



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EL YODO MOLECULAR PREVIENE LA QUIMIORRESISTENCIA EN CÉLULAS  
CANCEROSAS MAMARIAS A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR  
PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS TIPO GAMA.

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

ALEXANDER BONTEMPO

TUTOR PRINCIPAL

DRA. CARMEN ACEVES VELASCO

Instituto de neurobiología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA

Instituto de neurobiología

DR. HECTOR MAYANI VIVEROS

Hospital de oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

JURIQUILLA, QRO JULIO 2017



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.



*En la parte inferior del escalón, hacia la derecha, vi una pequeña esfera tornasolada, de casi intolerable fulgor. Al principio la creí giratoria; luego comprendí que ese movimiento era una ilusión producida por los vertiginosos*

*espectáculos que encerraba. El diámetro del Aleph sería de dos o tres centímetros, pero el espacio cósmico estaba ahí, sin disminución de tamaño.*

*Cada cosa (la luna del espejo, digamos) era infinitas cosas, porque yo claramente la veía desde todos los puntos del universo. Vi el populoso mar, vi el alba y la tarde, vi las muchedumbres de América, vi una plateada telaraña en el centro de una negra pirámide, vi un laberinto roto (era Londres), vi interminables ojos inmediatos escrutándose en mí como en un espejo, vi todos los espejos del planeta y ninguno me reflejó, vi en un traspatio de la calle Soler las mismas baldosas que hace treinta años vi en el zaguán de una casa en Fray Bentos, vi racimos, nieve, tabaco, vetas de metal, vapor de agua, vi convexos desiertos ecuatoriales y cada uno de sus granos de arena, vi en Inverness a una mujer que no olvidaré, vi la violenta cabellera, el altivo cuerpo, vi un cáncer en el pecho, vi un círculo de tierra seca en una vereda, donde antes hubo un árbol, vi una quinta de Adrogué, un ejemplar de la primera versión inglesa de Plinio, la de Philemon Holland, vi a un tiempo cada letra de cada página (de chico, yo solía maravillarme de que las letras de un volumen cerrado no se mezclaran y perdieran en el decurso de la noche), vi la noche y el día contemporáneos, vi un poniente en...*

*... Querétaro que parecía reflejar el color de una rosa en Bengala, vi mi dormitorio sin nadie, vi en un gabinete de Alkmaar un globo terráqueo entre dos espejos que lo multiplican sin fin, vi caballos de erin arremolinada, en una playa del Mar Caspio en el alba, vi la delicada osatura de una mano, vi a los sobrevivientes de una batalla, enviando tarjetas postales, vi en un escaparate de Mirzapur una baraja española, vi las sombras oblicuas de unos helechos en el suelo de un invernáculo, vi tigres, émbolos, bisontes, marejadas y ejércitos, vi todas las hormigas que hay en la tierra, vi un astrolabio persa, vi en un cajón del escritorio (y la letra me hizo temblar) cartas obscenas, increíbles, precisas, que Beatriz había dirigido a Carlos Argentino, vi un adorado monumento en la Chacarita, vi la reliquia atroz de lo que deliciosamente había sido Beatriz Viterbo, vi la circulación de mi oscura sangre, vi el engranaje del amor y la modificación de la muerte, vi el Aleph, desde todos los puntos, vi en el Aleph la tierra, y en la tierra otra vez el Aleph y en el Aleph la tierra, vi mi cara y mis vísceras, vi tu cara, y sentí vértigo y lloré, porque mis ojos habían visto ese objeto secreto y conjetural, cuyo nombre usurpan los hombres, pero que ningún hombre ha mirado: el inconcebible universo.*

*Sentí infinita veneración, infinita lástima.*

*J. L. Borges - El Aleph -*

## **Agradecimientos.**

Agradezco el apoyo técnico de M. Juana Cárdenas-Luna, Felipe Ortiz, Adriana Gonzñales y Michael Jerioski. Un agradecimiento especial a Leonor Casanova y Lourdes Lara per el soporte académico. A Mario Nava-Villalba y Silva Argulo Barbosa les agradezco con cariño para las valiosas aportaciones en la discusión científica y para el contenido humano que me transmitieron.

Un recuerdo inolvidable a Guadalupe Delgado que siempre estará en mis recuerdos para haber sido siempre disponible en apoyarme técnicamente.

Un gracias sin pares a Rafael Arturo Rodriguez Cruz para haber sido mi anfitrión en un país que no conocía, para haberme enseñado mucho sobre las bellezas de México y para haber siempre encontrado la forma en apoyarme para que este proyecto fuera posible.

Un sincero agradecimiento al laboratorio de metabolismo energético D-02 y al Instituto de Neurobiología en su totalidad para haber sido mi casa durante el cumplimiento de mi doctorado.

Un gran abrazo a Xochitl Zambrano por su presencia, para haberme siempre valorado e infundido mucha energía y motivación.

A todo los colaboradores que han participado en la realización de mi proyecto les va un enorme agradecimiento de corazón, viajar con ustedes ha sido muy valioso en mi crecimiento como científico y como ser humano....

**¡GRACIAS!**

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Metabolismo Energético del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección de la Dra. Carmen Aceves Velazco en el marco del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Este trabajo fue financiado parcialmente con apoyo de la UNAM (PAPIIT-UNAM, IN201516) y CONACYT (176911). El autor fue apoyado económicamente con una beca de manutención del CONACYT (Numero de registro: 262489).

# INDICE

Resumen.....	pag. 8
Abstract.....	pag. 9
Introducción.....	pag. 10
<b>I. Antecedentes</b>	
I.1. Fundamentos y teorías del cáncer.....	pag. 11
I.2. Teorías del origen celular del cáncer.....	pag. 13
I.2 a. Las células troncales cancerosas.....	pag. 14
I.2 b. La transición epitelio-mesenquima.....	pag. 15
( <i>epithelial-mesenchimal transicion, EMT</i> )	
I.3. Quimiorresistencia.....	pag. 15
I.3 a. Proteínas ABC.....	pag. 16
I.3 b. Expresión alterada de proteínas apoptóticas.....	pag. 17
I.3 c. p21: ¿onco-supresor u oncogén?.....	pag. 19
I.4. Doxorubicina.....	pag. 20
I.5. Glándula mamaria y cáncer	
I.5 a. Desarrollo y función mamaria.....	pag. 23
I.5 b. Cáncer mamario.....	pag. 26
I.6. El yodo en los procesos fisiológicos y neoplásicos.....	pag. 30
I.7. Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPAR)....	pag. 33
I.8. Antecedentes específicos.....	pag. 36
<b>II. Hipótesis.....</b>	<b>pag. 36</b>
<b>III. Objetivos.....</b>	<b>pag. 36</b>
III.a Objetivo General.....	pag. 36
III.b Objetivos Específicos.....	pag. 37
<b>IV. Materiales y métodos</b>	
IV.1. Cultivos celulares.....	pag. 37
IV.2. Establecimiento de línea quimiorresistente (MCF-7/D).....	pag. 37
a partir de MCF-7/W	
IV.3. Determinación de proliferación celular y.....	pag. 38
cálculo del coeficiente de interacción	



IV.4. Expresión de genes implicados en la quimiorresistencia.....	pag. 38
(RT-qPCR en tiempo real)	
IV.5. Citometría de flujo.....	pag. 41
IV.6. Cuantificación intracelular de DOX.....	pag. 41
<b>V. Resultados</b>	
V.1. Establecimiento y caracterización del modelo de exposición.....	pag. 42
a baja concentración de DOX y estandarización de los tratamientos con DOX	
V.2. Sensibilidad de las líneas celulares a yodo y.....	pag. 44
análisis del coeficiente de Interacción	
V.3. Mecanismos moleculares.....	pag. 45
V.4. Análisis de los fenotipos CTC y EMT.....	pag. 48
VI. Discusión.....	pag. 51
VII. Conclusiones.....	pag. 55
<b>Bibliografía</b>	
<b>Material suplementario.....</b>	<b>pag. 69</b>

# Resumen

La quimiorresistencia es un fenómeno complejo que involucra alteraciones en vías de señalización relacionadas con el ciclo celular, el metabolismo de fármacos, la apoptosis, etc. Este fenómeno se correlaciona con la adquisición de fenotipos de tipo troncal y/o de transición epitelio-mesénquima. En este estudio, la Doxorubicina (DOX), un miembro de la familia de las antraciclinas que se utiliza en la terapia de primera línea para varios tipos de cáncer, se utilizó para establecer un modelo celular de cáncer mamario quimiorresistente. En este modelo se analizó el efecto del yodo molecular ( $I_2$ ) tan solo como en coadyuvancia con DOX en los procesos de quimiorresistencia e invasión. Células de carcinoma mamario humano (MCF7/W) fueron tratadas crónicamente con 10 nM de DOX para generar la línea DOX-resistente (MCF-7/D). Esta línea se estableció después de 30 días de tratamiento cuando el cultivo mostró una tasa de proliferación similar al de las células MCF-7/W. Las células DOX-resistentes también mostraron aumentos en marcadores relacionados con supervivencia, anti-apoptosis y quimiorresistencia como p21, Bcl-2 y MDR-1. La administración de  $I_2$  indujo efectos antiproliferativos (40%) en ambas líneas celulares y su co-administración con DOX aumentó significativamente el efecto antineoplásico de DOX (60%). La combinación  $I_2$ /DOX también se acompañó de una mayor retención del fármaco dentro de las células y de incrementos en la expresión de los receptores PPAR $\gamma$ . Todos estos cambios se asociaron a la disminución significativa de las sub-poblaciones CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> y E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup>. Los cultivos suplementados con  $I_2$ +DOX durante 96 horas mostraron una débil inducción de xenotransplantes, lo que indica que el suplemento de  $I_2$  es capaz de revertir la capacidad tumorigénica de las células MCF-7/D. En conclusión, el yodo molecular reduce la resistencia a DOX posiblemente re-diferenciando a la célula cancerosa hacia un fenotipo menos invasivo y por lo tanto representa un agente anti-quimiorresistencia con potencial clínico.

Palabras clave: Quimiorresistencia, Doxorubicina, Yodo, MCF-7.

## Abstract

Chemoresistance is a complex phenomenon that involves alterations in signaling pathways related to cell cycle, drug metabolism, apoptosis, etc., and correlates with the acquisition of phenotypes of Stem Cell and/or epithelial-mesenchymal transition. In this study, Doxorubicin (DOX), a member of the anthracycline family which is widely used as first-line therapy for various cancers, was used to establish a breast cancer chemoresistant *in vitro* model. Through this model we analyze the effect of molecular iodine (I<sub>2</sub>) alone and co-administered along with DOX over chemoresistance mechanisms and tumor initiating ability. Cells of human breast carcinoma (MCF-7/W) were chronically treated with 10 nM of DOX to generate DOX-resistant line (MCF-7/D). This line was established after 30 days of treatment when the cellular proliferation showed a similar rate to that of MCF-7/W. The DOX-resistant cells also showed increases in survival related markers, anti-apoptosis and chemoresistance as p21, Bcl-2 and MDR-1. I<sub>2</sub> supplement showed antiproliferative (40%) effects in both cell lines and its co-administration with DOX significantly increased the antineoplastic effect of DOX (about 60%). I<sub>2</sub>/DOX combination was also associated with increased drug retention and increases in expression of PPAR<sub>γ</sub> receptors. All these changes were associated with significant reduction in CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> and E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup> sub-populations. Cultures supplemented with I<sub>2</sub>+DOX for 96 hours showed a weak induction of xenotransplantation, indicating that I<sub>2</sub> treatment is able to reverse the tumorigenic ability of MCF-7/D cells. In conclusion, the molecular iodine/DOX reduces resistance by re-differentiation of the cancer cell to a less invasive phenotype and therefore represents an agent with anti-chemoresistance clinical potential.

Key words: Chemoresistance, Doxorubicin, Iodine, MCF-7.

# Introducción

El cáncer es una familia heterogénea de patologías caracterizadas por la desregulación, tanto de la proliferación como de la muerte celular, así como por la capacidad de invadir tejidos y diseminarse a distintos órganos (metástasis). El cáncer mamario es la neoplasia de mayor incidencia a nivel mundial, se caracteriza por una gran capacidad de resistencia a los fármacos y una temprana transformación hacia células con capacidad invasiva y metastásica. En los últimos años enormes esfuerzos se han encaminado al desarrollo de terapias eficaces que combinen fármacos conocidos y altamente efectivos con compuestos novedosos que sinergizan las acciones antineoplásicas y aminoren los efectos adversos. La Doxorubicina (DOX) es la antraciclina más usada en el tratamiento de cáncer mamario tanto por su potente efecto antineoplásico como por su bajo costo. Sin embargo, su uso terapéutico como monoterapia se ha limitado ya que genera una rápida resistencia y alta cardiotoxicidad. Por otro lado, la baja incidencia de cáncer mamario en países asiáticos se ha asociado con una elevada ingesta de yodo a través del consumo de algas marinas. Varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro han demostrado que dosis moderadamente altas de yodo molecular ( $I_2$ ) tienen efectos antitumorales en varios modelos de cáncer, y que dichos efectos se ejercen a través de la re-diferenciación celular evitando la instalación de resistencia e induciendo la apoptosis. En este estudio, se desarrolló un modelo celular resistente a DOX semejando el ambiente celular durante la terapia convencional. Células parentales de cáncer mamario humano MCF-7 fueron suplementadas con una concentración constante de 10 nM de DOX permitiendo su adaptación y adquiriendo la resistencia al fármaco. Con este modelo celular (MCF7/D) se analizaron los mecanismos involucrados en la instalación de la quimiorresistencia y los efectos ejercidos por el yodo molecular ( $I_2$ ) sobre dichos mecanismos. Los resultados mostraron que la instalación de la resistencia a DOX se acompaña de la selección de grupos celulares con fenotipo troncal y/o inducción de la Transición Epitelio-Mesenquima y de la adquisición de mecanismos de expulsión de fármacos y antiapoptóticos. La presencia de  $I_2$  indujo la transdiferenciación de los grupos celulares a fenotipos menos agresivos evitando la instalación de quimiorresistencia. En conclusión este trabajo provee datos que soportan la propuesta del  $I_2$  como adyuvante en el tratamiento de cánceres mamaros quimiorresistentes a DOX.

# I. Antecedentes

## I.1. Fundamentos y teorías del cáncer

Según el Instituto Estadounidense de Cancerología (NCI, por sus siglas en inglés) con el término cáncer se describen más de 100 enfermedades, en las que células anormales proliferan sin control y pueden invadir tejidos cercanos o también diseminarse a otras partes del cuerpo a través de los sistemas circulatorio y linfático.

El nombre de las varias patologías cancerosas a nivel mundial se basa en la nomenclatura internacional de las enfermedades oncológicas (ICD-O). En la codificación de las distintas patologías se puede usar un criterio topográfico, es decir, dependiendo del órgano o tejido de proveniencia o un criterio morfológico que nombra las distintas patologías en relación a las características del tumor. La etiología de dichos procesos patológicos ha sido largamente discutida originando varias hipótesis y teorías. Se pueden resumir las teorías de la carcinogénesis propuestas en los últimos 60 años en cinco modelos (Vineis et al. 2010).

- 1.-Modelo centrado en las mutaciones y el consecuente papel que juegan el ambiente químico, las radiaciones y los virus como causa de dichas mutaciones.
- 2.-Un modelo basado en inestabilidad genética con un enfoque en los factores hereditarios.
- 3.-Modelo no genotóxico en el cual los mecanismos propuestos son expansión clonal y fenómenos epigenéticos.
- 4.-Selección de células somáticas semejante a una selección darwiniana y que puede abarcar los tres modelos previos.
- 5.-Modelo que localiza la carcinogénesis en un contexto de organización tisular

En la concepción de estos modelos se reconoce que la patogénesis del cáncer y su desarrollo temporal es un proceso multi-etapas. En un modelo de carcinogénesis en la piel, por ejemplo, se han demostrado la ocurrencia secuencial de tres etapas: iniciación, promoción y progresión (o conversión maligna). La iniciación a causa de la exposición a agentes mutagénicos se puede explicar a través de la mutación en un único gen importante (Ej.: rasHa). Aparentemente se observa solamente en pocas células epidérmicas y se trata de un cambio irreversible. La promoción causa la formación de numerosos papilomas benignos y se obtiene a través de estímulos no mutagénicos repetidos que promueven la amplificación de las células previamente inicializadas. El hecho de que un único estímulo de promoción no sea suficiente para obtener

un efecto estable presupone que los cambios en este nivel son primordialmente de tipo epigenético. Los estímulos de promoción tales como inflamación y respuesta al daño tisular proveen un ambiente que a través de señales proliferativas y mitóticas, favorece la formación de poblaciones clonales de células inicializadas. La última etapa, que se denomina progresión o conversión maligna es un fenómeno que de forma espontánea se observa con baja frecuencia y que es estimulado por la exposición a agentes genotóxicos. La progresión se da por cambios en genes específicos que alteran el ciclo celular y la apoptosis, entre otros (Hennings et al. 1993).

Se ha demostrado que para el establecimiento de cáncer a nivel clínico se requieren por lo menos 6 o 7 mutaciones. A través de un modelo matemático se ha propuesto que para la acumulación de dichas mutaciones se requiere de un aumento en la tasa mutacional resultado de la inestabilidad tanto genética como genómica (Loeb et al. 2008). La tasa mutacional espontánea en un contexto celular con eficientes mecanismos de reparación génica no es suficiente para la acumulación de las mutaciones necesarias al desarrollo tumoral. La alteración en los mecanismos de reparación y de control de la integridad génica proveen un mecanismo racional para explicar el desarrollo tumoral en los tiempos descritos en epidemiología (Loeb et al. 2008).

En este sentido algunos autores introdujeron el concepto de fenotipo mutador, fenotipo que resulta de mutaciones de genes *caretaker*, es decir genes responsables de la integridad del DNA y de su reparación (Negrini et al 2010). Para racionalizar y proveer un marco teórico necesario para comprender la enorme heterogeneidad de las patologías tumorales y los fenómenos necesarios para su crecimiento maligno (entre los cuales se encuentra la inestabilidad genética), se describieron características distintivas (*Hallmarks*) comunes en la biología de todas las patologías cancerosas. Hanahan, inicialmente en el 2000 y con ulteriores detalles y ampliaciones en el 2011, propuso seis *Hallmarks*: proliferación celular sostenida, la evasión a los supresores del crecimiento, la invasividad/capacidad metastásica, la inmortalidad celular, la angiogénesis y la resistencia a la apoptosis (Hanahan et al. 2000; Hanahan et al. 2011).

En su revisión del 2011, además de incluir mayores evidencias en soporte de su propuesta anterior, extiende el número de *Hallmarks* a ocho, introduciendo la capacidad de evadir el control del sistema inmunitario y la desregulación del metabolismo energético (efecto Warburg). En la misma revisión, la discusión se extiende también a la inestabilidad génica y al papel del

componente inflamatorio atribuyéndoles la habilidad de favorecer el establecimiento del fenotipo tumoral. Según el autor la adquisición de los *Hallmarks* a lo largo de la progresión tumoral es dependiente de la inestabilidad génica, enfatizando la importancia de este fenotipo en el desarrollo de las patologías neoplásicas.

La complejidad observada en la etiología y en las características macroscópicas de estas patologías se refleja también a nivel molecular. La activación de onco-genes (Felsher 2008) la desactivación de genes supresores de tumores (*caretakers* y *gatekeepers*) por medio de mutaciones o mecanismos epigenéticos son los cambios moleculares que más se asocian a carcinogénesis (Levitt & Hickson 2002).

Un amplio número de genes y mutaciones han sido investigados para determinar su asociación con el cáncer y ninguno ha demostrado ser fundamental para la carcinogénesis. Por ejemplo la proteína p53 se encuentra mutada en el 43.28% de los cánceres colorrectales, mientras que en cáncer de hueso está mutado sólo en el 14.43%. Estos datos sugieren que aunque las patologías cancerosas encuentran una clasificación clínica, cada caso representa una situación única en su género debido a las numerosas combinaciones posibles de los mecanismos que potencialmente pueden ser involucrados.

Aunado a lo anterior, diversos estudios experimentales y epidemiológicos han mostrado numerosos factores de riesgo asociados al cáncer.

Los factores ambientales y de estilo de vida que más se correlacionan con el aumentado del riesgo de cáncer son: El tabaquismo, la alimentación, el sobrepeso, virus, bacterias, parásitos, exposición ocupacional/ambiental a carcinógenos y factores hormonales/reproductivos.

Además, se han descrito para algunos tipos de cáncer, factores genéticos familiares que incrementan el riesgo de este padecimiento (Weinberg. 2014).

## **I.2. Teorías del origen celular del cáncer**

Como se deduce de los antecedentes presentados previamente, las masas cancerosas están conformadas por numerosas poblaciones celulares heterogéneas en morfología, expresión de antígenos, tasas de proliferación, capacidad metastásica y sensibilidad a las terapias. El origen de dicha variabilidad es todavía causa de discusión. Dos teorías han surgido para intentar a explicar dicho fenómeno: las células troncales cancerosas o CTC (*Cancer Stem Cells; CSC*)

(teoría jerárquica) y la expansión clonal (teoría estocástica). La teoría de las CTC se basa en la existencia de una sub-población particular de células que comparten características con las células troncales o CT (Stem Cells SC) las cuales son responsables de la iniciación, progresión y reincidencia tumoral. Por definición, estas células poseen la habilidad de autorenovarse; es decir, la posibilidad de replicarse un número teóricamente infinito de veces manteniendo constante la población de CTC y reproducirse asimétricamente dando lugar también a células progenitoras capaces de diferenciarse. En conjunto estas dos características explican la heterogeneidad celular encontrada en las masas tumorales. Por otro lado, la teoría estocástica propone que en un plazo suficiente de tiempo la acumulación de mutaciones y cambios epigenéticos al azar junto con un proceso selectivo juegan un papel central en la etiología de las patologías cancerosas (Campbell & Polyak 2007; Alkatout & Kalthoff 2008). Sin embargo, se ha propuesto una teoría que unifica las dos teorías anteriores. En este sentido se está discutiendo el concepto de plasticidad celular que presupone que la activación de programas embrionarios como es el caso de la Transición Epitelio-Mesenquima (EMT por su nombre en inglés) son suficientes para conferir a las células somáticas diferenciadas las características troncales (Mani et al. 2008; Radisky et al. 2008).

