución en el metabolismo energético general con respecto a MCF-7 pero mantienen a la OxPhos como vía predominante en el

aporte de ATP (87%). Aunque se observó un aumento en la expresión de la mayoría de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, solo las actividades de la HK y LDH mostraron un incremento (2 y 10 veces respectivamente), mientras que las actividades de las enzimas mitocondriales CS, GDH y COX mostraron una disminución. Las MCF-7 CSC son más sensibles a CasII-gly, un inhibidor mitocondrial. Estos datos sugieren que una terapia antimitocondrial sería más adecuada para erradicar esta subpoblación.

Por primera vez este trabajo ha reportado, midiendo sistemáticamente proteína, actividades y flujos del metabolismo energético, la dependencia energética (OxPhos) en células de tumor sólido de cáncer de mama con fenotipo troncal (CSC) las cuáles fueron obtenidas mediante un proceso de selección en condiciones de estrés microambiental mimetizando las condiciones tumorales *in vivo*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que el organismo produce células malignas en exceso, ya que éstas presentan cambios genéticos por los cuáles se dividen activamente; pueden invadir y destruir tejido a su alrededor y diseminarse a otros órganos, lo cual se conoce como metástasis [Rudden, 2007].

Estas células malignas o cancerosas difieren de las células normales en que son menos especializadas, esto es que no presentan una función específica en el tejido de origen, dividiéndose sin control. Además estas células no responden ante la señalización para detener la división o las señales para inducir muerte por apoptosis y son capaces de evadir el sistema inmune [Hanahan y Weinberg, 2011; NCI, 2015].

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2012 causó 8.2 millones de defunciones. Entre los principales tipos de cáncer se encuentran: el pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, de mama y de esófago [OMS; GLOBOCAN, consultado en 2015].

En mujeres, el principal cáncer a nivel mundial es el de mama (CaMa). Según la OMS, cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y fallecen 458 mil personas por dicha causa. En México, durante el 2012, este tipo de cáncer se presentó en 30.9% de la población mexicana de 20 años y más, siendo la principal neoplasia en el país. Con respecto a la tasa de mortalidad, 15 de cada 100 mil mujeres fallecieron por esta enfermedad [INEGI, 2015].

1.2 CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER

Hace algunos años la hipótesis de que existía una pequeña subpoblación de células, la cual era resistente a fármacos y contaba con la capacidad de regenerar un tumor completo, comenzó a tomar gran importancia. A estas células se les reconoció como: células troncales de cáncer (cancer stem cells, CSC por sus siglas en inglés) o células iniciadoras de tumor [Kwon y Shin, 2013]. Las CSC tienen un papel muy importante en la formación y recurrencia de tumores malignos debido a sus características de malignidad incrementada que se mencionan en los párrafos siguientes. En un principio las CSC se identificaron en leucemias pero ya se han encontrado en muchos tipos de tumores sólidos incluyendo carcinoma de mama, próstata, colon, entre otros [Wiestler et al., 2007].

Las CSC presentan características similares a células troncales normales, tales como la capacidad de auto-renovación para iniciar y sostener el crecimiento tumoral, tal y como las células troncales normales renuevan nuestros órganos y tejidos [Stanford Medicine, 2016].

Actualmente se sabe que la subpoblación de CSC corresponde aproximadamente al 0.1 - 1% del total de las células del tumor [Yu et al., 2012] y que tiene la capacidad de formar nuevos tumores, resistencia a fármacos antineoplásicos, son metastásicas e invasivas y presentan el fenotipo de transición epitelio-mesénquima (con desregulación de E-cadherina e incremento de proteínas mesenquimales como vimentina, fibronectina, metaloproteinasas de matriz extracelular entre otras) [Yu et al., 2012; Kwon y Shin, 2013]. Con respecto a las células tumorales no troncales, las CSC tienen propiedades diferentes. El ciclo celular de las CSC es más lento en comparación con las células tumorales no troncales [Fillmore y Kuperwasser, 2008], lo cual permite que evadan la radioterapia y la quimioterapia.

Las CSC tienen un sistema para expulsar los fármacos, bombas de expulsión, glicoproteína P y otras bombas de la familia MDR-1, lo cual las hace resistentes a las terapias convencionales con: doxorrubicina, etopósido, vinblastina, paclitaxel, topotecan, irinotecan e imatinib [Dean et al., 2005]. Las células

tumorales no troncales son sensibles a estos fármacos, por tener niveles menores de la P-glicoproteína, por lo tanto estas drogas eliminan a la población no troncal sin afectar a las CSC favoreciendo así la recurrencia y metástasis [Wiestler et al., 2007]. Además, las CSC presentan proteínas con mayor capacidad de reparación de DNA, proteínas antiapoptóticas y una lenta proliferación [Gilbert y Ross, 2009].

Las CSC pueden ser identificadas por medio de marcadores moleculares, aunque algunos tipos de cáncer comparten estos marcadores existen marcadores específicos para cada tipo de cáncer. Los marcadores que presentan las CSC de cáncer de mama son CD44+, CD24- y ALDH1A3+ [de Beça et al., 2013]. CD44 es una glicoproteína transmembranal que promueve la migración en células normales y se encuentra sobreexpresada en la mayoría de las células cancerosas [Naor et al., 2008; Ponta et al., 2003]. Esta proteína está involucrada en cascadas de señalización que favorecen la iniciación de tumor [Bourguignon, 2001] y asociada a la regulación de la adhesión, la proliferación, el crecimiento, la sobrevivencia, la motilidad, la migración, la angiogénesis y la diferenciación celular [Du et al., 2008; Naor et al., 2008]. CD44 es utilizado como marcador de superficie para aislar CSC de cáncer de mama, próstata, páncreas, ovario y colorrectal [Du et al., 2008; Bapat, 2010]. Por otro lado, CD24 es una proteína de superficie que se encuentra presente en algunos tipos de cáncer [Lee et al., 2010; Kristiansen et al., 2003; Zheng et al., 2011]; coexiste con CD44 y ha tenido gran interés como marcador de CSC [Lee et al., 2010]. CD24 se encuentra menos expresada en células progenitoras que en células diferenciadas en cáncer de mama [Fang et al., 2010]. Recientemente se ha identificado a la ALDH1 como marcador de células progenitoras y troncales; además se observó que cuando se encuentra presente ALDH1, en células de cáncer de cabeza, cuello, pulmón, próstata, páncreas y cáncer de mama, se generan tumores en xenotransplantes en ratón con mayor eficacia con respecto a células que no la expresan [Douville et al., 2009].

Las vías Notch, Wnt y Hedgehog se encuentran conservadas en la regulación de las células troncales normales y su desregulación está vinculada con

oncogénesis [Karamboulas y Ailles, 2013]. Si las CSC son las responsables de mantener el tumor y su crecimiento, es importante entender el mecanismo de regulación de éstas. Hay evidencia de que algunas vías de señalización tales como WNT, β -catenina, PTEN, TGF-B, Hedgehog, Notch y Bmi-1 se encuentran alteradas en estas células [Bosch et al., 2007].

Otra característica que presentan estas células es la capacidad de formar esferas independientes de anclaje en cultivos en rotación (mamosferas). Se ha observado que el ensayo de formación del modelo 3D del esferoide es ideal para el estudio de las CSC ya que se ha utilizado como identificador de CSC [Manuel-Iglesias et al., 2013].

1.3 LA IMPORTANCIA DEL NICHOS TUMORAL EN LAS CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER

Al igual que las células troncales normales se encuentran en determinados nichos, también se establece que las CSC lo hacen en nichos dentro de su microambiente tumoral [Matsuda et al., 2014]. Los nichos son microambientes especializados que regulan y favorecen la supervivencia y desarrollo de las células.

En el nicho de las CSC se encuentran células tumorales no troncales [Ye et al., 2014], células troncales mesenquimales, adipocitos, fibroblastos asociados a tumor, células endoteliales y células inmunes, con las cuales a través de redes de citocinas, quimiocinas, interleucinas y factores de crecimiento regulan el crecimiento de las CSC (Figura 1) [modificado de Korkaya et al., 2011].

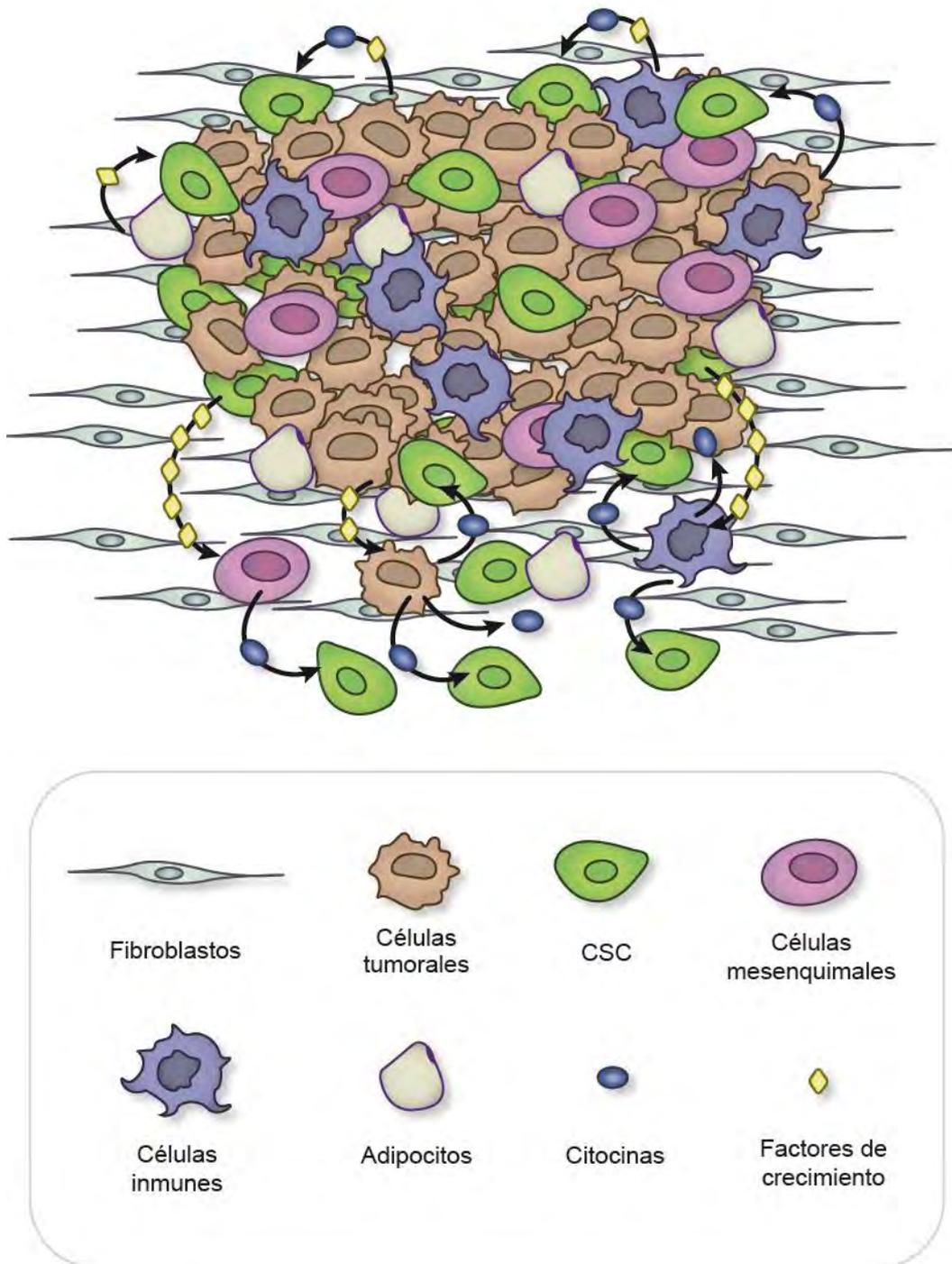


Fig.1. Representación del nicho tumoral donde se encuentran las CSC (Modificado de Korkaya et al., 2011).

1.4 MICROAMBIENTE EN CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER

Dentro de un tumor sólido *in vivo* las células troncales de cáncer son estimuladas por señales que proceden de su microambiente las cuales incluyen restricciones de glucosa y nutrientes; acidosis, deprivación de oxígeno y, además, son seleccionadas al resistir a drogas antineoplásicas usadas en la clínica para cáncer de mama como taxol o doxorubicina [Ahmad, 2013; Flavahan et al., 2013; Li et al., 2013; Mohyeldin et al., 2010; Philip et al., 2013; Prud'homme et al., 2010].

Diversos reportes indican que la concentración de O₂ en zonas oxigenadas de algunos tumores es de 30-80 mmHg (30-86 μM) y en zonas hipóxicas de 2.5-10 mmHg (1-10 μM) [Erickson et al., 2003; Hunjan et al., 1998; Kallinowski et al., 1989; Rodríguez-Enríquez et al., 2014; Vaupel et al., 1991]. La hipoxia (1% de oxígeno) induce cambios biológicos que favorecen la evolución de células malignas de tumor, por ejemplo, incremento en expresión de genes para resistencia a fármacos, resistencia a apoptosis y facilidad para invasión tumoral y metástasis, baja expresión de genes de reparación de DNA e inestabilidad genómica [Lin y Yun, 2010]. Así mismo se ha propuesto que la hipoxia en el tumor favorece a las CSC al mantener sus características a través de la activación de vías como Notch, WNT y sonic Hedgehog, en cáncer de cerebro, mama y colon [Lin y Yun, 2010; Karamboulas y Ailles, 2013].

