



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del bloqueo farmacológico de CD44
en células de cáncer de colon**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ABIMAEEL MONDRAGÓN PERALTA



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

Ciudad Universitaria, Cd. de Méx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Mondragón
Peralta
Abimael
5553764377
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309107325

2. Datos del tutor

Dr.
Marco Antonio
Velasco
Velázquez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Aliesha Araceli
González
Arenas

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Wendy
Xolalpa
Villanueva

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Luis Enrique
Arias
Romero

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Wendy Beatriz
Pérez
Báez

7. Datos del trabajo escrito

Efecto del bloqueo farmacológico de CD44 en células de cáncer de colon
60 p
2018

A mis padres:

Este logro es de los tres, porque sin su cariño, apoyo y motivación nunca habría cumplido esta meta. Gracias por ser parte de mi vida y por no soltar mi mano aun cuando la luz de la esperanza parece apagarse. Los amo.

Abimael Mndrqn

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por el tipo de formación que nos ofrece y todo lo que nos brinda, tanto a nivel profesional como a nivel personal, por todas las experiencias que he vivido en esta maravillosa casa de estudios.

A la Facultad de Ciencias, donde pasé una de las mejores etapas de mi vida, por todo lo que aprendí y por todas las personas que ahí conocí y marcaron mi vida.

A CONACYT (con referencia CB 2013/221103 y número de registro 26176) y a PAPIIT-UNAM (IN228626) por apoyar este proyecto.

A la Dra. Aliesha A. González, a la Dra. Wendy Xolalpa, a la Dra. Wendy B. Pérez, al Dr. Luis E. Arias por sus observaciones y sugerencias para mejorar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, por impulsarme siempre a lograr mis objetivos, por estar conmigo en las buenas, en las malas y en cualquier situación, porque sin su presencia nada de esto sería posible, por ser una madre y un ser humano ejemplar.

A mi papá, porque gracias a él he cumplido una meta más, por estar siempre conmigo y por darme las bases para ser cada día una persona mejor.

A mis hermanos Esmeralda y Angel por formar parte de mi vida, aunque a veces me desesperan un poco, son muchas las alegrías que me dan. A Doina que es una incondicional integrante más de mi hermosa familia.

A la familia Peralta por todas las motivaciones, alegrías, cuidados y todo tipo de apoyo que me han dado a lo largo de mi carrera y de mi vida, en especial a mis tías Erika, Maga y Blanca, y a mis primas Lupe y Maribel.

A mi tío Miguel y a Marcos, porque en cada plática con ellos siempre había risas y emociones, y le daban su mejor cara a la vida, haciendo más amena mi trayectoria. Siempre estarán presentes en nosotros.

A la familia Mondragón, especialmente a Emma, Juana, Bertha y a mis tíos Pedro, Oli y Manuel por su apoyo en todo momento, sobre todo en tiempos difíciles y por estar pendientes de mi desarrollo personal y profesional.

Al Dr. Marco Velasco por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por todo lo que he aprendido con él, por la convivencia y sobre todo por supervisar el desarrollo de este trabajo que tanto me apasionó.

A Claudia, a Sele, a “la morena” y a Cristina por ser las mejores amigas, de esas personas que siempre están cuando las necesitas (y cuando no también), además de todas las alegrías, aventuras y experiencias que hemos vivido juntos, y sobre todo por tantas ocurrencias con las que siempre me hacen reír, haciéndome olvidar esos momentos de estrés.

A mis compañeros del Laboratorio de Farmacología Molecular, porque la convivencia con cada uno de ellos ha hecho más agradable mi estancia ahí. En especial a doña Sandra, mi compañera del turno nocturno, por compartir conmigo sus conocimientos y por la confianza que me ha brindado. A la Dra. Wendy Xolalpa, por sus enseñanzas y la convivencia, porque ella fue una persona clave para que yo llegara aquí. A doña Andrea, aunque ya no está en el laboratorio, los momentos agradables fueron muchos y una buena amistad continúa. A Fabi, Luz y a Dianita sonsacadora, grandes amigas y grandes personas con las que en poco tiempo he compartido demasiados momentos agradables.

ABREVIATURAS

AF	Autofluorescencia	DMSO	Dimetilsulfóxido
ALDH	Aldehído deshidrogenasa	DNA	Ácido Desoxirribonucleico
AM	Acoplamiento Molecular	DTM	Dominio transmembranal
APC	Adenomatous Poliposis Coli	E. E. M.	Error Estándar de la Media
Ca-Co	Cáncer de colon	EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
CI	Concentración Inhibitoria	EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
CMS	Consenso de Subtipos Moleculares	FDA	Food and Drug Administration
CT	Células troncales	HA	Ácido Hialurónico
CTC	Células troncales del cáncer	MEC	Matriz Extracelular
CTC-Co	Células troncales del cáncer de colon	MTT	3,(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)- 2,5 difeniltetrazol
CV	Cribado Virtual	PBS	Buffer Salino de Fosfatos
DC	Dominio Citoplásmico	rpm	Revoluciones por minuto
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma	SFB	Suero Fetal Bovino
DEAB	Dietilaminobenzaldehído	Topo-II	Topoisomerasa-II
DM	Dinámica Molecular	VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 El cáncer	3
2.2 Carcinogénesis	3
2.3 Características distintivas del cáncer (hallmarks)	5
2.4 Clasificación del cáncer.....	9
2.5 Epidemiología	10
2.6 Cáncer de colon	11
2.7 Tratamiento contra el cáncer de colon	15
2.8 Células troncales del cáncer	17
2.9 Células troncales del cáncer de colon.....	18
2.10 El marcador CD44	19
3. ANTECEDENTES DEL PROYECTO	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos particulares.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODO	25
7.1 Cultivo celular.....	25
7.2 Ensayos de citotoxicidad.....	25
7.3 Ensayos de formación de tumoroesferas	26
7.4 Citometría de flujo	27
7.5 Análisis estadístico.....	28
8. RESULTADOS	28
8.1 Ensayos de citotoxicidad.....	28
8.2 Ensayos de formación de tumoroesferas	29
8.3 Elección del fármaco con posible mayor selectividad hacia células troncales del cáncer en la línea celular HCT-15	31
8.4 Citometría de flujo: expresión de CD44.....	32
8.5 Ensayos de formación de tumoroesferas con células pretratadas con etopósido	34
8.6 Citometría de flujo: coexpresión CD44/ALDH	36
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES	42
11. ANEXO	44
12. REFERENCIAS	45

1. RESUMEN

El cáncer es una patología caracterizada por la proliferación celular incontrolada. Esta patología es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En México, el cáncer de colon (Ca-Co) es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia y el séptimo tipo causante de muertes, afectando principalmente a hombres y personas mayores de 60 años. Actualmente, la terapia para tratar el Ca-Co depende de la etapa o estadio en que este se encuentre. Las células troncales del cáncer (CTC) se han descrito como un pequeño subgrupo de células presentes en los tumores, con capacidad de autorrenovación y diferenciación. Las CTC son las responsables de la iniciación y mantenimiento de los tumores, además de estar involucradas en la reincidencia y metástasis, por lo que su erradicación podría generar terapias más efectivas contra el cáncer. Las células troncales del cáncer de colon (CTC-Co) se han identificado con base en la expresión de marcadores de superficie, como la proteína CD133, o por alta actividad de la enzima ALDH. Recientemente, algunos estudios han demostrado que las células de Ca-Co que expresan la proteína CD44 poseen propiedades de troncalidad, considerando que CD44 puede ser mejor marcador de CTC-Co que CD133. El receptor CD44 es una glicoproteína transmembranal, cuyo principal ligando es el ácido hialurónico (HA). La vía de señalización activada por la unión HA/CD44 también está involucrada en la regulación de la transcripción de supresores tumorales y genes asociados a pluripotencia. Nuestro grupo de trabajo realizó previamente la búsqueda de fármacos antagonistas de CD44 mediante cribado virtual y los evaluó en células de cáncer de mama. Se demostró que el etopósido antagoniza CD44, induciendo la diferenciación de las CTC de mama. En este trabajo usamos como modelo la línea celular de Ca-Co HCT-15 para analizar los efectos del bloqueo de CD44 con tres de los fármacos obtenidos en el cribado virtual: emetina, etopósido y pictilisib. Primero, evaluamos por ensayos de MTT la citotoxicidad de los fármacos a 48 h de exposición y obtuvimos las concentraciones inhibitorias (CI). Después, mediante ensayos de formación de tumoresferas en presencia de fármaco evaluamos el efecto de cada uno en la capacidad clonogénica de las células. Los resultados mostraron mayor

selectividad del etopósido hacia las CTC-Co, por lo que fue el fármaco elegido para realizar experimentos posteriores. Después de exponer a las células durante 48 h a las CI 25, 50 o 75 del etopósido, medimos por citometría de flujo la población celular CD44⁺ y observamos un aumento significativo con respecto al control. Posteriormente, mediante ensayos de formación de tumoresferas en ausencia de fármaco, evaluamos la capacidad clonogénica de las células previamente expuestas a las CI de etopósido y observamos una disminución significativa en el número de tumoresferas formadas. Debido a la discrepancia de los resultados entre el aumento de la población CD44⁺ y la disminución en la formación de tumoresferas, decidimos medir por citometría de flujo la coexpresión de los marcadores CD44 y ALDH. Observamos que la población CD44⁺/ALDH⁺ disminuyó, aunque no significativamente. Tras el tratamiento con etopósido, nuestros resultados sugieren que el bloqueo de CD44 en las células HCT-15 afecta la clonogenicidad de las CTC-Co, sin embargo, el efecto del etopósido también podría afectar otras vías involucradas en la proliferación y viabilidad celular en los subtipos troncal y no troncal. Por lo tanto, el etopósido podría ser un buen candidato para realizar estudios posteriores tanto *in vitro* como *in vivo* para demostrar las ventajas de su posible uso en la quimioterapia contra el Ca-Co.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El cáncer

El cáncer puede definirse como aquella patología cuya principal característica es la proliferación celular incontrolada, en donde las células se encuentran comprometidas a sufrir mitosis indefinidamente (Boticario & Angosto, 2009). Esta patología engloba a un grupo de enfermedades caracterizadas por la presencia de células anormales que crecen y se dividen de forma aberrante en cualquier parte del cuerpo (Macarulla, Élez, Capdevila, & Tabernero, 2011), llegando a formar masas llamadas tumores (NCI, 2015). Esto es debido a la acumulación de alteraciones genéticas que llevan a la desregulación del programa celular que controla la división y diferenciación (R.W. Ruddon, 2007) y de los mecanismos homeostáticos que determinan el equilibrio entre proliferación y muerte celular (de Baptista & Melo, 2014).

