



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“EFECTO DEL ETOPÓSIDO SOBRE EL FENOTIPO
TRONCAL EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER
DE MAMA MDA-MB-231”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:
ANDREA RODRÍGUEZ MORENO**

**ASESOR DE TESIS:
DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y Examen Profesional**

Efecto del etopósido sobre el fenotipo troncal en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

Que presenta la pasante: **Andrea Rodríguez Moreno**

Con número de cuenta: **308203943** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Junio de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	Dra. Ana Paola Rojas Meza	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga*

Agradecimientos

Al CONACYT por haber apoyado el trabajo aquí presentado a través del proyecto CB-2013-01 221103 y Red Temática Células Troncales y Medicina Regenerativa.

Al proyecto PAPIIT IN228616 por haber apoyado el trabajo aquí presentado.

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

Agradecimientos personales

A mi papá Enrique Rodríguez de Landa por haberme enseñado que de las cosas hay que ocuparse y no preocuparse; a mi mamá María del Carmen Moreno Amable por haberme ensañado a darlo todo en cada cosa que me proponga hacer; a mi hermana Pachol que siempre ha sido mi sostén e inspiración en cada etapa de mi vida; a mi hermano Tavo por ser esa personita tierna que me motiva siempre a seguir adelante; a mis abuelitas Queta y Tere que son mis mas grandes ejemplos de fortaleza y superación; a los tíos y primos que nos han acompañado a mi familia y a mí en todos nuestros logros y fracasos; a todos esos amigos que tuve la fortuna de conocer a lo largo de mi vida estudiantil y sobre todo a Valeria, Joselyn, Rodrigo y Karla que se quedaron a mi lado dándome ánimos en todo lo que hago; al hombre que se ha convertido en mi compañero de vida, Eric Felipe Gutiérrez González que me ha complementado tanto espiritual como intelectualmente en estos casi 6 años de felicidad, apoyo y comprensión; a mis compañeritos de laboratorio sobre todo a Don Abimael por hacer más divertido este casi año y medio de esplendida ciencia.

Finalmente le agradezco a mi amada Universidad que me ha formado como una profesional capaz desde mi ingreso en 2007 a la ENP 3 y hasta la conclusión de mi licenciatura en la FES Cuautitlán y CU. Y en especial al Dr. Marco A. Velasco Velázquez y la Dra. Inés Velázquez Quesada que me brindaron las herramientas necesarias para concluir esta etapa de mi vida.

Glosario de siglas y abreviaturas

7AAD	7-Aminoactinomicina
α-SMA	Actina de Musculo Liso α
ALDH	Aldehido Deshidrogenasa
ATM	Ataxia Telangectasia Mutada
ATCC	American Type Culture Collection
CDDP	Cis-diaminodicloroplatino II
CI 50	Concentración Inhibitoria 50
CMLA	Cáncer de Mama Localmente Avanzado
CTT	Células Troncales Tumorales
DMSO	Dimetilsulfoxido
DEAB	Dietilaminobenzaldehido
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESA	Epithelial Specific Antigen
HA	Hialuronato
MRSE	Moduladores de Receptores Selectivos de Estrógenos
RE	Receptor de Estrógenos
RP	Receptor de Progesterona
SFB	Suero Fetal Bovino
TEM	Transición Epitelio Mesenquima
TGF-β	Tumor Growth Factor β
TME	Transición Mesenquima Epitelio
Topo II	Topoisomerasa II
TSP-I	Trombospondina I
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Índice

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
	2.1 Generalidades del cáncer	2
	2.2 Epidemiología del cáncer	3
	2.3 Carcinogénesis	3
	2.3.1 Señas de identidad “hallmarks” del cáncer	5
	2.4 Cáncer de mama.....	13
	2.4.1 Clasificación del cáncer de mama	13
	2.4.2 Tratamientos contra el cáncer de mama.....	15
	2.4.3 Células troncales tumorales.....	19
	2.4.4 Células troncales tumorales de cáncer de mama	20
	2.4.5 El receptor CD44	23
III.	Antecedentes.....	25
IV.	Justificación	26
V.	Hipótesis.....	28
VI.	Objetivos	28
VII.	Metodología.....	29
	7.1. Compuestos.....	29
	7.2 Material biológico.....	29
	7.3 Evaluación de la viabilidad mediante reducción de MTS.	29
	7.4 Cuantificación del efecto del etopósido en el fenotipo CD44 ⁺ /CD24 ^{low/-} por citometría de flujo.....	30
	7.5 Determinación del efecto del etopósido sobre la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) por citometría de flujo.....	30
	7.6 Determinación del efecto del etopósido en la formación de mamoesferas. .	31
	7.7 Cuantificación de muerte celular por citometría de flujo.....	32
	7.8 Sensibilización a agentes citotóxicos.....	32
	7.9 Análisis estadístico.....	33
VIII.	Resultados.....	33
	8.1 Evaluación de la viabilidad mediante reducción de MTS.	33

8.2 Cuantificación del efecto del etopósido en el fenotipo CD44 ⁺ /CD24 ^{low/-} por citometría de flujo.....	34
8.3 Determinación del efecto del etopósido sobre la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) por citometría de flujo.....	35
8.4 Determinación del efecto del etopósido en la formación de mamoesferas. .	36
8.5 Cuantificación de muerte celular por citometría de flujo.....	38
8.6 Sensibilización a agentes citotóxicos.	39
IX. Discusión.....	40
X. Conclusiones.....	46
XI. Referencias	47

Índice de figuras

Figura 1. Etapas del desarrollo del cáncer (Imagen modificada de (Rundhaug & Fischer, 2010).	3
Figura 2. Señas de identidad del cáncer descritas en el 2000 por Hanahan y Weinber (Figura modificada de (Hanahan & Weinberg, 2000))......	6
Figura 3. Posibles orígenes de las células troncales tumorales mamarias (imagen modificada de (Velasco-Velazquez et al., 2012)).	21
Figura 4. Receptor CD44. A) Estructura del gen de CD44, las isoformas CD44v se forman del exón 6a al exón 14 mientras que la isoforma CD44s se forma con los exones 1-5 y 15-19. DT (Dominio Transmembranal) y DC (Dominio Citoplasmático). B) Estructura del receptor.....	24
Figura 5. Viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 tras el tratamiento con etopósido. No se presentaron cambios estadísticamente significativos en la viabilidad celular con respecto al control. Se realizó un ANOVA de una vía con 0.05 de significancia. Experimento representativo de una n=3. Las barras representan la media de sextuplicados ± el error estándar.....	34
Figura 6. Cuantificación del efecto del etopósido sobre el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ por citometría de flujo. A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD44 y CD24 en la línea celular MDA-MB-231 tratada con etopósido por 24 h. Experimento representativo de tres experimentos independientes. B) Cuantificación del porcentaje de células CD44 ⁺ /CD24 ⁻ . Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Bonferroni con 0.05 de significancia. *P<0.05, **P<0.01. Las barras representan la media ± el error estándar de la misma n=3.	35
Figura 7. Efecto del etopósido en la actividad de la enzima ALDH. A) Análisis del efecto del etopósido en la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa	

(ALDH) por citometría de flujo. Experimento representativo de cuatro experimentos independientes. B) Comparación estadística de los tratamientos con etopósido con respecto a su control (DMSO 0.2%). Se realizó un ANOVA de una sola vía con un 0.05 de significancia. Las barras representan la media \pm el error estándar $n=4$ 36

Figura 8. Efecto del pretratamiento con etopósido en la formación de mamoesferas. A) Micrografías de la formación de mamoesferas previo tratamiento por 24 h con el control (DMSO 0.2%) o etopósido 10 μM . La barra en las micrografías representa 100 μm . Se realizaron 12 replicados para el control y 24 para el tratamiento. B) Cuantificación del número de mamoesferas para el control y el tratamiento con etopósido 10 μM por cada 100 células. Las barras representan \pm el error estándar de la misma. C) Cuantificación del tamaño de las mamoesferas del control y el tratamiento con etopósido 10 μM . A ambas cuantificaciones se les realizó la prueba t de Student con un 0.05 de significancia. **** $P<0.0001$ 38

Figura 9. Cuantificación de la muerte celular de las células MDA-MB-231 tras el tratamiento con etopósido por citometría de flujo. A) Análisis de las células necróticas y apoptóticas por citometría de flujo. Experimento representativo de una $n=3$. B) Comparación estadística del porcentaje de células en apoptosis o necrosis entre el control con DMSO 0.02% y el tratamiento con etopósido 10 μM . Se realizó una prueba de t de Student con un 0.05 de significancia. * $P<0.05$. Las barras representan la media \pm el error estándar de la misma $n=3$ 39

Figura 10. Sensibilización de las células MDA-MB-231 con etopósido 10 μM hacia agentes citotóxicos. A) Curva de viabilidad de células tratadas con etopósido 10 μM y CDDP (azul) y curva de viabilidad de células tratadas con DMSO 0.02% y CDDP (rojo). B) Comparación estadística de los promedios de las IC 50 de ambos tratamientos. Se realizó la prueba t de Student con un 0.05 de significancia. Las barras representan la media \pm el error estándar $n=5$ 40

I. Resumen

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres a nivel mundial. En el 2012 se registraron 522 000 fallecimientos por esta causa y en México es la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años. Las células troncales tumorales (CTT) mamarias promueven la progresión del cáncer de mama hacia grados avanzados, la resistencia a la quimio y radioterapia, e inducen metástasis. Aguirre *et al.* seleccionó *in silico* al fármaco etopósido como posible antagonista de la unión de hialuronato al receptor CD44. Este receptor es un marcador de CTT mamarias que participa en el mantenimiento de sus características pluripotentes.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del etopósido en diversas funciones de células de cáncer de mama empleando la línea celular MDA-MB-231. El efecto en la viabilidad se estudió con el ensayo de reducción de MTS. Encontramos que el etopósido no disminuye significativamente la viabilidad y, por lo tanto, los efectos identificados en ensayos posteriores son independientes de la citotoxicidad. Mediante la cuantificación de los marcadores CD44/CD24 y la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) por citometría de flujo se evaluó el efecto del etopósido sobre el fenotipo troncal. El etopósido provoca un aumento del marcador CD24 y por lo tanto la disminución de la población CD44⁺/CD24^{low/-}. Sin embargo la población ALDH⁺ no disminuyó significativamente. En ensayos de formación de mamoesferas se encontró que el etopósido disminuye significativamente tanto la frecuencia como el tamaño de las mamoesferas. La ausencia de citotoxicidad se corroboró cuantificando las células apoptóticas y necróticas por citometría de flujo, tras la exposición a 10 μ M de etopósido. Finalmente, ya que las CTT son quimioresistentes, se evaluó la capacidad del etopósido de sensibilizar a las células MDA-MB-231 hacia el agente citotóxico cisplatino (CDDP). El tratamiento previo con etopósido no afecta la respuesta de las células a CDDP.

En conjunto, estos datos sugieren que el etopósido disminuye el fenotipo troncal en la línea celular MDA-MB-231.

II. Introducción

2.1 Generalidades del cáncer

Clínicamente el cáncer es el nombre general que se le da a un grupo de más de 100 enfermedades relacionadas (National, 2015a) en las que varía la edad en que se presenta, tasa de crecimiento del tumor, nivel de diferenciación celular, método diagnóstico, invasividad, potencial metastásico, respuesta al tratamiento y pronóstico. En términos moleculares las enfermedades cancerosas presentan alteraciones genéticas. Estas alteraciones se producen a través de diversos mecanismos en los que puede haber alteraciones directas al genoma o anomalías en la transcripción y traducción de genes (Ruddon, 1995). En todos los tipos de cáncer las células de alguna parte del cuerpo empiezan a dividirse sin control y comienzan a diseminarse en los tejidos circundantes. Las células cancerígenas se diferencian de las células normales en que son menos especializadas, son invasivas, se replican sin control y no responden ante señalizaciones de muerte programada (National, 2015b).

Los tipos de cáncer usualmente reciben su nombre dependiendo del órgano en el que se originó, sin embargo también pueden adquirir su nombre del tipo de tejido en que se formó el cáncer (National, 2015b) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación del cáncer según el tejido de origen.

Nombre de la neoplasia	Tipo de tejido
Carcinoma	Se origina en células epiteliales.
Sarcoma	Se origina en tejido conectivo.
Leucemia	Se origina en células progenitoras de la médula ósea.
Linfoma	Se origina en los linfocitos T y B
Mieloma múltiple	Se origina en células plasmáticas del sistema inmunitario
Melanoma	Se origina en los melanocitos
Tumores del Sistema Nervioso	Se origina en células del sistema nervioso y adquieren su nombre del tipo de célula nerviosa.

2.2 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes (Organización, 2015). Los tipos de cáncer que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 en las próximas dos décadas (Organización, 2015).

En México para el 2012 se registraron 78 719 defunciones por esta causa con una tasa de mortalidad general de 67.8 por cada 100 000 habitantes. Los tipos de cáncer con mayor mortalidad son pulmonares, prostáticos, gástricos, hepáticos y mamarios, en ese orden de importancia. Sin embargo, se encuentran diferencias importantes de acuerdo al sexo. Para el sexo femenino se presenta mayor mortalidad en el cáncer mamario, cérvico-uterino y hepático, mientras que para el masculino las principales causas de muerte por cáncer son: prostático, pulmonar y gástrico (Secretaria, 2015).

2.3 Carcinogénesis

El desarrollo del cáncer se da en múltiples etapas. Hoy en día se reconocen tres etapas básicas: iniciación, promoción y progresión (Devi, 2004; Rundhaug & Fischer, 2010) (**Figura 1**). La distinción entre inicio y promoción se hizo formalmente en un modelo murino de cáncer de piel en 1947 donde se aplicó tópicamente una dosis única de hidrocarburos aromáticos policíclicos (iniciador) y dosis repetidas de aceite de croton (promotor), y se encontró que para el establecimiento del tumor es necesario pero no suficiente la presencia del iniciador (Albert, 1994; Weston, 2003)



Figura 1. Etapas del desarrollo del cáncer (Imagen modificada de (Rundhaug & Fischer, 2010).

La iniciación se da esencialmente cuando hay cambios irreversibles en una célula somática blanco de forma espontánea o derivados de la exposición a un carcinógeno (Devi, 2004). Estos cambios involucran la activación de oncogenes, que son genes que codifican para una proteína capaz de transformar una célula en cultivo o inducir cáncer en animales. Todos los oncogenes son derivados de genes normales llamados proto-oncogenes cuyos productos participan en el control de la proliferación celular. Por ejemplo, *Ras* es un proto-oncogen que codifica una proteína intracelular de transducción de señales y el gen *Ras^D* que es un oncogen derivado de *Ras* el cual codifica para una “oncoproteína” que promueve una señal excesiva de crecimiento (Lodish, 2001). La desactivación de genes supresores de tumores es otro fenómeno presente en la oncogénesis, estos genes codifican para proteínas que inhiben la proliferación celular, por ejemplo, la desactivación del gen *RB* que codifica para la proteína *RB*, la cual se encuentra unida al factor de transcripción E2F responsable de la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Lodish, 2001); la desactivación de este gen es responsable de la formación del retinoblastoma, esta condición está presente en otros tipos de cáncer como el de pulmón, mama y vejiga (Albert, 1994).

A pesar de los cambios que han sufrido las células en la iniciación, estas pueden permanecer sin causar daño alguno. Para completar la transformación neoplásica se requiere la exposición a estímulos repetidos y prolongados de propagación (Devi, 2004). La hipótesis que se tiene sobre la promoción del tumor es que el promotor probablemente actúa induciendo la expresión de algunos genes que afectan directa o indirectamente la proliferación celular (Albert, 1994). El promotor generalmente no es mutagénico y es capaz de mediar sus efectos biológicos sin activarse metabólicamente. Estos agentes se caracterizan por su habilidad de reducir el periodo de latencia en la formación tumoral después del fenómeno iniciador de la neoplasia (Weston, 2003).