### **I.2 a. Las células troncales cancerosas**

Las CT son importantes fisiológicamente, tanto en el desarrollo embrionario debido a sus propiedades de auto-renovación y multipotencialidad, como en los procesos de reparación de daños durante la vida del organismo adulto. La multipotencialidad se refiere a la capacidad de las CT de originar mediante divisiones asimétricas todos o algunos de los tipos celulares presentes en algún órgano o tejido. Además, por su naturaleza, las CT son altamente resistentes al efecto citotóxico de numerosas moléculas, confiriéndoles una capacidad intrínseca de resistencia a los fármacos. Además, el control de la actividad de la CT está bajo la influencia del microambiente que las rodea, que mediante señales parácrinas activa o reprime su actividad. Evidencias experimentales correlacionan a las CTC con el desarrollo del cáncer y resistencia a distintos fármacos (Shipitsin et al. 2007; Fillmore & Kuperwasser 2008). Diversos estudios explican la quimiorresistencia de las CTC con la sobre-expresión de transportadores ABC y modulación de mecanismos apoptóticos (An & Ongkeko 2009; Chiodi et al. 2011, Abdullah & Chow 2013).



## **I.2 b. La transición epitelio-mesenquima** **(*Epithelial to-mesenchymal transition, EMT*)**

La EMT es también un proceso fisiológico normal en el desarrollo embrionario (por ejemplo, en la migración de la cresta neural o la formación del mesodermo) y en la etapa adulta en situaciones de reparación de daño. Es un proceso en el que las células epiteliales adquieren características mesenquimales como la morfología fusiforme y la capacidad de migración entre otras. Estas modificaciones son debidas a cambios en la expresión de proteínas de adhesión y del citoesqueleto como Vimentina, N-Caderina, E-Caderina y fibronectina. Se conoce que mensajeros como bHLH, Twist 1, Twist 2, Snail, Slug, Zeb1, Zeb2, FOXC2, ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina, Notch y TGF $\beta$ 1 son capaces de inducir la EMT, y que estas células transformadas comparten con las CTC marcadores de membrana y características de resistencia a fármacos (Mani et al. 2008; Radisky et al. 2008; Ouyang et al. 2010, Işeri et al. 2011).

## **I.3. Quimiorresistencia.**

Las adaptaciones metabólicas y de la expresión génica que experimentan las células de cáncer como respuesta a la exposición a los fármacos se conoce como quimiorresistencia. En numerosos casos, la quimiorresistencia que se desarrolla por la exposición a un fármaco es eficaz contra una amplia gama de fármacos de distintas familias. Dicha resistencia cruzada (Multi Drug Resistance, MDR) se debe a que varios mecanismos moleculares involucrados en la resistencia son generales (Eskiocak 2008). En la figura 1 se muestran los mecanismos más importantes relacionados a resistencia a los fármacos.

Los más importantes para este trabajo son los siguientes:

- a) Sobre-expresión de proteínas transportadoras de membrana dependientes de ATP (super familia de las ABC), que permiten expulsar al fármaco de la célula.
- b) Modificaciones tanto genéticas como epigenéticas de las proteínas involucradas en la apoptosis y reparación del DNA.
- c) Alteraciones de las proteínas reguladoras del ciclo celular.
- d) Alteración de blancos moleculares tales como mutaciones o cambios en la expresión génica.

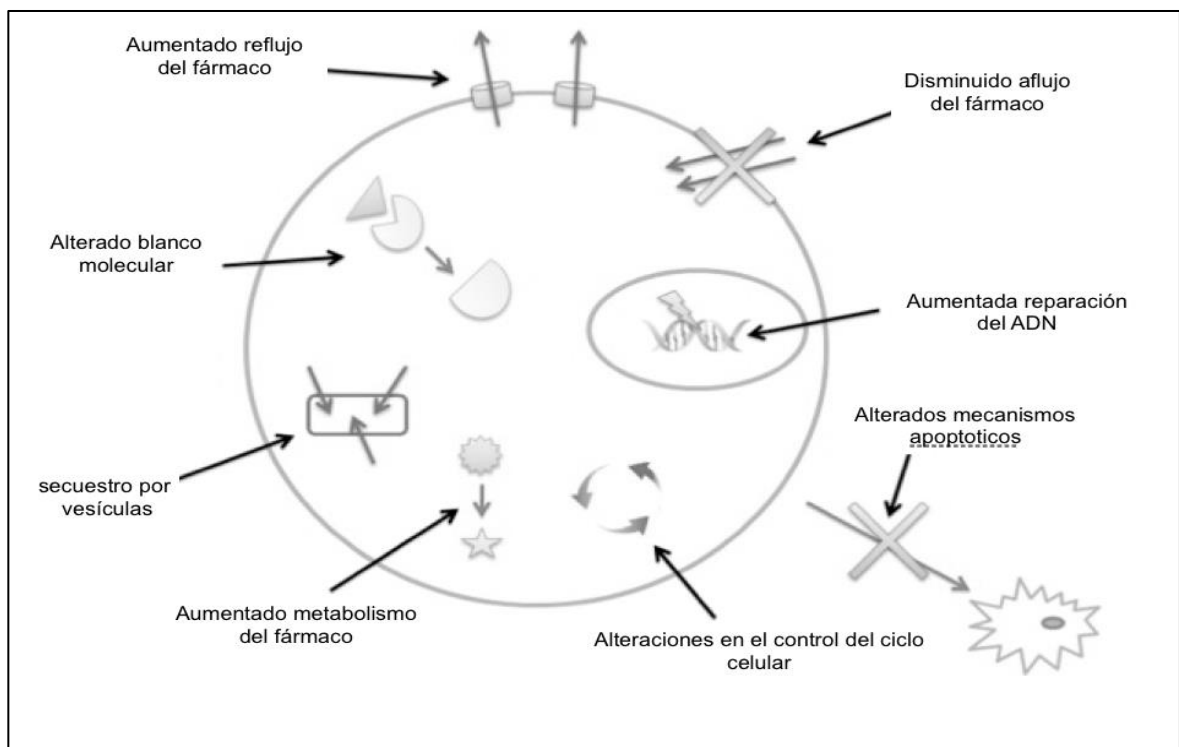


Fig.1: Mecanismos de la quimiorresistencia.

Las alteraciones producidas en la célula en respuesta a la exposición al fármaco pueden modificar los mecanismos necesarios para su acción. Adaptado de Gong et al. 2012.

### I.3 a. Proteínas ABC

La super familia de transportadores de membrana dependientes de ATP (*ATP-binding cassette*, ABC) consiste en su mayoría en proteínas transportadoras de membrana con afinidad para una larga lista de sustancias incluyendo azúcares, aminoácidos, fármacos, antibióticos, toxinas, lípidos, esteroides, sales biliares, péptidos, nucleótidos, metabolitos endógenos e iones (Durmus et al. 2015). El papel fisiológico de estas proteínas es expulsar componentes endógenos de señalización o de desecho así como sustancias tóxicas exógenas. En las células eucariotas estas proteínas actúan sólo en dirección centrífuga, exportando los substratos al exterior contra gradiente de concentración y utilizando la hidrólisis de ATP. En sus formas funcionales, las ABC contienen por lo menos 4 dominios: dos transmembranales que forman el sitio catalítico y dos de interacción con ATP, con propiedad de ATPasa, que proveen la energía necesaria para el transporte. Es ampliamente aceptado que estas proteínas, que actúan sobre un gran número

de fármacos, participan en la quimiorresistencia, permitiendo a la célula cancerosa expulsar la droga e impidiendo el mantenimiento de las concentraciones citoplasmáticas necesarias para obtener el efecto terapéutico deseado (Sharom 2008).

### **I.3 b. Expresión alterada de proteínas apoptóticas.**

La apoptosis es un fenómeno fisiológico importante en distintos procesos, desde el desarrollo embrionario hasta la homeostasis y mantenimiento de los organismos adultos. La apoptosis es una forma de muerte celular programada regulada por un gran número de proteínas y rutas de señalización. En la célula se lleva a cabo dicho proceso mediante un desequilibrio entre estímulos de supervivencia y de muerte que activan la degradación de los componentes celulares, del DNA y la sucesiva fragmentación celular. Como última etapa, la fagocitosis de los fragmentos celulares (llamados cuerpos apoptóticos) por los macrófagos, permite la eliminación completa de la célula apoptótica. Este mecanismo además permite el reciclaje de algunos componentes celulares sin derramar el contenido celular en el ambiente extracelular lo que causaría una reacción inflamatoria. Existen varios mecanismos de apoptosis. La respuesta a daño al DNA o estrés oxidativo son las causas más frecuente de apoptosis intrínseca la cual puede ser dependiente o independiente de caspasas que son enzimas que pertenecen a una familia de cistein-proteasas. La letra 'C-' de la palabra 'Caspasas' de hecho representa la cisteína mientras que '-aspasa' recuerda la propiedad exclusiva de estas proteínas de hidrolizar el enlace peptídico después de un residuo aminoácido de aspartato. Las Caspasas se dividen en dos categorías: inicializadoras como la 8 y la 9 y efectoras como es el caso de la caspasa 3. En caso de daño al DNA, estrés oxidativo o hipoxia, se produce un aumento de permeabilidad mitocondrial tanto por alteraciones en el potencial de membrana, como mediado por proteínas específicas como Bax, Bad y Bid (de las cuales Bcl-2 es su inhibidor). El aumento de permeabilidad permite la libre difusión en el citoplasma de factores normalmente almacenados en el espacio intramembranal tales como la Caspasa 9, el Citocromo C, SMAC, Diablo y Omi/HtrA2, entre otros. Citocromo C en conjunto con APF1 y Caspasa 9 constituyen un complejo con actividad proteolítica capaces de activar las Caspasas efectoras. Smac, Diablo y Omi/HtrA2 tienen la función de anular el efecto inhibitorio sobre la activación de las Caspasas efectoras que ejercen las proteínas IAP (Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis). Las Caspasas efectoras fragmentan numerosas proteínas esenciales a la vida celular y otras que constituyen el citoesqueleto, además de activar numerosas DNAsas que se encargan de fragmentar el DNA genómico (Fig. 2) (Wong 2011). La apoptosis, sin embargo puede darse también por

mecanismos intrínsecos independientes de Caspasas como por ejemplo por medio del Factor Inductor de Apoptosis (AIF de su nombre en inglés). Se ha demostrado que dicha proteína se encuentra anclada a la membrana mitocondrial interna por medio de su región N-terminal. La activación de la poly(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) en respuesta a daño al DNA induce la síntesis de polímeros de ADP-ribosa los cuales desestabilizan la membrana mitocondrial y alteran la homeostasis de calcio. El calcio, al entrar en el espacio intermembranal de las mitocondrias activa la Calpainas, cistein-proteasas dependientes de calcio. Estas enzimas tienen la capacidad de cortar el fragmento N-terminal de AIF permitiéndole así poder difundir en el citoplasma y translocarse en el núcleo donde produce fragmentación del DNA y la condensación de la cromatina.(Norberg et al. 2010; Vosler et al. 2009).

Los estímulos de tipo extrínsecos son otros mecanismos responsables de apoptosis. Las vías extrínsecas presuponen la interacción de ligandos específicos con receptores de membrana tales como el Receptor del Factor de Necrosis Tumoral de tipo 1 (TNFR1) y Fas (CD95). Los dominios intracelulares de dichos receptores al ligarse con sus propios agonistas (TNF1 y FasL respectivamente) reclutan numerosas proteínas formando los complejos proteicos adaptadores ligando-receptor, conocidos como Complejos de inducción de muerte (DISC de su nombre en inglés.). DISC por último, es responsable de la activación de la Caspasa inicializadora 8 la cual como se mencionó previamente, desencadena la cascada apoptótica mediada por caspasas (Wong et al. 2011).

Es importante resaltar que el mecanismo de acción de muchos fármacos empleados en tratamientos oncológicos es inducir la apoptosis en respuesta al daño al DNA o al aumento en el estrés oxidativo. En los procesos de quimiorresistencia, las células cancerosas alteren dichos mecanismos apoptóticos adquiriendo así la capacidad de sobrevivir a los efectos citotóxicos de estos fármacos.

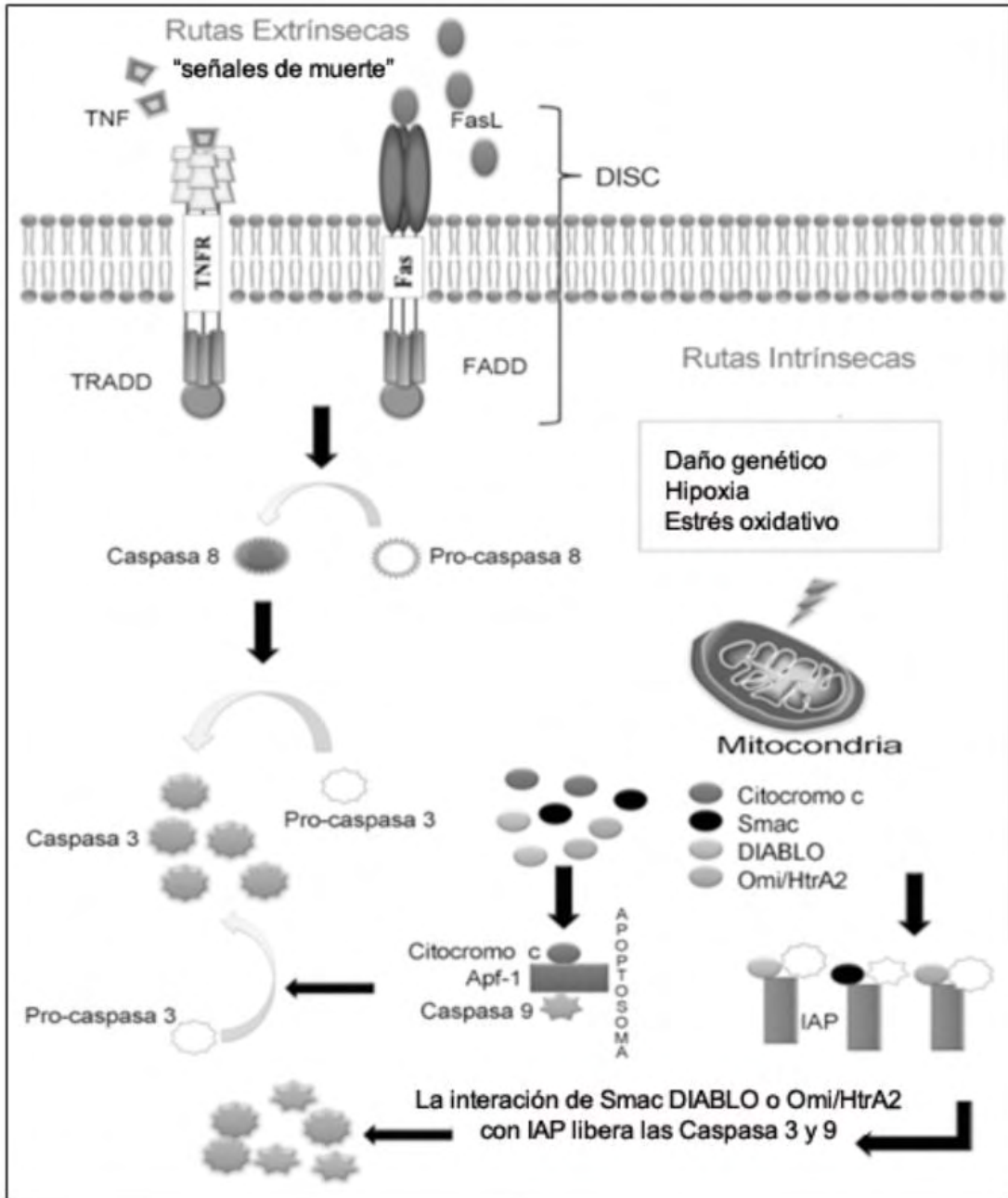


Fig. 2: Rutas extrínsecas e intrínsecas de activación de apoptosis y proteínas involucradas. (adaptado de Wong et al. 2011).

### I.3 c. p21: ¿onco-supresor u oncogén?

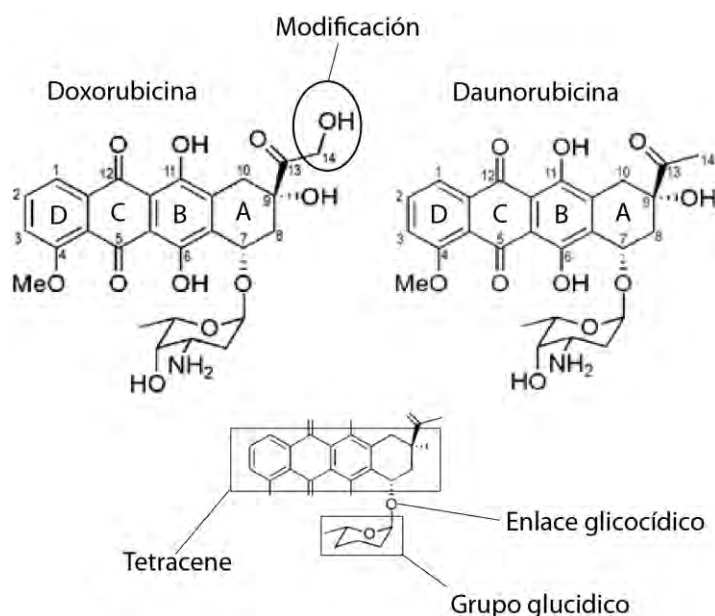
Como se mencionó anteriormente, la modulación de los genes que controlan el ciclo celular es un mecanismo observado en la quimiorresistencia. Entre las numerosas proteínas involucradas en los mecanismos de control del ciclo celular se pueden nombrar p53, p27 y p21. P21 ha sido históricamente considerada una proteína onco-supresora asociada al bloqueo del ciclo celular,

apoptosis y senescencia. Su activación puede estar mediada o no por la proteína p53. Los mecanismos más conocidos de la acción de p21 incluyen su capacidad de inhibir la actividad de los complejos ciclina-CDK (quinasas dependientes de ciclinas) esenciales a la progresión del ciclo celular a través de la formación de un complejo con el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA de su nombre en inglés). Sin embargo evidencias recientes reevalúan a p21 como una proteína con un papel dual, con efectos tanto apoptóticos como anti-apoptóticos dependiendo del tipo y del contexto celular. Así, el efecto de p21 parece ser resultado de una intrincada red en la que puede además interactuar con proteínas involucradas en reparación de daño al DNA (Liu et al. 2003; Abbas and Dutta 2009). Debido a su dualidad, esta proteína no es seleccionada negativamente durante la carcinogénesis: de hecho, se encuentra expresada en un gran número de neoplasias en las que puede ser utilizada como factor pronóstico desfavorable. Se ha observado también que la sobre-expresión de p21 dependiente de ErbB2 confiere resistencia a Taxol en cáncer mamario (Hawthorne et al. 2009). Por otro lado, el eje erf2-p21 se ha asociado con el establecimiento de una población con marcadores troncales, con la reactivación de los mecanismos anti-oxidantes y con quimiorresistencia en células tumorales mamarias como MCF-7, MDA-MB231 y T47D (Achuthan et al. 2011). Otros reportes muestran un incremento en la expresión de p21 en células MCF-7 en la sub población con marcadores troncales (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>) (Clarke et al. 2005; Calcagno et al. 2010). Parte de la explicación a esta dualidad puede sustentarse en el hecho de que las acciones de los agentes citotóxicos utilizados en la terapia actual, actúan sobre poblaciones de células mitóticamente activas. La sobre-expresión de p21 proveería a las células con un factor protector contra el efecto de dichos fármacos permitiendo de esta manera la sobrevivencia celular.

#### **I.4. Doxorrubicina**

La historia de la Doxorubicina (14-hidroxyldaunorubicina) empieza en los años 50 cuando una industria farmacéutica italiana, Farmaitalia interesada en desarrollar nuevos agentes anticancerosos descubre una cepa de *Streptomyces* capaces de producir un pigmento rojo de lo que se purificó una molécula activa: la Daunorubicina (DAU). Por medio de mutaciones de estos microorganismos en el intento de encontrar una alternativa menos tóxica se obtuvo una variedad bacteriana (*Streptomyces peucetius* Var. *Caesius*, ATCC Cat# 27952) de la cual se purificó otra molécula de mayor eficacia antitumoral, que se le denominó Adriamicina (Doxorubicina) en honor del mar Adriático.