La hipoglucemia es la exposición a concentraciones de 0.01 a 2.8 mM de glucosa y se ha demostrado que esta condición modifica el contenido de proteínas glucolíticas como Glut1, Glut3, HKI y HKII [Bar et al. 2010], se ha demostrado que favorece el enriquecimiento de marcadores troncales (CD44, Oct-3/4 y Nanog); así como lo inducen la hipoxia, la combinación de hipoxia/hipoglucemia o el tratamiento con fármacos [Flavahan et al., 2013; Krishnamachary et al., 2012; Li et al., 2013]. En estas condiciones (hipoxia, baja concentración de glucosa o exposición a drogas antineoplásicas) las células troncales son estimuladas y encienden: a) la activación de vías del fenotipo troncal (Wnt, BMP, Notch, Sonic hedgehog) [Li et al., 2013], b) factores de transcripción del fenotipo troncal (Oct3/4) [Covello, 2006], c) la adquisición

del fenotipo de transición epitelio-mesénquima [Ahmad, 2013], d) la resistencia a drogas mediante la sobreexpresión P-glicoproteína, transportadores ABC y la activación de citocromos p450 [Alison et al., 2012; Myung et al., 2012], e) la recurrencia tumoral responsable de la agresividad tumoral y metástasis; y, f) la capacidad de auto-renovación [Alison et al., 2012]. Por lo que al simular estas condiciones *in vitro* se podría favorecer el fenotipo troncal en cultivo.

1.5 AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER

En la actualidad existen pocos métodos para el aislamiento de células con fenotipo troncal, de tumores de origen sólido, siendo el principal y más empleado la citometría de flujo [Clarke, 2005; Greve et al., 2012]. El aislamiento de células troncales por medio de la citometría de flujo se basa en el uso de la expresión de marcadores de superficie (marcadores de células troncales de cáncer; CD44+, CD24- y ALDH1+) [Krishan, et al., 2010]. El citómetro de flujo puede seleccionar y aislar las células que expresan esos receptores. Sin embargo, el aislamiento y el estudio de la subpoblación con fenotipo troncal usando esta metodología se dificulta debido a la promiscuidad e inespecificidad de algunos marcadores de células troncales [Medema, 2013; Tosoni et al., 2012;]; además, en ocasiones no se obtiene una densidad celular óptima para estudios a largo plazo [Ponti et al., 2005] como caracterizar una funcionalidad de las células como por ejemplo el metabolismo energético. Asimismo, es posible que la misma técnica comprometa la viabilidad de la subpoblación aislada.

Por otra parte, la adquisición de biopsias frescas para aislar subpoblaciones de células troncales se dificulta debido a la escasa disponibilidad de ellas para su estudio a nivel de ciencia básica.

Debido a lo anterior, es necesario evaluar nuevas metodologías que nos permitan *in vitro* obtener subpoblaciones enriquecidas de células con fenotipo troncal para el estudio y análisis de estrategias terapéuticas dirigidas contra esta población.

Por lo anterior, en esta tesis se propone una metodología con la cual se mimeticen o se traten de recrear las condiciones patofisiológicas microambientales, tales como la hipoxia, la hipoglucemia y la exposición a drogas, condiciones similares a las que se encuentra expuesta dicha subpoblación *in vivo* con el objetivo de estimular el enriquecimiento de esa pequeña fracción de células con fenotipo troncal en cultivos en monocapa.

El aislamiento o enriquecimiento de células con fenotipo troncal permitirá estudiar sus estrategias de sobrevivencia y proponer nuevos blancos terapéuticos.

1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO EN CÉLULAS TRONCALES DE CÁNCER

La reprogramación del metabolismo energético se ha establecido como un *hallmark* del cáncer, ya que éste es la única manera de suministrar la energía para favorecer el crecimiento y proliferación de células cancerosas [Hanahan y Weinberg, 2011]. Además, varios estudios indican que es necesario entender el metabolismo energético de células tumorales para poder implementar un mejor diagnóstico, diseño de fármacos y terapias para el cáncer [Moreno-Sánchez et al., 2007].

La glucólisis es una vía metabólica que a partir de una molécula de glucosa se generan dos moléculas de piruvato, conservando energía en forma de ATP y NADH. Según la condición ambiental en la que se encuentre el organismo puede ser aeróbica y anaeróbica. La primera da como resultado la oxidación del piruvato a través del Ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, a CO₂ y H₂O por la mitocondria. En anaerobiosis el piruvato se reduce a lactato, generando el NAD⁺ necesario para mantener la glucólisis activa [Voet y Voet, 2004].

En la mitocondria también se lleva a cabo la fosforilación oxidativa que consiste de un sistema oxidante y de uno fosforilante. El primero necesita de transportadores de sustratos mitocondriales del ciclo de Krebs que oxida estos sustratos para generar NADH y FADH₂ y por último de la cadena respiratoria, la

cual transfiere electrones desde el par NAD^+/NADH hasta el par $\text{O}_2/2\text{H}_2\text{O}$ a través de los complejos que la conforman: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinona-citocromo c oxido-reductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV). Mientras que el sistema fosforilante se conforma por la ATP sintasa (complejo V), que sintetiza ATP a partir de ADP y P_i (fosfato inorgánico), el transportador de adenin nucleótidos (ANT) que intercambia ADP por ATP y por el transportador de fosfatos [Lenhinger, 1993; Nicholls, 1987].

Anteriormente se consideraba que el aporte de ATP en las células tumorales sólo dependía de la glucólisis pero estudios revelaron que la fosforilación oxidativa (OxPhos) en células cancerosas es funcional y tiene un aporte importante de ATP en estas células [Moreno-Sánchez et al., 2014]. En condiciones de normoxia y 25 mM de glucosa, el 70% de la energía necesaria es aportada por la OxPhos en diversos tipos de tumores [Zheng, 2012; Zu y Guppy, 2004]. La producción de ATP por OxPhos en carcinoma cervical y de mama es de 79 y 91%, respectivamente. En condiciones hipóxicas (24 horas; 1% de oxígeno) el aporte de ATP por esta vía disminuye a 29 y 36%, respectivamente [Rodríguez-Enríquez et al., 2010].

Hasta el día de hoy no hay reportes sobre los flujos del metabolismo energético en células troncales de cáncer de mama que indiquen cuál es el aporte de ATP de cada vía energética, únicamente se han realizado estudios a nivel de mRNA o bien proteínas, y se han medido contenidos de enzimas (Tabla 1) relacionadas con el metabolismo energético [Vlashi et al., 2014]. Lo anterior no es una medida directa de función de la vía ni del aporte de ATP; es decir, midiendo sólo el mensajero o la proteína o una actividad no indica que esa vía metabólica se encuentre activa [Moreno-Sánchez et al., 2016] por lo que es necesario medir flujos metabólicos y determinar el aporte de ATP de cada vía.

Tabla 1. Antecedentes del metabolismo energético en CSC de cáncer de mama

CSC de mama	Vs.	Glucólisis		Fosforilación Oxidativa		Referencia
		Parámetro	Resultado	Parámetro	Resultado	
Biopsias	No CSC	Producción de ácido láctico Actividad de LDH.	Aumenta producción de ácido láctico 5 veces. LDH aumenta 1.6 veces			Cell Death Dis, (2014) 5, e1336
MCF-7, MDA-MB-231, T47D, SUMI59PT	No CSC	Consumo de glucosa Lactato en medio.	Aumenta dos veces. Menor producción de lactato.	Fluorescencia, Potencial de membrana.	Mayor número de mitocondrias. Aumenta potencial.	Breast Cancer Res Treat, (2014) 146 : 525
Tumores de mama MMTV-Wnt1	No CSC	mRNA. Producción de lactato,	Expresión de genes glucolíticos aumentan. Mayor consumo de glucosa, Aumenta producción de lactato.	Microscopía PCR	Menos mitocondrias y menor mtDNA.	Stem Cells (2014) 32 : 1734
Mamoesferas MCF-7 y T47D	Monocapa			Proteómica Inhibidor (Oligomicina)	Aumento en 41 proteínas mitocondriales. Inhibición de formación del esferoide.	Oncotarget (2014) 5 (22), 11029

Analizando la tabla 1, aunque se ha intentado establecer algún parámetro del metabolismo energético para indicar qué vía aporta mayor cantidad de ATP, no se ha obtenido hasta ahora un resultado sobre el flujo glucolítico o mitocondrial para determinar el tipo de metabolismo que presentan las CSC de mama. Algunos autores mencionan que son más glucolíticas mientras que otros han obtenido resultados donde su metabolismo podría depender más de la fosforilación oxidativa, sin embargo, las mediciones no han sido adecuadas ya que se evalúa el contenido de proteína o mRNA o transporte de glucosa cómo indicativo de glucólisis, que como ya se ha explicado no son convenientes (debido a que la glucosa al ser internalizada puede distribuirse a otras vías como la de las pentosas fosfato o la síntesis de glucógeno y no necesariamente a la producción de lactato); y no reflejan el aporte de ATP. Así mismo, es sabido que la cantidad de proteína no es necesariamente el reflejo del flujo de una vía metabólica [Moreno-Sánchez et al., 2016], por lo cual es necesario medir el flujo de cada una (glucólisis y fosforilación oxidativa) y de esta manera concluir quién aporta la mayor cantidad de ATP. Debido a que no se ha establecido el aporte de ATP en CSC, partimos del hecho de que en la población tumoral heterogénea el principal aporte de ATP proviene de la mitocondria y es probable que en CSC este aporte se mantenga en condiciones de normoxia. Con lo anterior se puede diseñar una estrategia terapéutica dirigida hacia esta subpoblación troncal con el conocimiento de que existen cationes lipofílicos que tienen preferencia por la mitocondria tumoral y que pueden servir como terapia dirigida [Rodríguez-Enríquez et al., 2014].

Por estas razones se sugiere la necesidad de determinar correcta y sistemáticamente el metabolismo energético de las CSC y el aporte de ATP correspondiente a cada vía energética.

CAPÍTULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

En el estudio de células troncales de cáncer no han intentado enriquecer la fracción de células troncales *in vitro* mediante la combinación de estímulos presentes en el microambiente tumoral (hipoxia, hipoglucemia, exposición a drogas) y que se sabe favorecen la progresión de esta subpoblación. Por lo tanto, enriquecer *in vitro* esta subpoblación permitirá obtener células con fenotipo tipo troncal para diferentes estudios.

En células de mamíferos y humanas, las dos vías que aportan ATP son la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Sin embargo, la dependencia de ATP de cada vía no ha sido determinada en células con fenotipo troncal de cáncer de mama sólo existen antecedentes en la población tumoral heterogénea completa que permiten predecir que el metabolismo en las CSC puede ser dependiente de la OxPhos. Debido a que la presencia de las CSC en tumores correlaciona con la regeneración de otro tumor, la recurrencia y la metástasis, conocer la vía de la cual depende principalmente la síntesis de ATP en esta subpoblación permitirá diseñar nuevas estrategias terapéuticas ya que actualmente no existe una terapia específica para las CSC.

Lo novedoso de este trabajo radica en obtener, *in vitro*, células con fenotipo troncal y determinar el metabolismo energético predominante (la vía que aporta la mayor cantidad de ATP) en estas CSC de CaMa.

2.2 HIPÓTESIS

Las células de CaMa MCF-7 enriquecidas en células troncales de cáncer (MCF-7 CSC) en condiciones de normoxia dependerán principalmente de la fosforilación oxidativa en el aporte de ATP.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 General

Evaluar el metabolismo energético de las MCF-7 CSC.

2.3.2 Particulares

Establecer un protocolo para seleccionar las CSC de MCF-7 en monocapa mediante condiciones de estrés *in vitro* como hipoxia, hipoglucemia y uso de fármacos (Taxol y Doxorubicina)

Caracterizar a las MCF-7 CSC por medio de marcadores específicos (CD44, CD24, ALDH1A3, Oct3/4) y a través de su crecimiento.

Determinar el contenido de proteínas glucolíticas, actividades enzimáticas (HK, LDH) y el flujo de la glucólisis en las MCF-7 CSC.

Determinar contenido de proteínas mitocondriales, actividades enzimáticas (CS, GDH, COX) y el flujo de la OxPhos en las MCF-7 CSC.

Determinar la dependencia energética de las MCF-7 CSC.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CULTIVO DE CÉLULAS EN MONOCAPA

Una alícuota inicial de 2×10^6 células/mL de la línea celular MCF-7 se cultivó en una caja petri (150 x 20 mm) en medio DMEM 25 mM de glucosa (Dulbecco's modified Eagle's medium) enriquecido con 10% de suero fetal bovino y 10,000 unidades de penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire y se cosecharon al tener una confluencia del 80 a 90%.

3.2 PROTOCOLO DE SELECCIÓN DE CSC BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS MICROAMBIENTAL

El protocolo final se estandarizó con base en la evaluación de diferentes condiciones, tiempos y concentraciones de drogas, solas o en combinación [Gallardo-Pérez et al., manuscrito en preparación]. Al final de cada protocolo se midió la cantidad de CD44 (marcador de células troncales). El protocolo que generó la mayor cantidad de CD44 (alrededor de más 25 veces con respecto a MCF-7) fue el seleccionado y es el que se describe a continuación:

Una vez alcanzada una confluencia celular del 80% se generó una condición de hipoglucemia mediante el cambio de DMEM 25 mM por DMEM 2.5 mM en combinación con un fármaco, Taxol, a una concentración de 100 nM por 12 horas a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire. Posteriormente el medio se cambió por DMEM 25 mM adicionando otro fármaco, Doxorrubicina, a una concentración 100 nM y se metieron a una cámara de hipoxia (Coy Laboratories) a condiciones de hipoxia severa (0.1% de oxígeno) por 12 horas. Por último se cambió el medio por DMEM 25 mM sin suero fetal bovino por 24 horas para prevenir la diferenciación [Yin et al., 2011]. Inmediatamente se extrajeron las células para realizar los ensayos y experimentos que a continuación se relatan.