La progresión del tumor es el proceso a través del cual los cambios sucesivos a la transformación y promoción llevan a la formación de subpoblaciones malignas que contribuyen al incremento en el tamaño del tumor debido a las mutaciones antes

descritas. En el primer paso de la progresión tumoral, también llamado conversión neoplásica, las células que sufrieron cambios debido al iniciador pasan a un estado en el que se encuentran más propensas al desarrollo de malignidad por la acumulación de mutaciones en sus genes. La heterogeneidad celular durante el desarrollo de la malignidad puede ser consecuencia de la adquisición temprana de mutaciones específicas que desestabilizan el genoma. Por ejemplo la mutación en TP53 o genes de reparación del DNA. El nivel de malignidad depende de la frecuencia de las mutaciones (Devi, 2004). La tasa de mutaciones puede ser alta debido a los mutágenos presentes en su microambiente o a las alteraciones intracelulares que se dieron durante la iniciación del tumor sobre la maquinaria de replicación, recombinación o reparación del DNA (Albert, 1994).

Conforme los tumores avanzan las células cancerosas pierden la capacidad de adherencia e invaden los tejidos circundantes, lo que da lugar a la metástasis. Las células cancerígenas reclutan células no tumorigénicas de los tejidos vecinos así como de la circulación para construir el microambiente tumoral, el cual a través de interacciones recíprocas cáncer-estroma cooperan para promover la progresión del tumor a través de señalizaciones parácrinas e interacciones físicas (Cammarota & Laukkanen, 2016). Estas interacciones controlan la adhesión, supervivencia, proteólisis, migración, evasión del sistema inmune y linfo/angiogénesis (Bogenrieder & Herlyn, 2003). El microambiente contiene fibroblastos asociados a cáncer, células endoteliales, células inmunes, adipocitos, células troncales del cáncer, células troncales mesenquimatosas y varias proteínas de matriz extracelular (Cammarota & Laukkanen, 2016).

2.3.1 Señas de identidad “hallmarks” del cáncer

Como ya se mencionó anteriormente las células cancerígenas se diferencian de las normales en que estas se replican sin control, no responden a señales de muerte programada y son invasivas, lo que se relaciona con las “señas de identidad del cáncer” descritas en el año 2000 por Hanahan y Weinber, estas “señas” describen las alteraciones esenciales que se desarrollan durante el incremento en la malignidad de un tumor, las cuales son: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a

la muerte celular, inducción de la angiogénesis, activación de la invasión y metástasis, inmortalidad replicativa (**Figura 2**) (Hanahan & Weinberg, 2000) y dos señas de identidad emergentes descritas por Hanahan y Weinber en 2011, reprogramación energética del metabolismo y evasión de la destrucción inmune (Hanahan & Weinberg, 2011).

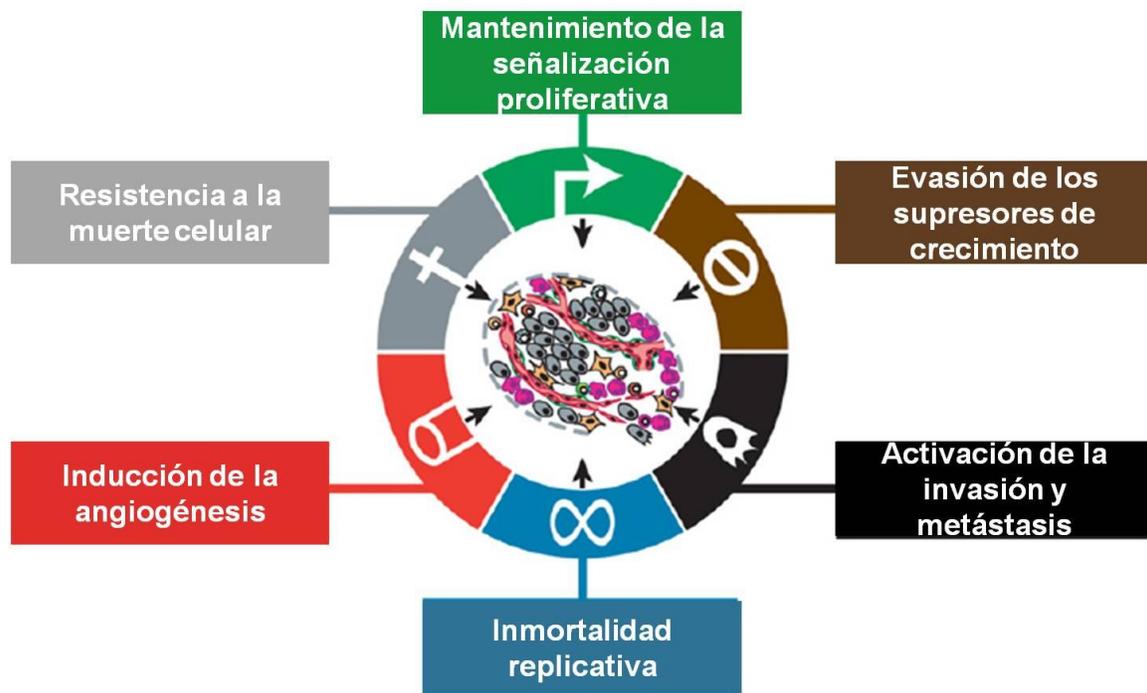


Figura 2. Señas de identidad del cáncer descritas en el 2000 por Hanahan y Weinber (Figura modificada de (Hanahan & Weinberg, 2000)).

- Mantenimiento de la señalización proliferativa

En tejidos normales hay un control cuidadoso de la producción y detención de las señales de crecimiento las cuales dirigen la entrada y progresión en el ciclo celular, de este modo se garantiza la homeostasis en el número de células, el mantenimiento de la arquitectura tisular y su función. Esta señalización se da a través de factores de crecimiento que se unen a receptores de superficie que normalmente contienen un dominio de tirosin cinasa y son secretados por células vecinas. Las células cancerígenas tienen la capacidad de sostener la señalización proliferativa mediante varias vías (Hanahan & Weinberg, 2011) por ejemplo,

pueden producir sus propios factores de crecimiento a los que responden mediante la expresión de receptores a fin para estos mismos factores de crecimiento, resultando en una estimulación proliferativa autócrina. También pueden enviar señales para estimular células normales dentro del estroma asociado al tumor para que estas secreten factores de crecimiento (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004; Cheng, Chytil, Shyr, Joly, & Moses, 2008). La recepción de señales también se puede ver alterada por el aumento en la expresión de receptores de superficie lo que lleva a tener células hiperresponsivas o por alteraciones en la estructura del receptor lo que facilita la unión del ligando (Hanahan & Weinberg, 2011).

- Evasión de los supresores de crecimiento

Las células cancerígenas tienen la capacidad de evitar los mecanismos que regulan negativamente la proliferación celular. Las células se pueden forzar a salir del ciclo proliferativo y pasar a la quiescencia (fase G0 del ciclo celular) del cual pueden salir en un futuro cuando la señalización extracelular se los permita. Lo anterior es ocasionado por anomalías en los genes supresores de tumores de los cuales los más representativos son TP53 y RB que operan complementariamente en la regulación de los circuitos que rigen la entrada de la célula en el ciclo celular o activan la senescencia celular y programas apoptóticos (Hanahan & Weinberg, 2000). Merlin, el producto citoplasmático del gen NF2, dirige la inhibición por contacto mediante la unión de moléculas de superficie como E-cadherina a receptores transmembranales tirosin-cinasa como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR por sus siglas en inglés), esto lo hace fortaleciendo la adhesión de la unión célula-célula mediada por E-cadherina. Además Merlin limita la habilidad de la célula de emitir señales mitogénicas mediante el secuestro de receptores de factores de crecimiento, este mecanismo se encuentra alterado en varios tipos de cáncer (Curto, Cole, Lallemand, Liu, & McClatchey, 2007; Okada, Lopez-Lago, & Giancotti, 2005). La estimulación por el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β por sus siglas en inglés) inhibe la proliferación celular en cáncer en algunos contextos celulares y la promueve en

otros. TGF- β mantiene las vías de señalización en balance y numerosos factores están involucrados en su función de activador de la proliferación celular, por lo tanto la alteración en la señalización de esta molécula por la disrupción o mutación de sus reguladores lleva a la generación y progresión de tumores. Por ejemplo, la sobre expresión de los antagonistas para TGF- β , SKI y SKIL (SKI y SKIL pertenecen a la familia de proto-oncogenes nucleares SKI) favorecen la proliferación celular en varios tipos de cáncer como melanoma, cáncer de mama, leucemias entre otros (Ikushima & Miyazono, 2010).

- Resistencia a la muerte celular

La muerte celular por apoptosis sirve como una barrera natural contra el desarrollo del cáncer. La maquinaria apoptótica se puede desencadenar por dos vías, una que procesa la señalización extracelular de muerte por ejemplo por Fas ligando y el receptor Fas y otra intracelular que se desencadena, por ejemplo, por TP53 (Hanahan & Weinberg, 2011). Anormalidades en los sensores que desencadenan la apoptosis son clave para el desarrollo tumoral, la más notable es el sensor de daño al DNA TP53; éste induce apoptosis por la expresión de las proteínas BH3, Noxa y Puma cuando hay niveles elevados de rupturas en el DNA y otras aberraciones cromosómicas (Junttila & Evan, 2009). Los tumores pueden incrementar la expresión de reguladores antiapoptóticos (BCL-2, Bcl-x_L) o de señales de supervivencia (Igf1/2), disminuir factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma) o crear cortos circuitos en las vías de señalización extracelular de muerte (Lowe, Cepero, & Evan, 2004).

La autofagia es una respuesta fisiológica celular en la que se degradan los organelos celulares, como los ribosomas y las mitocondrias, permitiendo que los catabolitos resultantes sean reciclados para la biosíntesis y metabolismo energético. Este fenómeno es poco frecuente en células normales, sin embargo se incrementa en ciertos estados de estrés celular como en la deficiencia de nutrientes (Hanahan & Weinberg, 2011). En el proceso tumorigénico la autofagia puede funcionar como un mecanismo supresor de tumores por la remoción de organelos y proteínas dañados y limitando el crecimiento celular e inestabilidad

genómica. En el 40 a 75% de los tumores de mama, próstata y ovario se ha demostrado que la pérdida del gen BECN1 (gen relacionado con la autofagia) está involucrado en la prevención de estos tipo de cáncer. Por otro lado la autofagia confiere tolerancia al estrés lo que permite a las células tumorales sobrevivir bajo condiciones adversas. También se ha demostrado recientemente que la autofagia mediada por el oncogen Ras induce senescencia, que es el arresto del ciclo celular mantenido por la expresión de inhibidores del ciclo celular (p16^{Ink4a}, p21^{Cip1} y p27^{Kip1}) en células metabólicamente viables (Yang, Chee, Huang, & Sinicrope, 2011).

La muerte celular por necrosis está bajo el control genético en algunas circunstancias y no se desencadena por procesos descontrolados al azar. En contraste con la apoptosis y la autofagia, la necrosis libera señales proinflamatorias que reclutan células inmunes inflamatorias las cuales pueden activar la promoción del tumor. Adicionalmente las células necróticas pueden secretar factores bioactivos regulatorios como IL-1 α , que pueden estimular directamente a las células viables vecinas a proliferar lo que facilita la progresión neoplásica (Hanahan & Weinberg, 2011)

- Inducción de la angiogénesis

Como en los tejidos normales, cuando los tumores exceden unos milímetros de tamaño requieren de nutrientes y oxígeno así como de eliminar residuos metabólicos y dióxido de carbono, por lo que durante la progresión del tumor se activa un “switch angiogénico” (Weis & Cheresh, 2011) y permanece encendido causando la creación de nuevos vasos sanguíneos que ayudan a sostener el crecimiento neoplásico. Los inductores e inhibidores angiogénicos mejor conocidos son el Factor de Crecimiento Vascular-A (VEGF-A por sus siglas en inglés) y trombospondina-1 (TSP-1) respectivamente (Hanahan & Weinberg, 2011; Kaur et al., 2010). Las células tumorales explotan su microambiente mediante la secreción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, los que crean un gradiente de concentración que inicia la proliferación de células endoteliales, antes quiescentes, de vasos sanguíneos y linfáticos cercanos. La mayoría de los

tumores montan una respuesta inflamatoria que atrae células mieloides al microambiente del tumor las cuales secretan factores solubles para escalar la respuesta angiogénica (Weis & Cheresh, 2011).

- Activación de la invasión y metástasis

En carcinomas de tejidos epiteliales la malignidad se ve reflejada en la invasión local y metástasis distantes, las células asociadas al cáncer generalmente desarrollan alteraciones en su forma así como en su unión con otras células y con la matriz extracelular. La alteración mejor caracterizada es la pérdida de E-cadherina por las células cancerosas, molécula clave en la adhesión célula-célula. El incremento de la expresión de E-cadherina se ha establecido como un antagonista de la invasión y la metástasis, mientras que la reducción en su expresión se sabe que potencia estos fenómenos. La cascada de invasión y metástasis comienza con la invasión local, después la intravasación de las células cancerígenas en los vasos sanguíneos y linfáticos, tránsito de las células cancerosas a través del sistema sanguíneo y linfático, extravasación del torrente sanguíneo a órganos parenquimatosos distantes, formación de pequeños nódulos por las células cancerosas (micrometástasis) y finalmente el crecimiento de las micrometástasis en tumores macroscópicos. El programa transición epitelio mesenquima (TEM) está fuertemente implicado en la transformación de células epiteliales que adquieren la habilidad de invadir, resistir la apoptosis y diseminarse (Hanahan & Weinberg, 2011). La TEM y su reversión, la transición mesenquima-epitelio (TME), se presentan normalmente durante la embriogénesis y en tejidos totalmente diferenciados durante la cicatrización y regeneración (Micalizzi, Farabaugh, & Ford, 2010). Este programa es utilizado por las células cancerígenas para adquirir un fenotipo mesenquimal y de esta manera invadir otros tejidos. La vía de señalización de TGF- β juega un papel fundamental en el desarrollo de la TEM, sin embargo las vías de señalización de los receptores tirocincinasa, Wnt, Hedgehog o Notch, pueden actuar sinérgicamente con TGF- β para inducir la TEM o hacerlo independientemente. También la activación de proto-oncogenes como Ras, PI3K/AKT y Src pueden iniciar la TEM (Aneta,

Tomas, Daniel, & Jan, 2016). Clásicamente la TEM se desencadena por la activación de los factores de transcripción Snail/Slug, Twist o ZEB. Varios de estos factores de transcripción pueden reprimir la expresión de E-cadherina la cual es un supresor clave de la motilidad e invasividad (Hanahan & Weinberg, 2011). Los tumores son estructuras parecidas a órganos, compuestos de diversos tipos de células las cuales son requeridas para guiar y promover el crecimiento de estos tumores y su metástasis.