2.2 Carcinogénesis

La carcinogénesis es el proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas (Catherine Sánchez, 2013). A nivel celular, es un proceso irreversible (Loeb & Harris, 2008) de múltiples etapas, que puede surgir de mutaciones en genes supresores de tumores, alteración de oncogenes, cambios epigenéticos en el DNA, o de una combinación de estos factores (Smith et al., 2002). En general, se reconocen tres etapas principales de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión (Devi, 2004) (figura 1).

- *Iniciación*

Ocurre cuando hay uno o más cambios genéticos estables en la célula, que surgen espontáneamente o son inducidos por la exposición a un carcinógeno (Devi, 2004), virus (P. S. Moore & Chang, 2010) o por factores hereditarios (R. W. Ruddon, 1995). Se ha relacionado con una alteración genética ocurrida

durante la replicación del DNA (Waalkes, 1994) que afecta a los genes relacionados con la proliferación celular (Shibamoto & Bjeldanes, 2009). Dicha mutación puede ocurrir en tres clases de genes: los oncogenes, que estimulan el crecimiento celular; los genes supresores, que inhiben el crecimiento; y los genes supresores de tumores, que regulan la muerte celular programada o apoptosis (Gallegos, 2004).

- *Promoción*

Comprende la expansión clonal selectiva de las células alteradas durante la iniciación (células iniciadas) (Weston & Harris, 2003). Es un evento epigenético, ya que no implica cambios adicionales en el DNA (Shibamoto & Bjeldanes, 2009). El desarrollo neoplásico está influenciado por el ambiente intracelular y extracelular, que puede producir un aumento del potencial del crecimiento celular y/o un desacoplamiento de los procesos de comunicación intercelular que restringen la autonomía de la célula (Devi, 2004). Entonces, la promoción contribuye a la expansión de una población de células iniciadas que estarán en riesgo de transformarse en malignas.

- *Progresión*

Es la fase irreversible entre una lesión premaligna y el desarrollo del cáncer invasivo (I. Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, & Mukhtar, 2015). Resulta de la evolución continua mutagénica de la célula cancerosa, y da lugar a otros grados de invasividad, metástasis e independencia del microambiente, ya que ellas mismas producen las señales necesarias para activar sus factores de transcripción, que dan como resultado un aumento en el potencial de invasividad y metástasis (Mbeunkui & Johann, 2009; Shibamoto & Bjeldanes, 2009). Es decir, a medida que el tumor crece, las células pueden sufrir mutaciones adicionales que llevan a la expresión del fenotipo maligno y a la tendencia de las células a adquirir características más agresivas a lo largo del tiempo (Weston & Harris, 2003).

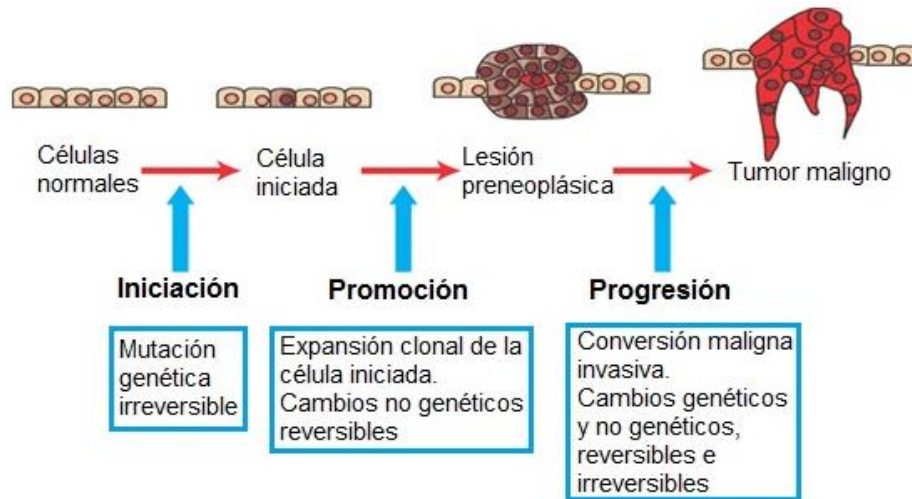


Fig.1. Etapas de la carcinogénesis. Imagen modificada de (Kusewitt & Ley, 1996).

2.3 Características distintivas del cáncer (hallmarks)

A diferencia de las células normales, las células cancerosas no son células especializadas, ya que las células normales maduran en tipos celulares distintos con funciones específicas, mientras que las células cancerosas no lo hacen y solo se dividen sin detenerse formando tumores (NCI, 2015).

Actualmente se conocen más de 100 tipos distintos de cáncer, y la diversidad de genotipos de las células cancerosas son resultado de la manifestación de al menos seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que conducen a la adquisición de los rasgos malignos (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011):

1) *Mantenimiento de la señal proliferativa*

Las células cancerosas tienen una desregulación en las señales promotoras del crecimiento y la división celular. Para que las células normales proliferen necesitan señales de estimulación que son transmitidas por la unión de factores de crecimiento, componentes de matriz extracelular (MEC), moléculas de interacción celular y moléculas de adhesión a receptores transmembranales (Hanahan & Weinberg, 2000). Las células cancerosas producen los propios

ligandos de sus factores de crecimiento, reduciendo así la dependencia de la estimulación por su microambiente. También pueden cambiar los tipos de receptores de componentes de la MEC, favoreciendo a los que transmiten las señales de crecimiento y proliferación, y además son capaces de estimular a las células normales del estroma asociado al tumor para que también secreten factores de crecimiento (Cheng, Chytil, Shyr, Joly, & Moses, 2008; Hanahan & Weinberg, 2011).

2) Evasión de los supresores de crecimiento

Las células cancerosas pueden evadir los programas que regulan negativamente la proliferación celular. Esos programas generalmente dependen de la acción de los genes supresores de tumores que limitan el crecimiento y la proliferación. Los dos genes supresores de tumores prototípicos codifican las proteínas RB (proteína del retinoblastoma) y p53 (Hanahan & Weinberg, 2011). Los defectos en las vías de señalización de estas proteínas provocan que se descontrole el ciclo celular y que las células proliferen persistentemente (Hanahan & Weinberg, 2011).

3) Activación de la invasión y metástasis

En carcinomas altamente agresivos está alterada la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión célula-célula y célula-componentes de MEC (Hanahan & Weinberg, 2011). Está favorecida la expresión de moléculas asociadas a la migración celular, como aquellas presentes durante la embriogénesis y la inflamación, por ejemplo N-cadherina, lo que permite que las células cancerosas lleguen a otras partes del cuerpo (Cavallaro & Christofori, 2004). El proceso de invasión y metástasis también se ha descrito como una secuencia de varias etapas (Fidler, 2003; Talmadge & Fidler, 2010). Comienza con la invasión local, seguida de la intravasación de las células cancerosas en los vasos linfáticos y sanguíneos cercanos. Luego, la diseminación de las células cancerosas a través de los sistemas linfático y hematógeno. Después ocurre la extravasación, que es el escape de las células

cancerosas del lumen de los vasos hacia el parénquima de los tejidos distantes. Posteriormente la formación de micrometástasis, que comprende la formación de pequeños nódulos de células cancerosas. Y finalmente la colonización de las células cancerosas, dando como resultado el crecimiento macroscópico de tumores (Hanahan & Weinberg, 2011; Talmadge & Fidler, 2010).

4) Potencial replicativo ilimitado

Se ha demostrado que las células normales cultivadas tienen un potencial replicativo limitado (Hayflick, 1997). Una vez alcanzado el límite de replications, las células entran en un estado irreversible no proliferativo pero viable, llamado senescencia. Generalmente, las células que logran evadir el estado de senescencia entran después en otro estado llamado crisis, que implica la muerte celular. En raras ocasiones, las células logran evadir la crisis y presentan un potencial replicativo ilimitado. A este rasgo se le llama inmortalización (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011). La mayoría de las células tumorales parecen estar inmortalizadas al adquirir un potencial replicativo ilimitado durante la progresión tumoral, que es esencial para su desarrollo maligno (Hayflick, 1997). Además, no muestran evidencias de senescencia o crisis (Hanahan & Weinberg, 2011).

5) Inducción de la angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren un sustento de oxígeno y nutrientes, así como una habilidad para evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono (CO₂) (Hanahan & Weinberg, 2011). La neovasculatura asociada al tumor generada por el proceso de angiogénesis responde a esas necesidades. Durante la progresión tumoral se activa una especie de “interruptor angiogénico” que provoca que la vasculatura se ramifique continuamente, formando nuevos vasos que ayuden a sostener los crecimientos neoplásicos en expansión (Hanahan & Folkman, 1996). La angiogénesis está regulada por factores que la inducen o la inhiben, algunos

de estos reguladores son proteínas de señalización que se unen a receptores de superficie de las células endoteliales vasculares (Baeriswyl & Christofori, 2009). El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, por sus siglas en inglés) es uno de los inductores de la angiogénesis mejor conocido, involucrado en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Ferrara, 2009).

6) *Evasión de la apoptosis*

La muerte celular programada o apoptosis es una serie de procesos moleculares en la célula, que conducen a su muerte (D. o. C. T. NCI, 2018). La resistencia a la apoptosis es un sello distintivo de todos los tipos de cáncer (Hanahan & Weinberg, 2000). La maquinaria apoptótica tiene dos clases de componentes, los sensores y los efectores (J. M. Adams & Cory, 2007). Los sensores son responsables de monitorear el ambiente intracelular y extracelular para detectar anomalías como daño en el DNA, señalización desequilibrada por acción de oncogenes, insuficiencia de factores de supervivencia, hipoxia, supresión de la señalización de moléculas de MEC, señalización de adherencia célula-célula, etc., que conducen a las células a encender el programa apoptótico (Evan & Littlewood, 1998; Giancotti & Ruoslahti, 1999; Ishizaki, Cheng, Mudge, & Raff, 1995). Los efectores consisten en una serie de proteasas intracelulares llamadas caspasas que ejecutan la apoptosis, promoviendo la ruptura de la membrana celular, el desensamble del citoesqueleto, la extrusión del citoplasma, la degradación de los cromosomas, fragmentación del núcleo y la destrucción selectiva de otras estructuras subcelulares y organelos (Thornberry & Lazebnik, 1998; Wyllie, Kerr, & Currie, 1980). La alteración de los componentes de la maquinaria apoptótica produce la inactivación de la vía, permitiendo que las células dañadas sigan proliferando. Una de las estrategias más comunes de la evasión de la apoptosis es mediante la pérdida de función de un regulador proapoptótico, como p53, que es un sensor de daño del DNA que puede inducir la activación de una cascada efectora apoptótica (Harris, 1996).