3.3 GENERACIÓN DE ESFERAS CELULARES (MODELO EN 3D)

Las esferas celulares se generaron utilizando el ensayo de formación de esferas en suspensión (mamoesferas) [Manuel-Iglesias et al., 2013]. Se cultivaron 1×10^5 células MCF-7 y MCF-7 CSC en un matraz Erlenmeyer con medio Dulbecco-DMEM sin suero y fueron colocados de manera inmediata en agitación orbital lenta (20-50 rpm) por 10 días a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂. El medio fue reemplazado por medio fresco cada 2 o 3 días para remover las células muertas. El tamaño de las esferas celulares fue medido cada 5 días con una retícula graduada (1/10 mm; Zeiss, NY, USA) en un microscopio de contraste de fases invertido (Zeiss, NY, USA).

3.4 ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS

Las células MCF-7 y las MCF-7 CSC fueron sembradas a una densidad de 2×10^4 células/mL en cajas petri 150x20 mm con DMEM completo a 37°C por 96 horas. Posteriormente se fijaron las células 20 minutos con etanol frío (70% v/v), se secaron con aire y se tiñeron con cristal violeta. Se escaneó la caja y se contaron las clonas por el software Clono-Counter [Niyazi et al., 2007].

3.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Tanto el *pellet* de las células MCF-7 y las MCF-7 CSC se resuspendieron en 200µL de buffer de lisis RIPA (PBS 1x pH7.2, 1% IGEPAL NP40, SDS 25%, desoxicolato de sodio 0.05% y 10 µL de inhibidores de proteasas (PMSF) 100 mM) [Gallardo Pérez et al., 2014]. Las células se pasaron a través de una jeringa de insulina para disociarlas y homogeneizarlas. Los lisados se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se separó y guardó a -20°C hasta su uso. Para realizar el Western blot, se mezclaron 40 µg de la proteína obtenida con buffer de carga con 5% de β-mercaptoetanol, se hirvieron durante 2 minutos y se cargaron en geles desnaturizantes de SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida. Las proteínas se

transfirieron a una membrana de PVDF a 300 mA, 15 volts y 30 minutos. La membrana se bloqueó con 5% de leche libre de grasa y 0.1% de tween-20 en TBS 1x (TBS 10x: Tris 0.5 M pH 7.5 y NaCl 1.5 M en agua) durante 1 hora. Las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales y policlonales en una dilución 1:500 de: NDI, ATPs, COX-IV, ANT, 2OGDH, CPTI, SCAD, GLUT-1, HKII, PFK-1, LDH-A, CD44, CD24, ALDH, α -Tubulin. (Santa Cruz, CA, USA) durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se hicieron cuatro lavados a las membranas de 15 minutos cada uno con TBS 1x/Tween-20 y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios por una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente se lavaron durante una hora con cambios de TBS 1x/Tween-20 cada 10 minutos; se añadió solución de quimioluminiscencia, se reveló en cuarto oscuro en tiempos de 1 a 5 minutos.

Las bandas obtenidas se analizaron con el programa *Scion Image* para Windows y se compararon con respecto a la densidad de banda de control de carga (α -Tubulina) [Gallardo Pérez et al., 2014].

3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS, FLUJOS ENERGÉTICOS Y APORTE DE ATP

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para generar los extractos celulares 10 mg de proteína de células MCF-7 y MCF-7 CSC fueron resuspendidos en 1 mL de buffer 25 mM Tris / HCl pH 7.6, con 1mM de EDTA, 5 mM DTT y 1 mM PMSF. El extracto celular se congeló en nitrógeno líquido y se descongeló a temperatura ambiente; este proceso se llevó a cabo 3 veces. Posteriormente la suspensión fresca se utilizó para determinar las actividades enzimáticas que se mencionan a continuación.

Las actividades enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente por medio de la generación o consumo de NAD(P)H a 340 nm (HK, LDH y GDH). En el caso de la CS, se detectó la formación de NTB a 412 nm. Los ensayos de realizaron en un volumen final de 1 mL de KME o HKE (para las enzimas

citosólicas y mitocondriales respectivamente) en presencia de Tritón x-100 al 0.02% y a 37°C.

Hexocinasa (HK)

El medio de reacción contenía: G6PDH (1U), NADP⁺ 0.5 mM, MgCl₂ 15 mM, ATP 10 mM y 0.1-0.2 mg de suspensión celular la reacción se inició con 2-3 mM de glucosa después de 3 minutos de incubación.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

Se adicionó NADH 0.15 mM y 0.02-0.03 µg de suspensión celular. La mezcla de reacción se incubó por tres minutos y la reacción se inició con 1 mM de piruvato.

Citrato sintasa (CS)

La actividad de esta enzima fue determinada con DTNB (5', 5'-ditiobis 2- ácido nitrobenzoico) 0.1 mM, acetil CoA 36 µM, 0.03-0.04 mg de proteína celular y la reacción se inició con la adición de 0.1 mM de oxaloacetato (OAA).

Glutamato deshidrogenasa (GDH)

La actividad de la GDH fue determinada en un espectrofluorofotómetro RF-5301PC Shimadzu a una longitud de excitación de 340 nm y una longitud de emisión de 460 nm detectando los cambios en la fluorescencia del NADH formado. En agitación suave y presencia de MgCl₂ 2 mM, ADP 1.5 mM, NAD⁺ 2 mM, rotenona 4 µM, Tritón x-100 0.02% y 0.25-1 mg de proteína celular. La reacción se inició con 10 mM de glutamato en un volumen final de 2 mL.

Citocromo c oxidasa (COX)

La actividad de COX fue determinada polarográficamente con un electrodo tipo Clark (0.025 mg de proteína/mL) en buffer ME (MOPS 25mM y EGTA 1 mM, pH 7.4), 5mM de ascorbato de sodio fresco y 50 mM de citocromo C a 37°C; la reacción se inició añadiendo 2.7mM de N,N,N',N'-tetrametil-fenilenediamina (PMS). Al final de cada trazo, se adicionó 10mM de azida de sodio. La actividad de COX fue el consumo de oxígeno sensible a azida.

GLUCÓLISIS

Para la determinación del flujo glucolítico, las células a una concentración de 8 mg de proteína/mL fueron incubadas en 2 mL de medio Ringer Krebs con agitación orbital (150 rpm) a 37°C en frascos de plástico. Después de 10 minutos de preincubación se tomó una alícuota de 0.5 mL (t=0) y se añadió 10 mM de glucosa al resto de las células; las siguientes alícuotas se tomaron a los 5, 10 y 20 minutos. La reacción se detuvo en todas las alícuotas con 50 µL de ácido perclórico frío. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se colocó en un tubo limpio con 50 µL de indicador Kodak y se neutralizó a pH 7 con diferentes volúmenes de KOH 3 M / Tris 0.1 M. Las muestras se guardaron a -72°C, hasta que se cuantificó el lactato [Rodríguez-Enríquez., et al. 2010]. Para determinar la producción de lactato por la vía de glutaminólisis, se siguió el mismo protocolo pero en presencia de 15 mM de 2DOG (se adicionó desde el periodo de preincubación). La diferencia entre la producción de lactato total y la generada por la glutaminólisis dio el flujo de la glucólisis [Marín-Hernández et al., 2014].

El lactato producido se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm, acoplado el consumo de lacto con la generación de NADH, en la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

La OxPhos se determinó con un electrodo tipo Clark registrando el consumo de oxígeno sensible a oligomicina (un inhibidor de la ATP sintasa). Para ello se agregaron 5 mg de proteína de las células, tanto MCF-7 como MCF-7 CSC, a 1.9 mL de medio Ringer Krebs (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM H₂PO₄, 25 mM HEPES y pH 7.4) saturado con aire y a 37° C. Una vez obteniendo el trazo inicial de consumo de oxígeno se agregó 5 µM de oligomicina. El cero químico se obtuvo consumiendo todo el oxígeno con ditionita [Rodríguez-Enríquez et al., 2010].

Los cálculos de velocidad se realizaron considerando que a la altura de la Ciudad de México y a 37° C hay disueltos 380 nanogramos átomo de oxígeno (ngAO) por mL de Ringer Krebs.

APORTE DE ATP DE CADA VÍA ENERGÉTICA

Para determinar cuál de las dos vías, glucólisis u OxPhos, aporta mayor cantidad de ATP a la célula, se calculó el ATP considerando que por cada lactato formado por la glucólisis se obtiene una molécula de ATP y que por cada ngAO consumido en la OxPhos se producen 2.5 moles de ATP [Nakashima et al., 1984]. La suma de ambas vías representa el 100% y se calculó la proporción de cada una.

3.7 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y MICROSCOPIA CONFOCAL

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

El $\Delta\Psi_m$ fue determinado en 0.25 mg de células incubadas con rodamina 6G 0.25 μM a 37°C en buffer Ringer-Krebs saturado de aire y monitoreado con un espectrofluorofotómetro RF-5301PC Shimadzu a una longitud de excitación de 480 nm y una longitud de emisión de 565 nm. Al final de cada experimento se adicionó 5 μM del desacoplante CCCP para establecer la magnitud de la señal de fluorescencia que correspondía al potencial de membrana mitocondrial [Hernández-Reséndiz et al., 2015].

MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células fueron cultivadas en una caja de petri de 35 mm con fondo de vidrio (MatTek; Ashland, MA, USA) con 0.5 μM de MitoTracker verde (MTG) y 1 μM de Bisbenzimidida. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal meta invertido de escaneo por láser Zeiss LSM 710, utilizando un objetivo de 40X y 63X y el láser de helio/neón/argón en fase sólida. La longitud de onda de

emisión de BisBenzimida fue 346 nm y se utilizó una longitud de onda de emisión de 460 nm. La longitud de onda de excitación del MTG fue de 488 nm y se utilizó una longitud de onda de emisión de 500-550 nm.

3.8 SENSIBILIDAD A UN INHIBIDOR METABÓLICO

IC₅₀ CASII-GLY

Las células MCF-7 y las MCF-7 CSC se sembraron (10,000 células por pozo) en cajas de 96 pozos sometidas a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 μ M) de Casiopeina II-gly durante 24 horas. Al finalizar se midió la viabilidad mediante la técnica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (20 μ L de MTT por cada 100 μ L de medio) para calcular la IC₅₀ en un lector de microplacas de 96 pozos a 595 nm (iMark Microplate Absorbance Reader. BioRad; California, USA) [modificado de van Tonder et al., 2015]

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba *t* de Student para muestras no pareadas considerando $P \leq 0.05$ o $P \leq 0.01$ como criterio de significancia.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 MARCADORES FENOTIPO TRONCAL

MCF-7 es una línea celular de tejido mamario que expresa receptores de estrógeno simulando lo que sucede en la mayoría de los tipos de cáncer de mama invasivo que expresan estos receptores. Esta línea se ha utilizado para estudios de resistencia a quimioterapia por tener un comportamiento similar a la heterogeneidad de un tumor *in vivo* y si se expone a presiones ambientales se vuelve farmacorresistente [Simstein et al., 2003]. Una vez terminado el protocolo para obtener células MCF-7 con fenotipo troncal, se observó que un pequeño porcentaje ($25.8 \pm 5.2\%$) de éstas sobrevivían y cambiaban su morfología como se muestra en la Fig. 2 a un fenotipo alargado, tipo fibroblastoide, como está reportado para células troncales [Fillmore y Kuperwasser, 2008]. Para dilucidar si estas células presentaban un fenotipo troncal se midieron los marcadores de superficie específicos para BCSC (células troncales de cáncer de mama): CD44, CD24 y ALDH1A3 (Fig. 3). En las células expuestas al protocolo mencionado, se observó un aumento de 25 veces la expresión de CD44; mientras que la cantidad de CD24 fue nula; con respecto al marcador ALDH1A3 se observó un incremento de 3 veces en MCF-7 CSC. Por lo tanto, al presentar un fenotipo CD44+, CD24- y ALDH1A3+, semejante a lo reportado [de Beça et al., 2013] y por esta razón las células obtenidas en este trabajo se nombraron MCF-7 CSC. Además, las MCF-7 CSC presentaron sobreexpresión del marcador de pluripotencia Oct3/4.