La DOX un miembro de las antraciclinas, caracterizadas por una aglicona y una porción glucídica. La glicona es compuesta por 4 anillos condensados llamada estructura tetracénica. En el anillo C se ubica una quinona mientras que en el anillo B se encuentra una hidroquinona. En el carbono 4 de anillo D se sitúa un grupo metoxilo y en el carbono 9 del anillo A se encuentra un grupo carbonilo. La parte glucídica está constituida por un residuo 3-amino-2,3,6-trideoxi-L-fucosilica unido a través de enlace glicosídico al carbono 7 del anillo A y que ha demostrado ser esencial para la actividad anti-tumoral de la molécula. La única modificación entre la DAU y la DOX es que en la primera la cadena lateral en el carbono 9 el grupo carbonilo termina con un grupo metilo mientras que en la DOX se encuentra un grupo  $-C_2OH$  (alcohol primario) (figura. 3). Aunque el cambio estructural parece mínimo entre las dos moléculas, éste es responsable de cambios marcados en el espectro de acción y potencia entre las dos variantes ( Järvinen et al. 2000; Czczuga et al. 2004; AbuHammad et al. 2013). Se ha propuesto que estos fármacos ejercen su efecto terapéutico por lo menos mediante tres mecanismos: actuando como intercalante del DNA, inhibiendo la actividad de la Topoisomerasa II $\alpha$  y por una exacerbada producción de radicales libres. La DAU es ampliamente utilizada en el tratamiento de leucemias, mientras que la DOX es el fármaco de primera línea en canceres sólidos.



**Fig. 3:** Estructura de Daunorubicina y de Doxorubicina. Se evidencian los grupos funcionales constituyentes las Antraciclinas y la modificación que caracteriza la Doxorubicina. (Elaboración propia)

La administración de DOX es seguida por una rápida depuración plasmática y una significativa distribución tisular. La vida media terminal de la DOX es de aproximadamente 30 horas. La DOX es parcialmente metabolizada en Doxorubicinolo y en menor cantidad en anglicón. La principal vía de eliminación es por heces y vía biliar. Los efectos adversos incluyen leucopenia, trombocitopenia, anemia, alopecia y estomatitis destacando el efecto cardiotóxico que representa el mayor límite en su utilización terapéutica. Se ha descrito que dicho efecto adverso es debido a la formación de radicales libres. La DOX sufre una reducción a su forma semi-quinónica catalizada por microsomas, sarcosomas y mitocondrias. En presencia de oxígeno la semi-quinona rápidamente se reduce nuevamente a quinona con la consecuente producción de súperoxido ( $O_3^-$ ) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species). El efecto cardiotóxico de la DOX incluye daños y anormalidades de las membranas tanto mitocondriales como del retículo sarcoplasmático. Algunos estudios apuntan a que la responsable de la fase reductiva del ciclo Redox de la DOX es la NADH-dehidrogenasa mitocondrial. Sin embargo, otros reportes proponen mecanismos adicionales que incluyen la actividad del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Davies & Doroshow 1986). Además, algunos autores sugieren que la cardiotoxicidad de las antraciclinas es mediada por el efecto que estas moléculas ejercen sobre la Topoisomerasa II $\beta$  expresada específicamente en el músculo cardíaco (Zhang et al. 2012).

Otro de los efectos adversos de la DOX es la capacidad de las células cancerosas de desarrollar resistencia al tratamiento. En tal sentido, además de los mecanismos generales de quimiorresistencia, se ha demostrado que alteraciones en la expresión de la Topoisomerasa II $\alpha$ , blanco molecular de la DOX, se asocia a un menor efecto citotóxico inducido por ésta antraciclinaa (Järvinen et al. 2000; AbuHammad & Zihlif 2013).



## I.5. Glándula mamaria y cáncer

### I.5 a. Desarrollo y función mamaria

La mama es una glándula exclusiva de los mamíferos y su función es sintetizar y secretar la leche para la nutrición, protección y el desarrollo óptimo del recién nacido.

La mama está compuesta de tejidos glandulares (secretores) y estromales (vasos sanguíneos, conductos linfáticos así como tejido adiposo y conectivo) (Fig. 4).

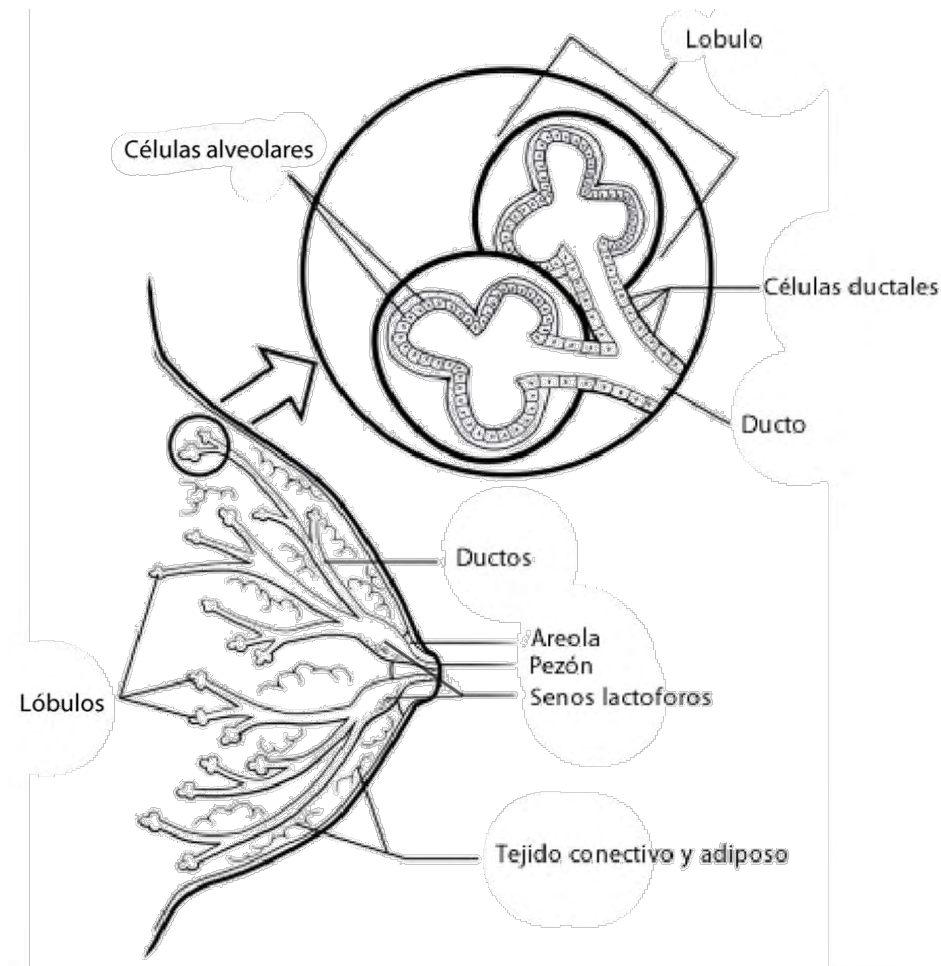


Fig.4: Componentes principales de la glándula mamaria. (Adaptado de <http://www.cancer.org/>)

A diferencia de la mayoría de los órganos del cuerpo que maduran durante la vida embrionaria, la glándula mamaria alcanza su diferenciación funcional hasta el primer embarazo-lactancia (Hassiotou 2013). Así, durante el ciclo de vida de las hembras de los mamíferos, la glándula

mamaria sufre numerosas modificaciones agrupadas en las siguientes etapas: el crecimiento fetal e infantil (prepuberal), la expansión durante la pubertad, la remodelación-diferenciación asociada con el embarazo y la lactancia, y finalmente la involución post-lactancia y post-menopáusica.

En la etapa fetal las líneas mamarias provenientes del ectodermo emergen a la superficie ventral a cada lado de la línea media desde la axila hasta la ingle. Dependiendo de la especie, aparecerán nódulos de células hacia la dermis para formar los brotes mamarios. Al nacimiento, la glándula mamaria consta primordialmente de conductos poco arborizados. Hasta este punto del desarrollo, el crecimiento de la glándula es isométrico y está confinado principalmente a una extensión modesta del sistema de conductos dentro del cojinete graso. Durante la pubertad se presenta un crecimiento alométrico de la glándula mamaria donde prolifera tanto el sistema glandular como del estroma. De hecho, en la mujer el crecimiento del estroma mamario precede al del glandular y la ganancia neta de tejido epitelial es menor comparada con la cantidad de tejido adiposo. En las hembras juveniles y adultas nulíparas se da un proceso cíclico de proliferación-diferenciación-apoptosis en el epitelio glandular que es regulado primordialmente por las hormonas del ciclo ovárico. Durante la gestación ocurre una rápida e intensa proliferación celular y se lleva a cabo la diferenciación terminal alveolar que trae como consecuencia la capacidad de sintetizar la leche. Una vez que cesa la lactancia, los alvéolos sufren de un proceso apoptótico masivo y de remodelación del estroma denominado involución, que da como resultado un epitelio mamario similar al que se tenía antes de la gestación (Mephan 1987).

El crecimiento y diferenciación del epitelio mamario está regulado por una gran diversidad de mensajeros neuroendócrinos entre los que se incluyen a los esteroides ováricos (estradiol y progesterona), a hormonas peptídicas (hipofisiarias, placentarias), tironinas, aminos y factores de crecimiento parácrinos (Tresguerres-Fernandez 2010). Estos mensajeros actúan directamente y se conoce que también participan en la síntesis y liberación de otros factores locales parácrinos y autócrinos, tanto en el parénquima como en el estroma mamario (Hassiotou & Geddes 2013).

El estroma intra-lobular se conforma de células mesenquimales que son altamente sensibles a las señales del micro-ambiente hormonal. Dicho estroma ha sido asociado con la iniciación y la progresión de diversas etapas de desarrollo mamario a través del *crosstalk* con el epitelio glandular. Poco se sabe acerca de las cascadas de señalización entre el estroma y el epitelio

que estimulan el desarrollo mamario, así como de los cambios histológicos dentro del estroma y el epitelio durante el ciclo embarazo-lactancia. También se tiene poca información relativa a los marcadores que identifican los varios tipos celulares presentes en la glándula en descanso y en la glándula funcional (Hassiotou & Geddes 2013).

Se cree que la capa basal perilobular contiene poblaciones de células troncales mamarias bi-potentes. La presencia de células troncales en la glándula mamaria fue postulado con base a su capacidad para expandirse e involucionar repetidamente a lo largo de la vida adulta. Un cultivo en tres dimensiones de mamoesferas demostró la presencia de células bi-potentes con capacidad de auto renovación, además de una población de células progenitoras en el epitelio mamario en reposo (Dontu et al. 2003). Se ha reportado que el perfil CD49<sup>alto</sup>/CD29<sup>+</sup>/CD24<sup>bajo</sup> caracteriza una población bi-potente de células troncales en la glándula en reposo, con capacidad de diferenciarse tanto en células lóbulo-alveolares como en células mioepiteliales. Se cree también que la citoqueratina 5 (CK5) es un marcador específico de las células troncales mamarias, y parece ser altamente específica de la capa basal tanto en la mama en reposo como en la lactante (Hassiotou & Geddes 2013). En el tejido glandular, la identificación de los tipos celulares que la constituyen se realiza generalmente utilizando distintas citoqueratinas específicas de cada tipo celular: 19 (CK19) para células ductales, 18 (CK18) para células alveolares y 14 (CK14) para las células mioepiteliales, las cuales también son positivas para actina de músculo liso (SMA).

Aunque la expresión de las distintas citoqueratinas se utiliza para diferenciar entre estos subtipos epiteliales, algunas investigaciones han demostrado la presencia de una pequeña población de células doble positivas CK19/CK14 ó CK18/CK14 en el epitelio mamario, lo que indica células en transición. Además se ha postulado que CK14 es un marcador para células troncales mamarias o de progenitores mioepiteliales. Esto demuestra la presencia de una jerarquía dentro del epitelio mamario por lo que todavía es necesario identificar marcadores más específicos de las distintas etapas de diferenciación celular a lo largo de este *continuum* jerárquico (Hassiotou & Geddes 2013). De hecho, esta característica de multipotencialidad celular que distingue al epitelio mamario ha permitido explicar en parte la elevada incidencia de cáncer mamario en mujeres nulíparas donde los componentes lóbulo-alveolares mamarios no completan su diferenciación terminal y las células troncales con el pasar del tiempo parecen ser más susceptibles de volverse cancerosas (Gleicher et al. 2013).

## **I.5 b. Cáncer mamario**

Según un criterio histopatológico, la OMS clasifica los cánceres que afectan la glándula mamaria en siete familias: epiteliales, mioepiteliales, mesenquimales, fibroepiteliales, tumores del pezón, linfomas y metástasis de otros cánceres primarios. A su vez, estas familias se pueden dividir en subgrupos con características histológicas y moleculares que reflejan distintas pronosis y perfiles clínicos (IARC 2003).

De todos los tipos de cáncer mamario (CM), los más frecuentes son el carcinoma ductal invasivo con una prevalencia de 40-75% y el carcinoma lobular invasivo que representa el 5-15%; ambos originados del componente epitelial de la glándula. Según las estadísticas más recientes de Globocan (IARC) 2012, el CM a nivel mundial tiene una incidencia de 1,761,000 nuevos casos anuales con una mortalidad de 522,000. Sólo en México cada año se detectan 20,444 nuevos casos y la muerte de 5,680 mujeres por este tipo de cáncer, representando por lo tanto una patología de fuerte impacto a nivel social y económico.

Diversos datos experimentales y epidemiológicos sustentan la existencia de factores tanto de riesgo como protectores en la incidencia de CM.

Los factores de riesgo más determinantes son el género y la edad. Se estimó que las mujeres tienen un riesgo 100 veces mayor que los hombres y una mujer de 70 años tiene un riesgo 10 veces mayor que en una mujer de 30 años.

### **Factores hereditarios y genéticos (Apostolou & Fostira 2013)**

#### Entre las mutaciones genéticas de alta penetrancia destacan:

El gen BRCA1 (Breast Cancer 1) codifica por una fosfoproteína nuclear que actúa como gen supresor de tumores a través de mantener la estabilidad genómica. Mutaciones germinales en dicha proteína aumentan el riesgo de desarrollo de CM al 80% y el riesgo de cáncer ovárico al 40%. Las células tumorales con mutaciones en este gen han demostrado tener un fenotipo triple negativo [ausencia de receptor de estrógenos (ER)], de progesterona (PR) y de factor humano de crecimiento epidermal 2 (hEGF2).

El BRCA2 (Breast Cancer 2) contiene 27 exones y varias mutaciones pueden ocurrir a lo largo de todo el gen. Los cánceres caracterizados por mutaciones en BRCA2 normalmente expresan ER y PR y muestran un comportamiento similar a los cánceres esporádicos.

El p53: es un gen supresor de tumores involucrado en el control de ciclo celular e inducción de apoptosis en caso de daño génico. Mutaciones de p53 en la línea germinal aumentan el riesgo de desarrollar cánceres a lo largo de la vida en un 90%, y aumentan el riesgo de desarrollar CM juvenil (antes de los 45 años) de 18-60 veces.

El gen PTEN (Homologo de fosfatasa y Tensina) codifica por una proteína con función de fosfatasa que defosforilando proteínas y lípidos induce arresto del ciclo celular y apoptosis. Mutaciones en su secuencia aumentan el riesgo de CM en un 50%, de tiroides en un 10% y el de endometrio de un 5-10%.

El STK11 es el gen que codifica una proteína con funciones de cinasa de serin-treonina y participa en la regulación del ciclo celular e inducción de apoptosis siendo de tal forma un gen supresor de tumores. Mutaciones de dicho gen correlacionan con el aumento de en el riesgo de desarrollar cualquier tipo de patología cancerosa hasta en un 85%.

Mutaciones en la línea germinal de E-Caderina (CDH1), proteína de adhesión dependiente de calcio se asocian a un aumento de riesgo de cáncer lobular de mama, así como cánceres colorrectal y gástrico.

Alteraciones génicas de moderada penetrancia se han encontrado en: CHEK2 (Checkpoint kinase 2), PALB2 (FANCN, gen de la anemia de Fanconi), ATM (gen ataxia telangiectasia mutado), BRIP1 (BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1), RAD51C (RAD51 paralogo C) y XRCC2.

El producto del gen CHEK2 (Checkpoint kinase 2) es una cinasa de treonina activada por daños al DNA que media la activación de complejos de reparación. Una mutación específica en este gen (c.1100delC) incrementa el riesgo de CM bilateral y duplicación en la incidencia cáncer mamario masculino. Familias homocigotas para esta mutación tienen 6 veces más riesgo de desarrollar CM.

El gen PALB2 (FANCN, gen de la anemia de Fanconi) codifica una proteína que interactúa con BRCA2 durante la recombinación homóloga y de reparación de las rupturas de la doble hélice

del DNA. Mutaciones en la línea germinal se asocian a un aumento del riesgo de CM de 5.3 veces.

La proteína producida por el gen ATM (gen Ataxia Telangiectasia Mutado) es una cinasa relacionada a PI3K, la cual muestra múltiples funciones complejas como orquestar la reparación de daño al DNA, a través de un mecanismo que incluye a p53, BRCA1 y CHECK2. Se ha propuesto que mutaciones de este gen se asocian a un aumento en el riesgo de desarrollar CM de 2 veces llegando a ser de 5 veces en mujeres con menos de 50 años de edad.

La proteína originada de BIRP1 (BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1) interactúa con BRCA1. La expresión de una versión trunca de BRIP1 incrementa el riesgo de CM en familias con alto riesgo no asociado a mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2.

El gen RAD51C (RAD51 paralog C) codifica una proteína esencial en la recombinación homóloga durante la reparación de daño al DNA. RAD51C se ha investigado en 1100 familias con alto riesgo de cáncer tanto mamario como ovárico. En las que previamente se determinó no tener mutaciones en BRCA1 o BRCA2. 1.3% de estas familias afectadas por ambas patologías cancerosas han demostrado tener una mutación en la línea germinal de dicho gen. Ninguna mutación se ha detectado en las familias afectadas únicamente por CM.

La proteína producida por el gen XRCC2 al igual que numerosas proteínas mencionadas previamente está involucrada en la reparación por recombinación homóloga de los daños al DNA. Mutaciones de esta proteína se han asociado a un aumento de riesgo para desarrollar diversas patologías cancerosas, especialmente en la mama.

La densidad de glándula mamaria también es un factor de riesgo y está altamente asociado a la raza, donde las mujeres caucásicas presentan una mayor densidad. Este riesgo varía desde el 1.76 en las mujeres con baja densidad mamaria hasta un 4,64 en las mujeres con densidad elevada.

## **Factores Reproductivos**

La nuliparidad, la menarca temprana, la menopausia tardía y una edad avanzada para el primer embarazo se relacionan con un mayor riesgo de cáncer mamario. Por otra parte, el embarazo antes de los 20 años, la menarca tardía, la menopausia temprana y la ovariectomía en las

mujeres menores de 35 años de edad se cuentan como factores que protegen contra el cáncer mamario. Este conjunto de datos han dado lugar a la hipótesis de que la completa diferenciación del tejido lóbulo-alveolar mamario que ocurre después del primer embarazo y lactancia son factores decisivos en la susceptibilidad de las células mamarias a volverse cancerosas (Bray et al. 2004).

Por otra parte, otro factor reproductivo considerado como posible factor de riesgo es el uso de anticonceptivos hormonales. Formulaciones a base de estrógenos y progestágenos es la forma de anticoncepción más utilizada en el mundo bajo diferentes modalidades, dosis y combinaciones de esteroides. En diversos estudios epidemiológicos no se ha encontrado una asociación consistente entre el uso de anticonceptivos orales y el riesgo de cáncer mamario. Sin embargo algunos estudios, han identificado que dicho riesgo se incrementa en mujeres que inician el consumo de anticonceptivos orales antes de los 25 años y por un periodo mayor a veinte años (Danaei et al. 2005).

### **Estilo de Vida**

Estudios epidemiológicos de poblaciones migrantes mostraron la primera evidencia sólida de que los factores culturales/ambientales son factores determinantes en la incidencia de cáncer mamario (Bray et al. 2004). Está bien documentado que en poblaciones asiáticas, que comúnmente presentan una baja incidencia de cáncer mamario en sus países de origen, cuando emigran a países occidentales, incrementan el riesgo y la incidencia de esta enfermedad en las generaciones sucesivas. También se ha observado un incremento en la incidencia de CM en los países en vías de desarrollo que modifican sus hábitos de alimentación y calidad de vida semejantes al de los países desarrollados (Ziegler et al. 1993). Con base en estos hallazgos se han señalado varios factores nutricionales asociados al riesgo/prevención de cáncer mamario. Algunos de los factores que aumentan el riesgo son: 1) la obesidad, 2) el alto consumo de grasa total y grasa saturada, 3) el consumo de carne al carbón quemada o muy cocida, y 4) la ingesta de alcohol. En contraste, los factores que reducen el riesgo son: 1) el consumo de frutas y verduras, 2) el consumo de carotenoides, 3) el consumo de soya y algas marinas, 4) el consumo de fibra y 5) el aumento de la actividad física (Cann et al. 2000; Gerber et al. 2003; Danaei et al. 2005).