2.4 Clasificación del cáncer

El cáncer se puede clasificar en función del tipo de tejido en donde se origina (tipo histológico) o por la ubicación en el cuerpo donde se desarrolla (NCI, 2015; SEER, 2017).

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos Americanos (NCI, por sus siglas en inglés), dentro de la primera clase se encuentran los siguientes tipos de cáncer (NCI, 2015; SEER, 2017):

- Carcinoma: neoplasia maligna de origen epitelial o cáncer del revestimiento interno o externo del cuerpo. Los carcinomas a su vez se clasifican en cuatro subtipos, según el tipo de células epiteliales donde se originan:
 - a) Adenocarcinoma: se forma en tejidos glandulares, donde las células epiteliales producen fluidos o mucosa (cáncer de mama, colon, próstata).
 - b) Carcinoma basocelular: comienza en la capa basal de la epidermis, es decir, en la capa externa de la piel.
 - c) Carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide: se forma en las células epiteliales que se encuentran justo debajo de la superficie externa de la piel. Las células escamosas también recubren otros órganos, como el estómago, intestinos, pulmones, vejiga y riñones.
 - d) Carcinoma de células de transición: se forma en el urotelio, tejido que se encuentra en el revestimiento de la vejiga, los uréteres y parte de los riñones.
- Sarcoma: cáncer que se origina en los huesos y tejidos blandos, incluyendo músculo, grasa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejido fibroso (como tendones y ligamentos). Es de origen mesenquimal (R.W. Ruddon, 2007).
- Leucemia: cáncer que comienza en el tejido formador de sangre de la médula ósea. Este tipo de cáncer no forma tumores sólidos, pero las células cancerosas se acumulan expulsando a las células normales. Las leucemias se clasifican a su vez en cuatro subtipos: aguda o crónica, según la rapidez en que la enfermedad progresa; y a) linfoblástica o b) mieloide, de acuerdo al tipo de célula en que se origina el cáncer.

- a) Linfoma: cáncer que comienza en los linfocitos (células T o células B), los cuales se van acumulando en los ganglios y vasos linfáticos, así como en otros órganos del cuerpo.
- b) Mieloma: cáncer que se origina en las células plasmáticas, las cuales se acumulan en la médula ósea y forman tumores en los huesos de todo el cuerpo.
- Melanoma: cáncer que comienza en las células que se convierten en melanocitos. Se forman en la piel o en otros tejidos pigmentados (como el ojo).

La segunda clase es menos precisa, y es en general más común para el público, ya que se relaciona con el órgano principal donde se desarrolla el cáncer. Por ejemplo cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon y recto, cáncer de útero, etc. (SEER, 2017).

2.5 Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En el año 2012, a nivel mundial se registraron más de 14 millones de nuevos casos de cáncer y más de 8.2 millones de muertes relacionadas a esta enfermedad (Ferlay J. et al., 2013). Se ha determinado que una de cada seis defunciones son causadas por cáncer, y se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años (OMS, 2017).

A nivel mundial, los tipos de cáncer con mayor incidencia son el cáncer de pulmón, seguido del cáncer de mama, el cáncer colorrectal, y el cáncer de próstata. Los principales causantes de muertes son el cáncer de pulmón, el cáncer de hígado, el cáncer de estómago y el cáncer colorrectal (Ferlay J. et al., 2013) (figura 2a).

En México, los tipos de cáncer con mayor incidencia son el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer cervicouterino y el cáncer colorrectal, y los principales tipos causantes de muertes son el cáncer de pulmón, el cáncer de próstata, el cáncer de estómago y el cáncer de hígado (Ferlay J. et al., 2013) (figura 2b).

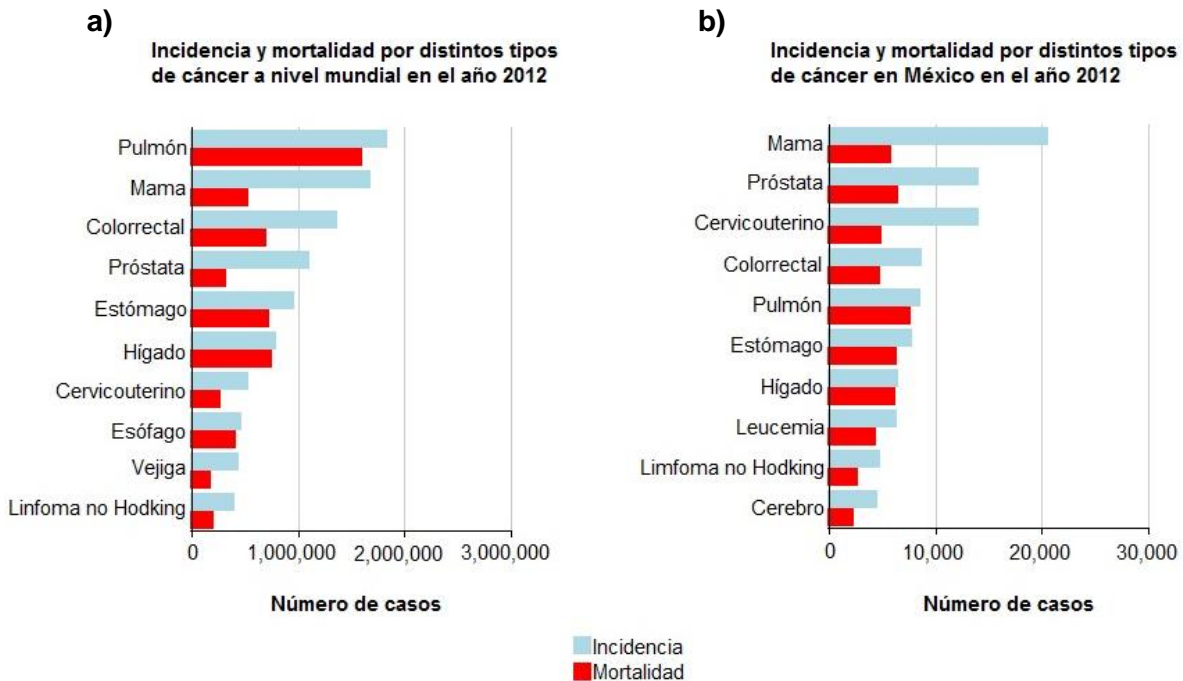


Fig. 2. Gráficas comparativas de los tipos de cáncer, mostrando el número de casos de incidencia y mortalidad, sin distinción de sexo. **a)** A nivel mundial y **b)** en México, en el año 2012. Imágenes modificadas de (Ferlay J. et al., 2013).

2.6 Cáncer de colon

El colon es un elemento que forma parte del intestino grueso, cuyas funciones principales son la absorción de agua y electrolitos del quimo, y el almacenamiento y transporte de la materia fecal hasta su expulsión (Segarra, 2006). Se divide anatómicamente en cuatro regiones: colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide (K. L. Moore, Dalley, & Agur, 2009) (figura 3a).

Histológicamente, el colon está organizado en cuatro capas distintas (Ricci-Vitiani, Fabrizi, Palio, & De Maria, 2009): mucosa, submucosa, muscular y serosa (AECC, 2014) (figura 3b). El epitelio colónico mucoso de la superficie luminal consiste en una sola capa de células epiteliales columnares dispuesta a lo largo del eje radial, formando invaginaciones llamadas criptas (Anderson, Hessman, Levin, Monroe, & Wong, 2011; Ricci-Vitiani et al., 2009). Se distinguen tres tipos celulares que componen las criptas: en la base se encuentran las células troncales epiteliales del colon; cerca de la porción inferior de la cripta se encuentran las células de

amplificación transitoria, involucradas en la expansión de la renovación epitelial e inicio de la diferenciación celular; y en la parte superior de las criptas se encuentran las células colónicas diferenciadas (Anderson et al., 2011; Ricci-Vitiani et al., 2009) (figura 3c).

Son cuatro los linajes celulares diferenciados en la cripta colónica: 1) colonocitos, células primarias de absorción; 2) células calciformes, encargadas de la secreción de mucina; 3) células enteroendócrinas, productoras de hormonas; y en algunos casos 4) células de Paneth, las cuales son células secretoras antimicrobianas (Anderson et al., 2011; Ricci-Vitiani et al., 2009).

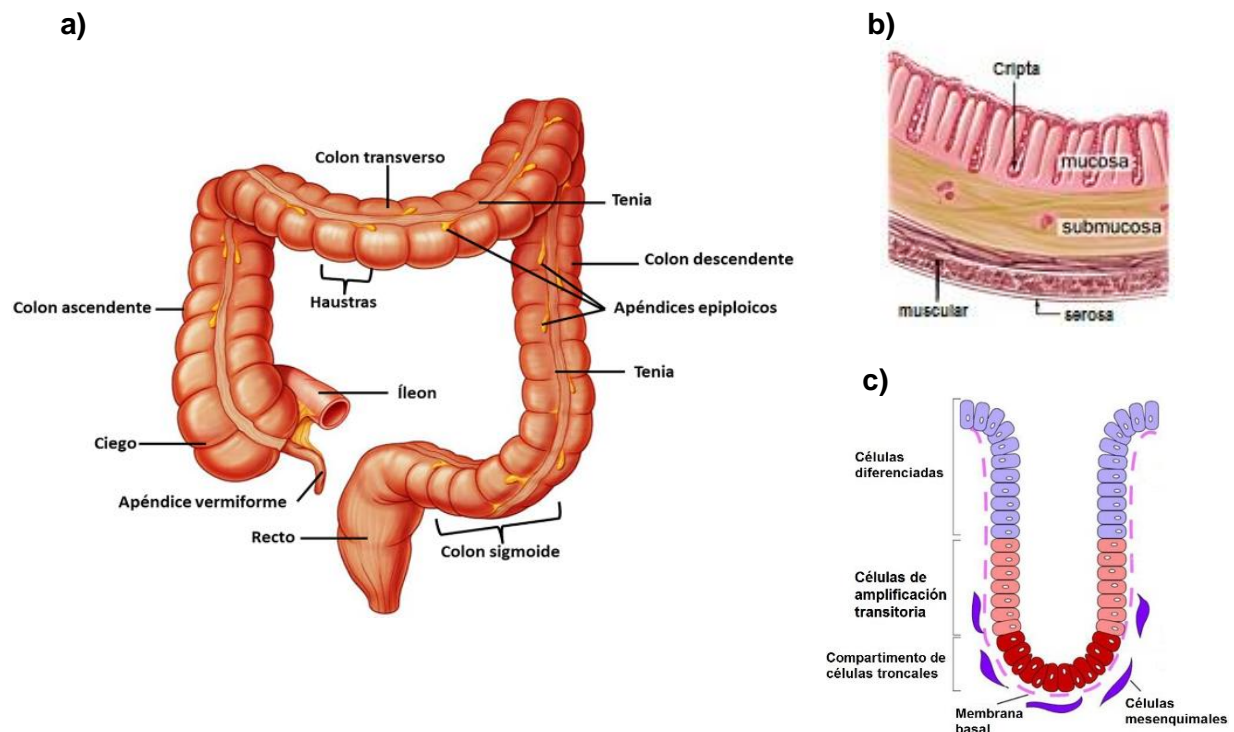


Fig. 3. Colon humano. **a)** Disposición y partes del colon (imagen tomada de (www.cancerenpositivo.org, 2015)). **b)** Representación de un corte transversal del colon, señalando las capas que lo componen (imagen modificada de (www.bbccolonica.ca, 2016)). **c)** Estructura de una cripta colónica (imagen modificada de (Anderson et al., 2011)).