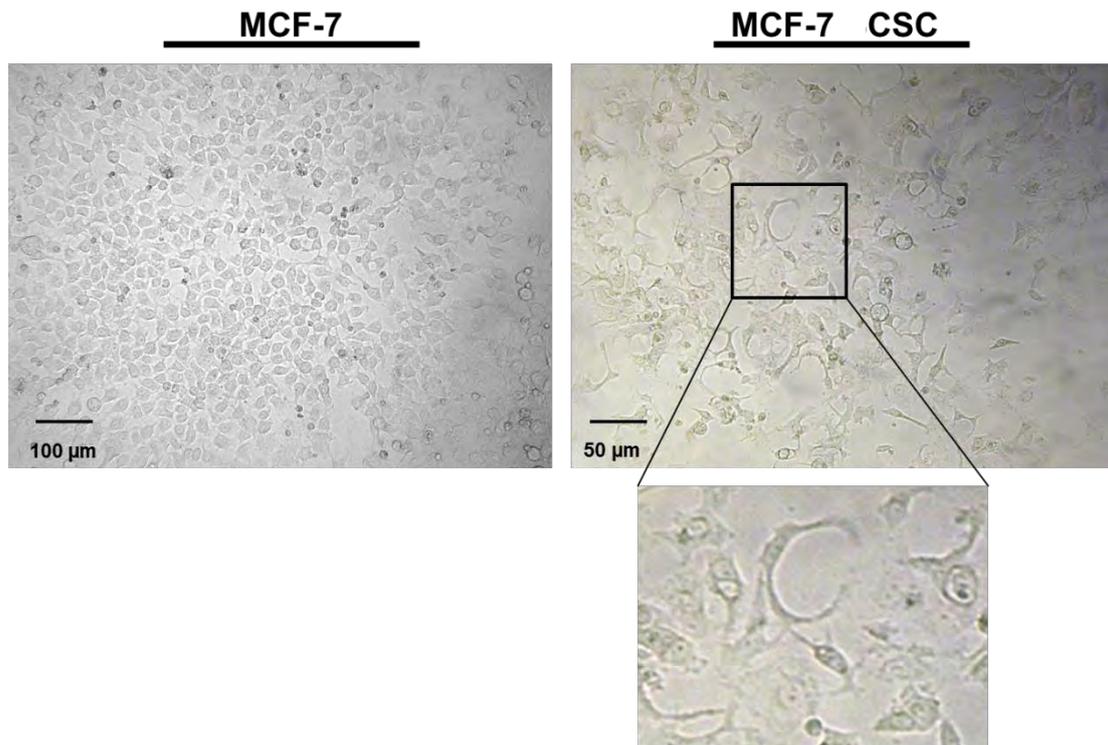


Fig. 2. Fotomicrografía donde se observa el cambio morfológico después del protocolo de aislamiento. a) Células MCF-7 control y b) Células MCF-7 CSC.

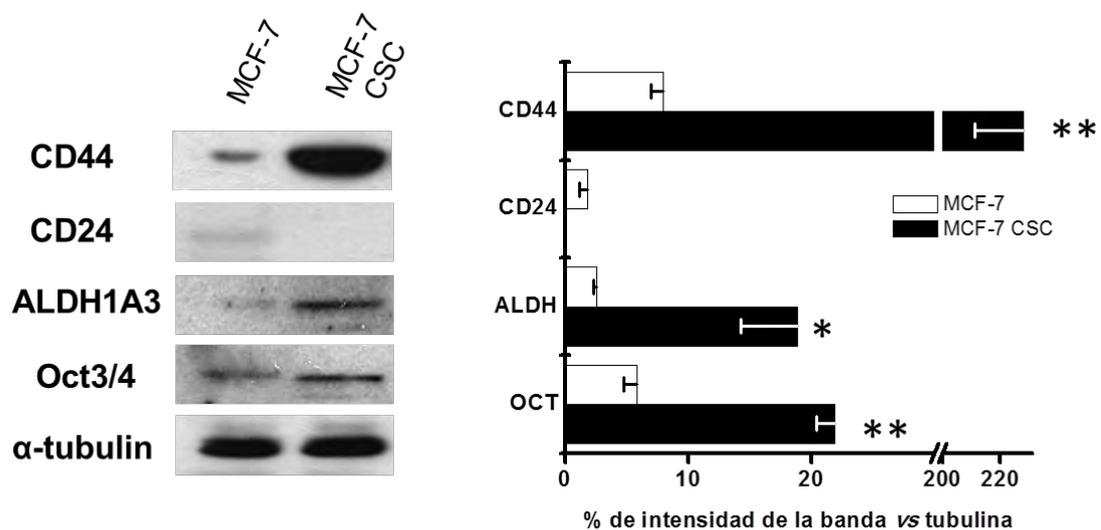


Fig. 3. Western blot de CD44, CD24, ALDH1A3 y Oct3/4. Se muestra el promedio del análisis densitométrico con desviación estándar. n=4; *P≤0.05, ** P≤0.01 vs. MCF-7.

Posteriormente se realizó una curva de crecimiento con las MCF-7 CSC obtenidas. Para ello se sembraron 500,000 células en cajas Petri de 60X15 mm y se contaron las células cada día (Fig. 4). Durante los primeros 3 días se observó que las MCF-7 CSC en DMEM completo comenzaron con un crecimiento demasiado lento, al cuarto día iniciaron su proliferación obteniéndose un mayor número de células con respecto a las células control al día 7; sin embargo, como ya se mencionó, el medio con suero posiblemente induce la diferenciación de las células troncales y disminuye el fenotipo troncal. La expresión de CD44 disminuyó aproximadamente 50% después de 7 días con respecto al día 0 en medio DMEM completo (Fig. 5). Es por esto que se realizaron todos los experimentos inmediatamente después de realizar el protocolo de selección antes mencionado. A pesar de que se utilizó medio sin suero para evitar diferenciación, se prefirió realizar los experimentos durante este tiempo para estudiarlas con el mayor porcentaje de marcadores de fenotipo CSC.

Las células MCF-7 presentaron un cambio en la proliferación con medio sin suero debido a la ausencia de este pero con un comportamiento similar al control con medio completo. En medio sin suero no hubo proliferación de MCF-7 CSC durante los 7 días, pero tampoco hubo muerte celular (Fig. 4).

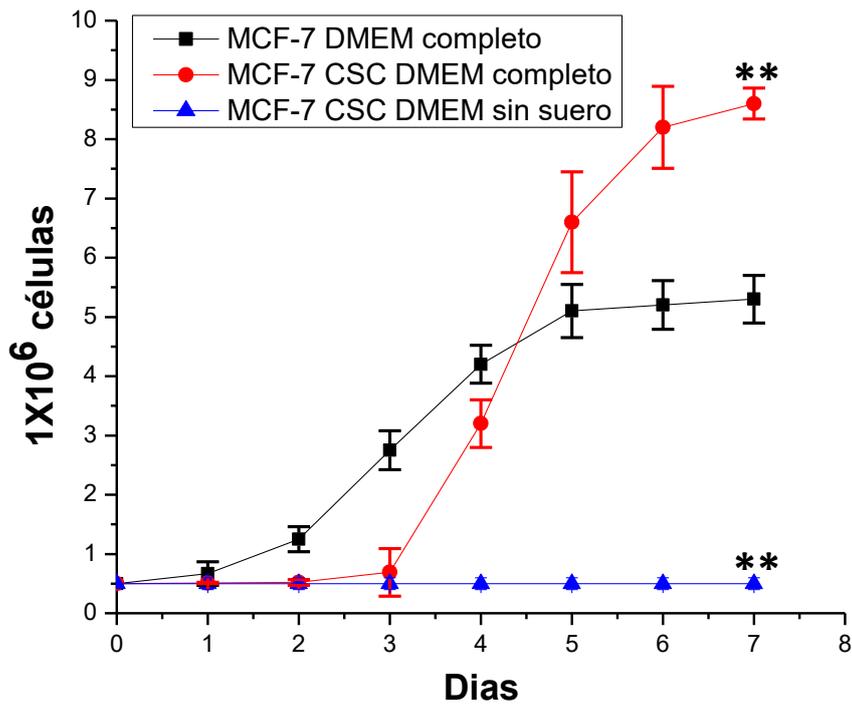


Fig. 4. Curva de crecimiento de MCF-7 y MCF-7 CSC en medio completo y medio sin suero. n=3; ** P≤0.01 vs. MCF-7.

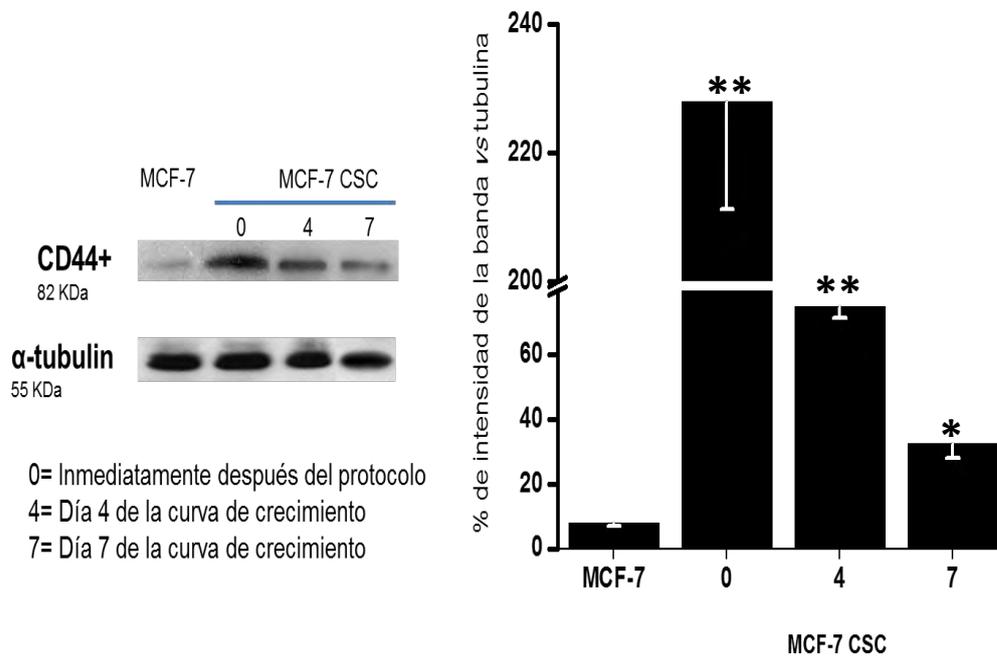


Fig. 5. Contenido de CD44 después de 4 y 7 días de crecimiento en DMEM completo en células MCF-7 CSC. n=3; *P≤0.05, ** P≤0.01 vs. MCF-7.

Por lo anterior, fue imposible obtener más material de MCF-7 CSC, ya que para esto hubiera sido necesario un medio enriquecido en factores de crecimiento para cancer stem cells. Es por esto que se hicieron todos los experimentos correspondientes inmediatamente después que las células salieron del protocolo de selección. Para poder realizar la medición de flujos de las vías y extracción de proteína, mínimo se requieren 30×10^6 células y se obtuvieron con el protocolo realizado.

Mamoesferas y clonogenicidad

La caracterización de estas células con fenotipo tipo troncal continuó con la generación de mamoesferas en medio sin anclaje y con agitación orbital desde el inicio del crecimiento. Lo anterior permite observar la generación de mamoesferas enriquecidas en CSC. Se observó que las MCF-7 CSC obtenidas por el protocolo de selección, tienen mayor capacidad para formar estas esferas celulares. A los 5 días de cultivo del modelo en 3D, los esferoides de MCF-7 CSC eran del doble de tamaño que los de MCF-7. A los 10 días de cultivarlos, eran 7 veces más grandes que los de MCF-7 (Fig. 6), la curva de crecimiento se dejó hasta este día debido a que el modelo control comenzaba a disgregarse.

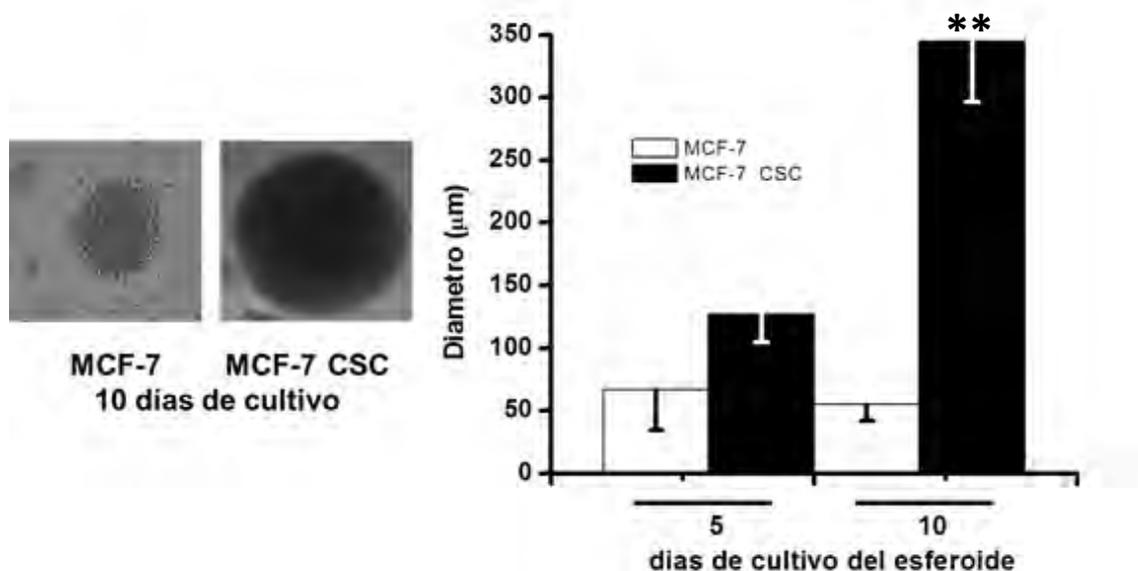


Fig. 6. Formación de mamoesferas. n=3; ** $P \leq 0.01$ vs. MCF-7.