- Inmortalidad replicativa

En el año 2000 estaba extensamente aceptado el hecho de que las células que forman un tumor tienen la capacidad de replicarse ilimitadamente. Esto contrasta con lo que pasa en las líneas celulares de la mayor parte del cuerpo, las cuales sólo son capaces de replicarse un número limitado de veces. Esta limitación está asociada con dos barreras distintas de proliferación: senescencia, un estado irreversible en el que la célula está viable pero no se encuentra en proliferación, y crisis, que involucra la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

Los telómeros están compuestos en un tándem múltiple de hexanucleótidos repetidos (TTAGGG) unidos a proteínas específicas como TRF2 (Blasco, 2005; de Lange, 2002), estos se van acortando progresivamente en células no inmortalizadas propagadas en cultivo, eventualmente pierden la habilidad de proteger los extremos del DNA de la fusión de extremos; estas fusiones generan cromosomas dicentricos inestables cuya resolución resulta en una codificación del cariotipo que amenaza la viabilidad celular. La telomerasa es una DNA polimerasa especializada que agrega segmentos repetidos de telómeros, esta no está en cantidades suficientes para mantener la longitud de los telómeros indefinidamente en células no inmortalizadas (Blasco, 2005) pero expresada en el 90% de las células inmortalizadas espontáneamente, incluyendo las células cancerígenas humanas. La eventual inmortalización de células que forman tumores se ha atribuido a su habilidad de mantener el DNA telomérico a longitudes suficientes para evitar la desencadenación de la senescencia o apoptosis, logrado con mayor frecuencia por la sobre expresión de la telomerasa, o menos

frecuentemente, a través de un mecanismo de mantenimiento de telómeros basada en la recombinación alternativa (Hanahan & Weinberg, 2011).

- Reprogramación energética del metabolismo

Las células cancerígenas deben hacer ajustes en el metabolismo energético para impulsar el crecimiento y la división celular. En condiciones aeróbicas, las células normales procesan glucosa, primero a piruvato vía glucólisis en el citosol y después a dióxido de carbono en las mitocondrias por la fosforilación oxidativa; bajo condiciones anaeróbicas la glucólisis se ve favorecida, y relativamente poco piruvato se envía a las mitocondrias que consumen oxígeno. Otto Warburg observó primero una anomalía en el metabolismo energético de la célula cancerosa: siempre en presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar el metabolismo de la glucosa, y por lo tanto su producción energética, limitando el metabolismo energético a la glucólisis, llevando al estado que ha sido determinado como “glucólisis aeróbica” (Warburg, 1956a, 1956b). En las células tumorales la glucólisis está asociada a la inhibición de la apoptosis, mediante la sobreexpresión de la hexoquinasa, la cual expulsa el poro de transición de permeabilidad (canal de alta conductancia dentro de la membrana mitocondrial la cual se abre aumentando la permeabilidad a solutos con peso molecular de 1500Da “transición de permeabilidad” (Bernardi & Forte, 2007)) lo que inhibe la salida del citocromo C, que desencadena la apoptosis (Israel & Schwartz, 2011). Se ha encontrado que algunos tumores poseen dos poblaciones de células cancerígenas las cuales difieren en sus vías de obtención energética, una subpoblación glucosa-dependiente que secreta lactato y otra utiliza lactato producida por sus vecinas (Hanahan & Weinberg, 2011).

- Evasión de la destrucción inmune

La teoría de la vigilancia inmunológica propone que las células y tejidos están monitoreados constantemente por un sistema inmune siempre alerta, y que este sistema inmune es responsable de detectar y eliminar la mayoría de las células cancerígenas incipientes y sus tumores emergentes. Las células cancerígenas

altamente antigénicas pueden evadir la destrucción por el sistema inmune mediante la secreción de componentes incapacitantes para el sistema inmune. Por ejemplo las células cancerígenas tienen infiltrados celulares como células natural killers (NK) y linfocitos T citotóxicos que secretan TGF- β u otros factores inmunosupresores. El TGF- β transforma los linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ a linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ reguladores los cuales inhiben la respuesta inmune antitumoral (V. C. Liu et al., 2007).

2.4 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer no-cutáneo más común en el mundo y la causa más común de mortalidad por cáncer entre las mujeres del mundo entero. A nivel mundial, en 2012 se detectaron alrededor de 1,700,000 casos nuevos y aproximadamente 522 000 pacientes fallecieron por esta causa (Ferlay J et al., 2014; UK, 2014). En el 2012, más de 408 000 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer de mama en toda América y 92 000 fallecieron a causa de esta enfermedad. Las proyecciones indican que el número de mujeres diagnosticadas de cáncer de mama en esta región aumentará en un 46% en el 2030. El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de América Latina y el Caribe (Salud, 2014). En México el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres de entre 30 y 54 años (Knaul et al., 2009).

2.4.1 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es un conjunto de enfermedades clínica y genéticamente heterogéneas, por lo que es necesario tener una clasificación para seleccionar el tratamiento y dar el pronóstico a los pacientes.

- Clasificación histológica: En la clasificación histológica se determina la procedencia del tumor es decir si es ductal (de los conductos lácteos) o lobular (de los lóbulos productores de leche). También se determina si el tumor es *in situ* o invasivo (National, 2015b) . Estos tumores invasivos se subclasifican según su grado de diferenciación, es decir que tanto se parece el tejido tumoral al normal (National, 2015b). Para realizar esta clasificación se utiliza el sistema modificado por Nottingham de Scarff-

Bloom-Richardson, el cual toma en cuenta tres diferentes características: pleomorfismo nuclear (cambio en tamaño y forma del núcleo en células tumorales), formación tubular (porcentaje del tumor que tiene formaciones tubulares), e índice mitótico (número de células que están dividiéndose activamente). A cada característica se le da un puntaje de 1 a 3; posteriormente se hace la sumatoria de estos puntajes y se les asigna un grado tumoral: grado I están bien diferenciados (puntaje 3-5), grado II moderadamente diferenciados (puntaje 6-7) y grado III pobremente diferenciados (puntaje 8-9) (Malhotra, Zhao, Band, & Band, 2010; Society, 2016).

- Clasificación molecular: Perou *et al.* realizó la clasificación molecular del cáncer de mama mediante el análisis de los patrones de expresión génica en tejidos de mama humanos normales o malignos de 42 individuos mediante microarreglos (Perou et al., 2000). De esta manera se encontró correspondencia de la expresión de genes con la expresión de receptores hormonales, por lo que los tumores se clasificaron en tumores positivos y negativos para receptores hormonales.

Los subtipos moleculares positivos para receptores hormonales más reproduciblemente identificados son los grupos luminales (Schnitt, 2010). Por otro lado los tumores negativos para receptores hormonales se clasifican en tumores triple negativos, HER2 (receptor 2 de crecimiento epidérmico humano) y parecido al normal. Estos subtipos difieren entre sí por su expresión de genes, características clínicas, respuesta al tratamiento y pronóstico (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Zepeda, Recinos, Cuellar, Robles, & Maafs, 2008).

Las características de los subtipos antes mencionados son:

- Luminales: Expresan el receptor de estrógenos (RE) y/o receptor de progesterona (RP) y pueden tener o no la proteína HER2. Los subtipos luminales que expresan HER2 son más propensos a invadir nódulos linfáticos que los que no lo expresan, por lo que tiene un

peor pronóstico y mayores probabilidades de reincidencia local (Inic et al., 2014).

- HER2: Carecen de los receptores hormonales RE y RP, y expresan niveles altos de la proteína HER2. En la práctica clínica los pacientes que sobreexpresan la proteína HER2 tienen un mal diagnóstico (Vuong, Simpson, Green, Cummings, & Lakhani, 2014).
- Triple negativos: Este subtipo de tumor no expresa los receptores hormonales RE y RP ni la proteína HER2. Un subgrupo de carcinomas triple negativos son los basales que además expresan el receptor del factor de crecimiento epidermal, citoqueratinas de alto peso molecular como la citoqueratina 5/6 y citoqueratina 14 y 17, entre otros genes basales epidermales. Los pacientes con este subtipo molecular tienen el peor pronóstico, recidiva y no existen terapias dirigidas (Vuong et al., 2014).
- Parecido al normal: Este subtipo tiene patrones de expresión parecidos al de tejido normal de mama. La importancia de este subtipo aún no se ha determinado ya que algunos argumentan que podría ser sólo una extensión del perfil de expresión entre el HER2 y el triple negativo (Zepeda et al., 2008) o que puede ser una contaminación de las muestras con el tejido mamario normal (Peddi, Ellis, & Ma, 2012).

2.4.2 Tratamientos contra el cáncer de mama

Las opciones de tratamiento son distintas dependiendo del grado histológico la metástasis a nódulos linfáticos, el estatus de los receptores hormonales, la sobreexpresión de la proteína HER2, comorbilidad, estado de menopausia y edad (Maughan, Lutterbie, & Ham, 2010). El tratamiento se clasifica basándose en el grado del carcinoma:

In situ. Al carcinoma lobular *in situ* generalmente no se le da tratamiento, sin embargo su hallazgo incrementa la probabilidad de desarrollar cáncer invasivo. Por el contrario el carcinoma luminal *in situ* puede progresar a cáncer de mama invasivo, por lo que el tratamiento más común es la radioterapia, sin embargo se

aconseja la cirugía conservativa de seno en enfermedad extensiva o multifocal (Maughan et al., 2010).

Grado I y II

Cirugía: la mastectomía radical modificada ha sido el estándar tradicional para el tratamiento de estadios invasivos tempranos de cáncer de mama. Sin embargo recientemente se ha optado por realizar cirugías conservativas de seno que consiste en remover solo el tejido afectado, lo cual es estéticamente más aceptado por las pacientes. Esta cirugía generalmente es seguida de radiación para evitar la recurrencia local y mejorar la tasa de supervivencia en las pacientes. La decisión para aplicar alguno de estos tratamientos es la presencia de cáncer en los nódulos linfáticos (Maughan et al., 2010). Un estudio realizado a 1850 mujeres en el que se aplicó al azar mastectomía total, cirugía conservativa de seno y cirugía conservativa de seno seguido de radiación, no arrojó cambios estadísticamente significativos en la recurrencia del cáncer y supervivencia de las mujeres entre los tres grupos de tratamiento después de 20 años de iniciado el estudio (Fisher et al., 2002).

Radiación: La radiación luego de la cirugía conservativa de seno se utiliza comúnmente ya que se ha demostrado que este tratamiento reduce a la mitad la velocidad de recurrencia de la enfermedad y reduce la tasa de mortalidad por cáncer de mama en aproximadamente un sexto en 15 años (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative et al., 2011). Las mujeres con cáncer en nódulos linfáticos, mastectomía total y que se les aplicó radioterapia y quimioterapia tienen mejores tasas de supervivencia que las mujeres a las que sólo se les aplicó quimioterapia (Ragaz et al., 2005).

Terapias neoadyuvantes/adyuvantes sistémicas. Las terapias neoadyuvantes sistémicas son aquellas utilizadas para disminuir el tamaño de los tumores y de esta manera poder realizar la cirugía conservativa; y las terapias adyuvantes son aquellas utilizadas en pacientes después de la cirugía (Mauri, Pavlidis, & Ioannidis, 2005).

- Quimioterapia: La quimioterapia es el estándar para tratar mujeres con cáncer en nódulos linfáticos o con tumores de hasta 1 cm de largo. Este tratamiento es más eficaz en pacientes con tumores negativos para receptores hormonales que los positivos para estos receptores. Varios estudios han sugerido que las antraciclinas y los taxanos tienen mejores resultados que otros quimioterapéuticos, sobre todo en tumores que sobreexpresan ERBB2 (Maughan et al., 2010).
- Terapia endocrina: La terapia endocrina que consta de moduladores de receptores selectivos de estrógeno (MRSE), inhibidores de aromatasas y agonistas de hormonas liberadoras de gonadotropina tienen como función prevenir la producción de estrógenos o bloquearlos, y de esta manera prevenir la estimulación de los tumores sensibles a estrógenos. Este tratamiento no es efectivo en pacientes con tumores negativos para receptores hormonales. Los inhibidores de aromatasas son más comúnmente utilizados en mujeres postmenopáusicas (Maughan et al., 2010).
- Terapia tejido específica: Para tratar los cánceres que sobreexpresan ERBB2 se utiliza un anticuerpo monoclonal humanizado anti-ERBB2 (trastuzumab) (Maughan et al., 2010). Esta terapia se administra junto con antraciclinas y taxanos (Buzdar et al., 2005)

Grado III. El cáncer de mama localmente avanzado (CMLA) incluye tumores de hasta 5 cm, afectación regional extendida de los nódulos linfáticos, compromiso directo de la pared torácica o piel. Las pacientes con estos tumores no son candidatas para la mastectomía conservativa.

- Tratamientos sistémicos de inducción: Los pacientes con CMLA se les administra quimioterapia para disminuir el tamaño del tumor en un 50% y de esta manera facilitar la mastectomía conservativa. La terapia endocrina de inducción es menos efectiva que la quimioterapia y puede ser apropiada para pacientes de edad avanzada que no toleran la quimioterapia por su alta toxicidad. El tratamiento combinado de quimioterapia y terapia

endocrina seguida de la mastectomía en pacientes con CMLA positivo para receptores hormonales tiene mejores resultados. La terapia de inducción tejido específico ésta indicada para pacientes con CMLA que sobreexpresan la proteína HER2 después de 12 meses de la mastectomía (Maughan et al., 2010).

- Terapia local: La respuesta a la quimioterapia determina el tipo de terapia local a aplicar como la cirugía, la radiación o ambas. En pacientes que no responden a la quimioterapia de inducción se realiza la mastectomía total además de la extirpación de los nódulos linfáticos axilares y claviculares seguido de radioterapia (Maughan et al., 2010).

Metástasis. La quimioterapia o radioterapia acompañadas con radioterapia o bifosfonatos se utilizan para disminuir el dolor por complicaciones óseas. El tratamiento sistémico depende del estado de receptores hormonales, tasa de progresión de la enfermedad, y la voluntad del paciente a soportar los efectos adversos de la quimioterapia. En mujeres en las que la enfermedad avanza más rápidamente es mejor tratar con quimioterapia. El Trastuzumab junto con la quimioterapia es la mejor opción para tratar la metástasis de tumores HER2 positivos (Maughan et al., 2010).

Aun cuando se cuenta con diferentes alternativas terapéuticas para el cáncer de mama, estudios clínicos demuestran que las terapias actuales no son suficientes para erradicar la enfermedad. En general, las terapias sistémicas inducen respuestas que van del 60% al 80% en cánceres primarios y alrededor del 50% en metástasis (Gonzalez-Angulo, Morales-Vasquez, & Hortobagyi, 2007; Guarneri & Conte, 2004). Sin embargo, a pesar de la alta frecuencia de respuestas primarias, la mediana de la duración de esa respuesta es de 8 a 14 meses (Pusztai & Hortobagyi, 1998). En consecuencia, del 20% al 70% de las pacientes presentan enfermedad recurrente en un periodo de 5 años (Colleoni et al., 2004; Guarneri & Conte, 2004; Pisani, Bray, & Parkin, 2002). Más aún, es común que las pacientes con recurrencia presenten también resistencia incrementada, lo cual aumenta el riesgo de muerte (Gonzalez-Angulo et al., 2007).

En conjunto, estos datos indican que si bien los actuales tratamientos son efectivos al inicio de la terapia, el cáncer de mama progresa en la mayoría de las pacientes. Por esto, se requieren nuevas estrategias para tratar la enfermedad y disminuir el número de defunciones. Esas nuevas estrategias deben considerar la participación de las CTT en la iniciación, mantenimiento, y curso clínico del cáncer de mama.

2.4.3 Células troncales tumorales

Las células troncales están caracterizadas por la capacidad de autorrenovación y la habilidad de diferenciarse en diversos tipos de células especializadas. Estas características se han identificado en células troncales embrionarias, células troncales adultas, células troncales tumorales y células pluripotentes inducidas (Z. Yu, Pestell, Lisanti, & Pestell, 2012).

Los tumores son histológicamente heterogéneos, con subtipos de células cancerígenas exhibiendo distintos perfiles moleculares. Además las células con diferentes características moleculares dentro de un mismo tumor responden diferente a terapias anticancerígenas, llevando a la resistencia de fármacos. Las células cancerígenas además pueden desarrollar cambios adaptativos después de la terapia que exacerba la resistencia a fármacos (Singh & Settleman, 2010).