## I.6. El yodo en los procesos fisiológicos y neoplásicos.

El yodo es un elemento de la tabla periódica perteneciente a la familia de los halógenos con símbolo I. Al igual que los otros halógenos posee 6 números de oxidación (-1, 0,+1,+3,+5,+7) lo que le confiere la capacidad de formar un gran número de compuestos. En la naturaleza el yodo se presenta más comúnmente en forma de yodatos ( $\text{IO}_3^-$ ). El yoduro ( $\text{I}^-$ ) y el yodo con número de oxidación cero, es decir en forma molecular ( $\text{I}_2$ ), son otras de sus configuraciones naturales. Todas estas formas químicas se encuentran con más abundancia en las aguas marinas que en la tierra sólida. El intercambio de yodo desde el ambiente marino a los ambientes terrestres es mediado por compuestos orgánicos yodados tales como  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{CH}_2\text{CII}$ ,  $\text{CH}_2\text{I}_2$ ,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{I}$ , que por su volatilidad abandonan las aguas marinas para depositarse en la tierra firme (Hou et al. 2009). La introducción de estos compuestos yodados en el ciclo biológico es resultado de numerosas transformaciones tanto espontáneas como mediadas por enzimas. Así el  $\text{IO}_3^-$  es introducido por medio del metabolismo de bacterias y fitoplancton. La reducción del  $\text{IO}_3^-$  a su forma  $\text{I}^-$  se realiza por medio de enzimas que también catalizan la reducción de los nitratos a nitritos. Por medio de peroxidasas el  $\text{I}^-$  es oxidado a forma molecular (Amachi et al. 2007; Kazuaki 2009). Algunos autores demostraron que la internalización del yodo por parte de las células sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten sin dependencia de ATP, características de mecanismos de difusión facilitada (Küpper et al. 1998). Aunque el papel fisiológico más estudiado en vertebrados es su participación en la síntesis de las hormonas tiroideas, numerosos estudios han demostrado la participación de este elemento en muchas más funciones. Efectivamente, numerosas investigaciones han mostrado que el yodo a concentraciones moderadamente altas exhibe variados efectos extra tiroideos (Miller 2006). Se ha demostrado a través de gammagrafía que el radioisótopo  $^{131}\text{I}$  es detectado en estómago, glándulas salivares, líquido periencefálico y mama a partir de 30 minutos después de su administración (Venturi 2010). En 1961 Brown-Grant reportó que algunos órganos concentran transitoriamente el yodo entre los cuales se incluyen: leucocitos, placenta, útero, glándulas lagrimales, plexo coroideo, ojos, corteza suprarrenal, páncreas, hígado, mucosa intestinal,



nasofaringe, piel, y ovarios (Brown-Grant 1961). Aunque no se conoce con certeza el papel fisiológico del yodo en estos tejidos, se ha mostrado que su presencia actúa como un poderoso antioxidante (Hincal 2009). Venturi ha propuesto que la falta de yodo participa en la patogénesis del cáncer gástrico (Venturi 1993). En la tiroides también existen evidencias que correlacionan la carencia de yodo con procesos cancerosos (Belfiore et al. 1987). Se ha observado que la escasez de yodo es suficiente para provocar tanto en el humano como en la rata, atipia, displasia y mayor incidencia de neoplasias en la glándula mamaria (Eskin et al. 1968, Kilbane et al. 2000). Estudios clínicos utilizando yodo molecular a concentraciones milimolares mostraron la disminución significativa tanto en los síntomas como en los procesos inflamatorios de fibrosis mamaria (Ghent et al. 1993; Kessler 2004).

El análisis de datos poblacionales también considera el yodo como compuesto activo contra el desarrollo canceroso. La baja incidencia de cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada en la población japonesa. Según las estadísticas de 1997, la incidencia de cáncer mamario ajustada por edad entre la población japonesa era de 6.6 casos cada 100000 habitantes en comparación con los 22 y los 27 de Estados Unidos e Inglaterra respectivamente (Parker et al. 2008). Además, estudios de migración confirman que la menor incidencia en estas poblaciones es debida a factores ambientales y de estilo de vida más que a elementos genéticos (LeMarchand et al. 1985; Shimizu et al. 1991; Minami et al. 1996; Parker et al. 2008). Entre los factores considerados el más notorio es la alimentación. La alimentación oriental se basa en ingredientes muy distintos respecto a la alimentación occidental, entre los cuales sobresale una alta ingesta de fitoestrógenos (a través de la soya) y de yodo por el consumo de algas marinas (Pisani et al. 1999). Entre las varias familias de algas utilizadas en la dieta japonesa tres son las más conocidas: *nori* (*Porphyra* sp.), *wakame* (*Undaria pinnatifida*) y la *kombu* (*Laminaria* sp.). Se sabe que las algas marinas son almacenes naturales de yodo en numerosas formas químicas. Las algas *nori* y la *wakame* tienen un contenido de yodo de alrededor de 20-40 ug/g mientras que las algas *kombu* contienen una cantidad alrededor de 2500ug/g ( Müssig 2009; Zava & Zava 2011). Dicho estilo de alimentación resulta en una ingesta de yodo en la población oriental de 25 veces mayor respecto a las poblaciones occidentales (Konno et al. 1993). El aumento de la incidencia de cáncer mamario observado en los últimos decenios en la población japonesa moderna parece asociarse en el abandono de la dieta "oriental" tradicional (Zava & Zava 2011).

De las numerosas formas químicas del yodo, no todas tienen la capacidad de contrarrestar las patologías cancerosas. Se ha demostrado que mientras el yoduro es más efectivo en

restablecer un perfil eutiroideo en sujetos hipotiroideos, la forma química más activa como anti-carcinógeno es la forma molecular ( $I_2$ ). Usando el modelo murino de carcinogénesis por N-metil-N-nitrosourea se demostró que la ingesta específica de yodo molecular y no de yoduro o tiroxina, previene la incidencia de cáncer mamario alrededor del 70 por ciento (García-Solís et al. 2005). El yoduro también ha demostrado ejercer efectos antineoplásicos. Sin embargo su actividad es dependiente de peroxidasas (TPO y LPO), indicando que el mediador de dichos efectos es el yodo molecular resultado de la oxidación del yoduro (Vitale et al. 2000; Soriano et al. 2011). Los mecanismos de acción del yodo se dividen en efectos directos o indirectos. Entre los directos se describe su acción antioxidante a concentraciones bajas y oxidante en altas concentraciones actuando sobre la permeabilidad mitocondrial involucrando entre otros la apoptosis mediada por el factor inducible de apoptosis (AIF por su sigla en inglés) (Shrivastava et al. 2006). Entre los efectos indirectos se describen los mediados por la formación de yodolípidos. Varios yodolípidos pueden formarse en la tiroides después de un suplemento moderadamente alto de yodo en la dieta, pero pocos han demostrado tener actividad biológica. Entre ellos destacan el 2-yodohexadecanal (2-IDHA) y la 8,11,14-eicosatrienoic-6-yodo- $\delta$ -lactona (6-IL) derivados de la reacción del yodo con un fosfolípido perteneciente a la familia de las plasménil etanol-aminas y el ácido araquidónico (AA), respectivamente. El 2-IDHA ha demostrado inhibir tanto la síntesis de peróxido de hidrógeno dependiente de NADPH así como la actividad de la adenilato ciclasa. En altas dosis ha mostrado también la capacidad de inhibir tanto la formación dependiente de hormona estimulante de tiroides de adenilato cíclico (cAMP) como la formación de Inositol-3-fosfato (Preedy et al. 2009).

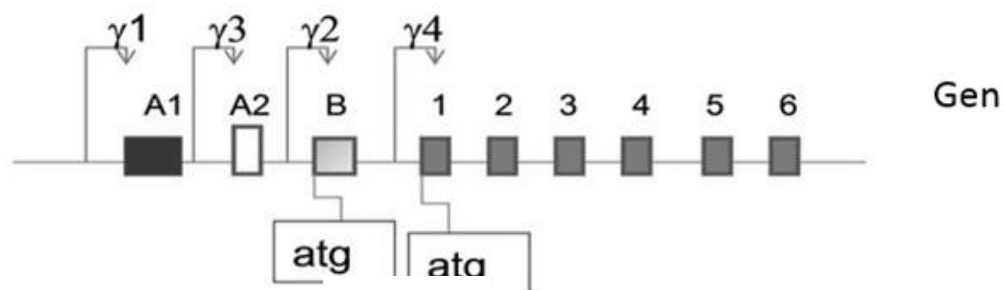
Por otro lado, la 6-IL se produce a partir del ácido araquidónico (AA). El AA es un ácido graso esencial en la composición de la membrana citoplasmática y es el precursor leucotrienos y prostaglandinas, compuestos que median inflamación y la respuesta inmune. También es precursor de tromboxanos presentes en las plaquetas. La 6-IL ha sido detectada in vivo tanto en tiroides como en tejido sano y canceroso de glándula mamaria después de haber administrado concentraciones moderadamente elevadas de yodo molecular en la dieta (Dugrillon et al. 1994; Nuñez-Anita et al. 2009). En un reporte de nuestro laboratorio se observó que las células cancerosas (MCF-7) eran más susceptibles a la inducción de apoptosis que las células mamarias sanas (MCF-12) al ser suplementadas con 200  $\mu$ M de yodo molecular. Esta susceptibilidad se correlacionó con una mayor generación de 6-IL y que dichas células cancerosas contenían una mayor cantidad AA. Por lo tanto se concluyó que el efecto diferencial

del I<sub>2</sub> en células cancerosas estaba relacionado a presencia de AA que constituye en consecuencia el factor limitante en la síntesis de 6-IL (Aceves et al. 2009). Además, a través de un ensayo de retardo electroforético (EMSA por su nombre en inglés), se demostró que la 6-IL se une específicamente y con alta afinidad a las proteínas PPAR, y es capaz de activar los elementos de respuesta específicos (PPRE) en un modelo de trans activación con células MCF-7 (Nuñez-Anita et al. 2009).

### I.7. Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPAR)

Los PPAR son una familia de proteínas que abarca tres miembros: alfa, beta/delta y gama. Su papel es de reguladores del metabolismo energético y sus ligandos endógenos son moléculas derivadas de lípidos. PPAR alfa se encuentra en el hígado y, en niveles menores, en el músculo cardíaco y huesos. La forma beta/delta es ubicua y, aunque no se conocen los detalles, ejerce un efecto general en el control energético. El tipo gama a su vez se encuentra en cuatro distintas isoformas, cada una con su propia ubicación (Fig. 5):

Gama1 es expresada virtualmente en todos los tejidos, incluyendo músculo cardíaco, músculo estriado, colon, riñón, páncreas y bazo. La isoforma Gama 2 se expresa especialmente en tejido adiposo blanco mientras que la Gama 3 se expresa en macrófagos, intestino y tejido adiposo blanco. Por último, la isoforma 4 se encuentra en las células endoteliales (Tyagi & Gupta 2011).







	ARNm	Proteína
PPAR $\gamma$ 1		477aa
PPAR $\gamma$ 2		505aa
PPAR $\gamma$ 3		477aa
PPAR $\gamma$ 4		477aa

Fig.5: Estructura del gen de PPAR $\gamma$  y sus productos. Como se observa las cuatro isoformas son originadas por promotores alternativos. Adaptado de Zappavigna et al. 2013

La estructura de la proteína es constituida por 4 dominios.



El dominio A/B es responsable de reclutar los co-factores para la regulación de la transcripción. El dominio C es un dominio de dedos de zinc y es el sitio de reconocimiento del elemento de respuesta y de interacción con el DNA. D conecta el dominio C con el dominio E/F, en donde se encuentra el sitio de unión a los ligandos (Astraci & Banerjee 2009). Se ha demostrado que el receptor gama, tiene numerosos efectos fisiológicos tanto en el metabolismo de los ácidos grasos como en la mediación de la inflamación, así mismo es relevante en contextos patológicos como la resistencia a la insulina y el cáncer (Astraci and Banerjee 2009). Por su capacidad de disminuir la concentración de glucosa y de revertir la resistencia a la insulina, los agonistas sintéticos de alta afinidad como la Rosiglitazona (RGZ) han sido utilizados en estudios clínicos y propuestos como tratamiento de la diabetes de tipo 2 (Willson et al. 2001). Su activación favorece el almacenamiento y la oxidación de ácidos grasos en adipocitos a través de la activación de la proteína que liga los ácidos grasos (*fatty-acid-binding-protein*, FABs) y de la proteína desacoplante 3 (UCP3). En el músculo, la activación de PPAR $\gamma$  se ha asociado con un incremento de la oxidación de glucosa a través de la regulación de piruvato dehidrogenasa-quinasa (PDK4) y de ácidos grasos por el aumento de UCP3. En los macrófagos, los eventos que participan en la regulación de los ácidos grasos abarcan un aumento en la absorción de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) relacionado al aumento de CD36 y un incremento de la expulsión de colesterol producido por la sobreexpresión de una bomba de membrana ABC (ABCa1). Por último, el hígado en respuesta a los agonistas de PPAR $\gamma$  presenta un aumento en la glucogénesis que se propone ocurre a través de la regulación de fosfoenolpiruvato carboxil-quinasa (PEPCK) (Fig. 6). En conjunto, estos mecanismos provocan un aumento en la sensibilidad a insulina y una disminución en los niveles circulantes de glucosa y triglicéridos (Willson et al. 2001).

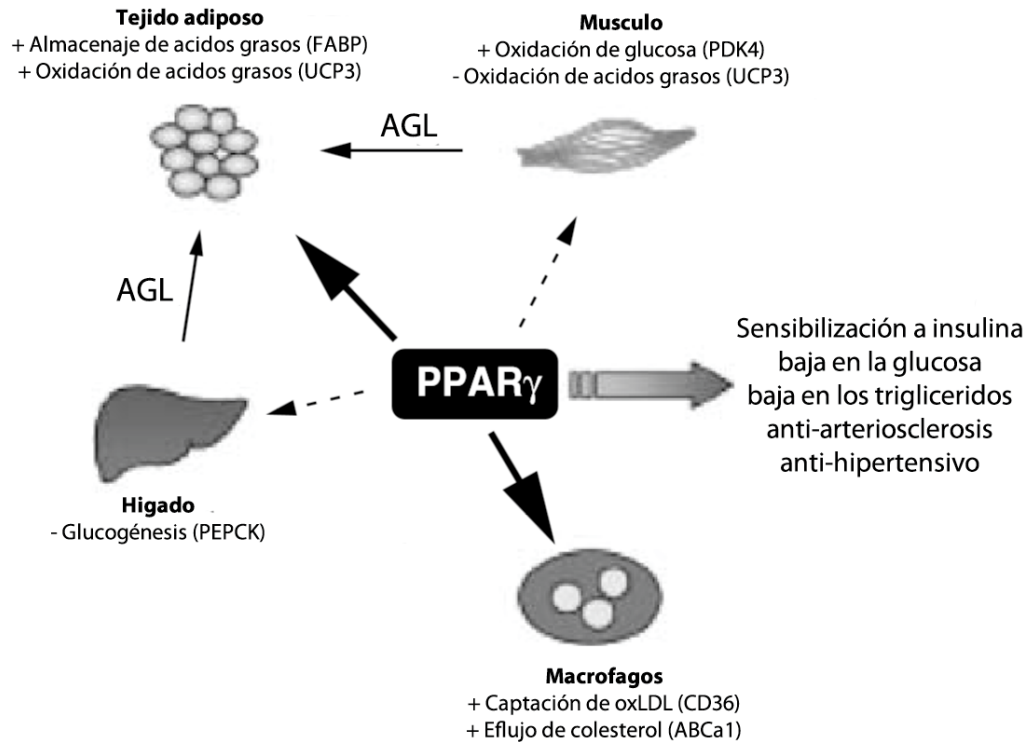


Fig. 6: Esquema de los efectos de la activación del PPAR $\gamma$  sobre el metabolismo de los ácidos grasos. AGL = Ácidos Grasos Libres. Adaptado de Willson et al. 2001.

En relación al cáncer, la activación de PPAR $\gamma$  induce procesos de re-diferenciación en células cancerosas pequeñas de pulmón y en cáncer de cerebro (Chang & Szabo 2000; Pestereva et al. 2012). Se ha demostrado también la reversión parcial de EMT en cáncer anaplásico de tiroides (Aiello et al. 2006). Su activación por agonistas sintéticos como RGZ, Pioglitazona y Trosiglitazona generan disminución en la expresión de las bombas de membrana ABC y por tanto reversión de multi-resistencia (Girnun et al. 2008; Davies et al. 2009; Weiss et al. 2009; Chen et al. 2010), aunque existen reportes donde contrariamente se observa un aumento en la expresión de dichos transportadores (Apostoli & Nicol 2012). Agonistas de PPAR $\gamma$  se relacionan con un aumento en la apoptosis a través de activación de caspasa-3, aumento en el cociente Bax/Bcl-2 y baja en la expresión de survivina y ciclooxigenasa-2 (Liu et al. 2005; Liu et al. 2007; Yang 2013).

## **I.8. Antecedentes específicos**

Numerosos grupos se han enfocado en mejorar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos utilizando moléculas naturales para limitar el establecimiento de quimiorresistencia y para evitar un aumento en la toxicidad. El I<sub>2</sub> ejerce efectos antineoplásicos en distintos cánceres, y su acción parece estar mediada por diversos mecanismos. A una concentración moderadamente alta el I<sub>2</sub> produce una marcada despolarización de la membrana mitocondrial desencadenando la apoptosis (Shrivastava et al. 2006). De forma indirecta y dependiendo del contexto celular, el yodo genera el yodolípido 6-yodolactona (6-IL) que al activar a los receptores PPAR $\gamma$  induce mecanismos de diferenciación y apoptosis. Estudios de nuestro laboratorio demostraron que en co-administración con DOX, el I<sub>2</sub> sinergiza el efecto antineoplásico permitiendo disminuir hasta 4 veces las dosis de DOX manteniendo la eficacia del tratamiento en roedores (Alfaro et al. 2013) y evitando la instalación de quimiorresistencia tanto en roedores como en humanos (Peralta et al. 2011; Alfaro et al. 2013). En este trabajo se desarrolló una línea celular DOX-resistente como modelo para describir los mecanismos moleculares involucrados en dicha quimiorresistencia y analizar la participación del I<sub>2</sub> en dichos procesos.

## **II. Hipótesis**

El yodo posiblemente revierte la quimiorresistencia en células MCF-7/D resistentes a través de la activación de los receptores PPAR $\gamma$  induciendo la re-diferenciación celular a un fenotipo sensible y menos agresivo.

## **III. Objetivos**

### **III.a Objetivo General**

Analizar el efecto del yodo molecular en los mecanismos de quimiorresistencia inducidos por Doxorubicina.

### **III.b Objetivos Específicos**

1. A partir de la línea celular MCF-7 silvestre (MCF-7/W), establecer un modelo celular de quimiorresistencia mediante su exposición continua a bajas concentraciones de DOX (MCF-7/D).
2. Cuantificar la expresión de genes involucrados en la quimiorresistencia y caracterizar el efecto de I<sub>2</sub> sobre dichas expresiones.
3. Caracterizar las poblaciones de tipo troncal y EMT presentes de las células MCF-7/D en presencia de DOX y/o I<sub>2</sub>.

## **IV. Materiales y métodos**

### **IV.1. Cultivos celulares**

Se utilizaron células MCF-7 (ATCC® HTB-22) obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC). Dicha línea celular fue obtenida a partir de una metástasis pleural y es ampliamente utilizada como modelo de adenocarcinoma mamario bien diferenciado y positivo para receptores de estrógeno. Además esta línea celular se ha utilizado como línea preferencial para el establecimiento de sub-líneas quimiorresistentes. Todos los cultivos se llevaron a cabo en medio DMEM (GIBCO) Suero bovino fetal (FBS) al 10% y 100U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina. Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **IV.2. Establecimiento de línea quimiorresistente (MCF-7/D) a partir de MCF-7/W**

A partir de la línea celular de MCF-7 silvestre (MCF-7/W) se obtuvo una línea MCF-7 resistente a Doxorubicina a través de tratamientos con Doxorubicina (10nM) en solución acuosa por lo menos por 4 pasajes (aprox. 30 días).

La Doxorubicina se utilizó en la forma farmacéutica de Adriblastina (farmacéutica Pfizer) con la siguiente composición: 250mg fructosa/5mg metilparabeno cada 50mg de clorhidrato de Doxorubicina (P.M. 579,99g/Mol). Por lo tanto se siguió la siguiente proporción para preparar las soluciones: 6.1mg Adriblastina = 1mg de Doxorubicina-HCl pura.

### **IV.3. Determinación de proliferación celular y cálculo del coeficiente de interacción.**

Se sembraron 25000 células en cada pozo de cajas de seis pozos de 3.5 centímetros. Al día siguiente se hizo un conteo inicial para verificar el número efectivo de células sembradas obteniendo el valor de tiempo cero (T0) y se inició el tratamiento experimental. El medio se cambió diariamente repitiendo los tratamientos específicos. Al grupo I<sub>2</sub>/DOX los dos compuestos fueron administrados juntamente. A las 96 horas las células se trataron con 1ml de tripsina se disgregaron por pipeteo y se contaron en cámara Neubauer contabilizando 5 campos. Todos los ensayos se hicieron por duplicado. La cuantificación se repitió por lo menos en tres experimentos independientes.

El coeficiente de interacción (CI) se calculó con la siguiente fórmula modificada de Gong et al.

$$CI=AB/(AxB)$$

Donde AB es el cociente entre proliferación celular en co-tratamiento sobre control. A y B representan los cocientes de proliferación con tratamiento con I<sub>2</sub> y DOX en mono-tratamiento sobre el control. Se considera que existe efecto sinérgico en valores inferiores a 1, efecto aditivo valores iguales a uno y efecto inhibitorio con valores mayores a 1. El método propone que efectos sinérgicos significativos son con valores inferiores a 0.7 (Gong et al. 2010). Por simetría proponemos que los efectos inhibitorios significativos se consideren con valores mayores a 1.3 por lo tanto los valores en el rango entre 0.7 y 1.3 se consideran como efecto aditivo.