El cáncer de colon (Ca-Co) es aquella neoplasia que se desarrolla en el tejido del intestino grueso (Donehower, 2007; Stokes, 2005) a partir de las células que componen las criptas (S.-J. Lee & Yun, 2010). Frecuentemente, el cáncer de colon

y el cáncer de recto se nombran en conjunto (colorrectal) debido a sus similitudes (ACS, 2017).

Con base en estudios epidemiológicos se ha estimado que entre un 70% y 80% de los casos de Ca-Co son esporádicos, en donde intervienen factores ambientales y de estilo de vida (Franco, Sikalidis, & Solis Herruzo, 2005; Müller, Ibrahim, & Arends, 2016). Por otro lado, el 20% o 30% restante de los casos están asociados a causas hereditarias, debido a síndromes de susceptibilidad de alto riesgo, como la poliposis adenomatosa familiar (PAF) o el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP), y/o como consecuencia de enfermedades inflamatorias del intestino (Munkholm, 2003; Whiffin et al., 2014).

De acuerdo con Vogelstein y colaboradores, el desarrollo del Ca-Co inicia con una deleción en el cromosoma 5q, que provoca la mutación del gen APC (Adenomatous Poliposis Coli) en una célula de la cripta (Fearon & Vogelstein, 1990; Kinzler & Vogelstein, 1996; Vogelstein et al., 1988). La mutación en APC conduce a la hiperproliferación del epitelio (Fodde, Smits, & Clevers, 2001), dando lugar a un adenoma (tumor no canceroso) temprano (Kinzler & Vogelstein, 1996; Vogelstein et al., 1988).

En el adenoma temprano se lleva a cabo una siguiente mutación, en el oncogén K-RAS, ubicado en el cromosoma 12p (Kinzler & Vogelstein, 1996; Vogelstein et al., 1988). Este evento permite que la célula mutada continúe proliferando, incrementando el tamaño del adenoma, dando lugar a un adenoma intermedio (Kinzler & Vogelstein, 1996; Vogelstein et al., 1988).

Una segunda deleción ocurre, afectando la región específica del cromosoma 18q (Vogelstein et al., 1988) que contiene los genes supresores de tumores DCC, DPC4 y JV18-1 (Kinzler & Vogelstein, 1996). Esta mutación provoca una alteración que afecta la adhesión celular y la apoptosis inducida por DCC (Tanaka, 2009). Las células siguen proliferando, hasta formar un adenoma tardío (Kinzler & Vogelstein, 1996; Vogelstein et al., 1988).

Posteriormente ocurre una tercera deleción, esta vez en el cromosoma 17p (Fearon & Vogelstein, 1990; Kinzler & Vogelstein, 1996; Vogelstein et al., 1988), causando una sustitución de aminoácidos en el gen supresor de tumor TP53

(Vogelstein et al., 1988). La mutación de TP53 provoca que las células con daños en el DNA evadan la apoptosis y continúen proliferando, dando lugar a la progresión del adenoma tardío a carcinoma (Tanaka, 2009).

La progresión tumoral continúa una vez que el carcinoma se ha formado (Vogelstein et al., 1988). Durante esta etapa otras alteraciones genéticas pueden llevarse a cabo, conduciendo a la metástasis del carcinoma (Kinzler & Vogelstein, 1996; Vogelstein et al., 1988). La figura 4 ilustra el desarrollo tumoral y las mutaciones ocurridas durante la carcinogénesis del Ca-Co.

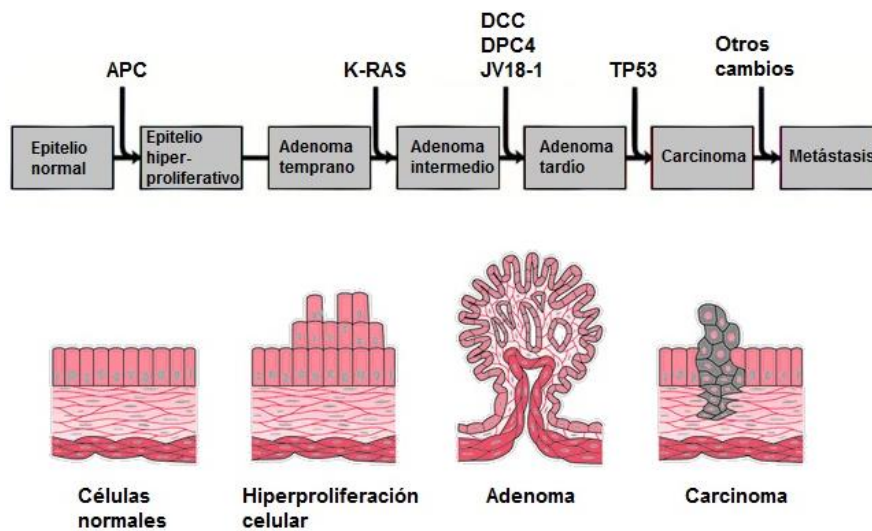


Fig. 4. Formación de un tumor y cambios genéticos asociados a la carcinogénesis del Ca-Co. Imagen modificada de (Jänne & Mayer 2000; Kinzler & Vogelstein, 1996).

El Ca-Co es una enfermedad altamente heterogénea, pero se puede clasificar en diferentes subtipos que se caracterizan por alteraciones moleculares y morfológicas específicas (Müller et al., 2016). De acuerdo con el consenso de subtipos moleculares (CMS, por sus siglas en inglés), el Ca-Co se clasifica en cuatro subtipos diferentes más un grupo mixto (Guinney et al., 2015). Esta clasificación se basa en los perfiles de expresión génica, integrando otras características como mutaciones, número de copias, metilaciones y proteómica (Guinney et al., 2015). La tabla 1 resume los subtipos moleculares y sus características.

Tabla 1. Clasificación molecular del Ca-Co. Características moleculares significativas de cada subtipo. Tabla modificada de (Graham, Coyle, Kennedy, & Wilson, 2016).

CMS1 MSI Inmune	CMS2 Canónico	CMS3 Metabólico	CMS4 Mesenquimal	Mixto
14% de los casos	37% de los casos	13% de los casos	23% de los casos	13% de los casos
Hipermutación, MSI	MSS, CIN	CIN baja	CIN/MSI heterogéneo	No determinado.
Activación inmune	Activación de la vía WNT/MYC	Activación moderada de la vía WNT/MYC	Activación Mesenquimal/TGF- β	Posible fenotipo de transición o heterogeneidad intratumoral.
Mutación en BRAF	Mutación en TP53. Sobreexpresión de EGFR	Mutación en KRAS, PIK3CA e IGFBP2	Sobreexpresión NOTCH3/VEGFR2	

CIN, inestabilidad cromosómica; **MSS**, microsatélite estable; **MSI**, microsatélite inestable.

En México, el Ca-Co tiene mayor incidencia en hombres que en mujeres (Ferlay J. et al., 2013), y el riesgo de desarrollarlo aumenta con la edad, pues la mayoría de los casos se presentan en personas mayores de 60 años, mientras que en jóvenes menores de 20 años el número de casos representa sólo el 1% del total (Adrouny, 2002).

A pesar de ser el cuarto tipo de cáncer más común y el séptimo causante de muertes asociadas a esta enfermedad, en México, la mortalidad es sustancialmente inferior a la incidencia (Ferlay J. et al., 2013). La mortalidad se atribuye principalmente al desarrollo de metástasis (S. Ju, Huang, Huang, & Su, 2015).

2.7 Tratamiento contra el cáncer de colon

El tratamiento contra el Ca-Co se clasifica en dos tipos (ACS, 2017; NCI, 2015):

- 1) Tratamiento local: es directamente en el tumor, por medio de:
 - Cirugía: extirpación del tumor.
 - Radioterapia: uso de rayos X de alta energía u otro tipo de radiación para destruir a las células cancerosas.
 - Ablación: destrucción de tumores pequeños con etanol, radiofrecuencia o criocirugía.

- Embolización: destrucción de tumores mayores a 5 cm por bloqueo del suministro sanguíneo.
- 2) Tratamiento sistémico: es a través del torrente sanguíneo, por medio de:
- Quimioterapia: uso de fármacos para para destruir o bloquear la multiplicación de células cancerosas. Se puede administrar antes (neoadyuvante) o después (adyuvante) de la cirugía. Se utilizan combinaciones para potenciar el efecto.
 - Terapia dirigida: uso de fármacos o compuestos para identificar y atacar células cancerosas específicas. Frecuentemente son fármacos que inhiben al factor de crecimiento VEGF o al receptor del EGF (EGFR).

Actualmente, la terapia para tratar el Ca-Co depende de la etapa o estadio en que este se encuentre. Cada estadio se caracteriza por la extensión o progresión del cáncer (ACS, 2017). La tabla 2 resume los tratamientos y fármacos más utilizados en la terapia contra el Ca-Co por etapa.

Tabla 2. Estadios y tratamiento del Ca-Co. Tabla obtenida de (ACS, 2017; NCI, 2015).