Evidencia reciente indica la existencia de células parecidas a las troncales dentro de los tumores, llamadas células troncales tumorales, que presentan características de células troncales y de células cancerosas. Además de las capacidades de autorrenovación y diferenciación, las CTT tienen la habilidad de iniciar nuevos tumores cuando se trasplantan a un animal hospedero (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001; Z. Yu et al., 2012). La primera evidencia moderna del papel de las células troncales en cáncer fue en 1994 en un estudio de leucemia mieloide aguda. En el 2003 las CTT humanas fueron identificadas en tumores sólidos incluyendo cáncer de mama y cáncer de cerebro. En subsecuentes reportes se identificaron CTT en una gran variedad de tumores incluyendo colon, páncreas, pulmón, próstata, melanoma y glioblastoma (Z. Yu et al., 2012).

La expresión de marcadores de superficie como CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, el antígeno epitelial específico (ESA por sus siglas en inglés) y la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH 1) se han utilizado para aislar y enriquecer CTT de diferentes tumores. A pesar del uso de estos marcadores para orientar la identificación de CTT aún no se ha llegado a un consenso para identificar con precisión esta población y por lo tanto no se puede definir la proporción exacta de las CTT en un tumor (Z. Yu et al., 2012).

2.4.4 Células troncales tumorales de cáncer de mama

Las células troncales tumorales de cáncer de mama (CTTM) fueron descubiertas en 2003 por Al-Hajj et al (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003). Ellos revelaron una población celular en tumores de cáncer de mama caracterizados por los marcadores de superficie ESA^+ , $CD44^+$, $CD24^{-/low}$ y la ausencia en la expresión de los marcadores de linaje CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 y CD140b (Lin-). Las células con el fenotipo $CD44^+/CD24^{-/low}$ subpoblación Lin- en tumores de cáncer de mama son más tumorigénicas. Tan sólo 200 células de fenotipo $ESA^+/CD44^+/CD24^{-/low}$ o con 1000 células de fenotipo $CD44^+/CD24^{-/low}$ obtenidas del sitio primario tumoral o de efusiones metastásicas pleurales pueden formar tumores en modelos de xenotrasplante en ratones NOD/SCID. En contraste se requirieron 50 000 células sin separar por fenotipo para producir tumores en ratones (Al-Hajj et al., 2003).

El origen de las CTTM no se ha definido aún. Una teoría propone que las CTTM provienen de la desregulación de las vías de autorrenovación y diferenciación de célula troncales normales, resultando en células cancerígenas con capacidades de autorrenovación y diferenciación. Esta teoría se basa en las similitudes entre las células troncales normales y las CTT y en que las células troncales normales son altamente susceptibles a mutaciones y transformación oncogénica. Otra teoría sugiere que las CTTM se originaron por activación de la TEM. Las células que han sufrido TEM son susceptibles a la transformación y tienen muchas características y comportamientos similares a células troncales normales y tumorales. Otra evidencia de esta teoría es que las células $CD44^+/CD24^{-/low}$ de tejidos normales y cancerosos de mama humanos expresan muchos genes asociados con células

que han sufrido la TEM (Figura 3) (Velasco-Velazquez, Homsí, De La Fuente, & Pestell, 2012).

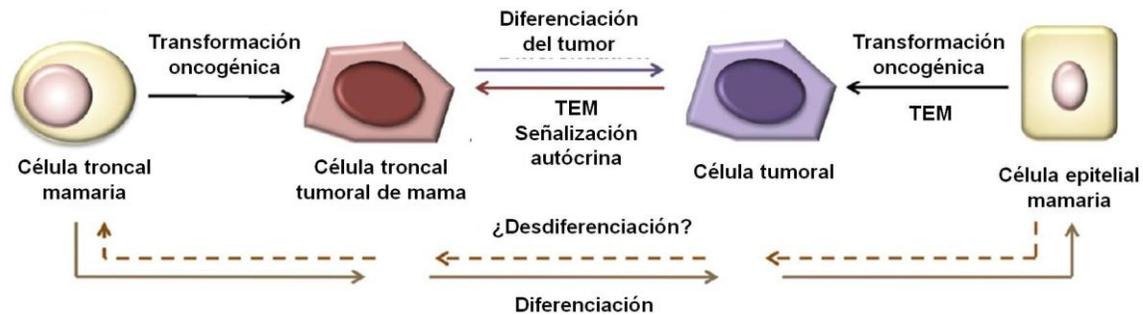


Figura 3. Posibles orígenes de las células troncales tumorales mamarias (imagen modificada de (Velasco-Velazquez et al., 2012)).

Las CTTM han sido aisladas a partir de muestras de pacientes después de su cultivo *in vitro* (Ponti et al., 2005) y de líneas celulares de cáncer de mama (Fillmore & Kuperwasser, 2008). Las CTTM, a diferencia del resto de las células tumorales, tienen la habilidad de formar mamoesferas en cultivo. El cultivo de mamoesferas es un sistema que permite la propagación de células troncales epiteliales mamarias, basado en la habilidad de dichas células de proliferar en condiciones no adherentes (Dontu et al., 2003; Dontu et al., 2004; R. Liu et al., 2007). Las mamoesferas formadas por células troncales tumorales mamarias (CTTM) están enriquecidas en células con fenotipo $CD44^+/CD24^{-/low}$. Sin embargo, solo una fracción de las células $CD44^+/CD24^{-/low}$ es capaz de autorrenovarse en cultivos posteriores (Ponti et al., 2005) y las líneas celulares que tienen aproximadamente un 90% de células $CD44^+/CD24^{-/low}$ no son más tumorigénicas que líneas celulares que solo contienen 5% de células con el mismo fenotipo (Fillmore & Kuperwasser, 2008). Lo anterior indica que el fenotipo $CD44^+/CD24^{-/low}$ no es universal, ni contiene a todas las CTT, por lo que se requieren marcadores adicionales para identificar y aislar CTTM.

La hipótesis que considera que las CTT están en la jerarquía más alta dentro de las células cancerosas considera que sólo las CTT pueden iniciar y sostener el crecimiento tumoral. Por esto, el descubrimiento de las CTT en pacientes de cáncer de mama llevó a plantear que esas células jugarían un papel fundamental

en el curso clínico de la patología. A la fecha, diversos estudios han demostrado que la presencia de CTT se asocia a una baja sobrevivencia. Por ejemplo, la expresión del marcador de CTT ALDH en muestras clínicas de cáncer de mama correlaciona con el grado del tumor, la presencia de metástasis, y una menor sobrevivencia (Charafe-Jauffret et al., 2010; Marcato et al., 2011). De manera similar, el análisis simultáneo de CD44 y CD24 en muestras de cáncer de mama identificó una correlación entre un alto porcentaje de células tumorales con el fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} y la presencia de metástasis distantes (Abraham et al., 2005). Aunado a esto, una firma molecular, obtenida mediante la comparación entre el patrón de expresión de células CD44⁺/CD24^{-/low} y el de células epiteliales mamarias, es capaz de clasificar muestras clínicas de acuerdo al riesgo de presentar metástasis (R. Liu et al., 2007).

Las CTT contribuyen a la recidiva después de recibir terapia pues estas células son más resistentes a la quimioterapia y radioterapia que el resto de las células tumorales. La administración de terapia neoadyuvante/adyuvante a pacientes de cáncer de mama incrementa la fracción de células CD44⁺/CD24^{-/low} y aumenta la formación de mamoesferas *in vitro* (F. Yu et al., 2007). De manera similar, la terapia con paclitaxel y epirubicina enriquece el número de células ALDH⁺ en tumores de mama (Tanei et al., 2009). Congruentemente, evidencia adicional proveniente de modelos murinos indica que la exposición a quimioterapia y radioterapia provoca una presión selectiva y/o evita la diferenciación de CTT. La inyección serial de células humanas de cáncer de mama en ratones tratados con epirubicina produce tumores que están enriquecidos en células CD44⁺/CD24^{-/low} (F. Yu et al., 2007). La radioterapia también incrementa la porción de células CD44⁺/CD24^{-/low} en ratones implantados con células humanas de cáncer de mama (Phillips, McBride, & Pajonk, 2006; Zielske, Spalding, Wicha, & Lawrence, 2011). Las CTT que sobreviven a la terapia pueden heredar su resistencia a sus descendientes, lo cual favorece la aparición de resistencia clínica y permite que los tumores progresen y, eventualmente, se vuelvan más agresivos. Por ejemplo, los tumores mamarios generados espontáneamente en ratones Brca1/p53⁻ son sensibles a cisplatino, pero pocos meses después del tratamiento, los tumores

reinciden en el mismo sitio. La porción de células CD29^{hi}/CD24^{med} (fenotipo de las CTT de mamas en el ratón) fue 4 veces más grande en los tumores reincidentes que en los primarios sin tratar (Shafee et al., 2008). Cuando las células CD29^{hi}/CD24^{med} de tumores reincidentes fueron seleccionadas y transplantadas a nuevos ratones, generaron tumores que fueron parcialmente o totalmente resistentes a cisplatino (Shafee et al., 2008), indicando la aparición de células progenitoras resistentes al fármaco.

2.4.5 El receptor CD44

CD44 es una glicoproteína de superficie que se expresa en varios tejidos celulares, incluyendo los tejidos de cáncer de mama. El gen CD44 mide de 50-60 Kb, se localiza en el cromosoma 11 y contiene 20 exones. El mRNA primario de CD44 puede sufrir varios splicings alternativos por lo que existen varias isoformas de esta proteína. El splicing alternativo entre los exones 5 y 15 pueden generar 10 isoformas de CD44 que se denominan CD44v. Además existe una isoforma estándar de CD44 (CD44s) que se genera por la eliminación de todos los exones (**Figura 4A**) (Isacke & Yarwood, 2002).

La proteína estándar tiene un dominio extracelular de 248 aminoácidos, la región aminoterminal está relativamente conservada entre los mamíferos (~85% de homología). La isoforma estándar como las variables poseen un dominio de unión al hialuronato (HA) que es el ligando principal de CD44. La región proximal a la membrana no está tan conservada (entre 35 y 45% de homología) e incluye varios sitios de glicosilación y de unión a sulfato de condroitina. Todas las isoformas de CD44 tienen 21 aminoácidos en el dominio transmembranal y 72 en el dominio citoplasmático (**Figura 4B**) (Isacke & Yarwood, 2002; Mackay et al., 1994). En un modelo murino se han observado cambios en la expresión de las isoformas CD44v por CD44s, asociado a la TEM en cáncer de mama (Brown et al., 2011). El hialuronato es uno de los principales componentes de la matriz extracelular y la matriz que rodea los tumores está enriquecida en HA (Toole, Wight, & Tammi, 2002). La activación de CD44 por HA no sólo afecta la adhesión celular a los componentes de la matriz extracelular, también estimula varias funciones

específicas de la célula tumoral, llevando a la progresión del cáncer de mama (Chen & Bourguignon, 2014).

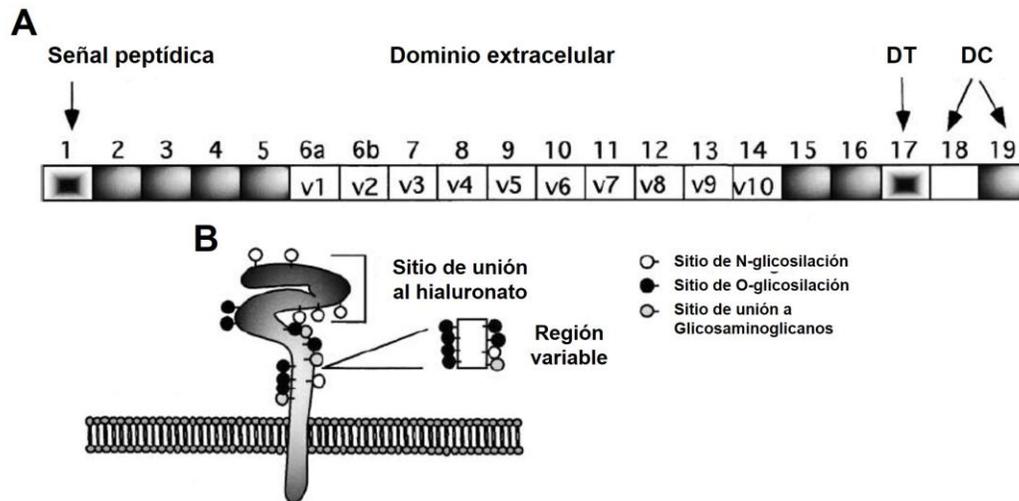


Figura 4. Receptor CD44. A) Estructura del gen de CD44, las isoformas CD44v se forman del exón 6a al exón 14 mientras que la isoforma CD44s se forma con los exones 1-5 y 15-19. DT (Dominio Transmembranal) y DC (Dominio Citoplasmático). B) Estructura del receptor

La unión CD44-HA está involucrado en la estimulación de receptores cinasas como ERBB2, EGFR y TGF- β , y en receptores no cinasa como c-Src y ROK requeridos para la progresión del tumor (Chen & Bourguignon, 2014).

La unión CD44-HA en cáncer de mama desencadena diversas vías de señalización que dan como resultado la invasión y metástasis, resistencia a la apoptosis, quimioresistencia y promoción del fenotipo troncal (Bourguignon, Spevak, Wong, Xia, & Gilad, 2009; Bourguignon, Wong, Earle, Krueger, & Spevak, 2010; Chen & Bourguignon, 2014). Por ejemplo, la unión del HA-CD44 promueve la unión de la proteína tirosinasa Src al dominio citoplasmático de CD44 lo que promueve la fosforilación de la proteína del citoesqueleto cortactina que da como resultado la migración. La unión de CD44-Src también fosforila el factor de transcripción Twist, el cual se trasloca al núcleo donde activa la transcripción de miR-10b.

miR-10b disminuye la proteína supresora de tumor HOXD10 lo que lleva a la sobre expresión de RhoA/RhoC, proteínas involucradas en el desplazamiento de la

membrana y remodelación del citoesqueleto, y ROK una serin-treonina cinasa que fosforila a reguladores del citoesqueleto como calpuna y aducina. Todo lo anterior da como resultado la promoción de la invasión tumoral de cáncer de mama (Bourguignon et al., 2010). Además la sobreexpresión de Twist en células de cáncer de mama CD44⁺ promueve el fenotipo troncal (Vesuna, Lisok, Kimble, & Raman, 2009).

Otra vía de señalización relacionada con la unión de CD44 al hialuronato, es la activación de PKC ϵ que fosforila a Nanog (un factor de transcripción que está relacionado con la autorrenovación y la troncalidad) que a su vez promueve la producción de miR21.

miR21 reduce la proteína supresora de tumor PDCD4, lo que provoca la sobreexpresión de IAP/MDR1, esto tiene como consecuencia la resistencia a la apoptosis y la promoción de la quimioresistencia. Además la unión de CD44-HA activa la vía de señalización de c-Jun la cual estimula de igual manera que Nanog, la expresión y función de miR-21, lo que lleva a la producción de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Bourguignon et al., 2009) (Chen & Bourguignon, 2014).

III. Antecedentes

En el laboratorio de Farmacología Molecular, Facultad de Medicina UNAM se realizó la búsqueda de antagonistas para el receptor de superficie CD44 mediante cribado virtual. El cribado virtual es una herramienta computacional que predice la unión de una molécula proveniente de bases de datos y una proteína con estructura tridimensional definida (Alvarez & Shoichet, 2005). El cribado virtual se realizó mediante acoplamiento molecular, el cual predice la forma de unión y afinidad de unión de un complejo formado por dos o más moléculas de estructura conocida (Huang & Zou, 2010). Para esto se utilizó el dominio N-terminal de unión a HA de CD44, como receptor y 13, 066 estructuras de 11,421 moléculas de la base de datos ZINC (Irwin & Shoichet, 2005), como ligandos (Aguirre-Alvarado et al., 2016). El puntaje del docking se obtuvo con AutoDock Vina y DSX_089 que se normalizo y se usó para generar un Zscore consenso para cada ligando.