### **IV.4. Expresión de genes implicados en la quimiorresistencia (RT-qPCR en tiempo real)**

El RNA total se obtuvo a partir de los cultivo después de 72 horas de tratamiento como sigue. La suspensión celular obtenida por tripsinización se centrifugó a 2500 RPM (635xg) por 2 minutos. Se retiró el sobrenadante y se re-suspendieron las células en PBS para limpiar los restos de tripsina. Se centrifugaron nuevamente, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 ml de trizol (invitrogen). Se mezcló por pipeteo para permitir la lisis celular. Se agregaron 200µL de cloroformo (Sigma), se mezcló suavemente por inversión. Se centrifugó 10 minutos a 12000



RPM (13684xg) a 4°C. Se separó la fase acuosa y a ésta se le adicionó 0.5ml de isopropanol (Sigma), se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 12000RPM (13684xg) a 4°C para la formación del botón. Se retiró el sobrenadante y se enjuagó el botón con 1 ml de EtOH 75%. Por centrifugación a 7500 RPM (5345xg) por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó secar por 30-45 minutos. Se resuspendió el botón en 50µl de agua destilada estéril y se guardaron a -70°C por lo menos por 24 horas. Se cuantificó la cantidad de RNA por espectrometría (Nanodrop 2000 Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) a una longitud de onda de 260nm. La calidad del RNA se analizó a través de electroforesis en agarosa al 2% por medio de fluorescencia con bromuro de etidio. La amplificación del cDNA se realizó a partir de 2 µg del RNA total y como inicializador de polimerización en las siguientes reacciones de PCR se utilizó el oligo antisentido correspondiente a cada gen a una concentración final de 2 nM. Se incubó 5 minutos a 70°C y después se adjuntaron 10µl de una mezcla compuesta como sigue: 5µl de buffer de reacción 5x, 0.7µl RNasinout y 1.25µl dNTPs 10pM, 1µl de transcriptasa inversa (M-MLV reverse transcriptase 200U/µl, Promega) y 2.05µl de dH<sub>2</sub>O. La mezcla final se incubó una hora a 40°C en termociclador (DNA thermal cycler 480, Perkin Elmer). Los cDNA se utilizaron en la cuantificación de MDR-1, ABCg2, BCL-2, Bax, vimentina, E-caderina, CD24, PPARγ, p21 por medio de un equipo rotor-gene RG 3000, Corbett research con el siguiente protocolo: a 0.5µl de cDNA se adicionó una mezcla de los oligos sentido y antisentido (0.4µl a concentración de 10pMol/µl, concentración final de cada uno 400 nM), 5ul de mezcla de reacción (Maxima Sybr green/Rox qPCR, Fermentas #cat. K0221) y agua hasta el volumen final de 10µl. El perfil de amplificación se muestra en Tabla 2.

La expresión de cada gen se normalizó por un gen estructural (Actina β). Las secuencias de los oligos para Vimentina, E-caderina, CD24, Bcl-2 y Bax se encontraron en literatura mientras que PPARγ, p21, MDR-1 y ABCg2 se diseñaron utilizando Primer-BAST

(Secuencias en Tabla 1)

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

Para evaluar la calidad de los productos se analizaron las respectivas curvas de disociación. Los experimentos se repitieron por lo menos tres veces por triplicado.

Gen	Oligo sentido	Oligo antisentido	pb amplicón
ABCg2 NM_001257386.1	AGTGTTTCAGCCGTGGAAC	GCATCTGCCTTTGGCTTCAA	194
Bax NM_001291428.1	AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAGCGC	TCCCGCCACAAAGATGGTCACG	415 327 366
Bcl-2 NM_000633.2	GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA	AGGCACCCAGGGTGATGCAA	306
Birc5(survivina) NM_001168.2	TTCTCAAGGACCACCGCATC	CCAAGTCTGGCTCGTTCTCA	126
CD24 NM_013230.3	CCCACGCAGATTTATTCCAG	GACTTCCAGACGCCATTTG	255
E-Caderina NM_004360.3	TGCCCAGAAAATGAAAAGG	GTGTATGTGGCAATGCGTTC	200
MDR-1 NM_000927.4	GAGAGATCCTCACCAAGCGG	ATCATTGGCGAGCCTGGTAG	122
P21 NM_000389.4	GACCATGTGGACCTGTCACT	GCGGATTAGGGCTTCCTCTT	176
Vimentina NM_003380.3	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	GCTTCTGTAGGTGGCAATC	163
Actina- $\beta$ NM_001101.3	CCATCATGAAGTGTGACGTTG	ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	175

Tab. 1: Se reportan los nombres, los símbolos de las variantes amplificadas, las secuencias de los oligos y el tamaño de los amplicones en pares de bases de los genes medidos en este estudio.

Fase	Temperatura(°C)	Tiempo	Repeticiones
Hotstart	95	10 min.	x1
Melting	95	15 sec.	x35
Anealing	60	30 sec.	
Elongation	72	30 sec.	
Melting curve	De 65 hasta 95	-	x1

Tab. 2: Programa de la PCR en tiempo real. La fluorescencia del Cybr green se detectó al final de cada fase "Elongation"

#### **IV.5. Caracterización de sub-poblaciones de tipo troncal y EMT.**

La tinción por los marcadores de troncalidad (CD44 y CD24) se realizó de la siguiente manera: después de tratar las células con DOX/I<sub>2</sub> durante 72 horas se realizó un lavado con PBS y se despegaron con EDTA 0.05% / PBS. A una alícuota de 1-2x10<sup>6</sup> células se adicionó EDTA 0.05%, suero fetal bovino (BSA) 0.05% y anticuerpos contra CD24 (Abcam, Cambridge, Reino Unido; acoplados a PE cat. #AB77219) y CD44 (BD Biosciences, San José, California, EE.UU., acoplado a FITC cat. #BD560977) ambos en proporción 1:50 en PBS. Posterior a una hora de incubación en hielo se realizó un lavado en PBS y se fijaron con formaldehído al 2% durante 10 minutos; nuevamente se lavaron las células en PBS y se resuspendieron en 1 ml de PBS para su análisis.

Para la tinción de los marcadores de EMT (E-Caderina y Vimentina), se realizó la separación de las células con una solución de tripsina-EDTA, se lavaron con 0.05% de EDTA/PBS y se fijaron en formaldehído al 2% (diluido en PBS) durante 10 minutos en hielo. Las células se permeabilizaron con una solución 1:1 de metanol/acetona a -20°C durante un minuto. Después de un lavado con PBS, se incubaron durante una hora en hielo con anticuerpos anti E-Cad acoplados a Alexa647 (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU. dilución 1: 2000 cat. #BD560062) y Vim acoplado a PE (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU. dilución 1:20 cat. #BD562337). Posteriormente se realizó un último lavado y las células se resuspendieron en 1 ml de PBS.

Para el análisis de las poblaciones se utilizó un citómetro de flujo BD Biosciences Accuri C6. Se aplicó VirtualGain® para normalizar la fluorescencia de fondo entre los tratamientos. Los datos fueron adquiridos y visualizados usando el software BD Biosciences Accuri C6.

#### **IV.6. Cuantificación intracelular de DOX.**

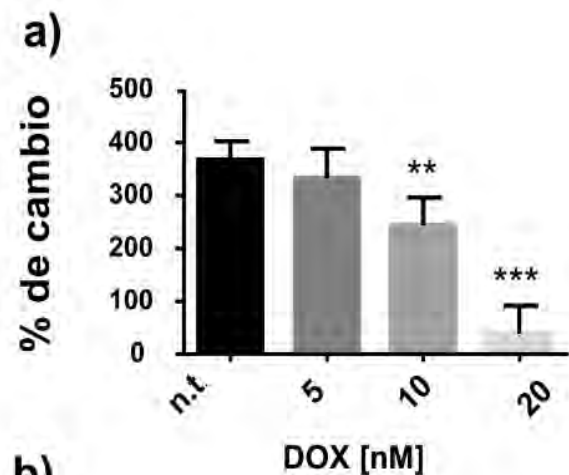
Después de un pretratamiento de 72 horas con I<sub>2</sub> 200 µM, el medio de los cultivos fue reemplazado con Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM), y las células se incubaron durante una hora. Se añadió una solución concentrada de DOX directamente al cultivo y se realizó una incubación de 1.5 horas a 37°C. Posteriormente se adicionó una solución de tripsina-EDTA 0.05% para despegar las células. Una muestra con 1-2x10<sup>6</sup> células se fijó con formaldehído al 2% (diluido en PBS). La fluorescencia de DOX se detectó con el citómetro de

flujo BD Biosciences Accuri C6 con excitación a 488 nM y filtro de emisión 585/40. Los datos fueron adquiridos y visualizados usando el software BD Biosciences Accuri C6.

## **V. Resultados**

### **V.1. Establecimiento y caracterización del modelo de exposición a baja concentración de DOX y estandarización de los tratamientos con DOX.**

Con el propósito de analizar del efecto del I<sub>2</sub> sobre la quimiorresistencia fue necesario establecer un modelo de quimiorresistencia que reflejara la condición clínica de exposición al fármaco (DOX) y sucesivamente definir las características de dicho modelo. Inicialmente analizamos a través de ensayos de proliferación el efecto de la DOX para determinar su potencia. La curva dosis-respuesta de DOX mostró una disminución de la proliferación alrededor del 50% a una concentración de 10 nM mientras que a 20 nM se produjo un arresto total de la proliferación (Fig. 7a). Durante el protocolo para la obtención del modelo de resistencia se determinó la dinámica de crecimiento para analizar el proceso de desarrollo de la resistencia. Se observó un retraso en el crecimiento de los cultivos después de los primeros dos pasajes (8 y 14, días respectivamente) recuperándose la tasa de duplicación después de 25 días de cultivo. Se consideró que las células eran DOX resistentes después de los 30 días de cultivo (Fig. 7b). El tratamiento crónico con 10 nM DOX se asoció a menor sensibilidad al fármaco como se demuestra en la reactivación de la proliferación de la línea MCF7/D (Fig. 7c). Con el fin de definir molecularmente los cambios entre la línea silvestre y la resistente se analizó la expresión de marcadores relacionados con quimiorresistencia y se detectó un aumento en la expresión de p21, Bcl-2 y MDR-1 (Fig. 7d). La interrupción del tratamiento crónico en MCF-7/D se reflejó en una disminución de la expresión de p21 y MDR-1.



**b)**

Pasaje después de tratamiento	Días necesarios para alcanzar confluencia al 80%	
	control	10 nM DOX
1	4	8
2	4	14
3	4	3
4	4	4

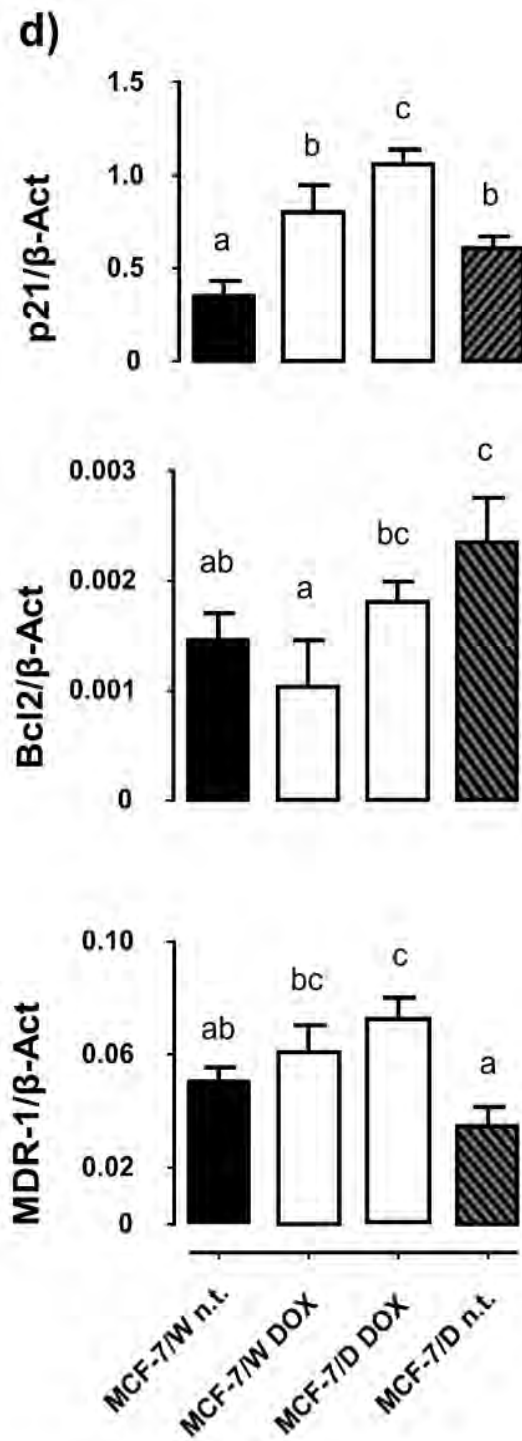
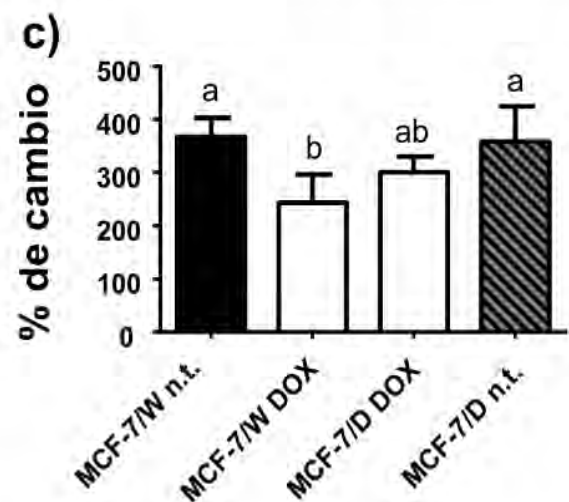
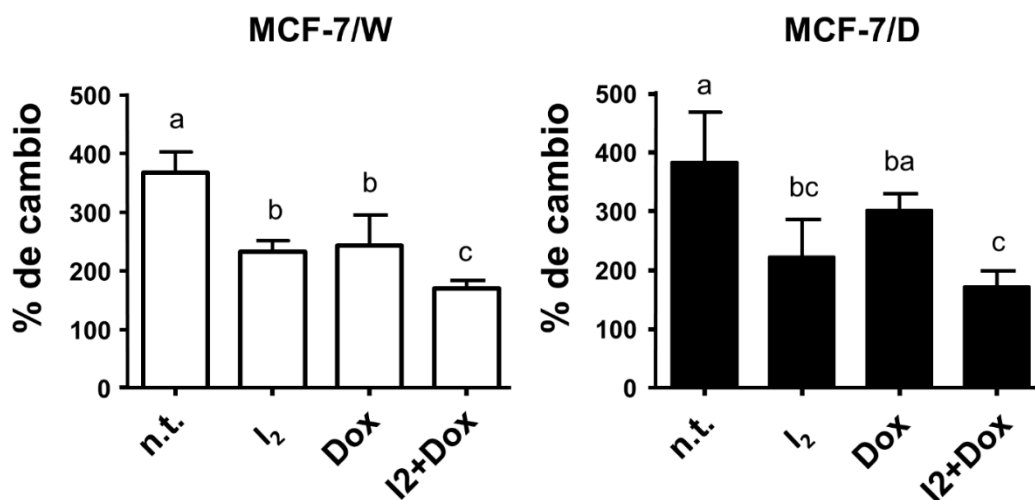


Fig. 7: a) Proliferación dosis-respuesta de DOX en MCF-7/W. b) Dinámica de crecimiento de las MCF-7/W durante el protocolo de instalación de quimiorresistencia. c) Proliferación de MCF-7/W y MCF-7/D después de 96 horas de tratamiento con DOX respecto a células no tratadas (n.t.) d) Expresión diferencial de genes en ambas líneas celulares después de 72 horas de tratamiento. Letras distintas representan una diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).  $n \geq 3$  ANOVA 2-vías Tukey post hoc test.  $\pm$ SD

## V.2. Sensibilidad de las líneas celulares a yodo y análisis del coeficiente de interacción

Obtenido el modelo y definidas sus características se realizó un ensayo de proliferación en triplicado para determinar el nivel de sensibilidad al yodo de dicha línea celular con 10 nM de DOX (Fig. 8). Se observó que 96 horas de tratamiento con  $I_2$  indujeron una inhibición de la proliferación de aproximadamente el 35% y el co-tratamiento inhibió en aproximadamente el 55% en ambas líneas celulares. Con el fin de entender cuantitativamente la naturaleza y la magnitud de la interacción entre  $I_2$  y DOX se calculó el coeficiente de interacción (CI) el cual reveló que en co-administración los dos compuestos ejercen un efecto de tipo aditivo (Fig. 8).



### Coeficiente de Interacción (CI)

MCF-7/W	MCF-7/D
1.11	0.98

Fig. 8: Efecto de DOX y  $I_2$  en la tasa de proliferación (Exclusión de Azul de Tripano) y coeficiente de interacción en las líneas celulares silvestres (MCF-7/W) y DOX-resistente (MCF-7/D). 96 horas de tratamiento,  $I_2$  200uM, DOX 10nM. Letras distintas representan una diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).  $n \geq 3$  ANOVA 2-vias Tukey post hoc test.  $\pm$ SD

Para analizar los mecanismos moleculares involucrados en la quimiorresistencia y la respuesta al yodo se analizó la expresión de genes (RT-PCR tiempo real) relacionados con arresto celular, apoptosis y los posibles mediadores funcionales. La administración de yodo tanto solo como en combinación con DOX resultó en un aumento en la inducción de apoptosis (cociente Bax/Bcl-2) en ambas líneas celulares, resultado principalmente por la disminución en la expresión de Bcl2. Survivina no mostró diferencias en ningún tratamiento y en ninguna de las líneas celulares (Fig. 9).

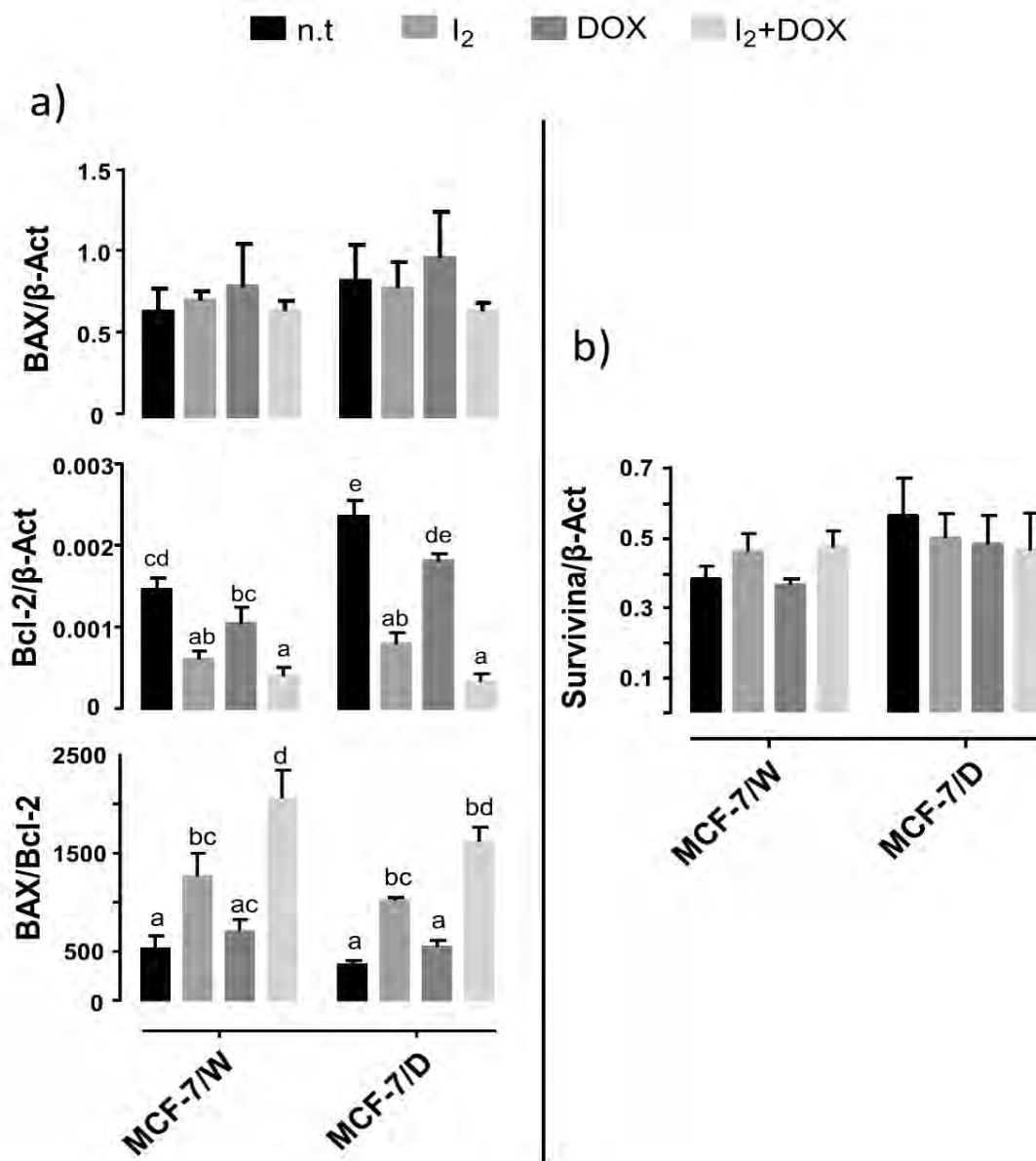


Fig. 9: Cuantificación de la expresión de genes asociados a apoptosis (a) y sobrevivencia (b). 72 horas de tratamiento. Letras distintas representan una diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).  $n = 3$ . ANOVA 2-vías. Tukey post hoc test.  $\pm$ SD

La expresión de la proteína p21 incrementó en presencia de DOX en ambos tipos celulares, siendo significativamente más estimulada en las células resistentes a DOX (MCF-7/D). La combinación I<sub>2</sub>/DOX canceló dicho aumento (Figura 10). En relación con los PPAR $\gamma$ , el yodo incrementó significativamente la expresión del receptor en ambas líneas celulares independientemente de la presencia de DOX (Figura 10).