Estadio	0	I	II	III	IV
Progresión del cáncer	Carcinoma <i>in situ</i>	Propagado hacia la pared del colon, pero sin atravesarla	Propagado a través de la pared del colon hasta tejidos circundantes, sin llegar a los ganglios linfáticos	Propagado a ganglios linfáticos, pero sin invadir otras partes del cuerpo	Propagado a otros órganos (como hígado, pulmón y cerebro), y tejidos y ganglios linfáticos distantes
Tratamiento local	Cirugía	Cirugía	Cirugía	Cirugía	Cirugía
Tratamiento sistémico (fármacos)	No necesario	No necesario	5-FU, leucovorín, oxaliplatino	5-FU + leucovorín, 5-FU + capecitabina, FOLFOX, CapeOx	capecitabina, cetuximab, irinotecán, panitumumab, regorafenib, 5-FU + leucovorín, trifluridina + tipiracil, FOLFOX, FOLFIRI, FOLFOXIRI, CapeOx

5-FU, 5-fluorouracilo; **CapeOx**, capecitabina + oxaliplatino; **FOLFIRI**, 5-FU + leucovorín + irinotecán; **FOLFOX**, 5-FU + leucovorín + oxaliplatino; **FOLFOXIRI**, 5-FU + leucovorín + oxaliplatino + irinotecán.

Cuando el cáncer regresa después del tratamiento, se le llama reincidencia, recidiva o recurrencia (NCI, 2015), la cual puede ser local (en el mismo sitio donde se originó inicialmente el cáncer), regional (en los ganglios linfáticos o tejidos cercanos al sitio de origen) o distal (en órganos o tejidos lejanos al sitio de origen) (NCI, 2015). El tipo de tratamiento contra el Ca-Co recurrente involucra generalmente cirugía, seguida de quimioterapia, o viceversa, siendo los posibles regímenes los mismos para tratar la enfermedad en etapa IV (ACS, 2017).

El tratamiento contra el Ca-Co puede provocar efectos secundarios, los más comunes son dolor, pérdida de cabello, úlceras bucales y en la garganta, pérdida de apetito, náuseas y vómitos, diarrea, fatiga, anemia, sangrado y hematomas, estreñimiento, delirios, edemas, problemas para dormir, problemas sexuales, etc. (ACS, 2017; NCI, 2015). Otros efectos secundarios dependen específicamente del tipo y la dosis de los fármacos administrados (ACS, 2017). Por ejemplo, la capecitabina puede producir el síndrome mano-pie; el oxaliplatino puede causar neuropatía y reacciones de alergia o de sensibilidad, provocando erupciones cutáneas, dolor de espalda y dificultad para respirar; el 5-FU y la leucovorín se asocian al desarrollo de estomatitis y neutropenia (ACS, 2017; Wolpin & Mayer, 2008).

2.8 Células troncales del cáncer

Las células troncales (CT) son definidas como aquellas células que tienen la capacidad de perpetuarse mediante autorrenovación y de diferenciarse para originar células maduras de un tejido particular (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001). Otras propiedades funcionales que definen a las CT son su multipotencia, quiescencia reversible o estados de dormancia, y mayor resistencia a fármacos citotóxicos (Bacelli & Trumpp, 2012).

Estudios recientes confirman la idea de que células con propiedades de troncalidad son las responsables de la tumorigénesis (Dean, Fojo, & Bates, 2005). Además de que juegan un papel importante en la metástasis y la reincidencia (Yu et al., 2015).

El modelo de las células troncales del cáncer (CTC) propone que, al igual que los tejidos normales, los tumores también están jerárquicamente organizados (Muraro et al., 2012). Sólo una pequeña población de las células tumorales indiferenciadas, dotadas de capacidad de autorrenovación y diferenciación, son responsables de la iniciación y el mantenimiento del tumor, en contraste con la mayoría de las células que componen la masa tumoral, las cuales no poseen la capacidad de regeneración (Polyak & Hahn, 2006; Reya et al., 2001).

La explicación del posible origen de las CTC se debate entre dos hipótesis (Rajasekhar, 2014). La primera indica que las CTC podrían originarse a partir de CT normales, ya que al igual que las CT embrionarias, las CTC tienen capacidad de autorrenovación casi ilimitada (Bacelli & Trumpp, 2012). La segunda hipótesis sugiere que las CTC podrían originarse a partir de células progenitoras diferenciadas, las cuales posteriormente adquieren las propiedades de troncalidad debido a la acumulación de anomalías genéticas o epigenéticas (Bacelli & Trumpp, 2012).

Las poblaciones de CTC han sido identificadas con base en la expresión de marcadores de superficie específicos y de genes relacionados a troncalidad, junto con otras características funcionales, como alta clonogenicidad, capacidad de diferenciación, formación de esferas y esferoides, y la capacidad para reproducir el tumor original al ser transplantadas en ratones inmunodeficientes (Clevers, 2011; Dalerba, Cho, & Clarke, 2007; Gires, 2011). También muestran mayor resistencia a la radiación y a la quimioterapia (Sanders & Majumdar, 2011).

2.9 Células troncales del cáncer de colon

Las células troncales del cáncer de colon (CTC-Co) fueron identificadas originalmente como un pequeño grupo de células CD133⁺ (O'Brien, Pollett, Gallinger, & Dick, 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). Otros estudios han demostrado que las CTC-Co también expresan los marcadores de superficie CD166 y EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) (Dalerba, Dylla, et al., 2007). Adicionalmente, algunos autores incluyen otros marcadores, como CD24, CD26, CD29, Msi-1 y

Lgr-5 (Khalek, Gallicano, & Mishra, 2010; Vaiopoulos, Kostakis, Koutsilieris, & Papavassiliou, 2012).

Recientes estudios sugieren que las células de Ca-Co CD44⁺ también poseen propiedades de troncalidad (Dalerba, Dylla, et al., 2007). Se ha considerado que CD44 es mejor marcador que CD133 para identificar a las CTC-Co (S. Y. Ju, Chiou, & Su, 2014), e incluso podría usarse como único marcador de selección (Chu et al., 2009; Du et al., 2008).

La actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), involucrada en la producción de ácido retinoico (Khorrami, Zavaran Hosseini, Mowla, & Malekzadeh, 2015), también se ha descrito como un valioso marcador de CTC-Co, ya que las células ALDH⁺ muestran mayor tumorigenicidad que las células ALDH⁻ (Huang et al., 2009).

La coexpresión de marcadores como CD166/CD44, CD44/CD24, CD24/CD29, CD133/ALDH, CD44/ALDH y EpCAM/CD44/CD166 se han propuesto como fenotipos alternativos que permiten un enriquecimiento para la identificación de células con capacidad de iniciar un tumor (Dalerba, Dylla, et al., 2007; Khalek et al., 2010; Khorrami et al., 2015; Yeung, Gandhi, Wilding, Muschel, & Bodmer, 2010).

Por otro lado, la expresión de los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *KLF4* y *c-MYC*, y la actividad Wnt/ β -Catenina también han sido considerados como marcadores prometedores para identificar a las CTC-Co (Saiki et al., 2009; Vaiopoulos et al., 2012). Dichos genes se asocian con el estado indiferenciado de células normales y cancerosas de diferentes tejidos (Saiki et al., 2009).

La presencia de todos los marcadores antes mencionados se han usado para aislar a las posibles CTC-Co, demostrando que cumplen con características funcionales de troncalidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Vaiopoulos et al., 2012).

2.10 El marcador CD44

CD44 es una glicoproteína transmembranal, compuesta por 341 aminoácidos (David Naor, Sionov, & Ish-Shalom, 1997) y con un peso molecular entre 85 y 200

kDa (Basakran, 2015). Es codificada por el gen CD44, ubicado en el cromosoma 11, cuyo transcrito experimenta un complejo procesamiento postranscripcional que puede dar lugar a isoformas diferentes de CD44 mediante splicing alternativo, como la isoforma estándar (CD44s) o isoformas variantes (CD44v) (Nieto & Suárez Nieto, 2015; Xu et al., 2015).

El gen CD44 está conformado por aproximadamente 60 kb (Coleman & Tsongalis, 2001). Contiene 20 exones, donde los exones 1 a 5 y 16 a 18 están conservados en todas las isoformas; las isoformas variantes están codificadas por los exones 6 a 15; y los exones 19 y 20 son insertados por splicing alternativo (Basakran, 2015; Louderbough & Schroeder, 2011) (figura 5a).

La proteína CD44 es una molécula de cadena simple compuesta por un dominio extracelular N-terminal (que contiene los sitios de unión al ligando), una región proximal a la membrana, un dominio transmembranal (DTM) y una cola o dominio citoplásmico (DC) (Goodison, Urquidí, & Tarin, 1999; David Naor et al., 1997) (figura 5b).

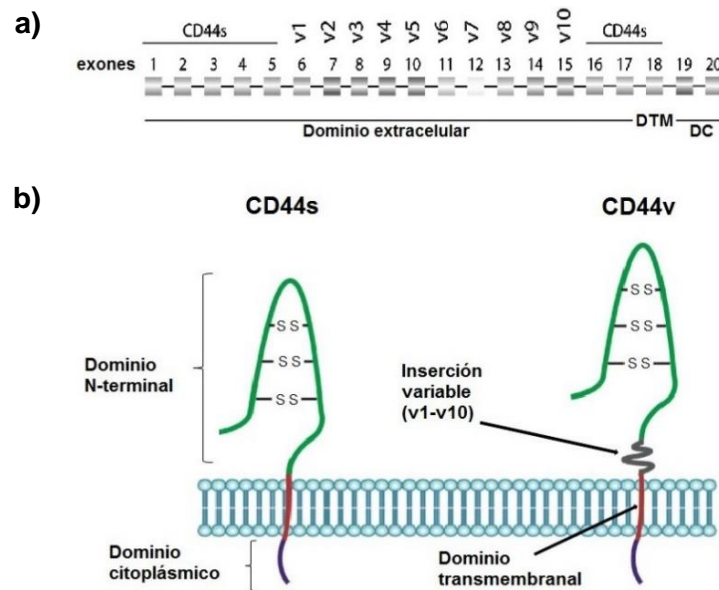


Fig. 5. Estructuras del gen y proteína CD44. **a)** Gen compuesto por 20 exones. Los exones 1 a 17 codifican para el dominio extracelular, el exón 18 codifica para el dominio transmembranal (DTM) y los exones 19 y 20 para el dominio citoplásmico (DC). **b)** Disposición de los dominios de la proteína CD44 en la membrana celular. SS indica puentes disulfuro. Imagen modificada de (Basakran, 2015; Louderbough & Schroeder, 2011).