Otra de las características que se han observado en las CSC es la formación de colonias (clonogenicidad); en este ensayo se obtuvo que las MCF-7 CSC generaron un total de 105 colonias con respecto a las MCF-7 que solo generaron 6 colonias después de 96 horas de crecimiento (Fig. 7).

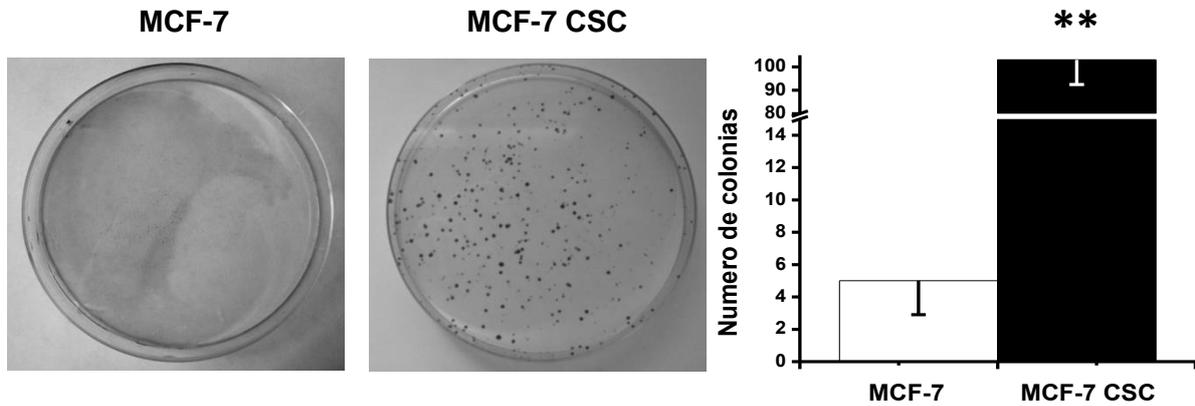


Fig. 7. Ensayo de Clonogenicidad. Los valores son el promedio de las determinaciones con desviación estándar. n=3. **P≤ 0.01 vs. MCF-7.

4.2 PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

Proteínas mitocondriales y glucolíticas

Con las MCF-7 CSC se realizó un análisis global de las proteínas del metabolismo energético. En las MCF-7 CSC se observó un aumento significativo (con respecto a las células MCF-7) en las proteínas de ambas vías, en las mitocondriales: ND1 (aumentó 2 veces), COX-IV (aumentó 1.3 veces), ANT (aumentó 3 veces), CPT1 (aumentó 4 veces), SCAD (aumentó 5 veces), excepto 2OGDH que fue la única que presentó una disminución de 1.5 veces (figura 8); así mismo se observó un aumento en el contenido de todas las proteínas glucolíticas medidas: GLUT1 (aumentó 3 veces), HKII (aumentó 1.5 veces), HPI (aumentó 4 veces), PFK (aumentó 2 veces) y LDHA (aumentó 2 veces). En la figura 8 se encuentran los geles representativos del Western blot y la gráfica comparando MCF-7 CSC contra MCF-7.

Con respecto a las proteínas involucradas en la β -oxidación, CPT1 y SCAD, se midieron debido a que con respecto a esta vía no hay datos en CSC y se ha demostrado que también puede ser un blanco importante en células cancerosas y requiere estudios más específicos que no serán evaluados en este trabajo.

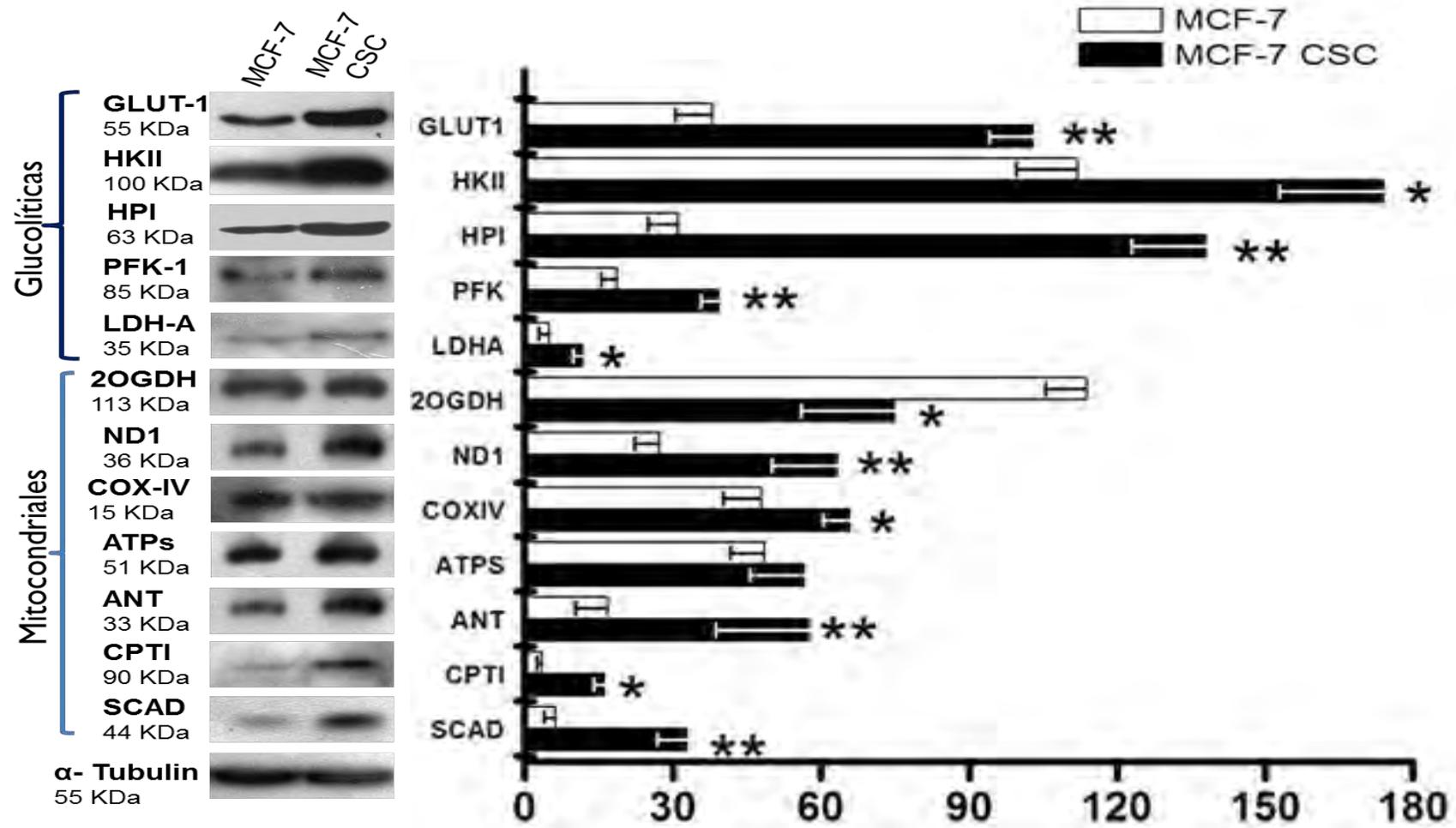


Fig.8. Contenido de proteínas del metabolismo energético en MCF-7 CSC. Los valores son el promedio de las determinaciones con desviación estándar. n=3; *P<0.05, ** P<0.01 vs. MCF-7.

4.3 ACTIVIDADES DE ENZIMAS GLUCOLÍTICAS Y MITOCONDRIALES

En las MCF-7 CSC se observó un incremento en la actividad de la HK (2 veces) y de la LDH (10 veces) en comparación con MCF-7 (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad de la HK y la LDH en las células MCF-7 y MCF-7 CSC

	MCF-7	MCF-7 CSC
HK	14 ± 4	31 ± 3 *
LDH	172 ± 49	1708 ± 250 *

Unidades: nmol/min/mg de proteína. Los valores son el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. n=3. *P ≤ 0.05 vs. MCF-7.

Por otra parte se observó una disminución de la actividad de enzimas mitocondriales como la CS y GDH (2 y 7 veces respectivamente) en comparación con MCF-7, también se observó una disminución en la actividad de COX, cuyo valor fue de 1.6 U para control y 1U para MCF-7 CSC (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad de enzimas mitocondriales en las células MCF-7 y MCF-7 CSC

	MCF-7	MCF-7 CSC
CS	45 ± 2	23 ± 8 *
GDH	2.8 ± 0.4	0.35 ± 0.1 *
COX	1.6 ± 0.2	1 ± 0.2 *

CS y GDH en nmol/min/mg. COX en Unidades/mg. Los valores son el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. n=3. *P ≤ 0.05 vs. MCF-7.

4.4 FLUJOS DE METABOLISMO ENERGÉTICO

Como ya se ha observado, la expresión de proteínas y la actividad de las enzimas no se puede correlacionar directamente con el flujo de la vía, ya que ha sido demostrado por [Moreno-Sánchez et al., 2016] que al presentarse la proteína no significa que esté activa para determinar un aumento en el flujo. De hecho en este estudio se observó que aunque la COX IV se incrementó en proteína, su actividad disminuye en MCF-7 CSC en comparación con MCF-7.

El flujo de la glucólisis en MCF-7 CSC fue de 2 nmol/min/mg, 5 veces menor al flujo glucolítico de las MCF-7 (Tabla 4) a pesar de haberse observado un aumento en el contenido de proteína y en la actividad de la HK y LDH.

Tabla 4. Flujo de la glucólisis en las células MCF-7 y MCF-7 CSC.

	MCF-7	MCF-7 CSC
Total	11 ± 4	3 ± 0.9 *
2DOG	0.1 ± 2	1 ± 3
Glucólisis	10 ± 4	2 ± 3 *
2DOG + Rotenona	3 ± 3	3 ± 1

Flujos en nmol/min/mg. Los valores son el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. Glucólisis=Total - 2DOG. La 2DOG revela la formación de lactato a partir de la glutaminólisis. n=3. *P ≤ 0.05 vs. MCF-7.

Por último se midió el flujo de la fosforilación oxidativa en las células MCF-7 CSC, obteniéndose un valor de 5 ngAO/min/mg lo cual correspondió a una disminución de 2.4 veces del flujo con respecto a MCF-7 (Tabla 5).

Tabla 5. Flujo de OxPhos en las células MCF-7 y MCF-7 CSC.

	MCF-7	MCF-7 CSC
Total	16 ± 2	7 ± 2 *
Oligomicina	4 ± 2 (75%)	2 ± 0.9 (71%)
OxPhos	12 ± 0.6	5 ± 0.9 *
CN	2 ± 0.3	2 ± 1

Flujo de la OxPhos en ngAO/min/mg. Los valores son el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. n=3. *P ≤ 0.05 vs. MCF-7. Entre paréntesis se muestra el porcentaje sensible a oligomicina.

Para una mejor visualización se presentan los flujos en la figura 9.

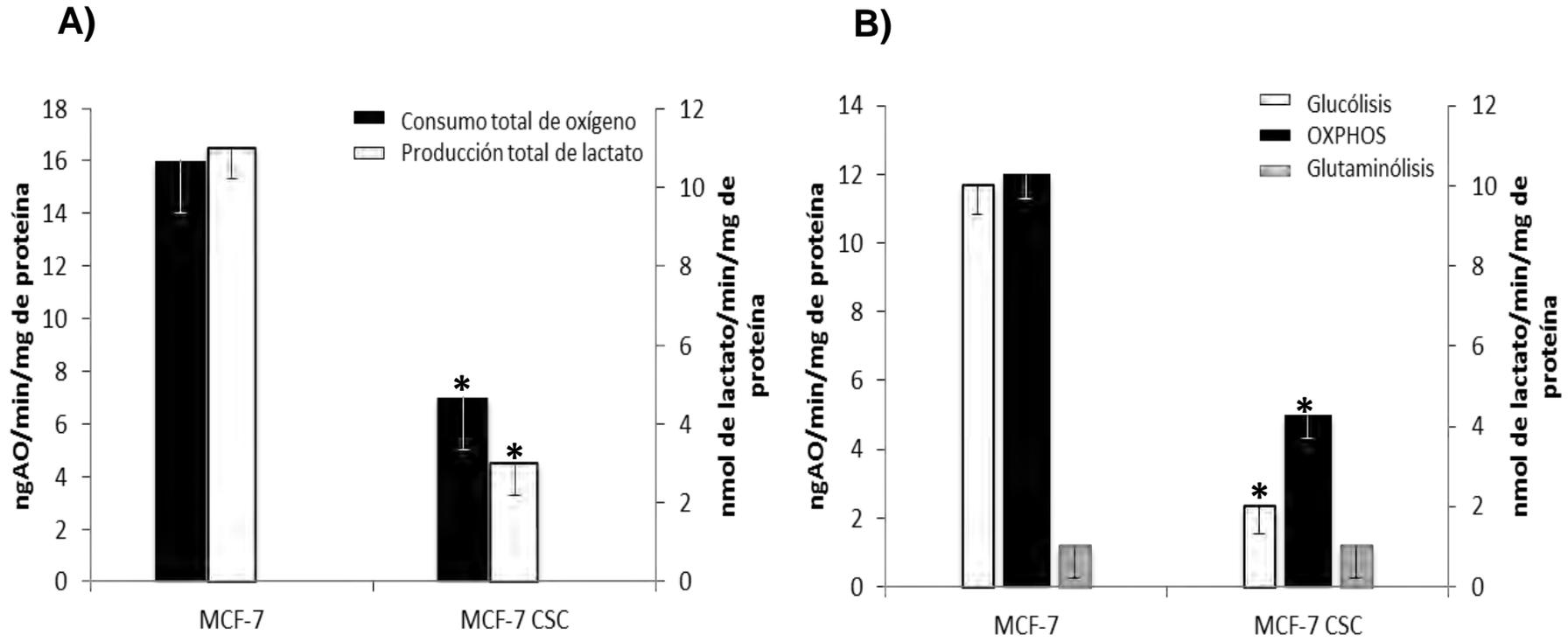


Fig. 9. Flujos del metabolismo energético. A) Consumo total de Oxígeno y producción total de lactato. Observamos en barras de color negro el consumo total de oxígeno al cual le corresponde el eje Y izquierdo. En barras blancas se observa la producción total de lactato a las que les corresponde el eje Y derecho, en donde se observa una disminución significativa en MCF-7 CSC con respecto a MCF-7. B) Flujos de Glucólisis, Glutaminólisis y OxPhos. Se presentan en barras negras el flujo de OxPhos al cual corresponde el eje Y izquierdo; en blanco las barras del flujo de glucólisis y en gris la glutaminólisis (flujo sensible a 2DOG) ambas corresponden al eje Y derecho. Los valores son el promedio de las determinaciones \pm desviación estándar. n=3. *P \leq 0.05 diferencia significativa.