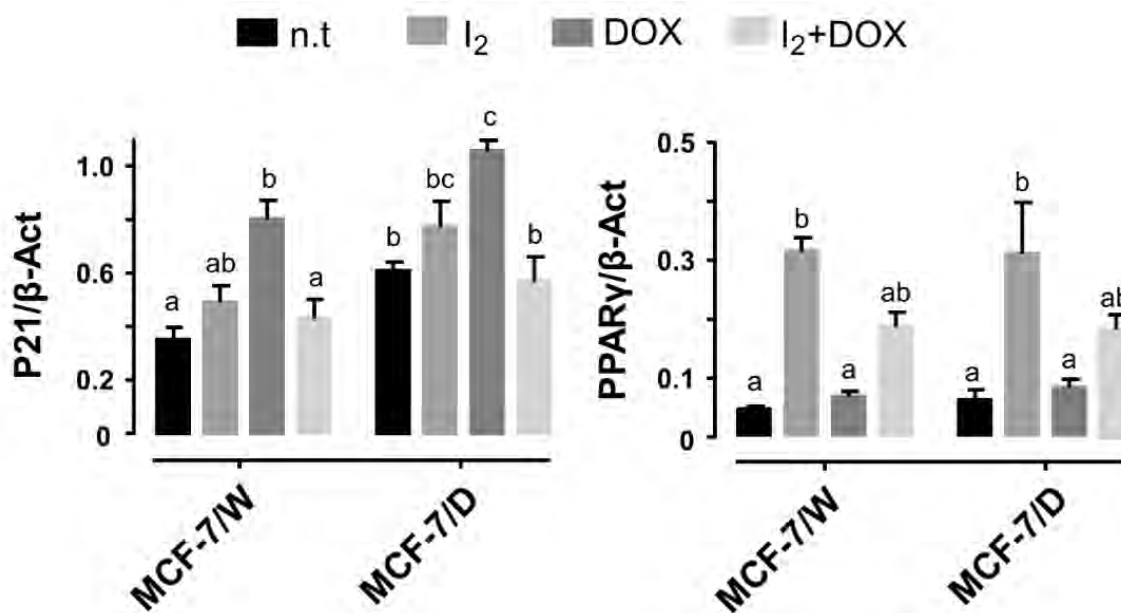
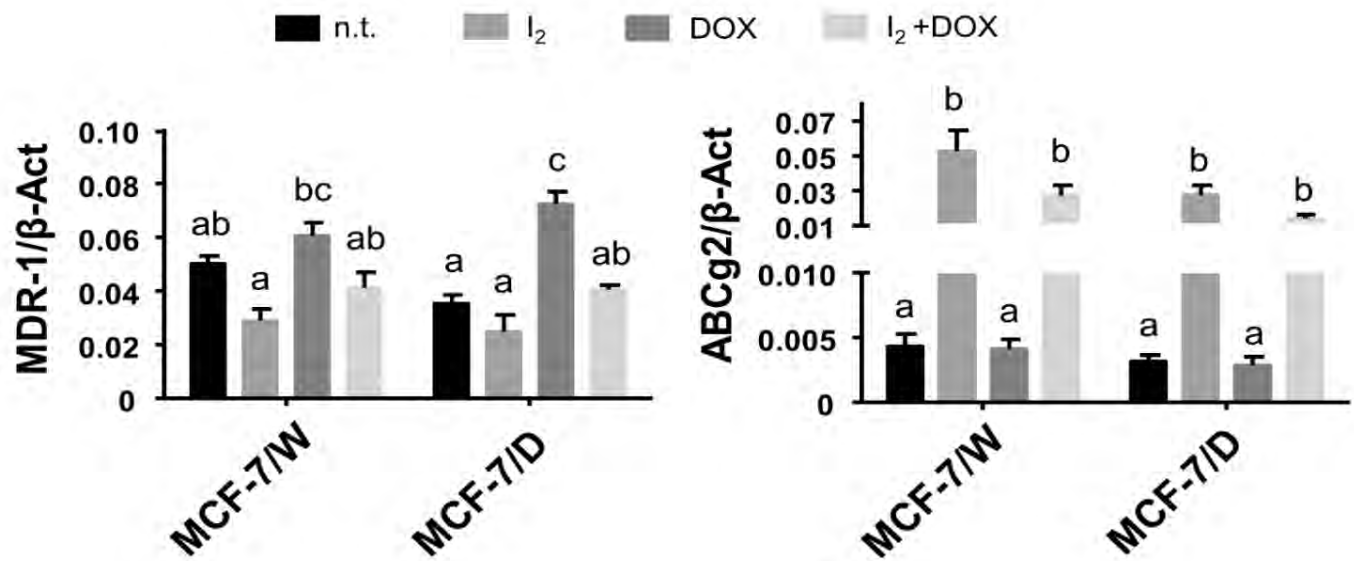


Fig. 10: Análisis de la expresión de p21 y PPAR $\gamma$ . Letras distintas representan una diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).  $n = 3$ . ANOVA 2-vías Tukey post hoc test.  $\pm$ SD

Con respecto a los mecanismos de expulsión de fármacos, se analizaron dos de los principales transportadores de membrana descritos para la quimiorresistencia a DOX: MDR1 y ABCg2. El análisis mostró que la presencia de DOX induce la expresión de MDR-1. El suplemento de yodo no modificó por sí solo la expresión de este transportador, pero evitó el incremento inducido por DOX. En el caso del transportador ABCg2, solamente el yodo estimula significativamente su expresión (Fig. 11).





**Fig.11:** Análisis de la expresión de MDR-1 y ABCG2, dos proteínas pertenecientes a la familia ABC involucradas en la expulsión de DOX. Letras distintas representan una diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).  $n = 3$ . ANOVA 2-vías Tukey post hoc test.  $\pm$ SD

Para investigar si los cambios en la expresión de los transportadores correlacionaban con la expulsión de DOX, se analizó su contenido intracelular mediante la evaluación de su fluorescencia por citometría de flujo. El tratamiento con I<sub>2</sub> por 72 horas se acompañó de una mayor retención de DOX (Fig. 12).

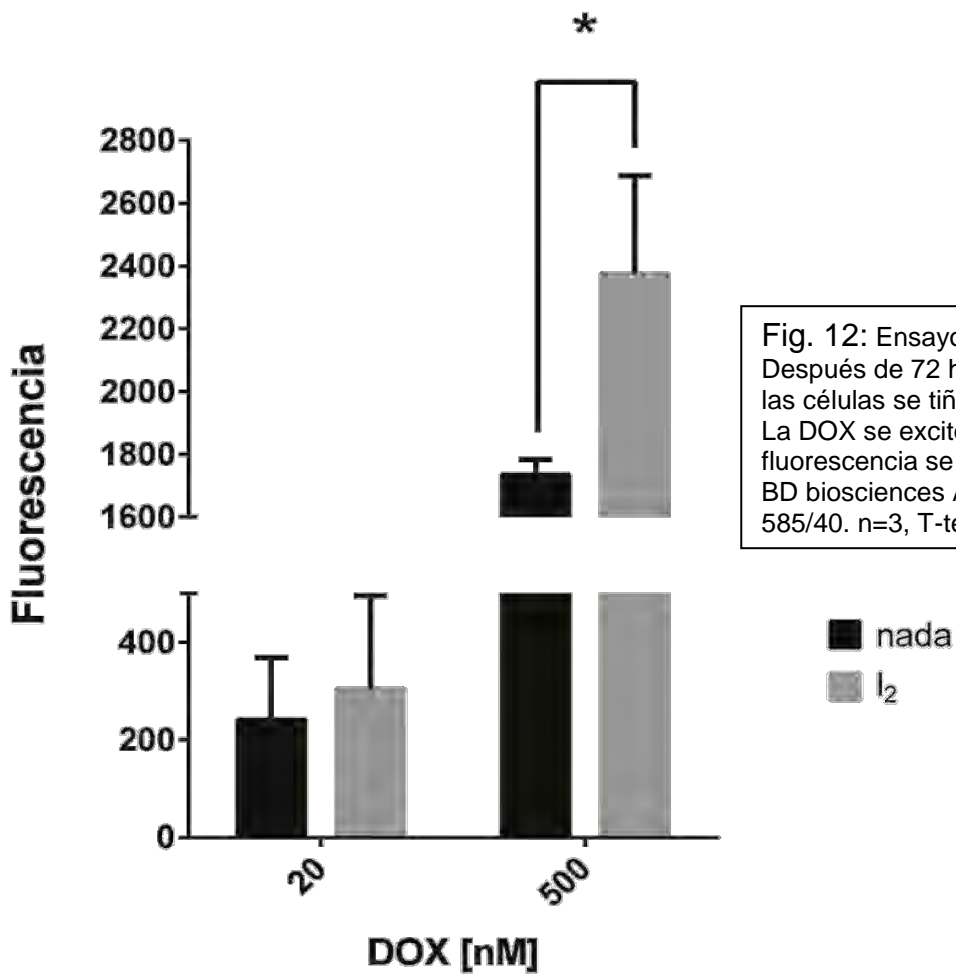


Fig. 12: Ensayo de retención de DOX. Después de 72 horas de pretratamiento con I<sub>2</sub> las células se tiñeron con DOX a 20 o 500 nM. La DOX se excitó con láser 488nm y la fluorescencia se detectó en citómetro de flujo BD biosciences Accuri C6 a través de filtro 585/40. n=3, T-test. ±SD

#### V.4. Análisis de los fenotipos CTC y EMT.

El análisis citométrico de los marcadores de CTC (CD44 y CD24), para entender el efecto tanto de DOX como de I<sub>2</sub> sobre la población troncal, mostró que el tratamiento con DOX no altera la expresión de dichos marcadores en las células MCF7/D. De hecho, la población con perfil canónico de CTC (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) que se esperaba como predominante en estas células, mostró ser poco representativa (2%). Por otro lado, el I<sub>2</sub> generó una disminución de la población CD44/CD24 doble positiva asociado con un aumento en la población doble negativa (CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>). El tratamiento con I<sub>2</sub> incrementó moderadamente la población con perfil CTC canónico (6%) (Fig. 13).

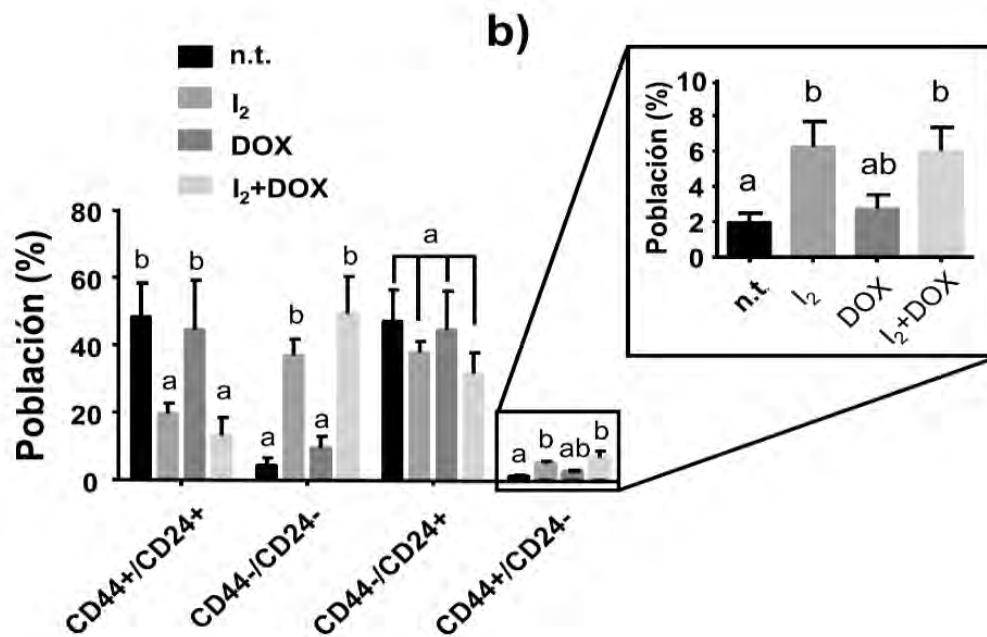
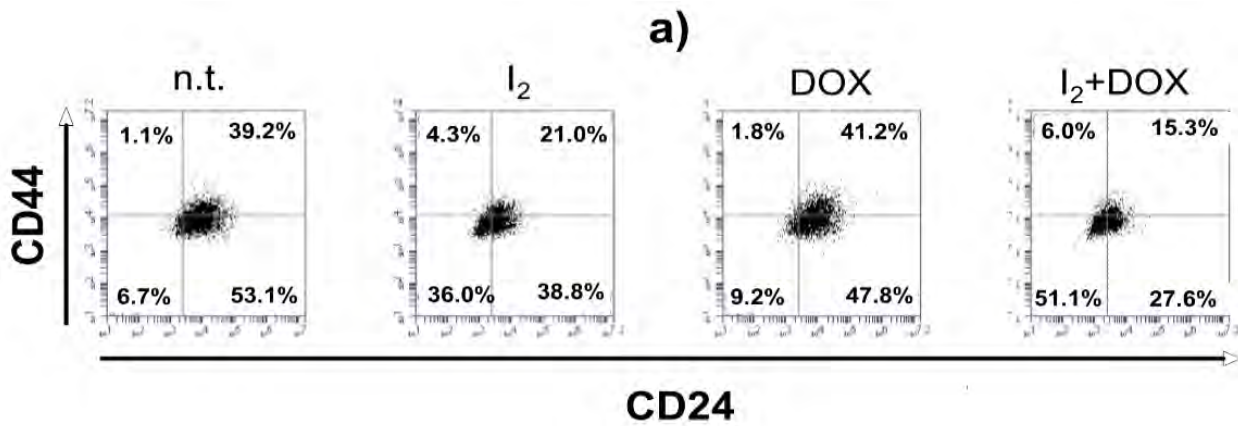


Fig. 13: Citometría de los marcadores CD44 y CD24. a) se reporta un diagrama de salida de BD Accuri C6 software como referencia. b) Cuantificación de la distribución de la población en tres ensayos independientes. En el marco se muestra en detalle la población con marcaje canónico por CTC. Letras distintas representan diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).  $n = 3$ , ANOVA 1-vía, Tukey post hoc test.  $\pm$ SD

La citometría de los marcadores de EMT reveló que las poblaciones más abundantes en las MCF-7/D son las E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup> y E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>-</sup> (Figura 14a). No se detectaron niveles en la población con perfil de EMT (E-Cad<sup>-</sup>/Vim<sup>+</sup>). La administración de DOX sola no produjo ningún cambio en las sub-poblaciones seleccionadas. En contraste, el tratamiento con I<sub>2</sub> tanto solo como en coadministración indujo una selección de la población considerada como normal (E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>-</sup>) con una significativa disminución en la población doble positiva. Este efecto también se confirmó a través del análisis de expresión por RT-qPCR, donde se observó una disminución en la expresión de Vim pero no de E-Cad en estas células (Fig.14b).

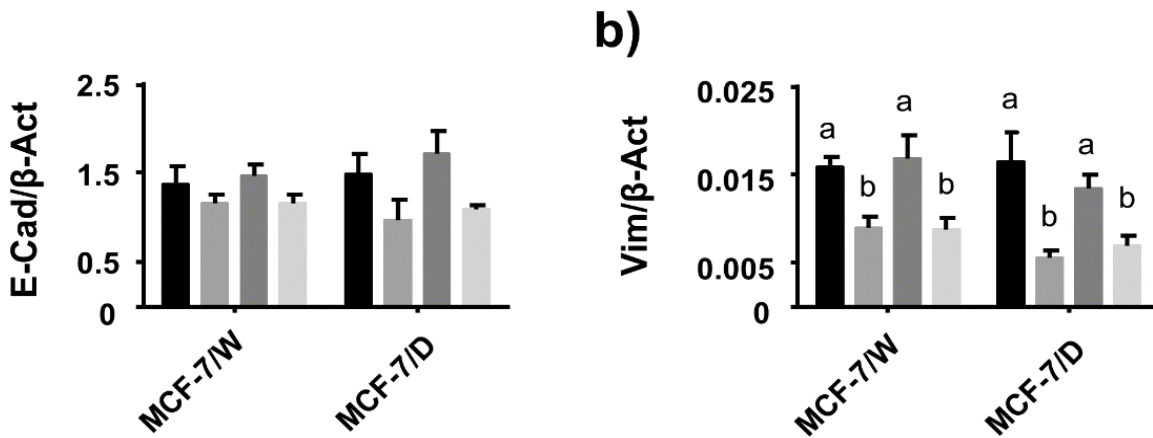
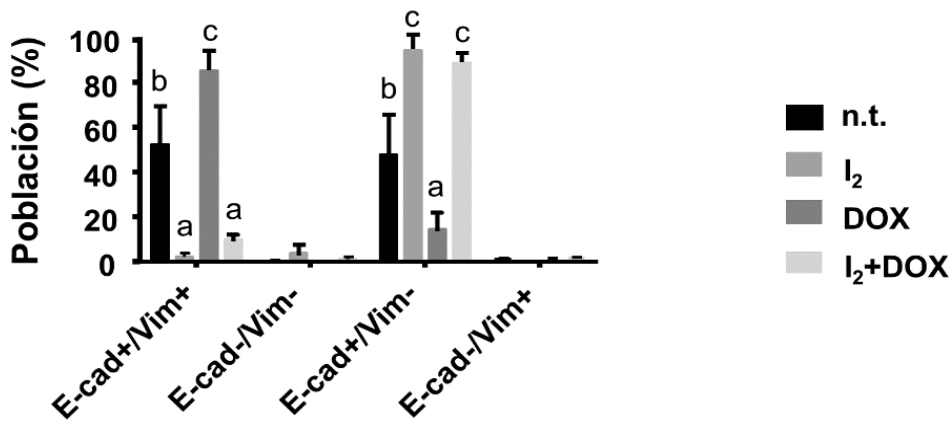
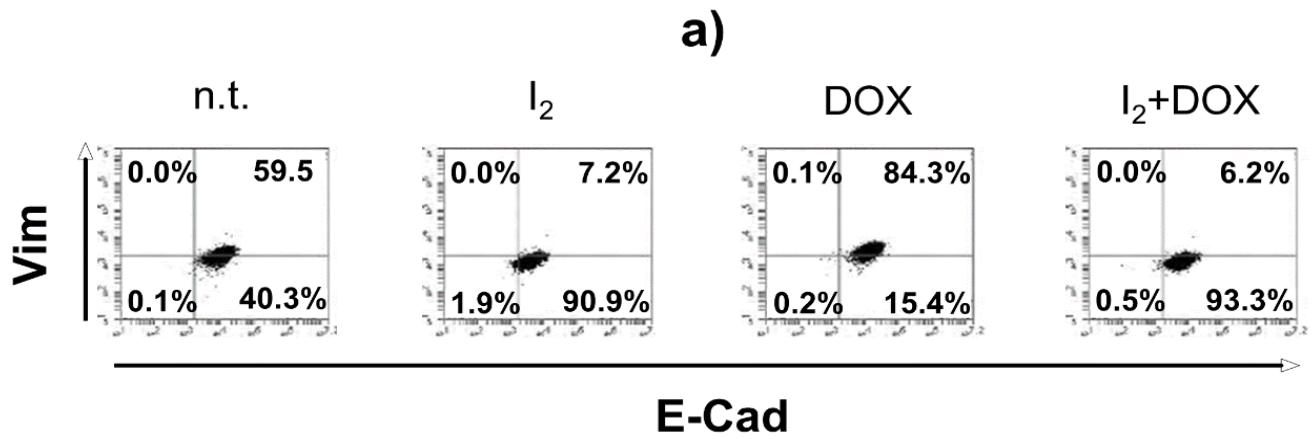


Fig. 14: a) Citometría de los marcadores E-Caderina y Vimentina. Se reporta un diagrama de salida de BD Accuri C6 software como referencia y la cuantificación de la distribución de la población en tres ensayos independientes. b) Evaluación de la expresión de E-Cad y Vim por RT-qPCR en células MCF-7/D después de 72 horas de tratamiento. Letras distintas representan una diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).  $n=3$ , ANOVA 1-vía, Tukey post hoc test.  $\pm$ SD

## VI. Discusión

Protocolos experimentales de múltiples etapas se han utilizado comúnmente para establecer modelos *in vitro* para el estudio de la quimiorresistencia. Sobre la base de este método, las células resistentes se seleccionan a través de tratamientos con concentraciones crecientes de DOX a partir de concentraciones nanomolares hasta milimolares, dependiendo del autor (Mehta 1994; Kars et al. 2006; Calcagno et al. 2008; Calcagno et al. 2010). Sin embargo, como señaló Calcagno (Calcagno et al, 2008), este modelo tiene una correlación débil con la realidad clínica, donde los tumores no sufren de incrementos subsecuentes, ni concentraciones tan altas de DOX durante los tratamientos clínicos convencionales (Lankelma et al, 1999; Weinberg et al, 2007). Por esta razón, en este trabajo se utilizó un tratamiento de una sola concentración durante 30 días, lapso que se asemeja al intervalo que separa un ciclo de tratamiento del siguiente en la práctica clínica. En nuestra experiencia DOX a baja concentración (10 nM) favorece la adaptación a la droga, como es sugerido por la tasa normal de proliferación celular y la disminución de la sensibilidad a la DOX. A nivel molecular, el efecto antineoplásico de DOX es consecuencia de una variedad de mecanismos; los más conocidos son su capacidad para intercalarse en el DNA y la habilidad de formar un complejo con la Topoisomerasa II $\alpha$  y el DNA que desencadena la apoptosis, aparentemente a través de la vía de p53-caspasas (Järvinen et al. 2000; Thorn et al. 2012). Numerosos informes concuerdan que las células DOX resistentes se adaptan por la disminución de la expresión de la topoisomerasa II $\alpha$ , así como por el aumento de la expresión de transportadores membranales y de mensajeros anti-apoptóticos (Calcagno et al. 2008; AbuHammad and Zihlif 2013). Algunos de estos mecanismos se observaron en nuestras células MCF-7/D, tales como la detención del ciclo celular (sobre-expresión de p21), mayor expulsión del fármaco DOX (sobre-expresión de MDR-1) y la evasión de la apoptosis (incrementos en Bcl-2), lo que indica que estas células pueden considerarse como un modelo de células quimiorresistentes.