CD44 es el principal receptor del ácido hialurónico (HA, por sus siglas en inglés), pero también se puede unir a otros componentes de la MEC, como el colágeno, la fibronectina, el sulfato de condroitina y la laminina (David Naor et al., 1997; Orian-Rousseau & Ponta, 2008). Otros ligandos de CD44 no relacionados con la MEC son la adresina mucosa, la serglicina y la osteopontina (David Naor et al., 1997).

El receptor CD44 es una molécula de adhesión involucrada en múltiples procesos biológicos, como interacciones célula-célula y célula-MEC; degradación del HA, migración y agregación celular; localización y activación de linfocitos; hematopoyesis, inflamación, desarrollo embrionario, apoptosis, producción de quimosinas y factores de crecimiento para células migratorias; y transmisión de señales de crecimiento (Goodison et al., 1999; David Naor et al., 1997; Sneath & Mangham, 1998).

CD44 está expresado en muchas enfermedades, entre ellas enfermedades inflamatorias, autoinmunológicas y cáncer (Basakran, 2015). En muchos tipos de cáncer está involucrado en la proliferación celular, migración, invasión, diferenciación, angiogénesis y metástasis (D. Naor, Nedvetzki, Golan, Melnik, & Faitelson, 2002). En el Ca-Co diversos estudios han demostrado que CD44 es de gran importancia para la iniciación y progresión del cáncer (Chu et al., 2009; Du et al., 2008).

En líneas celulares de Ca-Co como HCT-15 y HCT-116 se ha propuesto que la vía de señalización activada por la unión HA/CD44 está involucrada en el mantenimiento del fenotipo troncal, al regular la transcripción de marcadores de troncalidad, de factores de transcripción de supresores tumorales y de genes asociados a pluripotencia, además de regular la autorrenovación, anclaje celular independiente y crecimiento tumoral en xenotransplantes (Du et al., 2008; S. Y. Ju et al., 2014).

3. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

Aguirre-Alvarado y colaboradores reportaron la búsqueda de ligandos antagonistas del receptor CD44 por cribado virtual (CV). El CV es un método computacional utilizado para identificar estructuras químicas con propiedades particulares que permiten su interacción con una proteína blanco (Alvarez & Shoichet, 2005; Nature.com, 2017). Este CV se realizó por acoplamiento molecular (AM), una herramienta computacional que permite entender y predecir el modo de unión y la afinidad entre dos moléculas estructuralmente conocidas, donde el ligando es flexible y el receptor rígido (Morris & Lim-Wilby, 2008).

Para el CV se usó la estructura del dominio de unión del HA al receptor CD44 humano, disponible en la base de datos del PDB (Protein Data Bank) con número de acceso 1UUH (Teriete et al., 2004), y se utilizó la base de datos ZINC¹², la cual cuenta con las estructuras de compuestos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para su evaluación clínica en humanos (Irwin & Shoichet, 2005). Se obtuvieron 13,066 compuestos y se evaluó la probabilidad de unión de cada uno al dominio de unión del HA en CD44 mediante AM con los programas AutoDock 4.2, AutoDock Vina 1.1.2 y DSX_089. La evaluación del AM fue estimada con el valor de energía libre de unión ligando-receptor. Posteriormente, con cada uno de los programas se obtuvo un valor de Z-score, que es un valor traducido en unidades de desviaciones estándar que están por encima o por debajo de la media de un conjunto de datos (Black, 2009), y finalmente un Z-score consenso, que considera los Z-scores de los diferentes programas.

Con base al Z-score consenso se seleccionaron 10 compuestos como posibles antagonistas de CD44 y se refinó la selección a través de simulaciones de dinámica molecular (DM), un método similar al CV pero que considera flexibles tanto al ligando como al receptor (Hospital, Goñi, Orozco, & Gelpí, 2015). La DM se realizó con el programa AMBER 11 y se realizó la simulación durante 100 ns, utilizando un ensamble a temperatura y presión estándar. Con las 2,500 poses de los últimos 25 ns de la simulación de cada compuesto, se obtuvo el cálculo de la energía libre. Mientras que la unión CD44-HA tiene una energía libre de -5.9

Kcal/mol (Vuorio, 2013), la del etopósido fue de -13.1081 Kcal/mol, por lo que se seleccionó para su evaluación *in vitro* (Aguirre-Alvarado et al., 2016).

Los experimentos *in vitro* se realizaron con la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Para estudiar el bloqueo de CD44 por etopósido, llevaron a cabo ensayos de unión a HA, donde incubaron a las células previamente con un anticuerpo bloqueador monoclonal de CD44 o con el fármaco, y posteriormente expusieron a las células a HA acoplado al fluorocromo FITC. Mediante citometría de flujo midieron la intensidad de fluorescencia de las células y observaron que esta disminuyó significativamente en las células que fueron expuestas al etopósido, de la misma manera que en aquellas expuestas al anticuerpo monoclonal, comprobando así que el etopósido bloquea al receptor, inhibiendo la unión de su ligando (HA).

Para analizar la capacidad del etopósido como inhibidor de la adhesión celular inducida por HA, llevaron a cabo ensayos de adhesión estática. Observaron que el etopósido disminuyó significativamente el porcentaje de células adheridas a la capa de HA. Esta fue otra evidencia para demostrar que el etopósido inhibe la unión de HA a CD44 y la activación de funciones celulares, con lo que se demostró que el etopósido actúa como antagonista de CD44.

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México, el Ca-Co es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia y el séptimo tipo causante de muertes (Ferlay J. et al., 2013). Las CTC se han identificado como las responsables de la iniciación y el mantenimiento de los tumores (Reya et al., 2001), por lo que su erradicación farmacológica podría generar terapias más efectivas contra el cáncer. Hasta ahora no existen tratamientos dirigidos para atacar las CTC-Co. El receptor CD44 es un marcador de CTC-Co (Du et al., 2008), su vía de señalización favorece la iniciación, progresión y metástasis del Ca-Co, y está involucrada en la regulación de la expresión de otras moléculas supresoras

de las propiedades de troncalidad (S. Y. Ju et al., 2014). Por lo tanto, CD44 puede usarse como blanco terapéutico para desarrollar antagonistas que afecten el fenotipo y funciones características de troncalidad. Esto nos podría conducir a encontrar mejores tratamientos para el Ca-Co.

5. HIPÓTESIS

Dado que el receptor CD44 es un marcador de troncalidad en la línea celular de Ca-Co HCT-15, su bloqueo por medio de fármacos antagonistas reducirá la población troncal, provocando una disminución en la capacidad de formar tumoresferas y/o en la expresión del marcador ALDH.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Analizar el efecto de fármacos antagonistas del receptor CD44 sobre el fenotipo troncal en células de cáncer de colon HCT-15.

6.2 Objetivos particulares

- Evaluar la citotoxicidad de tres fármacos antagonistas de CD44 (emetina, etopósido y pictilisib) en la línea celular de Ca-Co HCT-15.
- Determinar el efecto de los tres fármacos en la formación de tumoresferas.
- Seleccionar aquel fármaco que muestre mayor selectividad hacia las CTC-Co.
- Medir la expresión de los marcadores de troncalidad CD44 y ALDH en células HCT-15 tratadas con el fármaco seleccionado.

7. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Cultivo celular

La línea celular de carcinoma colorrectal humano HCT-15 fue adquirida del American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB; Corning) a 37 °C y en atmósfera con 5% de CO₂. Los cultivos con aproximadamente 80% de confluencia celular se lavaron con 2 ml de buffer salino de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), se les adicionó 1 ml de Tripsina al 0.05% en EDTA (Gibco), y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Posteriormente las células se cosecharon con 3 ml de medio RPMI-1640 suplementado con SFB y se centrifugaron por 5 min a 5000 revoluciones por minuto (rpm). Se retiró el sobrenadante y los pellets celulares fueron resuspendidos en medio de cultivo. Se realizaron diluciones de las suspensiones celulares de 1:2 – 1:10 para generar subcultivos o para realizar conteos celulares en hematocitómetro (Bright-Line), evaluando simultáneamente la viabilidad celular por el método de exclusión de azul tripán (Sigma Aldrich). Para los experimentos posteriores se emplearon cultivos con $\geq 95\%$ de células viables.

7.2 Ensayos de citotoxicidad

En placas de 96 pozos (Nunc) se sembraron 10,000 células HCT-15 en cada pozo en 100 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de SFB y se dejaron adherir por 24 h. Posteriormente se adicionó a cada pozo 100 μ l de medio conteniendo fármaco a una concentración 2X. El rango de concentraciones evaluadas fue de 1.5625 a 200 μ M para etopósido, de 0.195 a 25 μ M para pictilisib y de 100 fM a 100 μ M para emetina. Los fármacos fueron obtenidos de Sigma Aldrich (para más información de los fármacos, consultar la tabla A1 del anexo). Como controles sin tratamiento (absolutos) se utilizaron pozos con células en medio con SFB, y como controles de disolvente se emplearon pozos con células, medio con SFB y dimetilsulfóxido (DMSO) para pictilisib y etopósido (0.05% y 0.4%,

respectivamente) o PBS (0.2%) para emetina. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5% de CO₂.

Transcurrido el periodo de incubación se retiraron 100 µl de medio de los pozos, se les agregaron 20 µl de bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; Sigma Aldrich) de un stock a 5 mg/ml y se incubaron nuevamente las placas a 37 °C y 5% de CO₂ por 2 h. Posteriormente se retiró el volumen completo de los pozos, se adicionó a cada uno 100 µl de DMSO (Sigma Aldrich) y las placas se agitaron 5 min a 200 rpm para disolver los cristales de formazán. Finalmente se hizo una lectura espectrofotométrica en un lector de placas EPOCH (BioTek) a una longitud de onda de 570 nm. Como blanco se utilizaron pozos sin células.

Con los resultados obtenidos se construyeron curvas de dosis-respuesta, considerando como 100% de viabilidad celular la señal obtenida en los controles de disolvente. Con las curvas se obtuvieron las concentraciones inhibitorias (CI) 25, 50 y/o 75 de los fármacos en la viabilidad celular.

7.3 Ensayos de formación de tumoroesferas

En placas de 96 pozos de ultra baja adherencia (Corning) se sembraron 100 células HCT-15 por pozo en 100 µl de medio de cultivo DMEM/F-12 libre de SFB y suplementado con 10 ng/ml de factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés; Gibco), 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, por sus siglas en inglés; Gibco), suplemento N2 1X (Gibco), suplemento B27 1X (Gibco) y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma Aldrich). Las células se incubaron durante 10 días a 37 °C y 5% de CO₂.