4.5 CONTRIBUCIÓN DE LA GLUCÓLISIS Y DE LA OXPHOS EN LA SÍNTESIS DE ATP EN MCF-7 CSC

A partir de los flujos de la glucólisis y de la OxPhos se determinó cuál de ellas es la que más energía aporta a la célula. Para esto se consideró que por cada lactato formado por la glucólisis se obtiene una molécula de ATP y por cada nanogrammo átomo de O₂ consumido de la OxPhos se producen 2.5 moles de ATP.

Tabla 6. Contribución en la síntesis de ATP de cada vía energética en MCF-7 CSC.

	MCF-7	MCF-7 CSC
Glucólisis	27 ± 3 %	13 ± 3 % *
OxPhos	73 ± 3 %	87 ± 3 % *

Los valores son el promedio de las determinaciones ± desviación estándar. n=3. *P ≤ 0.05 vs. MCF-7.

Esto indica que a pesar de tener una disminución (2.4 veces) en el flujo de fosforilación oxidativa, las MCF-7 CSC conservan su dependencia energética hacia OxPhos aumentando un 14% el aporte de ATP de la vía antes mencionada. Sin dejar de resaltar que el flujo de la glucólisis presenta una disminución (5 veces) en las MCF-7 CSC y disminuyó la dependencia energética de ésta vía con respecto a MCF-7.

4.6 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se correlacionó con la disminución en la OxPhos. El $\Delta\Psi_m$ de las MCF-7 CSC fue 2.5 veces menor que lo obtenido para MCF-7 (Tabla 7).

Tabla 7. Potencial de membrana mitocondrial en MCF-7 CSC.

MCF-7	MCF-7 CSC
145	58
UAF	UAF

Los valores son el promedio de las determinaciones. n=2. Las unidades de medida son UAF (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia).

4.7 EFECTO DE UN INHIBIDOR MITOCONDRIAL SOBRE LA VIABILIDAD EN MCF-7 CSC

En la evaluación de la sensibilidad a un inhibidor mitocondrial como la CasII-gly [Marín-Hernández et al., 2012] se observó que las MCF-7 CSC disminuyeron su viabilidad a un 50% con una concentración (IC_{50}) de 0.83 μ M mientras que para las MCF-7 la IC_{50} fue el doble (Tabla 8).

Tabla 8. IC₅₀ del inhibidor mitocondrial CasII-gly en MCF-7 CSC

	MCF-7 Control	MCF-7 CSC
CasII-gly	1.7 μ M	0.83 μ M

n=1

Estos resultados correlacionan con los reportados en la tesis de licenciatura (en revisión) de Alhelí Adán Ladrón de Guevara dónde además se observó que los inhibidores glucolíticos no tienen efecto sobre la viabilidad de las MCF-7 CSC.

4.8 VISUALIZACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS EN MCF-7 CSC MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Debido a que en las MCF-7 CSC se observó una reducción en el potencial de membrana mitocondrial y una mayor sensibilidad a un inhibidor mitocondrial se buscó otro parámetro para determinar si había diferencias con respecto al número y morfología de las mitocondrias entre las MCF-7 CSC y las MCF-7, para ello se empleó la microscopía confocal y el marcaje de mitocondrias. Lo anterior debido a que se ha reportado que las células que hacen metástasis (como es el caso de las CSC) modifican la morfología mitocondrial [Zhao et al., 2012]. Se marcaron las mitocondrias de ambas poblaciones celulares con MitoTracker verde (MTG) y se tiñeron los núcleos de las células con bisBenzimida. En las figuras 10 A y 10 B se observa una diferencia en el tamaño del núcleo y de las MCF-7 CSC con respecto al control, así como una posible diferencia en la morfología de las mitocondrias, siendo las de MCF-7 CSC un poco más delgadas y se encontraron distribuidas alrededor del núcleo. Sin embargo, hacen falta realizar más repeticiones y determinar el número de mitocondrias, pero como un primer acercamiento podría decirse que no hay una disminución en la cantidad de mitocondrias.

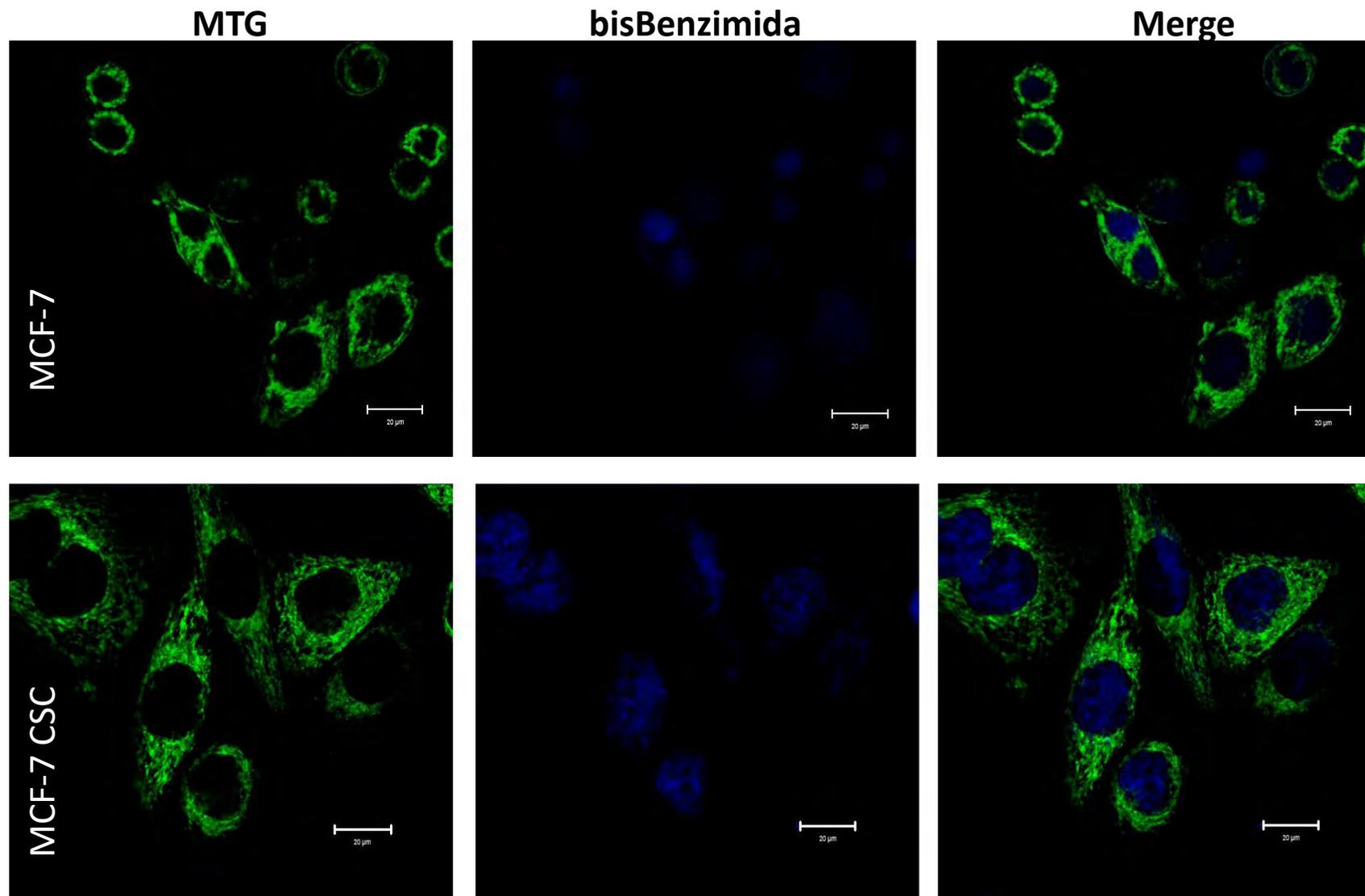


Fig. 10 A. Microscopia confocal a 40x. En verde se observan las mitocondrias y en azul el núcleo. Barra = 20 µm

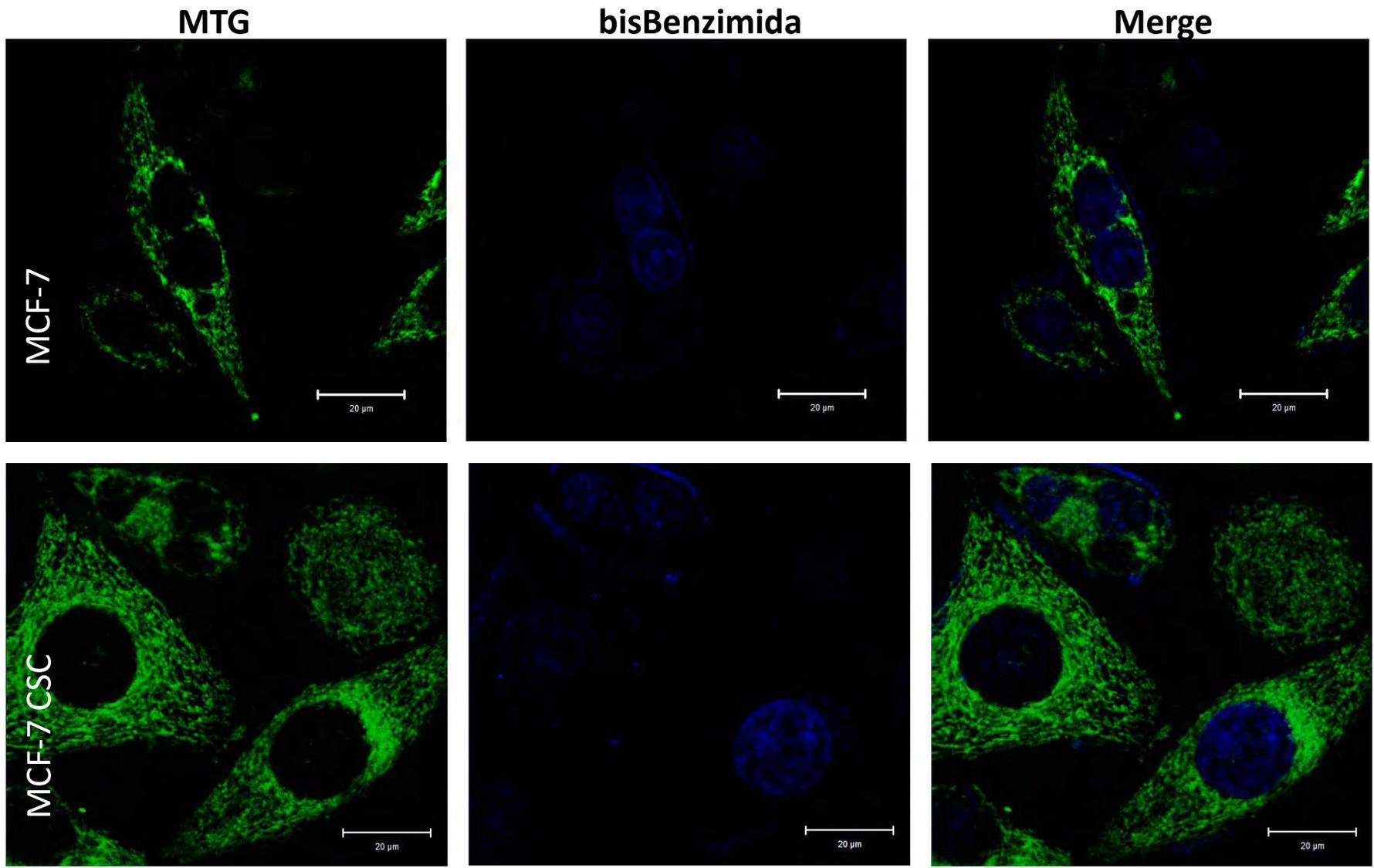


Fig. 10 B. Microscopia confocal a 63x. En verde se observan las mitocondrias y en azul el núcleo. Barra = 20 µm

V. DISCUSIÓN

Las CSC han tomado un gran interés para el estudio del cáncer, ya que se ha demostrado que esta subpoblación celular del tumor mantiene la tumorigénesis por su capacidad de auto-renovación, invasión, metástasis y formación de nuevos tumores [McDermott y Wicha, 2010]. De igual manera se le ha atribuido a esta subpoblación la recurrencia del cáncer ya que son resistentes a fármacos y a las terapias actuales contra el cáncer: quimioterapia y radioterapia [Dean et al., 2005].