Basándose en la distribución de estos valores se hicieron identificaciones imparciales de 12 compuestos con el mejor desempeño en el protocolo de acoplamiento consenso (Aguirre-Alvarado et al., 2016). Aguirre et al probaron simulación de dinámicas moleculares y análisis de energía libre de unión con 5 compuestos candidatos: irinotecan, bromocriptina, nilotinib, etoposido y bafetinib. De este análisis se obtuvo que la unión del etopósido con CD44 tuvo el valor más bajo de energía libre, lo que indica que el etopósido es el mejor candidato para la validación biológica (Aguirre-Alvarado et al., 2016).

Con los resultados antes descritos se procedió a analizar la actividad *in vitro* del etopósido como antagonista de CD44 utilizando la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama mediante la competencia para la adhesión a CD44 del HA marcado con isotiocianato fluorescente contra el etopósido por citometría de flujo y ensayos de adhesión al HA en placa, de los ensayos realizados se encontró que la reducción en la adhesión es similar a la que presentó el anticuerpo bloqueante, estos resultados soportan la hipótesis de que el etopósido es un antagonista de CD44 (Aguirre-Alvarado et al., 2016).

IV. Justificación

El cáncer de mama es la principal causa de muerte en mujeres de todo el mundo, en 2012 se registraron 522 000 fallecimientos por esta causa (UK, 2014). En México es la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años (Knaul et al., 2009). Debido a que en la actualidad no existen tratamientos efectivos para esta enfermedad es necesario seguir estudiando los procesos biológicos de las células de cáncer de mama para encontrar nuevos blancos y de esta manera desarrollar terapias eficaces para combatir esta enfermedad. Con el descubrimiento de las CTT en pacientes con cáncer de mama, se ha abierto una brecha de investigación para la creación de tratamientos dirigidos hacia esta población celular, ya que hay reportes que apuntan a que están involucradas en la promoción del cáncer de mama hacia grados avanzados, resistencia a la quimio y radioterapia, e inducción de metástasis. En este trabajo se estudiará el efecto del etopósido en el fenotipo troncal de la línea celular de cáncer de mama basal MDA-MB-231, pues

experimentos *in silico* sugieren que el etopósido podría ser un antagonista del receptor CD44, el cual regula el fenotipo troncal. La identificación de compuestos que abatan a la población troncal tumoral podría disminuir la metástasis, resistencia a fármacos y recidiva en pacientes con este padecimiento.

V. Hipótesis

Dado que el receptor CD44 regula características funcionales asociadas a la troncalidad en células cancerosas de mama, se espera que el fármaco etopósido, al ser antagonista del receptor, disminuya el fenotipo troncal en células MDA-MB-231.

VI. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto que tiene el etopósido sobre el fenotipo troncal tumoral de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de la medición de marcadores de troncalidad y la realización de ensayos funcionales de troncalidad.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto del etopósido sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231.
2. Evaluar el efecto del etopósido en la expresión de los marcadores de troncalidad mamarios CD44⁺/CD24⁻ y ALDH.
3. Evaluar el efecto del etopósido sobre la formación de mamoesferas de células MDA-MB-231.
4. Determinar el efecto del etopósido en la sensibilización de células MDA-MB-231 a cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP).

VII. Metodología

7.1. Compuestos.

- Etopósido: Se preparó un stock 50 mM de etopósido (Sigma-Aldrich) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenado a -70 °C hasta el momento de su uso.
- CDDP: Se utilizó una forma farmacéutica de cisplatino inyectable vehículo cbp 1 mg/ml (Blastolem RU) almacenado a temperatura ambiente aislado de la luz.

7.2 Material biológico.

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama basal MDA-MB-231 cuya morfología es mesenquimatosa, proveniente del American Type Culture Collection (ATCC) debido a su alta expresión del receptor CD44 (Fillmore & Kuperwasser, 2008; Kao et al., 2009). Estas células se cultivaron en botellas para cultivo celular de 25 cm² de área (Corning), en un volumen total de 5 ml hasta obtener una monocapa 90 % confluyente. El medio de cultivo utilizado fue medio Leibovitz's L-15 (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Gibco), estreptomycin (50 µg/ml), penicilina (50 µg/ml) y neomicina (100 µg/ml) (Gibco). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C en una atmósfera sin CO₂. Las células se despegaron de las botellas de cultivo decantando el medio, lavando con PBS pH 7.2 y exponiéndolas a 0.05 % de tripsina-EDTA (Gibco) durante 5 min. Las células se contaron en hematocitómetro, y se evaluó la viabilidad por la exclusión de azul tripan al 0.4 % (Sigma-Aldrich), siendo esta ≥ 95%.

7.3 Evaluación de la viabilidad mediante reducción de MTS.

Las células MDA-MB-231 se sembraron en placas estériles de 96 pozos (Corning) a una densidad de 5X10³ células/pozo, por sextuplicado. Las concentraciones estudiadas; en progresión geométrica base 2 estuvieron entre 1.6 y 200 µM de etopósido disueltas en L-15 suplementado con 1% SFB.

El tiempo de exposición fue de 24 h. Como control, las células fueron expuestas únicamente al disolvente del fármaco (0.4 % de DMSO). Después de la exposición

al etopósido se evaluó el efecto de este sobre la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] (Promega). La reducción del MTS da lugar a la formación de un producto de formazan, este proceso se lleva a cabo por las deshidrogenasas presentes en las mitocondrias de células metabólicamente activas. Cuatro horas previas a la finalización del tiempo de incubación de los fármacos se adicionó 1 parte de la mezcla 20:1 de MTS/PMS por cada 5 de medio y se incubó a 37 °C por 4 h en obscuridad (Cory, Owen, Barltrop, & Cory, 1991). La cantidad reducida de MTS la cual se cuantificó por espectrofotometría a 490nm es proporcional al número de células viables.

7.4 Cuantificación del efecto del etopósido en el fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-} por citometría de flujo.

Se sembraron las células en placas estériles de 6 pozos (Nunclon Delta) a una densidad de 2.5×10^5 células/pozo, por triplicado.

Se trataron las células con 1, 10, 100 μ M de etopósido disuelto en L-15 suplementado con 1% SFB por 24 h. Como control, las células fueron expuestas únicamente al disolvente del fármaco (0.2 % de DMSO). Se colectaron las células tratadas con TrypLE Select Enzyme (Gibco) y se tiñeron simultáneamente con anti-CD44-APC (clona G44-26, BD Pharmigen) y anti-CD24-PE (clona ML5, BD Pharmigen) en PBS con 10% de SFB. Para establecer la señal negativa de fluorescencia se utilizaron controles de isotipo (Sheridan et al., 2006). Las muestras se analizaron en FACS Aria III (BD Biosciences) o Attune NxT (Life Technologies) y los datos se analizaron con FlowJo, versión 8.7 (Tree Star Inc.).

7.5 Determinación del efecto del etopósido sobre la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) por citometría de flujo.

Se sembraron las células en placas estériles de 6 pozos (Nunclon Delta) a una densidad de 3.5×10^5 células/pozo, por triplicado.

Se trataron las células con 1, 10, 100 μ M de etopósido o su solvente al 0.2% en L-15 suplementado con 1% SFB por 24 h. Se colectaron las células tratadas con 0.05 % de tripsina-EDTA (Gibco), las células se contaron en hematocitómetro, se

evaluó la viabilidad por la exclusión de azul tripan al 0.4 % (Sigma-Aldrich), siendo esta ≥ 95 % y se hizo una suspensión celular de 2.5×10^5 células/ml con el buffer de ensayo ALDEFUOR (Stem cell Technologies) por cada condición experimental. Para la tinción de la enzima ALDH se utilizó el kit ALDEFUOR (Stem cell Technologies). Cada muestra se separó a la mitad para obtener de cada condición un tubo “control DEAB” y un tubo “problema” ALDEFUOR. Al tubo “control DEAB” se le adicionó el reactivo ALDEFUOR y el inhibidor dietilaminobenzaldehído (DEAB) que es un inhibidor específico de ALDH; mientras que al tubo “problema” solo se le adicionó el reactivo ALDEFUOR. La tinción se incubó 45 min a 37 °C aislado de la luz como se indica en el inserto del kit. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo Attune NxT (Life Technologies), y los datos se analizaron con FlowJo, versión 8.7 (Tree Star Inc.).

7.6 Determinación del efecto del etopósido en la formación de mamoesferas.

Se sembraron las células en placas estériles de 6 pozos (Nunc Delta) a una densidad de 2.5×10^5 células/pozo.

Se trataron las células con 10 μ M de etopósido y su disolvente al 0.02 % en L-15 suplementado con 1% SFB por 24 h. Se colectaron las células tratadas con 0.05 % de tripsina-EDTA (Gibco), las células se contaron en hematocitómetro, se evaluó la viabilidad por la exclusión de azul tripan al 0.4 % (Sigma-Aldrich), siendo esta ≥ 95 %, para cada condición experimental se hizo una suspensión celular de 1×10^3 células/ml por cada condición experimental y se pasó tres veces por una aguja de 25 G para asegurar que la suspensión fuera unicelular. En el ensayo de formación de mamoesferas se sembraron 100 células por pozo en placas de cultivo “Ultra Low Attachment” (Corning Costar) de 96 pozos en medio “mamocult” (Stem cell Technologies) suplementado con estreptomina (100 μ g/ml) y penicilina sódica cristalina (100 U.I. /ml) (Gibco), heparina 4 μ g/ml (Stem cell Technologies) e hidrocortisona 0.48 μ g/ml (Stem cell Technologies). El medio se repuso cada 3 días (Dontu et al., 2003). A los 10 días las mamoesferas mayores a 80 μ m se contaron y documentaron utilizando un microscopio invertido (Nikon). Las

mamoesferas mayores a 80 μm se contaron y documentaron con el programa Image J (Ferreira & Rasband, 2012).

7.7 Cuantificación de muerte celular por citometría de flujo.

Se sembraron las células en placas estériles de 6 pozos (Nunclon Delta) a una densidad de 2.5×10^5 células/pozo, por triplicado.

Se trataron las células con 10 μM de etopósido disuelto en L-15 suplementado con 1% SFB por 24 h. Como control, las células fueron expuestas únicamente al disolvente del fármaco (0.02 % de DMSO). Después los tratamientos se colectaron las células y se tiñeron simultáneamente con Annexina V-FITC (Life Technologies) y 7-aminoactinomicina (7-AAD; BD Pharmingen) (Zimmermann & Meyer, 2011). Como controles positivos para necrosis y apoptosis, se incluyeron células tratadas con choque térmico (60 °C, 60 min) y camptotecina (100 ng/mL, 24 h), respectivamente. Un mínimo de 10,000 células se adquirieron en el citómetro Attune NxT (Life Technologies), y los datos se analizaron con el programa FlowJo, versión 8.7 (Tree Star Inc.).

7.8 Sensibilización a agentes citotóxicos.

Se sembraron las células en placas estériles de 96 pozos (Corning) a una densidad de 5×10^3 células/pozo, por sextuplicado. Las células se expusieron 24 h a 10 μM de etopósido y un rango de concentraciones entre 50 y 400 μM de CDDP que variaron en progresión geométrica base 2; todo disuelto en L-15 suplementado con 1% SFB. Como control del ensayo se realizó una curva de viabilidad únicamente con DMSO 0.02 % y las diluciones de cisplatino. Como control de la curva de cisplatino y 0.02 % de DMSO se utilizó medio L-15 1 %SFB, y como control de la curva de cisplatino y etopósido, DMSO 0.02 %. Después de la exposición al etopósido se evaluó el efecto de este sobre la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] (Promega). Cuatro horas previas a la finalización del tiempo de incubación con CDDP se adicionó 1 parte de la mezcla 20:1 de MTS/PMS por cada 5 de medio y se incubó a 37°C por 4 hrs en

obscuridad (Cory et al., 1991). La cantidad reducida de MTS se cuantificó por espectrofotometría a 490 nm.

7.9 Análisis estadístico

Los datos de viabilidad, citometría de flujo y mamoesferas se analizaron con el software GraphPad Prism 6.01. Se aplicó la prueba ANOVA de una sola vía al ensayo de viabilidad, a la cuantificación del fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-} y a la cuantificación de ALDH. A la cuantificación del fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-} se realizó la prueba de comparación múltiple Bonferroni ya que el ANOVA arrojó diferencias mayores al 0.05 de significancia. Los datos de muerte celular por citometría de flujo y las CI 50 de la sensibilización a agentes citotóxicos se les aplicó la prueba t de Student. A los datos de la cuantificación de las mamoesferas primero se les realizó la prueba de normalidad D' Agostino & Pearson. Debido a que los datos no tuvieron una distribución normal se les aplicó una t de Student no paramétrica. En todos los casos el nivel de significancia fue de 0.05.

VIII. Resultados

8.1 Evaluación de la viabilidad mediante reducción de MTS.

Se determinó la viabilidad de las células MDA-MB-231 tras su exposición por 24 h a concentraciones de etopósido entre 1.6 y 200 μ M. Se encontró que el tratamiento de las células con el etopósido no tiene efectos estadísticamente significativos en la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones de estudio (**Figura 5**).

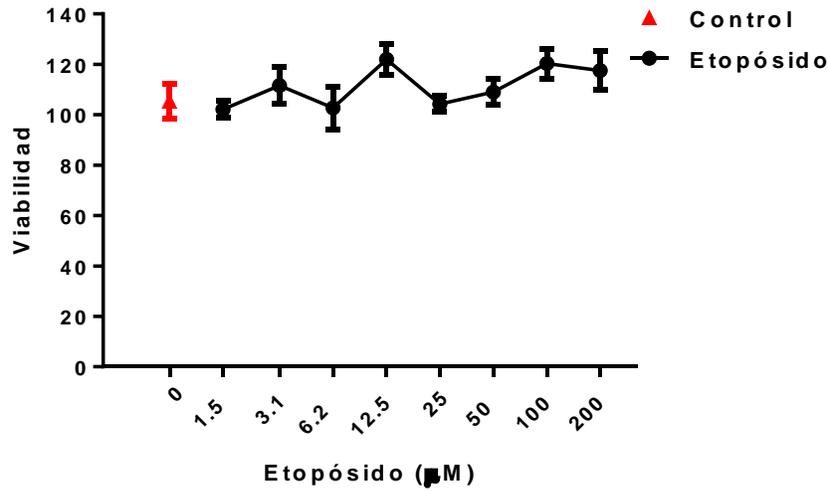


Figura 5. Viabilidad de la línea celular MDA-MB-231 tras el tratamiento con etopósido. No se presentaron cambios estadísticamente significativos en la viabilidad celular con respecto al control. Se realizó un ANOVA de una vía con 0.05 de significancia. Experimento representativo de una n=3. Las barras representan la media de sextuplicados ± el error estándar.

8.2 Cuantificación del efecto del etopósido en el fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-} por citometría de flujo.

Se determinó el efecto del etopósido a 1, 10 y 100 µM sobre el fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-} en la línea celular MDA-MB-231, ya que este es el fenotipo asociado a troncalidad en células tumorales de cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003). En el análisis por citometría de flujo se observó que desde la concentración de 1 µM de etopósido empieza a haber un aumento en la expresión de CD24 que se acentúa a partir de 10 µM y se mantiene hasta 100 µM (**Figura 6A**). Al realizar el análisis estadístico de estas mediciones se encontró que hay una disminución estadísticamente significativa de la población CD44⁺/CD24⁻ a partir de 10 µM como está representado en la **Figura 6B**.