Se realizaron dos estrategias experimentales. En los experimentos para obtener las CI₅₀ de tumoroesferas se usaron células sin previo tratamiento y se agregó al medio para tumoroesferas etopósido, pictilisib (0.1, 1 y 10 µM) o emetina (1, 10, 100 y 1000 nM). En otros experimentos se emplearon células pretratadas por 48 h con etopósido (CI₂₅, CI₅₀ y CI₇₅) y no se adicionó fármaco al medio para tumoroesferas. En todos los casos se utilizaron controles absolutos y controles de disolvente. El medio fue reconstituido con 50 µl en dos ocasiones cada tres días para mantener las concentraciones de los suplementos y fármacos.

Transcurridos 10 días se tomaron micrografías de cada pozo en un microscopio invertido (Nikon) con el software Nis Elements Basic Research y finalmente con el mismo software se cuantificaron las tumoroesferas, considerando como tal a aquellas colonias cuyo diámetro fuera $\geq 50 \mu\text{m}$.

7.4 Citometría de flujo

Para la evaluación de la actividad de la enzima ALDH en células HCT-15 pretratadas por 48 h con etopósido (Cl_{25} , Cl_{50} y Cl_{75}) se prepararon suspensiones celulares de 800,000 células/ml en buffer de ensayo del kit Aldefluor (Stem Cell Technologies). A las suspensiones celulares se le adicionaron 5 μl de sustrato Aldefluor e inmediatamente se trasladó la mitad del volumen total a otro tubo con 6 μl del inhibidor dietilaminobenzaldehído (DEAB). Las muestras se incubaron 45 min a 37 °C, en oscuridad y agitación constante. Posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm y se retiró el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 300 μl de buffer de ensayo y se analizaron en el citómetro de flujo (Attune NxT), considerando como señal negativa la obtenida en la muestra con inhibidor DEAB.

La evaluación de la expresión del receptor CD44 se realizó en células HCT-15 pretratadas por 48 h con etopósido (Cl_{25} , Cl_{50} y Cl_{75}), estas se cosecharon con Tripsina TripLE Express (Gibco) y se prepararon suspensiones celulares de 400,000 células en 198 μl de buffer de ensayo. Para medir la autofluorescencia (AF) basal de las células se trasladó la mitad de la suspensión celular a otro tubo y se le agregó 1 μl más de buffer de ensayo, mientras que a la otra mitad se le agregó 1 μl del anticuerpo Anti Human CD44 acoplado al fluorocromo Violeta Brillante 421 (BD Horizon). Las muestras se incubaron durante 30 min a 4 °C, en oscuridad y agitación constante. Posteriormente las muestras se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y se les hizo un lavado con buffer de ensayo. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 μl de buffer de ensayo y se analizaron en el citómetro de flujo, considerando como señal negativa la obtenida en la muestra de la AF.

7.5 Análisis estadístico

Los datos de todos los experimentos se representaron como la media \pm el error estándar de la media (E. E. M.). Para las curvas de los ensayos de citotoxicidad y tumoresferas se realizaron análisis de regresión no lineal con los modelos de ecuaciones de dosis-respuesta de inhibición $Y=100/(1+10^{(X-\text{LogIC}_{50})})$ o $Y=\text{respuesta mínima}+(\text{respuesta máxima}-\text{respuesta mínima})/(1+10^{(\text{LogIC}_{50}-X)^{\text{pendiente}}})$, según mejor se ajustaran los datos. Para las comparaciones estadísticas respecto a los controles en todos los casos se realizaron pruebas de ANOVA de una vía por el método de Dunnett. El nivel de significancia considerado fue de 0.05%. Todas las pruebas se realizaron con el software GraphPad Prism 6.

8. RESULTADOS

8.1 Ensayos de citotoxicidad

Mediante ensayos de reducción de MTT se evaluó el efecto citotóxico del pictilisib, etopósido y emetina en la línea celular HCT-15 después de 48 h de exposición. En la figura 6 se muestran las curvas de citotoxicidad de cada uno de los fármacos. Encontramos que el fármaco menos citotóxico fue pictilisib, ya que aún con la concentración máxima evaluada (25 μM , debido a su limitada solubilidad) no se alcanzó una CI_{50} de la viabilidad celular. El etopósido, cuya solubilidad es mayor, se evaluó hasta una concentración máxima de 200 μM , alcanzando una CI_{50} a 33.73 μM y la máxima concentración evaluada inhibió aproximadamente el 90% de la viabilidad celular. Por otro lado, la emetina fue el fármaco más citotóxico ya que la CI_{50} se alcanzó a 84 nM. La tabla 3 muestra las CI_{50} de los fármacos.

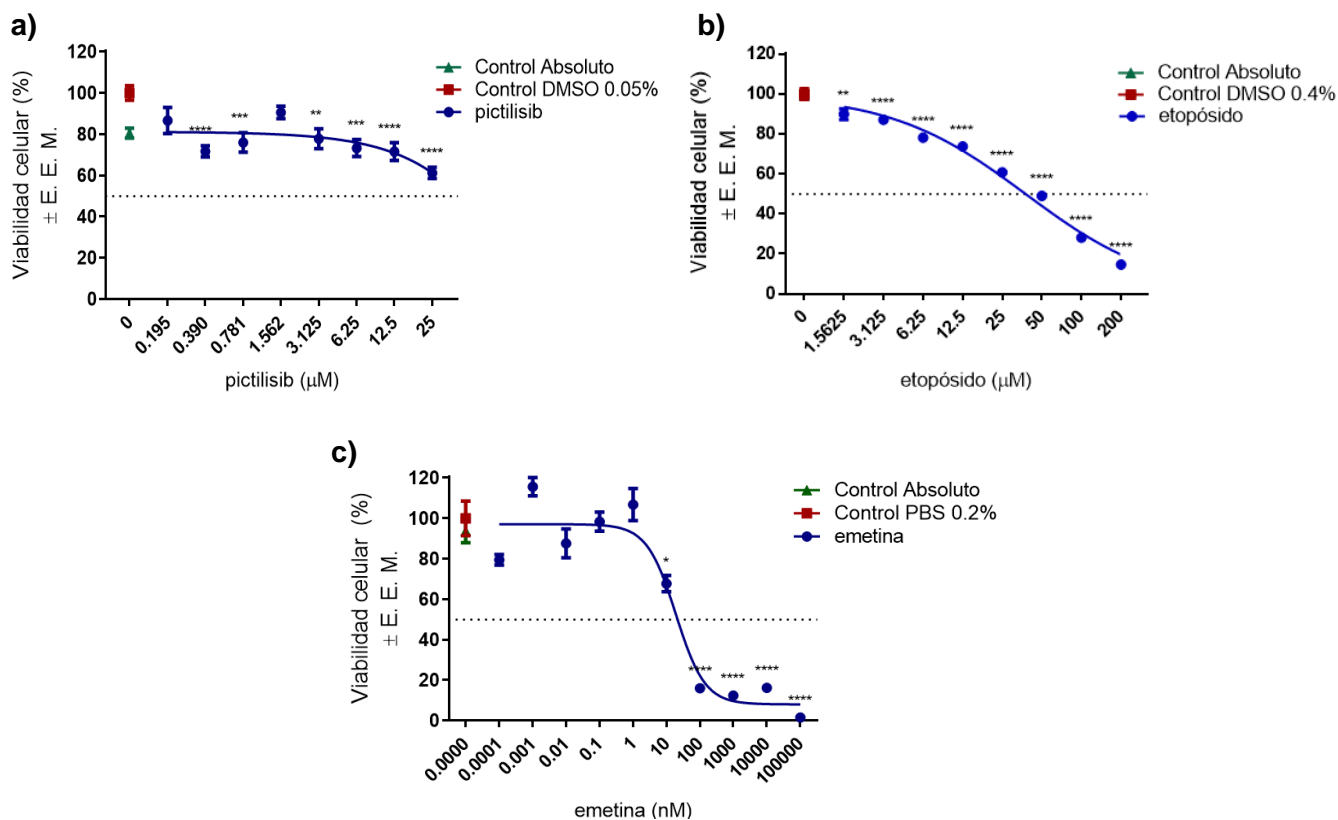


Fig. 6. Curvas de dosis-respuesta del efecto citotóxico a 48 h de los fármacos evaluados **a)** pictilisib, **b)** etopósido y **c)** emetina en la línea celular HCT-15. Experimentos representativos de tres independientes. Las comparaciones estadísticas se hicieron contra los respectivos controles de disolvente mediante pruebas de ANOVA con el método de Dunnet. Cada punto representa la media \pm el E. E. M. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, (****) $P < 0.0001$.

Tabla 3. CI_{50} de los fármacos en la viabilidad de las células HCT-15 a 48 h de exposición.

	pictilisib	etopósido	emetina
CI_{50}	> 25 μM	33.73 μM	84.65 nM

8.2 Ensayos de formación de tumoroesferas

Para obtener las CI_{50} de los fármacos en la formación de tumoroesferas, se cultivaron las células con diferentes concentraciones de fármaco como se describe en el punto 2 de la metodología. Las concentraciones evaluadas de los fármacos se determinaron a partir de las curvas de citotoxicidad, eligiendo algunas que

afectaron en menor medida la viabilidad celular (como máximo 30%). Para pictilisib y etopósido se evaluaron las concentraciones de 0.1, 1 y 10 μM , mientras que para emetina, el fármaco más citotóxico, se evaluaron las concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 nM. Los números totales de tumoresferas formadas con cada fármaco se normalizaron con los respectivos controles de disolvente, considerando como el 100% el número de tumoresferas formadas en estos. La figura 7 muestra las curvas de dosis-respuesta construidas con los datos obtenidos. Como se puede observar, se necesitó una mayor concentración de pictilisib para inhibir la formación de tumoresferas y a 10 μM no se alcanzó la CI_{50} . Por otro lado, el etopósido desde 1 μM disminuyó significativamente el número de tumoresferas formadas y la emetina lo hizo desde 1 nM. En la tabla 4 se muestran las CI_{50} de los fármacos.