Hasta ahora las terapias convencionales afectan principalmente a las células tumorales no troncales que son las que forman la masa tumoral, sin afectar a las CSC que son resistentes a fármacos y tienen la capacidad de auto-renovación. Por lo tanto, la búsqueda de estrategias terapéuticas novedosas para atacar a la subpoblación troncal es un tópico de interés en la actualidad.

La obtención de las CSC a través de biopsias humanas presenta algunas desventajas como la escasez de muestras, la dificultad de aislar y purificar estas células para poder cultivarlas. Para los ensayos realizados en este trabajo (medición de flujos glucolíticos y mitocondriales) se requieren grandes cantidades de células para su realización (alrededor de 30 mg de proteína, unas 25-30 millones de células) por lo que fue necesaria la búsqueda de un nuevo método para enriquecer y obtener CSC en cultivos en monocapa. Para ello se utilizaron las condiciones de estrés microambiental que se encuentran presentes en un tumor sólido *in vivo* y que se sabe estimulan el fenotipo troncal: hipoxia, hipoglucemia (baja concentración de glucosa) y exposición a drogas antineoplásicas.

Al exponer células MCF-7 a estas condiciones fue posible enriquecer y aislar una subpoblación con fenotipo troncal. Lo que se evaluó a través de distintos parámetros como la morfología fibroblastoide alargada [Fillmore y Kuperwasser, 2008] la presencia de marcadores como CD44+, CD24-, ALDH1A3 y Oct 3/4, la formación de mamoesferas y colonias [Bar et al., 2010; Manuel-Iglesias et al., 2013]. Con esto se determinó que el protocolo al que fueron expuestas las células permitió la obtención de una población

enriquecida en CSC de cáncer de mama de la línea celular MCF-7. Esto se vio reflejado en un aumento de 4 a 20 veces en los marcadores (CD44, CD24, ALDH1A3 y Oct 3/4) de fenotipo troncal con respecto a las células MCF-7 no tratadas, así mismo el protocolo nos permitió observar un aumento de hasta 10 veces más de CD44 en comparación con otros métodos como la citometría de flujo y otras técnicas de cultivo reportados. Una prueba adicional sería evaluar la formación de tumores en ratones atímicos pero para este estudio no fue posible. Sin embargo se evaluó que las MCF-7 CSC adquirieron capacidad de migrar e invadir en una matriz extracelular. Más del 80% de las MCF-7 CSC invadieron la matriz de la cámara de Boyden en comparación con MCF-7; además las MCF-7 CSC fueron capaces de migrar (mediante el ensayo de herida, Wound Healing Assay) y rellenar la herida después de 24 horas de cultivo, lo cual no realizaron las células MCF-7 [Datos no mostrados en este trabajo; Tesis de Licenciatura Alhelí Adán Ladrón de Guevara, en revisión].

Metabolismo energético

Una de las funciones que ha tomado gran relevancia en células tumorales es el metabolismo energético, ya que se propone a éste como posible blanco terapéutico [Hanahan y Weinberg, 2011]. En células tumorales se ha observado un aumento en la glucólisis incluso a altas concentraciones de O₂ (efecto Warburg) y de manera reciente se ha descrito un papel importante de la OxPhos al ser la principal fuente de ATP de las células tumorales [Moreno-Sánchez et al., 2014]. Con respecto a las CSC no hay estudios tan robustos para determinar qué tipo de metabolismo energético presentan (Tabla 1).

Los estudios sobre CSC de mama enfocados en el metabolismo energético son pocos ya que se han visto limitados por no existir un protocolo que separe estas células y brinde el material suficiente para hacer estudios más completos. Por lo que estos estudios presentan únicamente un enfoque proteómico, de mRNA, número de mitocondrias o en su defecto determinan el número de mitocondrias (Tabla 1). En otros casos consideran que el consumo total de oxígeno o la producción total de lactato son reflejo de la OxPhos y de la

glucólisis (Tabla 1), olvidando que otras vías metabólicas pueden estar involucradas en el consumo de oxígeno y en la producción de lactato. Por lo que el uso de inhibidores como la oligomicina y 2DOG es esencial para medir los flujos de la OxPhos y la glucólisis.

Procesos como son crecimiento, invasión y metástasis demandan gasto de energía [Amoêdo et al., 2013] por lo cual, la terapia metabólica puede ser útil una vez que se determina la vía energética de la cual depende la célula tumoral para la síntesis de ATP ya que se puede proponer un fármaco que inhiba a dicha vía.

Con base en estos antecedentes, en este proyecto se realizó el análisis del metabolismo energético de las MCF-7 CSC con el objetivo de establecer que vía es la principal fuente de ATP en estas células.

La glucólisis en MCF-7 CSC

Como se observa en la figura 8, el contenido de proteína de la mayoría de las enzimas y transportadores evaluadas tuvo un aumento, esto debido a que algunas de éstas corresponden a las reguladoras de las vías (transportadores de glucosa y hexocinasas). Por otro lado es importante resaltar que éstas también se encuentran relacionadas con procesos de malignidad, reparación del DNA, transcripción, apoptosis, detoxificación, control del ciclo celular, etc [Lincet e lcard, 2015], es decir, no sólo participan en su función canónica de la vía metabólica sino que también tienen efectos en otras vías ya sea como moléculas señalizadoras o transductores de señales que favorecen el fenotipo maligno. Es por esto que aunque se vea un incremento en las proteínas del metabolismo energético, es probable que se encuentren realizando otras funciones adicionales a su papel metabólico.

Por lo tanto, al ser esta técnica una forma semicuantitativa para evaluar la cantidad de proteína de ambas vías y al no ver resultados preferentes hacia una sola vía energética, se calcularon las actividades enzimáticas y por último los flujos para determinar de qué vía son dependientes las MCF-7 CSC.

Las MCF-7 CSC mostraron una disminución de 3 a 5 veces en el flujo glucolítico con respecto a MCF-7 (Tabla 4), lo cual no correlacionó con el aumento en el contenido de las proteínas glucolíticas y con el aumento en la actividad de las enzimas HK y LDH para las cuales ya se había reportado una actividad similar en MCF-7, destacando que en las CSC se ha observado un aumento en la actividad de la LDH [Ciavardelli et al., 2014]. Nuestros datos de la actividad concuerdan con la literatura en este sentido. Aunque la proteómica no es reflejo de los flujos del metabolismo energético [Moreno-Sánchez et al., 2016].

La disminución en la glucólisis se ve directamente correlacionado con la baja proliferación de las MCF-7 CSC, ya que se ha descrito que la mayoría de las células con proliferación lenta, o quiescentes, producen ATP preferentemente a partir de la OxPhos [Ward y Thompson, 2012] mientras que las células de cáncer proliferativas dependen de la glucólisis principalmente, aunque en ambos casos no hay evidencia experimental que valide estas aseveraciones.

Con respecto al aumento en la cantidad de proteína y actividad de HK y LDH correlaciona con la participación de éstas para dar el fenotipo y características específicas de las CSC. Además, se ha demostrado que el aumento en la expresión de la HKII está asociado con la metástasis de cáncer de mama a cerebro [Palmieri et al., 2009], y a la quimio-resistencia [Kaplan et al., 1990; Komurov et al., 2012]. La LDH-A ha sido descrita como necesaria para la iniciación del tumor, mantenimiento y progresión de éste [Le et al., 2010; Fantin et al., 2006] así como una asociación con cáncer agresivo y metastásico [Koukourakis et al., 2005]. Se ha observado que la expresión de enzimas glucolíticas contribuyen y presentan distintos roles en células de cáncer. La sobreexpresión de HKII se ha asociado con transformación oncogénica y baja prognosis y se ha demostrado que es inducido por HIF1 α [Lincet e Icard, 2015].

La OxPhos en MCF-7 CSC

Las MCF-7 CSC tuvieron una disminución de 2.4 veces en el flujo de la OxPhos con respecto a MCF-7. Esto correlaciona con una disminución de las

actividades de las enzimas mitocondriales CS, GDH y COX, 2, 7 y 1.6 veces respectivamente, mas no con el contenido de proteína la cual aumentó. Estas proteínas pueden participar en otras vías no necesariamente metabólicas. Por ejemplo, una baja concentración de la CS, en distintos carcinomas, se ha visto involucrada en el proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) y con características de células troncales de cáncer como mayor malignidad y resistencia a fármacos. También se observó morfología fibroblastoide en células cancerosas que tienen menor expresión de la CS [Lin et al., 2012], morfología que presentan las MCF-7 CSC (Figura 2). Lo anterior indica claramente que la disminución puede ser sinónimo de malignidad en este caso.

Las células dependientes de ATP por OxPhos metabolizan el piruvato a través de la vía glucolítica y oxidan piruvato a CO_2 a través del ciclo de Krebs donde el O_2 es el aceptor final en la cadena transportadora de electrones generando un gradiente electroquímico que permite la producción de ATP [Ward y Thompson, 2012]. Por lo tanto, otra vía mitocondrial que está involucrada con el ciclo de Krebs, para producción de ATP por acetil CoA, es la β -oxidación, la cuál ha sido reportada funcional en células tumorales no troncales [Rodríguez-Enríquez et al., 2015]. Las proteínas de la β -oxidación, CPT1 y SCAD, en las MCF-7 CSC tuvieron un aumento de hasta 10 veces, lo que puede sugerir que la vía está activa, aunque como se ha venido mencionando, es necesario medir el flujo, ya que la beta oxidación no se ha estudiado en las CSC.

Estado general de la mitocondria en MCF-7 CSC.

Con la finalidad de medir otro parámetro involucrado con el metabolismo mitocondrial se evaluó el potencial de membrana mitocondrial, el cual disminuye en MCF-7 CSC a un poco más de la mitad con respecto al control (Tabla 7). Esto coincide con la disminución general del metabolismo energético en MCF-7 CSC. Esto posiblemente se debe a que las CSC no se encuentran en un estado proliferativo, por lo cual mantiene los flujos mínimos requeridos para su supervivencia en condiciones de hipoxia y bajos nutrientes.

Posteriormente un último parámetro fue observar si había una disminución en el número de mitocondrias debido a la baja del metabolismo y potencial de la membrana mitocondrial, por lo tanto, por medio de fluorescencia y microscopía confocal se realizó el marcaje de mitocondrias con MitoTracker verde (MTG), donde se observó que no hay una diferencia, al menos cualitativa, en la cantidad de mitocondrias. En CSC de pulmón se observó que no hay diferencias con respecto a la masa mitocondrial en comparación con la población de origen y reportan que una conformación perinuclear de las mitocondrias puede ser indicativo de población CSC [Ye et al., 2011].

Dependencia energética en MCF-7 CSC y terapia dirigida.

Retomando los datos obtenidos de los flujos de glucólisis y OxPhos de MCF-7 CSC, los cuales se vieron disminuidos de 2 a 5 veces (Tabla 4 y Tabla 5), se determinó la dependencia energética de ésta subpoblación tumoral, en la cual se obtuvo el 87% de aporte de ATP por la vía de fosforilación oxidativa y un 13% de la glucólisis. En leucemia, que fue dónde primero se encontró y analizó la subpoblación de CSC, se ha reportado que existen CSC dividiéndose activamente y son las encargadas de mantener el tumor y otro grupo de CSC, que se encuentran en quiescencia, tienen resistencia a estrés citotóxico y se encargan de repoblar el tumor después de la quimioterapia [Zeuner, 2015; Lagadinou et al., 2013]. De igual manera estas CSC quiescentes de leucemia se caracterizaron por tener una baja tasa del metabolismo energético y una gran dependencia a la OxPhos observada con sensibilidad a inhibidores de la OxPhos. El estado de baja energía permite a estas células sobrevivir a condiciones de bajo oxígeno y baja concentración de nutrientes. Cuando se inhibe la OxPhos en estas células no hay compensación con la glucólisis como en el caso de otras células tumorales [Zeuner, 2015; Lagadinou et al., 2013]. Lo anterior apoya los datos obtenidos en este trabajo, con lo cual, con ayuda de estudios más exhaustivos del metabolismo energético en distintos tipos de cáncer, se podrá encontrar un perfil característico de las CSC para así proponer nuevas y mejores terapias o marcadores para atacar esta subpoblación tumoral.

Como ya se mencionó anteriormente, las CSC presentan un comportamiento de quiescencia, y esto se ve estrechamente relacionado con células con baja tasa de proliferación que dependen preferentemente de la OxPhos [Zhang et al., 2015] y con fenotipo de resistencia a drogas. No obstante este estado de quiescencia metabólica, su agresividad se mantiene alta como lo determinamos en las características de morfología, troncalidad, crecimiento, formación de mamoesferas y colonias (Figuras 2-7). Por lo tanto es necesario evaluar terapias dirigidas hacia esta subpoblación. Se han hecho estudios con inhibidores mitocondriales en los cuales observan menor proliferación de células tumorales no troncales dependientes de la OxPhos en monocapa y esferoides [Mandujano-Tinoco et al., 2013; Hernández-Reséndiz et al., 2015], por lo cual se evaluó la IC_{50} de viabilidad con CasII-gly, inhibidor multisitio pero con mayor afinidad por la mitocondria, debido a que es un catión lipofílico que tiene alta preferencia por células tumorales sobre las normales debido a la mayor carga negativa interna de la mitocondria tumoral con respecto a mitocondrias sanas, además la CasII-gly inhibe a la SDH, PDH y 2OGDH [Rodríguez-Enríquez et al., 2011; Marín-Hernández et al., 2012]. Interesantemente las MCF-7 CSC fueron más sensibles a éste compuesto (2 veces comparado con MCF-7) (Tabla 8), por lo tanto en estas células la OxPhos es la principal fuente de ATP, lo que correlacionó con reportes de nuestro grupo que indican que estas células tienen una sensibilidad mayor a inhibidores mitocondriales y no a inhibidores glucolíticos [Tesis de Licenciatura Alhelí Adán Ladrón de Guevara, en revisión]. Debido a la resistencia que tienen las CSC a las terapias convencionales usadas en la clínica estos resultados permiten proponer que un inhibidor mitocondrial será específico contra esta subpoblación celular.