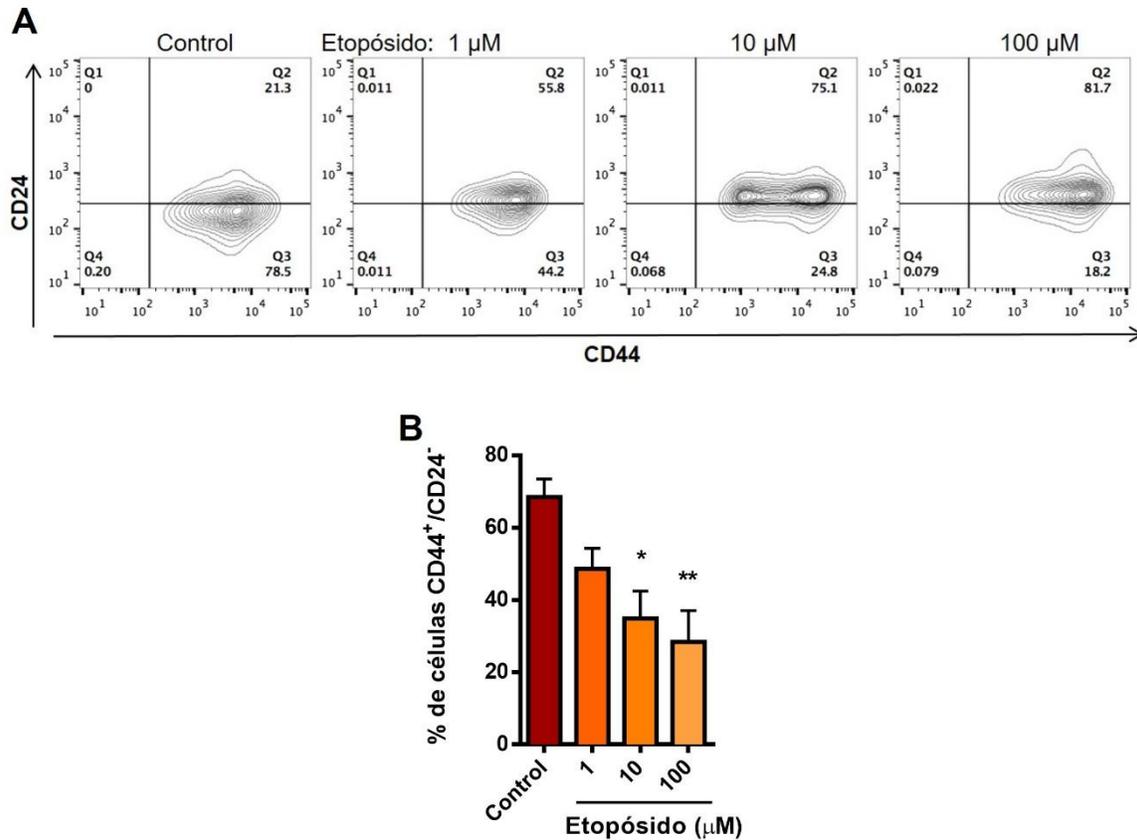


Figura 6. Cuantificación del efecto del etopósido sobre el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ por citometría de flujo. A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD44 y CD24 en la línea celular MDA-MB-231 tratada con etopósido por 24 h. Experimento representativo de tres experimentos independientes. B) Cuantificación del porcentaje de células CD44⁺/CD24⁻. Se realizó un ANOVA de una vía con prueba de Bonferroni con 0.05 de significancia. *P<0.05, **P<0.01. Las barras representan la media ± el error estándar de la misma n=3.

8.3 Determinación del efecto del etopósido sobre la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) por citometría de flujo.

Para saber si el etopósido es capaz de alterar otros marcadores de troncalidad a las mismas concentraciones utilizadas anteriormente, se estudió el efecto de este compuesto en la actividad de la enzima ALDH (marcador de troncalidad en cáncer de mama (Velasco-Velazquez et al., 2012)) en células MDA-MB-231. Para tener un control negativo de la función de ALDH se utilizó el reactivo DEAB del kit ALDEFUOR de Stem Cell Technologies, que inhibe la función de la enzima, a partir de las lecturas de este tratamiento se determinó la región negativa para ALDH (**Figura 7A**). Finalmente se encontró que a pesar de que hay una disminución del porcentaje de células ALDH positivas conforme aumenta la

concentración de etopósido, esta no es estadísticamente significativa comparada con el control (**Figura 7B**).

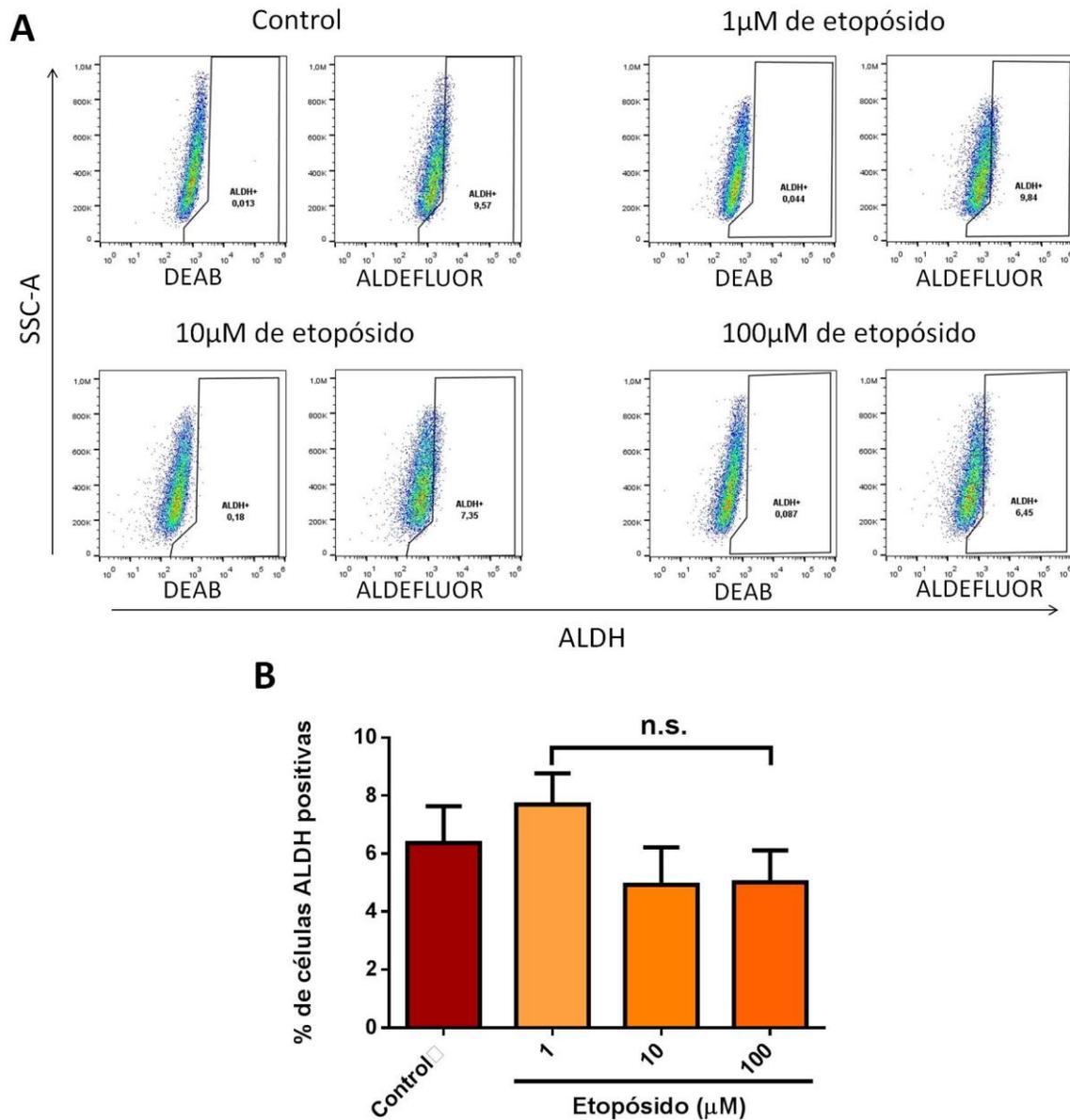


Figura 7. Efecto del etopósido en la actividad de la enzima ALDH. A) Análisis del efecto del etopósido en la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) por citometría de flujo. Experimento representativo de cuatro experimentos independientes. B) Comparación estadística de los tratamientos con etopósido con respecto a su control (DMSO 0.2%). Se realizó un ANOVA de una sola vía con un 0.05 de significancia. Las barras representan la media \pm el error estándar $n=4$.

8.4 Determinación del efecto del etopósido en la formación de mamoesferas. Debido a que el análisis del fenotipo troncal realizado en primer lugar solo se basó en la expresión de marcadores, fue necesario realizar una prueba funcional para

verificar que realmente se afecta la troncalidad de la línea celular MDA-MB-231. La prueba de troncalidad que se realizó fue el efecto que tiene el etopósido sobre la formación de mamoesferas, las cuales son colonias provenientes de células capaces de proliferar en condiciones no adherentes (Dontu et al., 2003). La forma de las mamoesferas de esta línea celular es de racimo de uvas a diferencia de otras líneas celulares como la línea celular MCF7 en que sus mamoesferas son esféricas. Debido a que la proporción de la población CD44⁺/CD24^{low/-} disminuye significativamente a partir de 10 μ M se decidió utilizar esta concentración para probar su efecto en la formación de mamoesferas. En las micrografías se observó una disminución de la frecuencia y tamaño de las mamoesferas en el pretratamiento por 24 h de etopósido comparado con el control (**Figura 8A**). Lo anterior se confirmó con la cuantificación de la frecuencia de mamoesferas formadas por cada 100 células (**Figura 8B**) y del tamaño de estas (**Figura 8C**) en las que se observó una disminución estadísticamente significativa del tratamiento con respecto del control en ambas cuantificaciones.

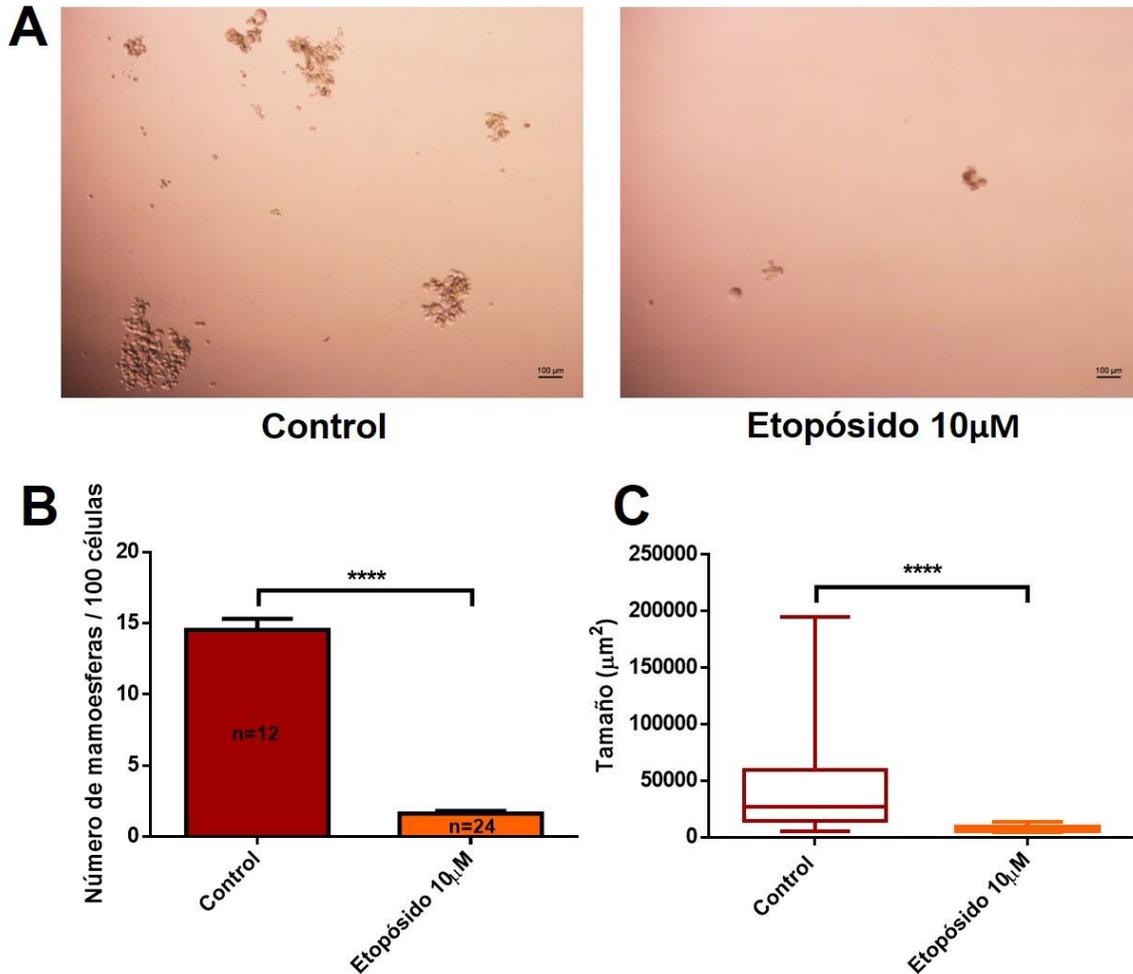


Figura 8. Efecto del pretratamiento con etoposido en la formación de mamoesferas. A) Micrografías de la formación de mamoesferas previo tratamiento por 24 h con el control (DMSO 0.2%) o etoposido 10 µM. La barra en las micrografías representa 100 µm. Se realizaron 12 replicados para el control y 24 para el tratamiento. B) Cuantificación del número de mamoesferas para el control y el tratamiento con etoposido 10 µM por cada 100 células. Las barras representan ± el error estándar de la misma. C) Cuantificación del tamaño de las mamoesferas del control y el tratamiento con etoposido 10 µM. A ambas cuantificaciones se le realizó la prueba t de Student con un 0.05 de significancia. ****P<0.0001.

8.5 Cuantificación de muerte celular por citometría de flujo.

Para saber si el etoposido causa muerte por necrosis y/o apoptosis con 10 µM de etoposido, concentración mínima en que hay una disminución estadísticamente significativa de la población con fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-}. Se realizó una tinción con Annexina V-FITC (Life Technologies) y 7-aminoactinomicina (7-AAD; BD Pharmigen). Las regiones del análisis de las células necróticas y apoptóticas se seleccionaron a partir de la lectura de células sin teñir (autofluorescencia, que es la fluorescencia natural de las células). Como controles positivos en las tinciones

para necrosis y apoptosis se realizaron tinciones a células tratadas con choque térmico de 60 °C y camptotencina (**Figura 9A**). La cuantificación arrojó que no hay cambios estadísticamente significativos en la muerte celular por necrosis con respecto al control de DMSO. Por otro lado, se observó un cambio estadísticamente significativo en la muerte celular por apoptosis de las células tratadas con etopósido con respecto al control, sin embargo la suma del porcentaje de células que murieron por necrosis y apoptosis tanto en el control con DMSO como en el tratamiento con etopósido no supera el 10% del total de células analizadas (**Figura 9B**).