El aumento aparentemente paradójico en la expresión de p21 en respuesta a DOX en ambos tipos celulares concuerda con informes recientes que muestran que p21 puede ejercer tanto efectos anti-como pro-apoptóticos en respuesta a los fármacos anti-tumorales, dependiendo del tipo de tejido y del contexto celular (Abbas & Dutta 2009). Los fármacos citotóxicos actúan habitualmente en células en mitosis en las que desencadenan la apoptosis mediante la inducción de daño en el DNA. A partir

de esto, es razonable suponer que las primeras alteraciones celulares en reacción a esas drogas pueden incluir la evasión de la apoptosis y la quiescencia celular. Esta afirmación parece contrastar con nuestro hallazgo de que las células MCF-7/D re-adquieren la velocidad de proliferación del tipo silvestre. Sin embargo el análisis poblacional de estas células DOX resistentes mostró la presencia de varias subpoblaciones que podrían tener diferentes tasas de proliferación. Estudios encaminados a analizar la tasa de proliferación y la expresión diferencial de esta proteína (p21) están en curso en nuestro laboratorio.

El objetivo principal del presente trabajo fue analizar el efecto de I<sub>2</sub> en la instalación de mecanismos de quimio-resistencia. Como se ha mencionado antes, el I<sub>2</sub> ejerce un efecto apoptótico directo a través de la despolarización de la membrana mitocondrial y/o por una acción indirecta a través la formación de 6-yodolactona (6-IL). Este yodolípido se genera por yodación del ácido araquidónico y mediante su acción agonista en los receptores PPAR $\gamma$  ejerce efectos antineoplásicos como la inducción de apoptosis y de diferenciación (Nuñez-Anita et al. 2009; Nava-Villalba et al. 2015). En el presente trabajo, el I<sub>2</sub> mantiene su efecto apoptótico independientemente de los mecanismos de resistencia a DOX adquiridos por las células MCF7/D. Varios informes han demostrado que la adaptación a DOX confiere resistencia a otros fármacos, principalmente por la sobreexpresión de transportadores ABC (Kars et al. 2006; AbuHammad & Zihlif 2013). Es posible que estos transportadores de membrana no transporten yodo. De hecho, nuestros resultados muestran que el I<sub>2</sub> *per se* inhibe moderadamente la expresión de MDR-1, pero evita significativamente la inducción de MDR-1 en respuesta a la exposición a DOX en MFC-7/D. Estos hallazgos sugieren que los cambios asociados al tratamiento de I<sub>2</sub> son capaces de interferir con la instalación de la resistencia a DOX. Una observación interesante es el aumento significativo de la expresión del transportador ABCg2 en ambas líneas celulares tratadas con I<sub>2</sub>. Está bien documentado que la activación de PPAR $\gamma$  regula de manera inversa la expresión de los transportadores, disminuyendo la expresión de MDR-1 y aumentando la de ABCg2. Aunque el gen MDR-1 no contiene elementos de respuesta a PPAR, estos receptores ejercen efectos inhibitorios sobre la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, que participa directamente en la regulación de MDR-1 (Moldes et al. 2003; Krause et al. 2010; Zhang et al. 2015). Por otro lado, ABCg2 se estimula directamente por los agonistas de PPAR $\gamma$  (Weiss et al. 2009) y aunque estos transportadores se sobre-expresan en algunos tipos de tumores, también se ha detectado en varios tejidos normales tales como el intestino, hígado, cerebro, placenta, glándulas mamarias, etc. (Liang et al. 2015). Además, esta proteína de resistencia (ABCg2) se induce fuertemente en la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia y es responsable de transportar la vitamina B2 hacia la

leche, lo que indica un papel fisiológico en células mamarias diferenciadas (van Herwaarden et al. 2007). Estos hechos, junto con la observación de que el tratamiento I<sub>2</sub> se acompaña de un aumento en la retención intracelular de DOX, sugieren que el efecto antineoplásico del I<sub>2</sub> podría estar relacionado con la activación de PPAR $\gamma$  que resulta en el mantenimiento y/o aumento de la sensibilidad a la droga (regulación a la baja de MDR-1 y por lo tanto permanencia del fármaco dentro de la célula) y la inducción de la diferenciación celular. Está bien establecido que las células MCF-7 pueden responder a los agonistas sintéticos de PPAR $\gamma$  produciendo un aumento en la acumulación de lípidos, inhibición de la proliferación celular y cambios característicos que hacen a un fenotipo menos maligno (Davies, Juurlink, and Harkness 2009; Ruiz-Vela et al. 2011; Bhat-Nakshatri et al. 2013). Estas respuestas también fueron descritas anteriormente por nuestro grupo en este tipo celular después de tratarlas con 6-IL (Nuñez-Anita et al. 2009). En este contexto, es posible que el aumento significativo en el transportador ABCg2 corresponda más a la inducción de diferenciación que a mecanismos de quimiorresistencia.

El análisis de los marcadores de CTC y EMT muestran que el perfil canónico para CTC (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) que se esperaba enriquecido en células resistentes, fue muy escaso (menos del 4%) en las células MCF-7/D. En contraste, las poblaciones más abundantes fueron los sub-tipos CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> y CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> (~40% cada uno). La suplementación con I<sub>2</sub> muestra un discreto aumento de la sub-población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (aprox. 6%), ningún cambio en CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> y una clara selección diferencial disminuyendo la población CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> y con un aumento significativo en la población doble negativa (CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>). Informes previos describen que el perfil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> no es el único perfil que se asocia a un fenotipo invasivo. Existen reportes que muestran que el aumento en la población doble positiva se asocia con una mala prognosis en cáncer de la glándula salival (Soave et al. 2013) y en carcinomas de páncreas (Ohara et al. 2013). De hecho, en el cáncer colorrectal, esta población doble positiva representa el marcador específico de CTC (Yeung et al. 2010). Resultados controversiales han sido reportados en relación con el perfil CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>. En algunos estudios, el aumento de las células CD24<sup>+</sup> se correlaciona con un fenotipo más agresivo (Kristiansen et al. 2003; Bretz et al. 2012; Ma et al. 2015), mientras que en otros reportes no se evidenció ninguna relación de este fenotipo con el pronóstico de agresividad (Mylona et al. 2008; Chen et al. 2015). En contraste, el fenotipo doble negativo no tiene ningún significado pronóstico en pacientes con cáncer de mama y en estudios preclínicos estas células resultaron incapaces de inducir crecimiento tumoral en un modelo de xenotrasplante en ratones SCID NOD (Chen et al. 2015), lo que sugiere una menor invasividad de esta población celular.

En relación al análisis de EMT, el perfil característico E-Cad<sup>-</sup>/Vim<sup>+</sup> estuvo ausente en las células MCF-7/D donde prevaleció el enriquecimiento de células doble positivas (E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>+</sup>). Una vez más el tratamiento con yodo se acompañó de cambios diferenciales de un fenotipo doble positivo a un fenotipo más diferenciado descrito como E-Cad<sup>+</sup>/Vim<sup>-</sup>. E-Caderina es una glicoproteína transmembranal que participa en las uniones adherentes de células epiteliales. Su pérdida demuestra ser suficiente para promover la inducción de un fenotipo invasivo, a través de la activación de vías específicas que otorgan a las células alta motilidad mediante la inducción de proteínas tales como Vimentina y N-Caderina (Onder et al. 2008). Por el contrario, Vim es el miembro más expresado y altamente conservado de la familia de proteínas de filamentos intermedios de tipo III. Se considera el principal marcador EMT y su alta expresión en varias líneas celulares de cáncer correlaciona con su capacidad de invasión. En células MCF-7, la sobre-expresión de Vim se acompaña de un aumento en la motilidad e invasividad (Satelli & Li 2011). Estas características se redujeron en un modelo de RNA de interferencia contra Vim en células MDA-MB-231, que constitutivamente expresan esta proteína (Satelli & Li 2011). En congruencia con estos datos, nuestros resultados mostraron que las células tratadas con I<sub>2</sub> exhiben una baja expresión de Vim. Más aún las células seleccionadas con el tratamiento DOX+ I<sub>2</sub> fueron incapaces de inducir xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos, corroborando su débil potencial invasivo (datos adicionales en el artículo).

Finalmente, la participación de los receptores PPAR $\gamma$  en los procesos antineoplásicos del yodo parece ser clara. Nuestro estudio mostró que asociado al suplemento de I<sub>2</sub>, ambos tipos celulares sobre-expresan el mensajero de PPAR isoforma  $\gamma$ . Está bien establecido que la activación de esta isoforma genera su propia sobre-expresión y disminuye a la isoforma tipo alfa, potenciando así los efectos diferenciadores (Núñez-Anita et al, 2013). En este contexto, se ha descrito que el proceso de la EMT, que se desencadena por factores tales como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-beta), SNAIL y TWIST, es revertido por la activación de PPAR $\gamma$  ( Reka et al. 2010; Tan et al. 2010;). Estudios previos han demostrado los efectos antineoplásicos de los ligandos de PPAR $\gamma$  en varios modelos preclínicos (Elrod & Sun 2008; Yang 2013). Sin embargo, los agonistas de estos receptores utilizados como monoterapia no mostraron efectos benéficos en pacientes con cáncer en estado avanzado (Burstein et al. 2003). De manera contraria, la activación de PPAR $\gamma$  en combinación con fármacos antineoplásicos convencionales, como el carboplatino o el fármaco conocido como ligando relacionado con el factor inductor de apoptosis (TRAIL), mostraron reversión de la quimiorresistencia sugiriendo que la diferenciación inducida por la activación de PPAR $\gamma$ , restaura la sensibilidad al



fármaco citotóxico (Girnun et al. 2008; Brautigam et al. 2011). Más aún, estudios en nuestro laboratorio utilizando a la DOX como terapia convencional, replicaron estos efectos sinérgicos. Efectivamente tanto en estudios preclínicos (Alfaro et al. 2013) como clínicos (Peralta et al. 2011), el suplemento de I<sub>2</sub> se acompañó de efectos antitumorales como potenciación en la inducción de apoptosis y el impedimento de la instalación de quimiorresistencia.

## **VII. Conclusiones**

El uso de I<sub>2</sub> a concentraciones moderadamente altas restaura la sensibilidad de las células de cáncer de mamario resistentes a Doxorubicina. Entre los mecanismos moleculares involucrados en dicho efecto destacan, 1) el bloqueo de la expresión de transportadores membranales asociados a la expulsión de Doxorubicina como el MDR-1, 2) la disminución de la expresión de mensajeros de arresto celular como p21 y antiapoptóticos como Bcl2, así como la inducción de marcadores de diferenciación como el transportador ABCg2. Estas modificaciones parecen dar lugar a la selección de una población celular menos agresiva incapaz de generar nuevos tumores (xenotrasplantes). Todos estos resultados nos permiten proponer al suplemento de I<sub>2</sub> como un agente clínicamente útil en el tratamiento de cánceres quimiorresistentes

## Bibliografía

- Abbas T. & Dutta A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer*, 9(6), pp.400–414.
- Abdullah L.N. & Chow E.K.H., 2013. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and translational medicine*, 2, pp.3–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3565873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- AbuHammad S. & Zihlif M., 2013. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics*, 101(4), pp.213–220. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.11.009>.
- Aiello A., Pandini G., Frasca F., Conte E., Murabito A., Sacco A., Genua M., Vigneri R. & Belfiore A., 2006. Peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology*, 147(9), pp.4463–4475. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777971> [Accessed May 29, 2012].
- Alfaro Y., Delgado G., Cárabez A., Anguiano B. & Aceves C., 2013. Iodine and doxorubicin, a good combination for mammary cancer treatment: antineoplastic adjuvancy, chemoresistance inhibition, and cardioprotection. *Mol. Cancer.*, 12(1), pp.45–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3673826&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Alkatout I. & Kalthoff H., 2008. Tumor Stem Cells : How to Define Them and How to Find Them ? In *Stem Cells*. Available at: <http://www.springerlink.com/index/R24021230KP242UG.pdf> [Accessed May 30, 2012].
- Amachi S., Kimura K., Muramatsu Y., Shinoyama H. & Fujii T., 2007. Hydrogen peroxide-dependent uptake of iodine by marine Flavobacteriaceae bacterium strain C-21. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), pp.7536–7541.
- An Y. & Ongkeko W.M., 2009. ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells? *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 5(12), pp.1529–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20885358>.
- Apostoli A.J. & Nicol C.J.B., 2012. PPAR Medicines and Human Disease: The ABCs of It All.

- PPAR research*, 2012, p.504918. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3423947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 5, 2013].
- Apostolou P. & Fostira F., 2013. Hereditary breast cancer: The Era of new susceptibility genes. *BioMed Research International*, 2013.
- Astraci E. & Banerjee S., 2009. PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 13(6), pp.417–421. Available at:  
<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PPARGID383ch3p25.html>.
- Belfiore A., La Rosa G.L., Padova G., Sava L., Ippolito O. & Vigneri R., 1987. The frequency of cold thyroid nodules and thyroid malignancies in patients from an iodine-deficient area. *Cancer*, 60(12), pp.3096–3102.
- Bhat-Nakshatri P., Goswami C.P., Badve S., Sledge G.W. & Nakshatri H., 2013. Identification of FDA-approved drugs targeting breast cancer stem cells along with biomarkers of sensitivity. *Scientific reports*, 3(MI), pp.2530–42. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3965360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brautigam K., Biernath-Wupping J., Bauerschlag D.O., Von Kaisenberg C.S., Jonat W., Maass N., Arnold N. & Meinhold-Heerlein I., 2011. Combined treatment with TRAIL and PPAR $\gamma$  ligands overcomes chemoresistance of ovarian cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(5), pp.875–886.
- Bray F., McCarron P. & Parkin D.M., 2004. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast cancer research : BCR*, 6(6), pp.229–39. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1064079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bretz N., Noske A., Keller S., Erbe-Hofmann N., Schlange T., Salnikov A. V., Moldenhauer G., Kristiansen G. & Altevogt P., 2012. CD24 promotes tumor cell invasion by suppressing tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) in a c-Src-dependent fashion. *Clinical and Experimental Metastasis*, 29(1), pp.27–38.
- Brown-Grant K., 1961. Extrathyroidal Iodide Concentrating Mechanisms. *physiological Reviews*, 41(1), pp.189–213.
- Burstein H.J., Demetri G.D., Mueller E., Sarraf P., Spiegelman B.M. & Winer E.P., 2003. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as

treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat*, 79(3), pp.391–397. Available at:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12846423](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12846423).

Calcagno A.M., Fostel J.M., To K.K.W., Salcido C.D., Martin S.E., Chewing K.J. et al., 2008.

Single-step doxorubicin-selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes. *British journal of cancer*, 98(9), pp.1515–1524.

Calcagno A.M., Salcido C.D., Gillet J.P., Wu C.P., Fostel J.M., Mumau M.D., Gottesman

M.M., Varticovski L. & Ambudkar S. V., 2010. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(21), pp.1637–52. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2970576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 11, 2013].

Campbell L.L. & Polyak K., 2007. Breast tumor heterogeneity: Cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle*, 6(19), pp.2332–2338.

Cann S.A., Van Netten J.P. & Van Netten C., 2000. Hypothesis: Iodine, selenium and the development of breast cancer. *Cancer Causes and Control*, 11(2), pp.121–127.

Chang T. & Szabo E., 2000. Induction of Differentiation and Apoptosis by Ligands of Peroxisome Proliferator-activated Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, pp.1129–1138.

Chen Q., Zhou J., Jiang C. & Chen J., 2010. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in SGC7901/VCR cells by PPAR?? activation by troglitazone. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, 30(3), pp.326–331.

Chen Y., Song J., Jiang Y., Yu C. & Ma Z., 2015. Predictive value of CD44 and CD24 for prognosis and chemotherapy response in invasive breast ductal carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(9), pp.11287–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617852>.

Chiodi I., Belgiovine C., Donà F., Scovassi A.I. & Mondello C., 2011. Drug Treatment of Cancer Cell Lines: A Way to Select for Cancer Stem Cells? *Cancers*, 3(1), pp.1111–1128. Available at: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/1/1111/> [Accessed March 25, 2012].

Czeczuga-Semeniuk E., Wołczyński S., Dabrowska M., Dziecioł J. & Anchim T., 2004. The effect of doxorubicin and retinoids on proliferation, necrosis and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish*

*Histochemical and Cytochemical Society*, 42(4), pp.221–7. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15704648>.

- Danaei G., Vander Hoorn S., Lopez A.D., Murray C.J.L. & Ezzati M., 2005. Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366(9499), pp.1784–1793.
- Davies G.F., Juurlink B.H.J. & Harkness T. a a, 2009. Troglitazone reverses the multiple drug resistance phenotype in cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, (3), pp.79–88.
- Davies K.J.A. & Doroshov J.H., 1986. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(7), pp.3060–3067.
- Dugrillon A., Uedelhoven W.M., Pisarev M.A., Bechtner G. & Gärtner R., 1994. Identification of delta-iodolactone in iodide treated human goiter and its inhibitory effect on proliferation of human thyroid follicles. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, 26(10), pp.465–469.
- Durmus S., Hendriks J.J.M.A. & Schinkel A.H., 2015. Chapter one - Apical ABC Transporters and Cancer Chemotherapeutic Drug Disposition. In J. D. S. and T. I. B. T.-A. in C. Research, ed. *ABC Transporters and Cancer*. Academic Press, pp. 1–41. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X14000025>.
- Elrod H. a & Sun S.-Y., 2008. PPARgamma and Apoptosis in Cancer. *PPAR research*, 2008, p.704165. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2442903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2012].
- Eskin B., Murphey S.A. & Dunn M.R., 1968. Induction of Breast Cancer in Altered Thyroid States. *Nature*, 218, p.1162.
- Eskiocak U., 2008. Effect of Doxorubicin on Telomerase Activity and Apoptotic Gene Expression in Doxorubicin- Resistant and -Sensitive MCF-7 Cells. *Experimental Chemotherapy*, pp.1–8.
- Felsher D.W., 2008. Oncogene addiction versus oncogene amnesia: Perhaps more than just a bad habit? *Cancer Research*, 68(9), pp.3081–3086.
- 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 research : BCR*, 10(2), p.R25. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2397524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 11, 2012].

- García-Solís P., Alfaro Y., Anguiano B., Delgado G., Guzman R.C., Nandi S., Díaz-Muñoz M., Vázquez-Martínez O. & Aceves C., 2005. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I<sub>2</sub>) but not by iodide (I<sup>-</sup>) treatment: Evidence that I<sub>2</sub> prevents cancer promotion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 236(1-2), pp.49–57.
- Gerber B., Muller H., Reimer T., Krause A. & Friese K., 2003. Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 79(2), pp.265–276. Available at: PM:12825861.
- Ghent W.R., Eskin B.A., Low D.A. & Hill L.P., 1993. Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast. *Canadian Journal of Surgery*, 36(5), pp.453–460.
- Girnun G.D., Chen L., Silvaggi J., Drapkin R., Chirieac L.R., Padera R.F. et al., 2008. Regression of drug-resistant lung cancer by the combination of rosiglitazone and carboplatin. *Clinical Cancer Research*, 14(20), pp.6478–6486.
- Gleicher N., 2013. Why are reproductive cancers more common in nulliparous women? *Reproductive BioMedicine Online*, 26(5), pp.416–419.
- Gong J., Jaiswal R., Mathys J.M., Combes V., Grau G.E.R. & Bebawy M., 2012. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 38(3), pp.226–234.
- Gong J.H., Liu X.J., Shang B.Y., Chen S.Z. & Zhen Y.S., 2010. HERG K<sup>+</sup> channel related chemosensitivity to sparfloxacin in colon cancer cells. *Oncol. Rep.*, 23(6), pp.1747–1756. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20428834>.
- Hanahan D., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70. Available at: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092-8674\(00\)81683-9](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092-8674(00)81683-9) \n <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WSN-4195FC1-5/2/aef1d48431eadea4567b697b1fee0514>.
- Hanahan D. & Weinberg R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hassiotou F. & Geddes D., 2013. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 26(1), pp.29–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997014> [Accessed April 30, 2014].
- Hennings H., Glick A.B., Greenhalgh D.A., Morgan D.L., Strickland J.E., Tennenbaum T. & Yuspa

- S.H., 1993. Critical aspects of initiation, promotion, and progression in multistage epidermal carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 202, pp.1–8.
- van Herwaarden A.E., Wagenaar E., Merino G., Jonker J.W., Rosing H., Beijnen J.H. & Schinkel A.H., 2007. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Molecular and cellular biology*, 27(4), pp.1247–53. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1800714&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hincal F., 2009. Oxidative Damage in Iodine Deficiency. In V. R. Preedy, G. N. Burrow, & R. R. Watson, eds. *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. Elsevier Inc., pp. 487–497. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374135-6.00051-0>.
- Hou X., 2009. Iodine Speciation in Foodstuff, Tissues, and Environmental Samples. In *Comprehensive Handbook of Iodine*. Elsevier Inc., pp. 139–150. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374135-6.00015-7>.
- Järvinen T.A., Tanner M., Rantanen V., Bärlund M., Borg A., Grénman S. & Isola J., 2000. Amplification and deletion of topoisomerase II $\alpha$  associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. *The American journal of pathology*, 156(3), pp.839–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1876829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kars M.D., Iseri O.D., Gündüz U., Ural A.U., Arpaci F. & Molnár J., 2006. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer research*, 26(6B), pp.4559–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201178>.
- Kazuaki I., 2009. iodine and iodine species in seawater: speciation, distribution, and dynamics. In *Comprehensive handbook of iodine*. Elsevier Inc., pp. 83–91.
- Kessler J.H., 2004. The effect of supraphysiologic levels of iodine on patients with cyclic mastalgia. *Breast Journal*, 10(4), pp.328–336.
- Kilbane M.T., Ajjan R.A., Weetman A.P., Dwyer R., McDermott E.W.M., O'Higgins N.J. & Smyth P.P.A., 2000. Tissue iodine content and serum-mediated <sup>125</sup>I uptake-blocking activity in breast cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(3), pp.1245–1250.