Cabe señalar que los resultados obtenidos en esta tesis, evaluados sistemática y rigurosamente, permiten determinar por primera vez que a pesar de que el metabolismo energético en células de cáncer de mama MCF-7 está disminuido, la dependencia energética es de la OxPhos, y por lo tanto esta vía se convierte en un blanco terapéutico preferencial, la cual incluso es más sensible que el tumor heterogéneo.

VI. CONCLUSIONES

Las condiciones de estrés microambiental (combinación de hipoxia, baja concentración de glucosa y exposición a drogas antineoplásicas) permitieron seleccionar y enriquecer la fracción de células con fenotipo troncal de cáncer de mama en cultivos en monocapa.

Por primera vez en la literatura, este trabajo reporta un análisis sistemático de la dependencia del metabolismo energético en células de cáncer de mama con fenotipo troncal. Para lo anterior se determinó, tanto de la glucólisis como de la fosforilación oxidativa, la cantidad de proteína, algunas actividades enzimáticas, pero lo más importante, flujos metabólicos y el porcentaje de ATP proveniente de cada vía energética. Con lo anterior se estableció que la fosforilación oxidativa es la vía que aporta mayor cantidad de ATP a las CSC de mama, por lo que una estrategia contra las CSC puede ser la terapia antimitocondrial.

REFERENCIAS

Ahmad A. (2013). Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncol.* 2013:290568.

Alison MR, Lin WR, Lim SM, Nicholson LJ. (2012). Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev.* 38(6):589-98.

Amoêdo ND, Valencia JP, Rodrigues MF, Galina A, Rumjanek FD. (2013). How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. *Biosci Rep.* 33(6).

Bapat SA. (2010). Human ovarian cancer stem cells. *Reproduction.* 140(1):33-41.

Bar EE, Lin A, Mahairaki V, Matsui W, Eberhart CG. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol.* 177(3):1491-502.

Bosch Barrera J, López-Picazo González JM, García-Foncillas López J, Prósper Cardoso F. (2007). [Stem cells and cancer: elucidating the origin of the cancer stem cell]. *Rev Med Univ Navarra.* 51(2):14-7.

Bourguignon LY. (2001). CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 6(3):287-97.

Ciavardelli D, Rossi C, Barcaroli D, Volpe S, Consalvo A, Zucchelli M, De Cola A, Scavo E, Carollo R, D'Agostino D, Forlì F, D'Aguanno S, Todaro M, Stassi G, Di Ilio C, De Laurenzi V, Urbani A. (2014). Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death Dis.* 17;5:e1336.

Clarke RB. (2005). Isolation and characterization of human mammary stem cells. *Cell Prolif.* 38(6):375-86.

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

de Beça FF, Caetano P, Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J, Schmitt F. (2013). Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol.* 66(3):187-91.

Dean M, Fojo T, Bates S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat RevCancer*. 5(4):275-84.

Douville J, Beaulieu R, Balicki D. (2009). ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 18(1):17-25.

Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q. (2008). CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 14(21):6751-60.

Erickson K, Braun RD, Yu D, Lanzen J, Wilson D, Brizel DM, Secomb TW, Biaglow JE, Dewhirst MW. (2003). Effect of longitudinal oxygen gradients on effectiveness of manipulation of tumor oxygenation. *Cancer Res*. 63(15):4705-12.

Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. (2010). CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*. 7(2):100-3.

Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*. 9(6):425-34.

Feng W, Gentles A, Nair RV, Huang M, Lin Y, Lee CY, Cai S, Scheeren FA, Kuo AH, Diehn M. (2014). Targeting unique metabolic properties of breast tumor initiating cells. *Stem Cells*. 32(7):1734-45.

Fillmore CM, Kuperwasser C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 10(2):R25.

Flavahan WA, Wu Q, Hitomi M, Rahim N, Kim Y, Sloan AE, Weil RJ, Nakano I, Sarkaria JN, Stringer BW, Day BW, Li M, Lathia JD, Rich JN, Hjelmeland AB. (2013). Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci*. 16(10):1373-82.

Gallardo-Pérez JC, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. (2014). GPI/AMF inhibition blocks the development of the metastatic phenotype of mature multi-cellular tumor spheroids. *Biochim Biophys Acta*. 1843(6):1043-53.

Gilbert CA, Ross AH. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*. 108(5):1031-8.

GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. (2012). Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry A*. 81(4):284-93.

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

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

Hunjan S, Mason RP, Constantinescu A, Peschke P, Hahn EW, Antich PP. (1998). Regional tumor oximetry: ¹⁹F NMR spectroscopy of hexafluorobenzene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 41(1):161-71.

INEGI. 2015 <http://www.inegi.org.mx/>

Kallinowski F, Schlenger KH, Runkel S, Kloes M, Stohrer M, Okunieff P, Vaupel P. (1989). Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res*. 49(14):3759-64.

Kaplan O, Navon G, Lyon RC, Faustino PJ, Straka EJ, Cohen JS. (1990). Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res*. 50(3):544-51.

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

Komurov K, Tseng JT, Muller M, Seviour EG, Moss TJ, Yang L, Nagrath D, Ram PT. (2012). The glucose-deprivation network counteracts lapatinib-induced toxicity in resistant ErbB2-positive breast cancer cells. *Mol Syst Biol*. 8:596.

Korkaya H, Liu S, Wicha MS. (2011). Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 121(10):3804-9.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Polychronidis A, Sivridis E. (2005). Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 22(1):25-30.

Krishan A, Sharma D, Sharma S, Hamelik RM, Ganjei-Azar P, Nadji M. (2010). ALDH(+)/CD44(+)/CD24(-) expression in cells from body cavity fluids. *Cytometry B Clin Cytom*. 78(3):176-82.

Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M. (2003). CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 9(13):4906-13.

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

Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, Ashton JM, Pei S, Grose V, O'Dwyer KM, Liesveld JL, Brookes PS, Becker MW, Jordan CT. (2013). BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 12(3):329-41.

Lamb R, Harrison H, Hulit J, Smith DL, Lisanti MP, Sotgia F. (2014). Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition. *Oncotarget.* 5(22):11029-37.

Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(5):2037-42.

Lee HJ, Choe G, Jheon S, Sung SW, Lee CT, Chung JH. (2010). CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification. *J Thorac Oncol.* 5(5):649-57.

Lenhinger, A, Nelson, D, Cox, M. (1993). *Principles of Biochemistry.* Worth Publishers. USA. Pp. 1013.

Li P, Zhou C, Xu L, Xiao H. (2013). Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. *Int J Med Sci.* 10(4):399-407.

Lin Q, Yun Z. (2010). Impact of the hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cell characteristics. *Cancer Biol Ther.* 9(12):949-56.

Lin CC, Cheng TL, Tsai WH, Tsai HJ, Hu KH, Chang HC, Yeh CW, Chen YC, Liao CC, Chang WT. (2012). Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Sci Rep.* 2:785.

Lincet H, Icard P. (2015). How do glycolytic enzymes favour cancer cell proliferation by nonmetabolic functions? *Oncogene.* 34(29):3751-9.

Mandujano Tinoco, E. A., & Gallardo Pérez, J. C. (2011). Análisis del metabolismo energético en capas celulares quiescentes y proliferativas de esferoides tumorales MCF-7 (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. México.

Mandujano-Tinoco EA, Gallardo-Pérez JC, Marín-Hernández A, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S. (2013). Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochim Biophys Acta*. 1833(3):541-51.

Manuel Iglesias J, Belouqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguiara A, Cufi S, Pavon A, Menendez JA, Dopazo J, Martin AG. (2013). Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS One*. 8(10):e77281.

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

Marín-Hernández A, López-Ramírez SY, Del Mazo-Monsalvo I, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. (2014). Modeling cancer glycolysis under hypoglycemia, and the role played by the differential expression of glycolytic isoforms. *FEBS J*. 281(15):3325-45.

Matsuda S, Yan T, Mizutani A, Sota T, Hiramoto Y, Prieto-Vila M, Chen L, Satoh A, Kudoh T, Kasai T, Murakami H, Fu L, Salomon DS, Seno M. (2014). Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. *Int J Cancer*. 135(1):27-36.

McDermott SP, Wicha MS. (2010). Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol*. 4(5):404-19.

Medema JP. (2013). Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol*. 15(4):338-44.

Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 7(2):150-61.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 274(6):1393-418.

Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Saavedra E, Pardo JP, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S. (2014). Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 50:10-23.

Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Gallardo-Pérez JC, Rumjanek FD, Rodríguez-Enríquez S. (2016). Understanding the cancer cell phenotype beyond the limitations of current omics analyses. *FEBS J.* 283(1):54-73.

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

Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. (1984). Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res.* 44(12 Pt 1):5702-6.

Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. (2008). Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol.* 18(4):260-7.

National Cancer Institute (NCI). USA. <http://www.cancer.gov/espanol>

Nicholls, D. (1987). *Bioenergética: introducción a la teoría quimiosmótica*. Ed. Reverté. Pp. 203.

Niyazi M, Niyazi I, Belka C. (2007). Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software. *Radiat Oncol.* 2:4.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 445(7123):106-10.

OMS. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, Hua E, Bronder JL, Weil RJ, Davis S, Stark AM, Merino MJ, Kurek R, Mehdorn HM, Davis G, Steinberg SM, Meltzer PS, Aldape K, Steeg PS. (2009). Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol Cancer Res.* 7(9):1438-45.

Philip B, Ito K, Moreno-Sánchez R, Ralph SJ. (2013). HIF expression and the role of hypoxic microenvironments within primary tumours as protective sites driving cancer stem cell renewal and metastatic progression. *Carcinogenesis.* 34(8):1699-707.

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. (2003). CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(1):33-45.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG.(2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 65(13):5506-11.

Prud'homme GJ, Glinka Y, Toulina A, Ace O, Subramaniam V, Jothy S. (2010). Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist. *PLoS One.* 5(11):e13831.

Rodríguez-Enríquez S, Carreño-Fuentes L, Gallardo-Pérez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, Marín-Hernández A, Olín-Sandoval V, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R. (2010). Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(10):1744-51.

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

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

Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, El Hafidi M, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Rodríguez-Zavala JS, Pacheco-Velázquez SC, Moreno-Sánchez R. (2015). Mitochondrial free fatty acid β -oxidation supports oxidative phosphorylation and proliferation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 65:209-21.

Rudden, R. (2007). *Cancer Biology*. 4th edition. Oxford University Press. USA

Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. (2003). Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med (Maywood).* 228(9):995-1003..

Stanford Medicine. Ludwig Center for Cancer Stem Cell Research and Medicine. 2016. <http://med.stanford.edu/ludwigcenter/overview.html>

- Tosoni D, Di Fiore PP, Pece S. (2012). Functional purification of human and mouse mammary stem cells. *Methods Mol Biol.* 916:59-79.
- van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 8:47.
- Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 51(12):3316-22.
- Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Reue K, Frohnen P, Chan M, Alhiyari Y, Dratver MB, Pajonk F. (2014). Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Res Treat.* 146(3):525-34.
- Voet, D. y Voet, J. (2004). *Biochemistry.* John Wiley and Sons. USA. Pp. 1591
- Ward PS, Thompson CB. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 21(3):297-308.
- Wiestler, O. D., Haendler, B., & Mumberg, D. (2007). *Cancer stem cells : novel concepts and prospects for tumor therapy.* Berlin : Springer.
- Ye J, Wu D, Wu P, Chen Z, Huang J. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumor Biology.* 2014;(5):3945.
- Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, Bian XW, Yu SC, Qian GS. (2011). Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer.* 129(4):820-31.
- Yu C, Yao Z, Jiang Y, Keller ET. (2012). Prostate cancer stem cell biology. *Minerva Urol Nefrol.* 64(1):19-33.
- Zeuner A. (2015). The secret life of quiescent cancer stem cells, *Molecular & Cellular Oncology,* 2:1, e968067.
- Zhang X, de Milito A, Olofsson MH, Gullbo J, D'Arcy P, Linder S. (2015). Targeting Mitochondrial Function to Treat Quiescent Tumor Cells in Solid Tumors. *Int J Mol Sci.* 16(11):27313-26.
- Zhao J, Zhang J, Yu M, Xie Y, Huang Y, Wolff DW, Abel PW, Tu Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene.* 32(40):4814-24.

Zheng J, Li Y, Yang J, Liu Q, Shi M, Zhang R, Shi H, Ren Q, Ma J, Guo H, Tao Y, Xue Y, Jiang N, Yao L, Liu W. (2011). NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression. *BMC Cancer*. 11:251:1-9.

Zheng J. (2012). Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett*. 4(6):1151-1157.

Zu XL, Guppy M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 313(3):459-65.