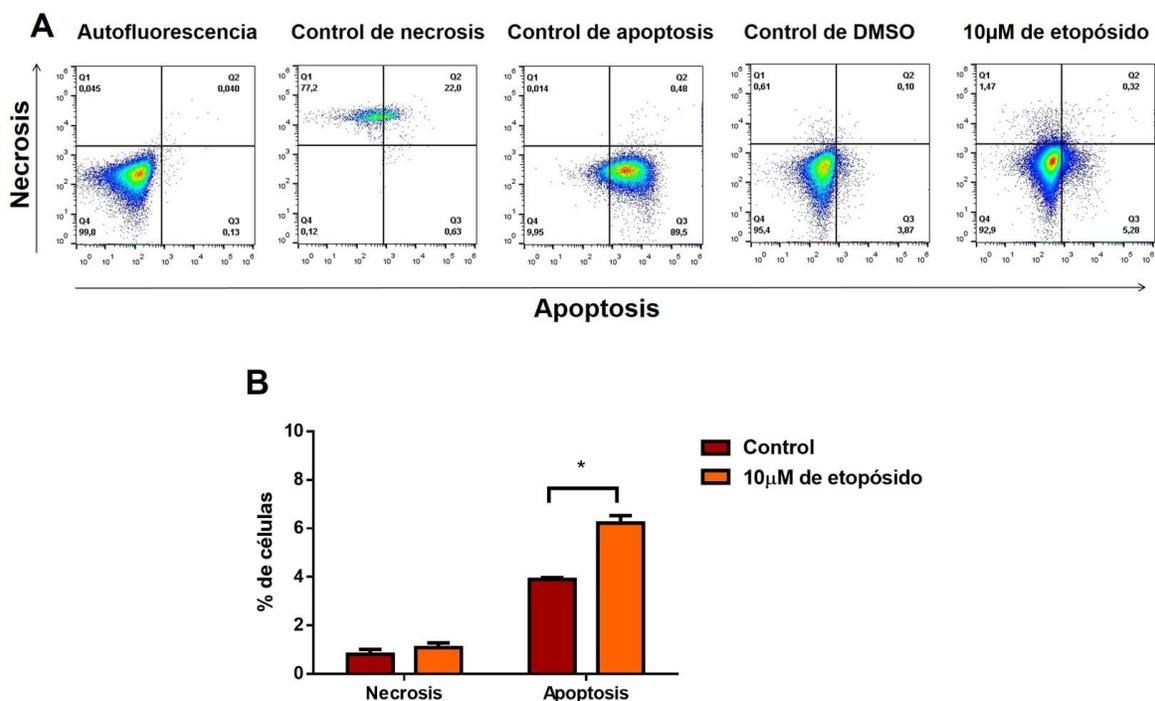


Figura 9. Cuantificación de la muerte celular de las células MDA-MB-231 tras el tratamiento con etopósido por citometría de flujo. A) Análisis de las células necróticas y apoptóticas por citometría de flujo. Experimento representativo de una n=3. B) Comparación estadística del porcentaje de células en apoptosis o necrosis entre el control con DMSO 0.02% y el tratamiento con etopósido 10 µM. Se realizó una prueba de t de Student con un 0.05 de significancia. *P<0.05. Las barras representan la media ± el error estándar de la misma n=3.

8.6 Sensibilización a agentes citotóxicos.

Finalmente otra característica que poseen las células troncales tumorales de cáncer de mama es la resistencia a la quimio y radioterapia (Phillips et al., 2006; F. Yu et al., 2007; Zielske et al., 2011). Para saber si el etopósido sensibiliza las

células MDA-MB-231 ante agentes citotóxicos, se realizó una curva de viabilidad con etopósido 10 μM y otra con el control (DMSO 0.02%), ambas junto con el agente citotóxico CDDP en un rango de concentraciones entre 50 y 400 μM (**Figura 10A**). El promedio de las concentraciones inhibitorias 50 (CI 50) de las curvas de viabilidad tratadas con etopósido 10 μM y de las curvas de viabilidad control tratadas con DMSO 0.02% se compararon estadísticamente y no se encontró una disminución en la viabilidad estadísticamente significativa del tratamiento con respecto del control (**Figura 10B**).

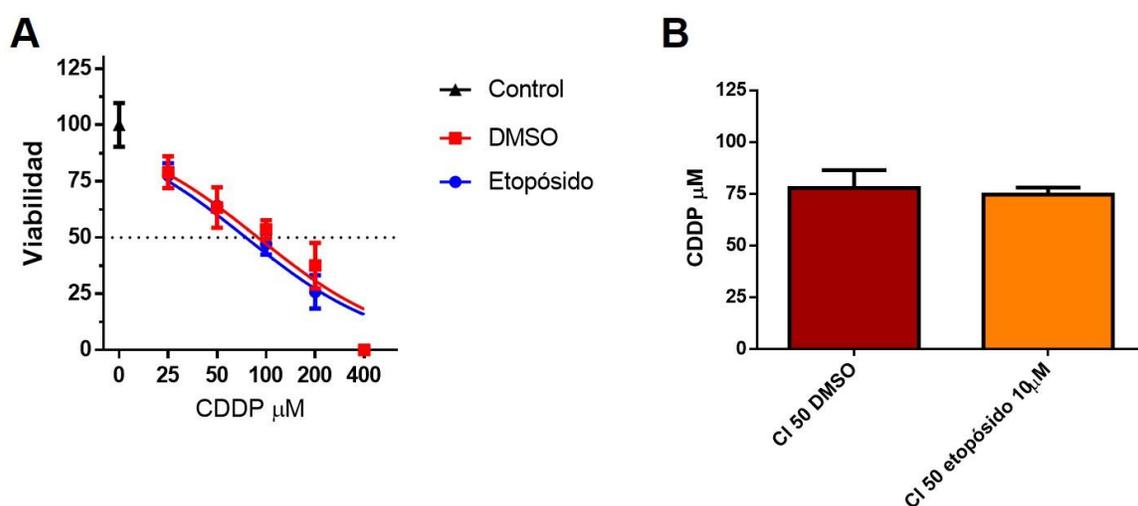


Figura 10. Sensibilización de las células MDA-MB-231 con etopósido 10 μM hacia agentes citotóxicos. A) Curva de viabilidad de células tratadas con etopósido 10 μM y CDDP (azul) y curva de viabilidad de células tratadas con DMSO 0.02% y CDDP (rojo). B) Comparación estadística de los promedios de las IC 50 de ambos tratamientos. Se realizó la prueba t de Student con un 0.05 de significancia. Las barras representan la media \pm el error estándar $n=5$.

IX. Discusión

En este trabajo se evaluó en primer lugar el efecto del etopósido sobre la viabilidad de la línea celular MDA-MB-231. El resultado del ensayo demostró que no hay cambios en la viabilidad celular ni a la concentración más alta utilizada (200 μM) como ya se ha reportado anteriormente (Polotskaia et al., 2012; Zhou et al., 2014). El mecanismo de acción del etopósido es la inhibición de la topoisomerasa II (topo II) (Fared, Mehwish, & Salmar, 2015).

La resistencia de las células MDA-MB-231 a este compuesto se debe a que la línea celular utilizada tiene la sustitución de una guanina por una adenina en el gen TP53 (O'Connor et al., 1997) lo que evita que p53 active la apoptosis (Walerych, Napoli, Collavin, & Del Sal, 2012).

Para comprender la relación que existe entre la topo II y la mutación de TP53 en la resistencia al etopósido, es necesario comprender el mecanismo de acción de esta enzima. La enzima topo II se encarga de cortar el DNA para su enrollamiento o desenrollamiento. El corte del DNA por topo II se realiza mediante la formación temporal del complejo de corte integrado por topo II, el DNA blanco y una cadena de DNA a la que no se realizará ningún corte. La topo II realiza el corte del DNA blanco e intercala la cadena de DNA que no sufrirá cortes, para evitar la religación del DNA blanco, y finalmente la topo II desplaza la doble cadena de DNA que no se cortó y religa el DNA blanco (Valkov & Sullivan, 2003).

La inhibición de topo II por parte del etopósido consiste en estabilizar el complejo de corte, con lo que se evita la religación del DNA. Como consecuencia de los cortes hechos al DNA por topo II, la proteína ataxia-telangectasia mutada (ATM) (principal activador de la respuesta al daño del DNA) se activa por la presencia del complejo MRN. El complejo MRN identifica las rupturas en el DNA y está compuesto por la proteína de recombinación meiotica 11 (MRE-11 por sus siglas en ingles), Rad 50 y la proteína del síndrome Nijmegen de las rupturas (NBS1 por sus siglas en ingles) (Yuan & Chen, 2010). Como consecuencia de la activación de la ATM se fosforila Chk2 (enzima central de la activación del arresto celular y de la apoptosis) que a su vez fosforila a p53, o directamente la ATM fosforila a p53, el cual promueve la transcripción de Bax, Noxa, Puma etc., los cuales desencadenan la apoptosis (Fared et al., 2015; Valkov & Sullivan, 2003).

Debido a que TP53 está mutado en la línea celular MDA-MB-231, como ya se menciono anteriormente, el etopósido no puede promover la apoptosis, lo que lleva a la resistencia del efecto de este compuesto.

La ausencia de efecto citotóxico correlaciona con la cuantificación de muerte celular por apoptosis mediante la tinción de la fosfatidilserina con Annexina V y la cuantificación de necrosis por la intercalación del 7-AAD en el DNA en la línea celular MDA-MB-231 posterior al tratamiento con 10 μ M de etopósido.

En ese ensayo se demostró que el etopósido causa muerte celular por apoptosis sólo en un 2% de las células tratadas y no causa muerte por necrosis, por lo tanto los efectos que se observan en otros ensayos de este trabajo no se asocian a un efecto citotóxico por parte del etopósido.

El siguiente paso para dilucidar el efecto del etopósido en el fenotipo troncal fue el estudio de la expresión de los marcadores de troncalidad CD44⁺/CD24^{low/-} (Al-Hajj et al., 2003). En las células MDA-MB-231 tratadas con etopósido, la proporción CD44⁺/CD24^{low/-} disminuyó significativamente principalmente por el aumento en la expresión del marcador CD24. En reportes previos la disminución del fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-} se ha asociado al aumento de marcadores epiteliales como E-cadherina, a la disminución de marcadores mesenquimatosos como vimentina y alfa actina de musculo liso (α -SMA por sus siglas en inglés) (Aguirre-Alvarado et al., 2016; Christiansen & Rajasekaran, 2006; Singh & Settleman, 2010).

En el reporte de Aguirre *et al.* se observó que tras el tratamiento con etopósido se ven afectados genes relacionados con la TEM, además de la disminución en la capacidad migratoria por la reversión del fenotipo mesenquimatoso a epitelial de las células MDA-MB-231 (Aguirre-Alvarado et al., 2016). Adicionalmente la proteína CD24 se encuentra expresada en células epiteliales luminales de mama (Jones et al., 2004; Shipitsin et al., 2007).

En reportes anteriores se ha demostrado que la inducción de la TEM en células de mama transformadas les proporciona características troncales (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008), esto hace suponer que la reversión parcial de la TEM que presentaron las células MDA-MB-231 tratadas con etopósido se asocia a la disminución de sus características de troncalidad.

Un estudio realizado por Ginestier *et al.* demostró que la población que expresa el fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-}, así como una alta actividad de la enzima ALDH, es la responsable de la formación de tumores cuando se realiza un inóculo en la glándula mamaria de ratones NOD/SCID (ratones inmunodeficientes en linfocitos T y B, y células NK) (Ginestier *et al.*, 2007). Debido a esto también se realizó la cuantificación del ALDH tras la exposición de las células MDA-MB-231 al etopósido. Se encontró una ligera disminución del porcentaje de células positivas para ALDH, sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa.

Ginestier *et al.* encontraron que el porcentaje de células que poseen el fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-}/ALDH⁺ en muestras de cáncer de mama es del 1.6% (Ginestier *et al.*, 2007). Para confirmar o rechazar que el etopósido afecta la expresión de estos marcadores que denotan troncalidad, es necesario realizar una triple tinción para los marcadores CD44, CD24 y ALDH posterior a su tratamiento con etopósido. En caso de que la población sea menor al 10% es recomendable realizar una selección y separación de células marcadas, para tener un número grande de células y de esta manera poder apreciar el efecto del etopósido en esa población.

A pesar de que estos marcadores pueden predecir si una población tiene características troncales, la identificación de una población troncal se realiza mediante ensayos de funcionalidad, como son la formación de mamoesferas en condiciones no adherentes, ensayos de exclusión de colorantes (Dontu *et al.*, 2003) y, el estándar de oro, la formación de tumores en ratones inmunocomprometidos (Clarke *et al.*, 2006). En este trabajo se realizó el ensayo de formación de mamoesferas después del tratamiento de las células con etopósido durante 24 h. En este ensayo se trataron las células únicamente con 10µM de etopósido debido a que es la concentración mínima que se requirió para disminuir significativamente la población CD44⁺/CD24^{low/-}. Observamos una disminución significativa tanto del tamaño como de la frecuencia de formación de mamoesferas.

La disminución en la frecuencia de la formación de mamoesferas de las células tratadas con etopósido con respecto de las tratadas con el control indica que hay menos células troncales presentes en la línea celular de estudio pues las células han perdido la capacidad de formar colonias (Dontu et al., 2003). Nuestros datos sugieren que la disminución del número de CTT se debe a la reversión de la TEM y no a la muerte de las células troncales. Por otro lado la disminución en el tamaño de las mamoesferas podría deberse a que el etopósido disminuye la tasa de replicación de las células MDA-MB-231 mediante un mecanismo que es desconocido, aunque no podemos descartar que esto se deba a las rupturas del DNA creadas por la topo II y el etopósido.

Finalmente se decidió comprobar si el etopósido era capaz de sensibilizar a las células MDA-MB-231 hacia compuestos citotóxicos como el CDDP. Sin embargo no hubo una disminución significativa de la CI 50 de la curva de viabilidad que tiene el etopósido y el CDDP con respecto de la curva control. El resultado obtenido difiere del reportado por Aguirre *et al.* en el que sí se presenta una disminución significativa de la CI 50 del CDDP después del tratamiento con etopósido, lo que podría atribuirse a dispersiones altas de los datos, debidas posiblemente a la metodología utilizada, por lo que se sugiere realizar nuevos experimentos para disminuir estas dispersiones (Aguirre-Alvarado et al., 2016).

El mecanismo de acción del CDDP se basa en la formación de aductos intracatenarios en el DNA (unión entre bases de una cadena de DNA), mediante la interacción del CDDP con los sitios nucleofílicos N-7 de las bases púricas del DNA. Estas lesiones en el DNA son reconocidas por aproximadamente 20 proteínas, las cuales desencadenan la muerte celular por apoptosis (Siddik, 2003).

Debido a que la muerte celular por CDDP esta mediada por apoptosis y tomando en cuenta que la activación de CD44 lleva a la expresión de Bcl2 (proteína antiapoptoica) en la línea celular de cáncer de mama MCF7 (Bourguignon et al., 2009), se tenía como hipótesis que al bloquear el receptor CD44 en la línea celular MDA-MB-231 con el etopósido disminuiría la expresión de Bcl2, lo que provocaría una disminución significativa de la CI 50 de CDDP. Sin embargo los resultados

sugieren que esta vía de señalización presente en la línea celular MCF7 no está presente en la línea celular MDA-MB-231.

Otra posible explicación de que la CI 50 del CDDP no disminuyera podría estar en el hecho de que la sobreexpresión de los transportadores de la superfamilia ABC esta correlacionada con la troncalidad en células cancerosas (Dean, 2009), y una de las principales causas de resistencia al CDDP es su exclusión por el transportador MRP2 (miembro de la superfamilia de proteínas transportadoras ABC) (Kool et al., 1997; Siddik, 2003). Y finalmente bajo el supuesto de que el etopósido solo afecta a la población troncal de la línea celular MDA-MB-231 cuyo tamaño probablemente es pequeño, no se logra apreciar la disminución de la sensibilización de estas células al CDDP cuando está presente el etopósido.