- Konno N., Taguchi H., Miura K., Taguchi S. & Murakami S., 1993. Serum thyrotropin concentration in apparently healthy adults, in relation to urinary iodide concentration [15]. *Clinical Chemistry*, 39(1), pp.174–175.
- Krause U., Harris S., Green A., Ylostalo J., Zeitouni S., Lee N. & Gregory C. a, 2010. Pharmaceutical modulation of canonical Wnt signaling in multipotent stromal cells for improved osteoinductive therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), pp.4147–52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2840116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 7, 2012].
- Kristiansen G., Winzer K.J., Mayordomo E., Bellach J., Schlüns K., Denkert C. et al., 2003. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9, pp.4906–4913.
- Küpper F.C., Schweigert N., Ar Gall E., Legendre J.M., Vilter H. & Kloareg B., 1998. Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta*, 207(2), pp.163–171.
- Lankelma J., Dekker H., Luque R.F., Luykx S., Hoekman K. & Valk P. Van Der, 1999. Doxorubicin Gradients in Human Breast Cancer. *Clin. Canc. Res.*, 5, pp.1703–1707.
- LeMarchand L., Kolonel L.N. & Nomura A.M., 1985. Breast cancer survival among Hawaii Japanese and Caucasian women. Ten-year rates and survival by place of birth. *American journal of epidemiology*, 122(4), pp.571–578.
- Levitt N.C. & Hickson I.D., 2002. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), pp.179–186.
- Liang Y., Li S. & Chen L., 2015. The physiological role of drug transporters. *Protein & Cell*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13238-015-0148-2>.
- Liu J.J., Huang R.W., Lin D.J., Peng J., Wu X.Y., Lin Q. et al., 2005. Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(January), pp.455–459. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15642706> [Accessed May 26, 2012].
- Liu J.-J., Liu P.-Q., Lin D.-J., Xiao R.-Z., Huang M., Li X.-D., He Y. & Huang R.-W., 2007. Downregulation of cyclooxygenase-2 expression and activation of caspase-3 are involved in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induced apoptosis in human monocyte leukemia cells in vitro. *Annals of hematology*, 86(3), pp.173–183.



- Loeb L.A., Bielas J.H. & Beckman R.A., 2008. Cancers exhibit a mutator phenotype: Clinical implications. *Cancer Research*, 68(10), pp.3551–3557.
- Ma Z.L., Chen Y.P., Song J.L. & Wang Y.Q., 2015. Knockdown of CD24 inhibits proliferation, invasion and sensitizes breast cancer MCF-7 cells to tamoxifen in vitro. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(13), pp.2394–2399.
- Mani S., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y. et al., 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), pp.704–715. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2728032&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 29, 2012].
- Mehta K., 1994. High levels of transglutaminase expression in doxorubicin-resistant human breast carcinoma cells. *International journal of cancer*, 58(3), pp.400–406. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.2910580316/abstract> [Accessed May 31, 2012].
- Mephan T.B., 1987. The composition of milk. In *Physiology of lactation*. Philadelphia: Open University Press, pp. 30–50.
- Miller D.W., 2006. Extrathyroidal benefits of iodine. *Journal of American Physicians and Surgeons*, 11(4), pp.106–110.
- Minami Y., Takano A., Okuno Y., Fukao A., Kurihara M. & Hisamichi S., 1996. Trends in the Incidence of Female Breast and Cervical Cancers in Miyagi Prefecture, Japan, 1959–1987. *Cancer Science*, 87(1), pp.10–17. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.1996.tb00193.x>.
- Moldes M., Zuo Y., Morrison R.F., Silva D., Park B.-H., Liu J. & Farmer S.R., 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *The Biochemical journal*, 376(Pt 3), pp.607–613.
- Müssig K., 2009. Iodine-Induced Toxic Effects due to Seaweed Consumption. In *Comprehensive Handbook of Iodine*. Elsevier Inc., pp. 897–908.
- Mylona E., Giannopoulou I., Fasomytakis E., Nomikos A., Magkou C., Bakarakos P. & Nakopoulou L., 2008. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24-/low and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Human Pathology*, 39(7), pp.1096–1102.
- Nava-Villalba M., Nuñez-Anita R.E., Bontempo A. & Aceves C., 2015. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone.

- Molecular Cancer*, 14(1), p.168. Available at: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0436-8>.
- Negrini S., Gorgoulis V.G. & Halazonetis T.D., 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), pp.220–228.
- Norberg E., Orrenius S. & Zhivotovsky B., 2010. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(1), pp.95–100.
- Nuñez-Anita R.E., Arroyo-Helguera O., Cajero-Juárez M., López-Bojorquez L. & Aceves C., 2009. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 89(1-2), pp.34–42.
- Ohara Y., Oda T., Sugano M., Hashimoto S., Enomoto T., Yamada K. et al., 2013. Histological and prognostic importance of CD44(+) /CD24(+) /EpCAM(+) expression in clinical pancreatic cancer. *Cancer science*, 104(8), pp.1127–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23679813>.
- Onder T.T., Gupta P.B., Mani S.A., Yang J., Lander E.S. & Weinberg R.A., 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Research*, 68(10), pp.3645–3654.
- Ouyang G., Wang Z., Fang X., Liu J. & Yang C.J., 2010. Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(15), pp.2605–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20238234> [Accessed March 25, 2012].
- Parker S., Tong T.T., Bolden S. & Wingo P.A., 2008. Cancer statistics, 1997. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 47(1), pp.5–27.
- Peralta G., Torres J., Delgado G., Dominguez A., De Obalda R., Durante L. & Aceves C., 2011. Iodine exhibits dual effects on breast cancer as a co-treatment with anthracyclines: anti-neoplastic synergy and cardioprotector. In *102nd Annual meeting, AACR, Orlando, Florida*. pp. 3509–16.
- Pestereva E., Kanakasabai S. & Bright J.J., 2012. PPAR $\gamma$  agonists regulate the expression of stemness and differentiation genes in brain tumour stem cells. *British journal of cancer*, 106(10), pp.1702–12. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22531638](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22531638).

- Pisani P., Parkin D.M., Bray F. & Ferlay J., 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *International Journal of Cancer*, 83(1), pp.18–29.
- Preedy V.R., Burrow G.N. & Watson R.R., 2009. Autoregulation of thyroid growth and function by iodine: Independent regulation of the thyroid gland by iodocompounds. In *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. academic Press/Elsevier, pp. 243–247.
- Radisky D.C. & LaBarge M. a., 2008. Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype. *Cell Stem Cell*, 2(June), pp.511–512.
- Reka A.K., Kurapati H., Narala V.R., Bommer G., Standiford T.J. & Keshamouni V.G., 2010. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$  Activation Inhibits Tumor Metastasis by Antagonizing Smad3 Mediated Epithelial Mesenchymal Transition. *Molecular cancer therapeutics*, 9(12), pp.3221–3232.
- Ruiz-Vela A., Aguilar-Gallardo C., Martínez-Arroyo A.M., Soriano-Navarro M., Ruiz V. & Simón C., 2011. Specific Unsaturated Fatty Acids Enforce the Transdifferentiation of Human Cancer Cells toward Adipocyte-like Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(4), pp.898–909.
- Satelli A. & Li S., 2011. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.*, 68(18), pp.3033–3046.
- Sharom F.J., 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, 9(1), pp.105–127.
- Shimizu H., Ross R.K., Bernstein L., Yatani R., Henderson B.E. & Mack T.M., 1991. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *British journal of cancer*, 63(6), pp.963–966.
- Shipitsin M., Campbell L.L., Argani P., Weremowicz S., Bloushtain-Qimron N., Yao J. et al., 2007. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer cell*, 11(3), pp.259–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349583> [Accessed March 10, 2012].
- Shrivastava A., Tiwari M., Sinha R.A., Kumar A., Balapure A.K., Bajpai V.K., Sharma R., Mitra K., Tandon A. & Godbole M.M., 2006. Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway. *The Journal of biological chemistry*, 281(28), pp.19762–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679319> [Accessed April 11, 2012].
- Soave D.F., Oliveira da Costa J.P., da Silveira G.G., Ianez R.C.F., de Oliveira L.R., Lourenço S.V.

- & Ribeiro-Silva A., 2013. CD44/CD24 immunophenotypes on clinicopathologic features of salivary glands malignant neoplasms. *Diagnostic pathology*, 8, pp.29–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3605183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Soriano O., Delgado G., Anguiano B., Petrosyan P., Molina-Servín E.D., Gonsebatt M.E. & Aceves C., 2011. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors: Association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocrine-Related Cancer*, 18(4), pp.529–539.
- Tan X., Dagher H., Hutton C.A. & Bourke J.E., 2010. Effects of PPAR $\gamma$  ligands on TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respiratory Research*, 11(1), pp.21–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2844370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman R., 2012. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21(7), pp.440–446.
- Tresguerres-Fernandez A.J., 2010. *Fisiología Humana* 4th ed., McGraw Hill.
- Tyagi S. & Gupta P., 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor : A family of nuclear receptors role in various diseases. , 2(4), pp.236–240.
- Venturi S., 1993. iodine gastric cancer.pdf. *European journal of cancer prevention*, 2, pp.17–23.
- Venturi S., 2010. Thyroid hormone, iodine and human brain evolution. In S. C. Cunnane & K. M. Stewart, eds. *Human Brain Evolution: The Influence of Freshwater and Marine Resources*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 105–124.
- Vineis P., Schatzkin A. & Potter J.D., 2010. Models of carcinogenesis: An overview. *Carcinogenesis*, 31(10), pp.1703–1709.
- Vitale M., Di Matola T., D'Ascoli F., Salzano S., Bogazzi F., Fenzi G., Martino E. & Rossi G., 2000. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology*, 141(2), pp.598–605.
- Vosler P.S., Sun D., Wang S., Gao Y., Kintner D.B., Signore A.P., Cao G. & Chen J., 2009. Calcium dysregulation induces apoptosis-inducing factor release: Cross-talk between PARP-1- and calpain- signaling pathways. *Experimental Neurology*, 218(2), pp.213–220.
- Weinberg R. A., 2014. *the biology of cancer*, Garland Science 2 ed.

- Weinberg B.D., Patel R.B., Exner A.A., Saidel G.M. & Gao J., 2007. Modeling Doxorubicin Transport to Improve Intratumoral Drug Delivery to RF Ablated Tumors. *J control release*, 124(1-2), pp.11–19.
- Weiss J., Sauer A., Herzog M., Böger R.H., Haefeli W.E. & Benndorf R.A., 2009. Interaction of thiazolidinediones (glitazones) with the ATP-Binding cassette transporters P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Pharmacology*, 84(5), pp.264–270.
- Willson T.M., Lambert M.H. & Kliewer S. a, 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annual review of biochemistry*, 70, pp.341–67. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=61142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wong R.S.Y., 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 30, p.87. Available at:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3197541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yang J., 2013. PPAR- $\gamma$  silencing inhibits the apoptosis of A549 cells by upregulating Bcl-2. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 16(3), pp.125–130.
- Yeung T.M., Gandhi S.C., Wilding J.L., Muschel R. & Bodmer W.F., 2010. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), pp.3722–3727. Available at:  
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0915135107>.
- Zappavigna S., Luce A., Vitale G., Merola N., Facchini S. & Caraglia M., 2013. Autophagic cell death : A new frontier in cancer research. , 2013(February), pp.250–262.
- Zava T.T. & Zava D.T., 2011. Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: A literature-based analysis. *Thyroid Research*, 4(1), p.14. Available at: <http://www.thyroidresearchjournal.com/content/4/1/14>.
- Zhang H., Jing X., Wu X., Hu J., Zhang X., Wang X., Su P., Li W. & Zhou G., 2015. Suppression of multidrug resistance by rosiglitazone treatment in human ovarian cancer cells through downregulation of FZD1 and MDR1 genes. *Anti-Cancer Drugs*, 26(7), pp.706–715. Available at:  
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001813-201508000-00003>.
- Zhang S., Liu X., Bawa-Khalife T., Lu L.-S., Lyu Y.L., Liu L.F. & Yeh E.T.H., 2012. Identification of

the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*, 18(11), pp.1639 – 1645. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2919>.

Ziegler R.G., Hoover R.N., Pike M.C., Hildesheim A., Nomura A.M., West D.W. et al., 1993. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(22), pp.1819–1827.

## Material suplementario

### Tipificación de las líneas celulares MCF-7/W y MCF-7/D 40nM

En el 2012 se había desarrollado una primera línea celular quimiorresistente a una concentración de 600 nM de DOX a partir de una línea parental MCF-7 obtenida de ATCC en el 2012. Se iniciaron los análisis moleculares y morfológicos de dicha línea encontrando inconsistencias en la expresión de genes estructurales como la sobreexpresión de  $\beta$ -Actina y Ciclofilina y una baja expresión de RSP18 entre las células parentales y la quimiorresistentes MCF7/D 600 nM. Además la morfología observada en la línea resistente correspondía más a un tipo fibroblasto que a una epitelial. Por estas razones se decidió verificar la naturaleza de dichas células para confirmar su parentesco con la línea de origen. Estas diferencias se iniciaron en las clonas resistentes a 40nM donde por primera vez se notaron los cambios morfológicos. Por tal razón se decidió tipificar el cultivo celular de 40nM. Se realizó una genotipificación por medio de perfil STR (*short tandem repeat*) en ambas células. Se realizó la extracción de DNA utilizando kit QIAamp DNA Mini de Quiagen y PCR en multiplex utilizando IDplex Plus de Quiagen. El análisis de los productos se realizó a través de electroforesis en capilar en equipo ABI 310 y con software genescan y genotyper. Los marcadores analizados fueron: CSF1PO, D13S317, D16S539, D5S818, D7S820, TH01, TPOX, Vwa, D3S1358, D21S11, D19S433, D2S1338, FGA, D18S51, D8S1179, y amelogenina. Este análisis lo realizó la compañía BiMoDi, Querétaro, QRO, México.

Para confirmar los datos se realizaron los siguientes análisis en nuestro laboratorio y en la Unidad de Proteogenómica del INB. Se corrió una PCR en condiciones no específicas utilizando oligos de humano de MDR-1 y Bcl-2. Los productos de la PCR en su totalidad se utilizaron en una reacción de clonación en pGEM easy vector de la Promega y utilizados para transformar *E. coli* cepa X-Blue. Después de digestión con enzima de restricción EcoRI de los plásmidos purificados a partir de 10 clonas bacterianas se seleccionaron tres insertos con distintos peso molecular para su siguiente secuenciación. La secuencias se alinearon utilizando *Blast*.

La congruencia entre el perfil que obtuvimos con el descrito en la base de datos de ATCC confirmó la autenticidad de las MCF-7/W. Por el contrario en el caso de las MCF-7/D 40nM no

se obtuvo amplificación de los marcadores indicando que dichas células no eran de origen humano y sugiriendo una contaminación en el cultivo (Tabla 4).

	MCF-7/W	MCF-7/D 40nM	ATCC
<b>marcadores</b>			
CSF1PO	10,10	N/A	10,10
D13S317	11,11	N/A	11,11
D16S539	11,12	N/A	11,12
D5S818	11,12	N/A	11,12
D7S820	8,9	N/A	8,9
THO1	6,6	N/A	6,6
TPOX	9,12	N/A	9,12
vWa	14,15	N/A	14,15
D3S1358	16,16	N/A	
D21S11	30,30	N/A	
D19S433	13,14	N/A	
D2S1338	21,23	N/A	
FGA	23,25	N/A	
D18S51	14,14	N/A	
D8S1179	10,14	N/A	
Amelogenina	x	N/A	x

Tab. 4: Análisis de STR. Se reportan los resultados de la análisis de lo STR en la línea silvestre (MCF-7/W) y en la línea resistente a 40nM (MCF-7/D 40nM). En la 4 columna se reporta la tipificación que se encuentra en la base de datos de ATCC (American Type Culture Collection).

La alineación de las secuencias aleatorias permitieron identificar su origen con el genoma de *Mus musculus* como se puede observar en la tabla 5.

Por lo tanto fue necesario abandonar la línea celular previamente desarrollada. Se obtuvo un nuevo lote de células MCF-7 del ATCC para reiniciar la línea DOX resistente a 10 nM. Se está elaborando una nota técnica de la contaminación para enviarla a ATCC.



Mus musculus glutathione S-transferase, theta 1 (Gstt1), mRNA  
 Sequence ID: [reflNM\\_008185.3](#) Length: 1049 Number of Matches: 1

Range 1: 699 to 890 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
329 bits(364)	7e-87	188/192(98%)	0/192(0%)	Plus/Minus
Query 7	CCCAGGGTGATGCAAGTTGTGAATTGTGAACCTGTGAGTTGTGAACCTGCCGCAGCTGGTGC			66
Sbjct 890	CCCAGTGTAAATGCAAGTTGTGAATTGTGAACCTGTGAGTTGTGAACCTGCCGCAGCTGGTGC			831
Query 67	AGGGATGAAGCGTCTGACGTCACCTGGATCATTGCCAGCACTCTGGGCATCAGCTTCTGCT			126
Sbjct 830	AGGGATGAAGCGTCTGACGTCACCTGGATCATTGCCAGCACTCTGGGCATCAGCTTCTGCT			771
Query 127	TTATGATGAGGTCAGCAGGGGGACAGTCCTTCACCTTCAGGATGACTTCATGGGCTTCCC			186
Sbjct 770	TTATGATGAGGTCAGCAGGGGGACAGTCCTTCACCTTCAGGATGACTTCATGGGCTTCCC			711
Query 187	TGAAGAGCTCCT	198		
Sbjct 710	GGAAGAGGTCCT	699		

Mus musculus strain mixed chromosome 12, alternate assembly Mm\_Celera  
 Sequence ID: [reflAC\\_000034.1](#) Length: 116539466 Number of Matches: 1

Range 1: 102291089 to 102291354 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
321 bits(205)	1e-84	246/271(91%)	5/271(1%)	Plus/Plus
Features: <a href="#">serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit...</a> <a href="#">serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit...</a>				
Query 29	TCCGTCCTGAAGCACAAcatcactaggtgctggatagctcanatattggcatatatact			88
Sbjct 102291089	TCAGGCCCAAGAAGCACAACTACTAGGTGCGTGATAGCTCAAATATGGCATATATACT			102291148
Query 89	cnntggatttttattcagttgtaagaatgaaaatgacatttgaggaaaaatggatggaa			148
Sbjct 102291149	CAATGGATTTTATTCAAGTTGTAAGAATG-AAATGACATTTGGAGGAAAATGGATGGAA			102291207
Query 149	ctagagactatcatTANCCAGATAGNCAAAACTGTTTCTTTTATAGAGACATAAATGN			208
Sbjct 102291208	CTAGAGACTATCATTAAAGCCAGATAGACAAAACCTGTTTCTTTTATAGAGACATAAATGT			102291267
Query 209	AGAACAGGNTCTTGNTCAANCCGGNAAGAAGGGNTTCATTTCCCTTNTTTTGAACCCNGGG			268
Sbjct 102291268	AGAACAGGCTCTTGATCAATCCGGTAAGAAGGGTTTCATTTCCCTTNTTTTGAACAGGG-			102291326
Query 269	CTTTCTCCTGTANACCCTTGGCNTGGTCTTG	299		
Sbjct 102291327	-TTTCT-CTGTATACCCCTGGC-TGGTCTTG	102291354		

Mus musculus chromosome 14, clone RP23-286K8, complete sequence  
 Sequence ID: [gblAC121296.7](#) Length: 232049 Number of Matches: 2

Range 1: 39737 to 39817 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
129 bits(142)	6e-27	78/81(96%)	1/81(1%)	Plus/Plus
Query 10	TCCCTGAAGCACA-GGTGCCTTGTCTGGAGGAGGCACCGCACAGCGAGGCTTTAAGTGGC			68
Sbjct 39737	TCCCCGAAGCACATGGTGCCTTGTCTGGAGGAGGCACCGCACAGCGAGGCTTTAAGTGGC			39796
Query 69	AGCAGAGGCTCTATGTGCCAC	89		
Sbjct 39797	AGCAGAGGCTTTATGTGCCAC	39817		

Tab. 5: Alineación de las secuencias aleatorias. Se reportan los resultados de la secuenciación aleatoria (BLAST) de tres fragmentos de cDNA de las células MCF-7D 40nM. Se observa que se obtuvo identidad con *Mus musculus* en los tres casos.