El estudio realizado en el presente trabajo sobre el efecto del etopósido en el fenotipo troncal de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 sugiere que este es un compuesto capaz de disminuir el fenotipo troncal. Sin embargo para concluir definitivamente que el etopósido disminuye la población de CTT es necesario realizar la inyección de las células tratadas con etopósido en ratones NOD/SCID y saber si este disminuye la capacidad de formar tumores en tal modelo de estudio.

Finalmente, la presente investigación reveló que el etopósido posiblemente afecta la troncalidad de células de cáncer de mama y por consiguiente basándonos en que el fenotipo troncal se asocia con la promoción del cáncer de mama hacia grados avanzados, resistencia a la quimio y radioterapia, e inducción de metástasis, este compuesto tiene potencial para convertirse en un tratamiento contra el cáncer de mama aun a concentraciones a las que no induce citotoxicidad.

X. Conclusiones

- El etopósido no es citotóxico para la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.
- El etopósido disminuye el fenotipo CD44⁺/CD24^{low/-} principalmente por el aumento de CD24 en la línea celular de estudio.
- No se observó una disminución de la población celular que expresa ALDH.
- El etopósido disminuye la frecuencia y el tamaño de las mamoesferas de la línea celular MDA-MB-231 a 10 μ M de etopósido.
- El etopósido no es capaz de sensibilizar a la línea celular MDA-MB-231 para aumentar el efecto citotóxico del CDDP, sin embargo aún falta demostrar si hay una sensibilización de población troncal de esta línea celular hacia el CDDP.
- Los resultados previos y los presentados en este trabajo sugieren que el etopósido afecta el fenotipo troncal de la línea celular MDA-MB-231, debido a su capacidad de inhibir a CD44.
- Es necesario la realización de ensayos in vivo para confirmar que el etopósido afecta el fenotipo troncal de la línea celular MDA-MB-231.
- El etopósido es un candidato potencial para combinarse con otros fármacos en el tratamiento del cáncer de mama.

XI. Referencias

- Abraham, B. K., Fritz, P., McClellan, M., Hauptvogel, P., Athellogou, M., & Brauch, H. (2005). Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*, 11(3), 1154-1159. doi: 11/3/1154 [pii]
- Aguirre-Alvarado, C., Segura-Cabrera, A., Velazquez-Quesada, I., Hernandez-Esquivel, M. A., Garcia-Perez, C. A., Guerrero-Rodriguez, S. L., . . . Velasco-Velazquez, M. A. (2016). Virtual screening-driven repositioning of etoposide as CD44 antagonist in breast cancer cells. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.8180
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100
- Albert, B., et al. (1994). *Molecular biology of the cell* (Tercera ed.). USA: Garland Publishing, Inc.
- Alvarez, J., & Shoichet, B. (2005). *Virtual Screening in Drug Discovery*. Boca Raton: Taylor and Francis Group.
- Aneta, G., Tomas, V., Daniel, R., & Jan, B. (2016). Cell polarity signaling in the plasticity of cancer cell invasiveness. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.7214
- Bernardi, P., & Forte, M. (2007). The mitochondrial permeability transition pore. *Novartis Found Symp*, 287, 157-164; discussion 164-159.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337. doi: 10.1038/nature03096
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6(8), 611-622. doi: 10.1038/nrg1656
- Bogenrieder, T., & Herlyn, M. (2003). Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, 22(42), 6524-6536. doi: 10.1038/sj.onc.1206757
- Bourguignon, L. Y., Spevak, C. C., Wong, G., Xia, W., & Gilad, E. (2009). Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem*, 284(39), 26533-26546. doi: 10.1074/jbc.M109.027466
- Bourguignon, L. Y., Wong, G., Earle, C., Krueger, K., & Spevak, C. C. (2010). Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem*, 285(47), 36721-36735. doi: 10.1074/jbc.M110.162305
- Brown, R. L., Reinke, L. M., Damerow, M. S., Perez, D., Chodosh, L. A., Yang, J., & Cheng, C. (2011). CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest*, 121(3), 1064-1074. doi: 10.1172/JCI44540

- Buzdar, A. U., Ibrahim, N. K., Francis, D., Booser, D. J., Thomas, E. S., Theriault, R. L., . . . Hortobagyi, G. N. (2005). Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol*, *23*(16), 3676-3685. doi: 10.1200/JCO.2005.07.032
- Cammarota, F., & Laukkanen, M. O. (2016). Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Stromal Evolution and Cancer Progression. *Stem Cells Int*, *2016*, 4824573. doi: 10.1155/2016/4824573
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., . . . Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, *66*(19), 9339-9344. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126
- Colleoni, M., Viale, G., Zahrieh, D., Pruneri, G., Gentilini, O., Veronesi, P., . . . Goldhirsch, A. (2004). Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*, *10*(19), 6622-6628. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0380
- Cory, A. H., Owen, T. C., Bartrop, J. A., & Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, *3*(7), 207-212.
- Curto, M., Cole, B. K., Lallemand, D., Liu, C. H., & McClatchey, A. I. (2007). Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol*, *177*(5), 893-903. doi: 10.1083/jcb.200703010
- Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., . . . Wicha, M. S. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*, *16*(1), 45-55. doi: 1078-0432.CCR-09-1630 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-09-1630
- Chen, L., & Bourguignon, L. Y. (2014). Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Jun signaling and miRNA21 expression leading to Bcl-2 expression and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer*, *13*, 52. doi: 10.1186/1476-4598-13-52
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*, *6*(10), 1521-1533. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203
- Christiansen, J. J., & Rajasekaran, A. K. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, *66*(17), 8319-8326. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410
- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, *21*(4), 532-540. doi: 10.1038/sj.onc.1205080

- Dean, M. (2009). ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 14(1), 3-9. doi: 10.1007/s10911-009-9109-9
- Devi, P. U. (2004). Basics of carcinogenesis. *Health Administrator*, 17(1), 16-24.
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., & Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, 17(10), 1253-1270. doi: 10.1101/gad.1061803
- 17/10/1253 [pii]
- Dontu, G., Jackson, K. W., McNicholas, E., Kawamura, M. J., Abdallah, W. M., & Wicha, M. S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*, 6(6), R605-615. doi: bcr920 [pii] 10.1186/bcr920
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., . . . Peto, R. (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 378(9804), 1707-1716. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61629-2
- Fared, S. M., Mehwish, M., & Salmar, S. (2015). Biochemical mechanisms of etoposide; upshot of cell death. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(12), 4920-4939.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, . . . Bray, F. (2014). Cancer Incidence and Mortality Worldwide. *IARC CancerBase* 1.1(11).
- Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). *Image J User Guide*
- Fillmore, C. M., & 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. doi: 10.1186/bcr1982
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., . . . Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*, 347(16), 1233-1241. doi: 10.1056/NEJMoa022152
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., . . . Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555-567. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014
- Gonzalez-Angulo, A. M., Morales-Vasquez, F., & Hortobagyi, G. N. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*, 608, 1-22.

- Guarneri, V., & Conte, P. F. (2004). The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31 Suppl 1, S149-161. doi: 10.1007/s00259-004-1538-5
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Huang, S. Y., & Zou, X. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int J Mol Sci*, 11(8), 3016-3034. doi: 10.3390/ijms11083016
- Ikushima, H., & Miyazono, K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 10(6), 415-424. doi: 10.1038/nrc2853
- Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuricic, I., . . . Jancic, S. (2014). Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin Med Insights Oncol*, 8, 107-111. doi: 10.4137/CMO.S18006
- Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, 45(1), 177-182. doi: 10.1021/ci049714+
- Isacke, C. M., & Yarwood, H. (2002). The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(7), 718-721.
- Israel, M., & Schwartz, L. (2011). The metabolic advantage of tumor cells. *Mol Cancer*, 10, 70. doi: 10.1186/1476-4598-10-70
- Jones, C., Mackay, A., Grigoriadis, A., Cossu, A., Reis-Filho, J. S., Fulford, L., . . . Lakhani, S. R. (2004). Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res*, 64(9), 3037-3045.
- Junttila, M. R., & Evan, G. I. (2009). p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*, 9(11), 821-829. doi: 10.1038/nrc2728
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. L., Girard, L., Gandhi, J., . . . Pollack, J. R. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*, 4(7), e6146. doi: 10.1371/journal.pone.0006146
- Kaur, S., Martin-Manso, G., Pendrak, M. L., Garfield, S. H., Isenberg, J. S., & Roberts, D. D. (2010). Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47. *J Biol Chem*, 285(50), 38923-38932. doi: 10.1074/jbc.M110.172304
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*, 51(2), 335-344.
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., . . . Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 57(16), 3537-3547.
- Liu, R., Wang, X., Chen, G. Y., Dalerba, P., Gurney, A., Hoey, T., . . . Clarke, M. F. (2007). The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-

cancer cells. *N Engl J Med*, 356(3), 217-226. doi: 356/3/217 [pii] 10.1056/NEJMoa063994

- Liu, V. C., Wong, L. Y., Jang, T., Shah, A. H., Park, I., Yang, X., . . . Lee, C. (2007). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*, 178(5), 2883-2892. *Molecular cell biology* (2001).
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315. doi: 10.1038/nature03098
- Mackay, C. R., Terpe, H. J., Stauder, R., Marston, W. L., Stark, H., & Gunthert, U. (1994). Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol*, 124(1-2), 71-82.
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 10(10), 955-960.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., . . . Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027
- Marcato, P., Dean, C. A., Pan, D., Araslanova, R., Gillis, M., Joshi, M., . . . Lee, P. W. (2011). Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells is Primarily Due to Isoform ALDH1A3 and Its Expression is Predictive of Metastasis. *Stem Cells*, 29(1), 32-45. doi: 10.1002/stem.563
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*, 81(11), 1339-1346.
- Mauri, D., Pavlidis, N., & Ioannidis, J. P. (2005). Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 97(3), 188-194. doi: 10.1093/jnci/dji021
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 117-134. doi: 10.1007/s10911-010-9178-9
- Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 3(8), e2888. doi: 10.1371/journal.pone.0002888
- National, C. I. (2015a). What is Cancer? Retrieved October 20, 2015, 2015, from <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>
- National, C. I. (2015b). What is cancer? Retrieved Enero 11, 2016, from <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>
- O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., . . . Kohn, K. W. (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res*, 57(19), 4285-4300.
- Okada, T., Lopez-Lago, M., & Giancotti, F. G. (2005). Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J Cell Biol*, 171(2), 361-371. doi: 10.1083/jcb.200503165

- Organización, M. S. (2015). Nota descriptiva No. 297. Retrieved Octubre 20, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Peddi, P. F., Ellis, M. J., & Ma, C. (2012). Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *Int J Breast Cancer*, 2012, 217185. doi: 10.1155/2012/217185
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. doi: 10.1038/35021093
- Phillips, T. M., McBride, W. H., & Pajonk, F. (2006). The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 98(24), 1777-1785. doi: 10.1093/jnci/djj495
- Pisani, P., Bray, F., & Parkin, D. M. (2002). Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer*, 97(1), 72-81.
- Polotskaia, A., Hoffman, S., Krett, N. L., Shanmugam, M., Rosen, S. T., & Bargonetti, J. (2012). 8-Amino-adenosine activates p53-independent cell death of metastatic breast cancers. *Mol Cancer Ther*, 11(11), 2495-2504. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0085
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., . . . Daidone, M. G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65(13), 5506-5511. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
- Pusztai, L., & Hortobagyi, G. N. (1998). High-dose chemotherapy: how resistant is breast cancer? *Drug Resist Updat*, 1(1), 62-72.
- Ragaz, J., Olivotto, I. A., Spinelli, J. J., Phillips, N., Jackson, S. M., Wilson, K. S., . . . Manji, M. (2005). Locoregional radiation therapy in patients with high-risk breast cancer receiving adjuvant chemotherapy: 20-year results of the British Columbia randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, 97(2), 116-126. doi: 10.1093/jnci/djh297
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. doi: 10.1038/35102167 35102167 [pii]
- Ruddon, R. (1995). *Cancer Biology* (Tercera ed.). Nueva York: Oxford University Press
- Rundhaug, J. E., & Fischer, S. M. (2010). Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. *Cancers (Basel)*, 2(2), 436-482. doi: 10.3390/cancers2020436
- Salud, O. P. d. I. (2014). Epidemiología del cáncer de mama en las Américas.
- Schnitt, S. J. (2010). Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*, 23 Suppl 2, S60-64. doi: 10.1038/modpathol.2010.33
- Secretaria, N. S. (2015). Panorama epidemiológico del cáncer. *Boletín epidemiológico*, 5(32), 1-6.
- Shafee, N., Smith, C. R., Wei, S., Kim, Y., Mills, G. B., Hortobagyi, G. N., . . . Lee, E. Y. (2008). Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in

Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res*, 68(9), 3243-3250. doi: 68/9/3243 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-07-5480

- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., . . . Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 8(5), R59. doi: 10.1186/bcr1610
- Shipitsin, M., Campbell, L. L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., . . . Polyak, K. (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 11(3), 259-273. doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.013
- Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279. doi: 10.1038/sj.onc.1206933
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741-4751. doi: 10.1038/onc.2010.215
- Society, C. C. (Producer). (2016). Grades of breast cancer. Retrieved from <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/breast/grading/?region=bc>
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., . . . Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874. doi: 10.1073/pnas.191367098
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S. J., Tanji, Y., Taguchi, T., . . . Noguchi, S. (2009). Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*, 15(12), 4234-4241. doi: 1078-0432.CCR-08-1479 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-08-1479
- Toole, B. P., Wight, T. N., & Tammi, M. I. (2002). Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem*, 277(7), 4593-4596. doi: 10.1074/jbc.R100039200
- UK, C. R. (2014). Breast Cancer Mortality Statistics
- Valkov, N. I., & Sullivan, D. M. (2003). Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. *Drug Resist Updat*, 6(1), 27-39.
- Velasco-Velazquez, M. A., Homsí, N., De La Fuente, M., & Pestell, R. G. (2012). Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(4), 573-577. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.020
- Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B., & Raman, V. (2009). Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*, 11(12), 1318-1328.
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*, 465(1), 1-14. doi: 10.1007/s00428-014-1593-7
- Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., & Del Sal, G. (2012). The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, 33(11), 2007-2017. doi: 10.1093/carcin/bgs232

- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 269-270.
- Warburg, O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 17(11), 1359-1370. doi: 10.1038/nm.2537
- Weston, A., Harris, C. (2003). Multistage Carcinogenesis. In D. W. Kufe, Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., et al (Ed.), *Holland-Frei Cancer Medicine* (sexta ed.). Hamilton: BC Decker.
- Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S., & Sinicrope, F. A. (2011). The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*, 10(9), 1533-1541. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0047
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., . . . Song, E. (2007). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131(6), 1109-1123. doi: S0092-8674(07)01417-1 [pii] 10.1016/j.cell.2007.10.054
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(12), 2144-2151. doi: 10.1016/j.biocel.2012.08.022
- Yuan, J., & Chen, J. (2010). MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. *J Biol Chem*, 285(2), 1097-1104. doi: 10.1074/jbc.M109.078436
- Zepeda, E., Recinos, E., Cuellar, M., Robles, C., & Maafs, E. (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cirugia y Cirujanos*, 76(1), 87-93.
- Zhou, B., Damrauer, J. S., Bailey, S. T., Hadzic, T., Jeong, Y., Clark, K., . . . Kim, W. Y. (2014). Erythropoietin promotes breast tumorigenesis through tumor-initiating cell self-renewal. *J Clin Invest*, 124(2), 553-563. doi: 10.1172/JCI69804
- Zielske, S. P., Spalding, A. C., Wicha, M. S., & Lawrence, T. S. (2011). Ablation of breast cancer stem cells with radiation. *Transl Oncol*, 4(4), 227-233.
- Zimmermann, M., & Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol*, 740, 57-63. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_8