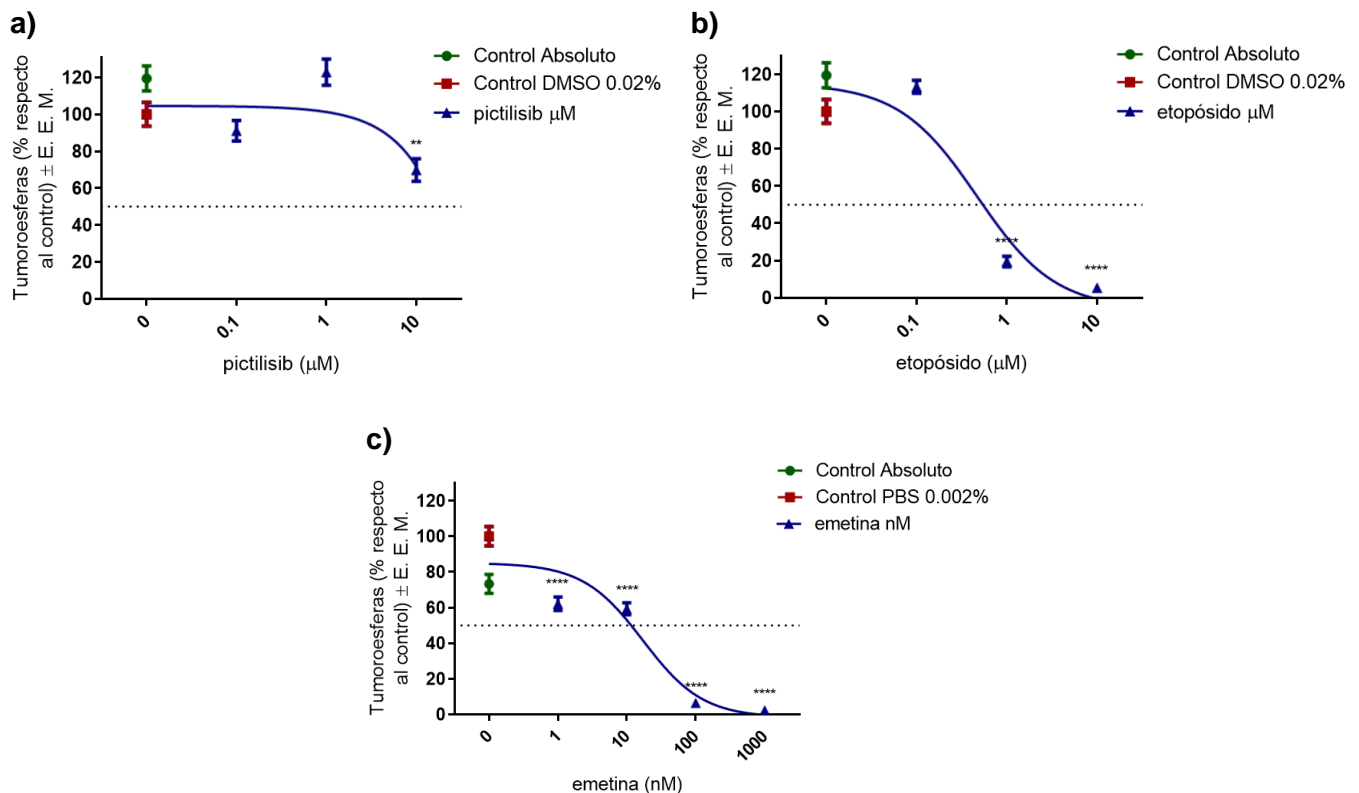


Fig. 7. Curvas de dosis-respuesta del efecto de los fármacos evaluados **a)** pictilisib, **b)** etopósido y **c)** emetina en la formación de tumoresferas en la línea celular HCT-15. Experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas se realizaron contra los respectivos controles de disolvente mediante pruebas de ANOVA con el método de Dunnet. Cada punto representa la media \pm el E. E. M. (**) $P < 0.01$, (****) $P < 0.0001$.

Tabla 4. CI_{50} de los fármacos en la formación de tumoresferas en la línea celular HCT-15 durante 10 días de exposición.

	pictilisib	etopósido	emetina
CI_{50}	> 10 μ M	0.46 μ M	17.06 nM

8.3 Elección del fármaco con posible mayor selectividad hacia células troncales del cáncer en la línea celular HCT-15

Con las CI_{50} de citotoxicidad y de formación de tumoresferas se calculó un cociente de selectividad hacia células troncales del cáncer de colon. Para ello se dividió el valor de CI_{50} de citotoxicidad entre el valor de CI_{50} de formación de tumoresferas de cada fármaco, ya que en condiciones adherentes (cultivos 2D) la mayoría de las células que forman colonias son no troncales, mientras que sólo aquellas con capacidad clonogénica, una propiedad de las células troncales, pueden formar colonias en condiciones no adherentes (cultivos 3D).

El valor más alto del cociente obtenido indica una posible mayor selectividad hacia las células troncales. En la tabla 5 se muestra que el valor del cociente de selectividad del etopósido es mayor respecto al de pictilisib y emetina, por lo tanto, fue el fármaco elegido para realizar experimentos posteriores.

Tabla 5. Cocientes de selectividad de los fármacos (CI_{50} citotoxicidad / CI_{50} formación de tumoresferas)

	pictilisib	etopósido	emetina
Cociente de selectividad	> 2.5	73.32	4.96

Dado que el etopósido fue el fármaco seleccionado, a partir de la curva de citotoxicidad (fig. 6b) se obtuvieron los valores de las CI_{25} , CI_{50} y CI_{75} para utilizar en los experimentos posteriores, con el fin de evaluar si los efectos del fármaco sobre características fenotípicas y funcionales asociadas a troncalidad dependen

de la concentración a la que se expusieron las células. La tabla 6 muestra las concentraciones que se evaluaron.

Tabla 6. Concentraciones Inhibitorias del etopósido en la viabilidad de células HCT-15 utilizadas en experimentos posteriores.

CI₂₅	CI₅₀	CI₇₅
12 μ M	35 μ M	105 μ M

8.4 Citometría de flujo: expresión de CD44

Se midió por citometría de flujo la expresión del marcador de troncalidad CD44 en células previamente expuestas por 48 h a las CI₂₅, CI₅₀ y CI₇₅ del etopósido. Para comparar, se utilizaron controles absolutos y de disolvente DMSO al 0.21%, este último por ser la concentración de disolvente que se alcanza al utilizar la CI₇₅ de fármaco en la viabilidad celular.

Encontramos que los cultivos celulares que fueron expuestos previamente a etopósido tuvieron un mayor porcentaje de células CD44⁺. La población CD44⁺ en el control absoluto y control de DMSO fue de 19.741% y 21.593%, respectivamente. En las células tratadas con las CI₂₅, CI₅₀ y CI₇₅ de etopósido la población CD44⁺ aumentó a 49.737%, 51.409% y 52.235%, respectivamente. La figura 8 muestra los porcentajes de células que expresaron el marcador CD44, obtenidos con el citómetro de flujo.

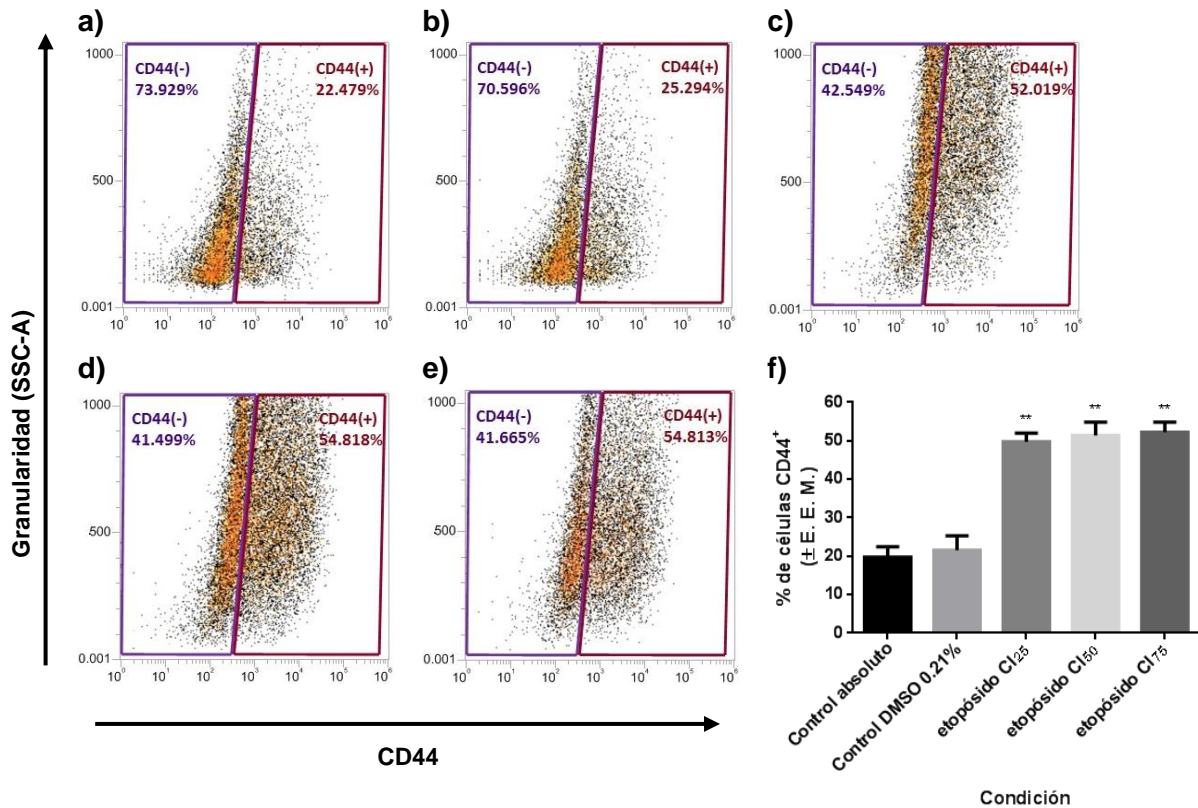


Fig. 8. Resultados de un experimento representativo cuantificado de las poblaciones CD44⁻ y CD44⁺ en el **a)** control absoluto, **b)** control de disolvente (DMSO al 0.21%), **c)** tratamiento con C₂₅ de etopósido, **d)** tratamiento con C₅₀ de etopósido y **e)** tratamiento con C₇₅ de etopósido. Regiones obtenidas en la adquisición en el citómetro de flujo con el software Attune NxT 2.5. **f)** Gráfica de los porcentajes de células CD44⁺ en las diferentes condiciones evaluadas, obtenida a partir de dos experimentos independientes. La comparación estadística se realizó contra el control de disolvente mediante pruebas de ANOVA por el método de Dunnet. Las barras representan la media ± el E. E. M. (**) $P < 0.01$.

Además, también se observó que las células que fueron expuestas a etopósido presentaron mayor tamaño y granularidad en comparación con las células de los controles. En la figura 9 se puede observar la dispersión del tamaño y granularidad de las células de las diferentes condiciones evaluadas.

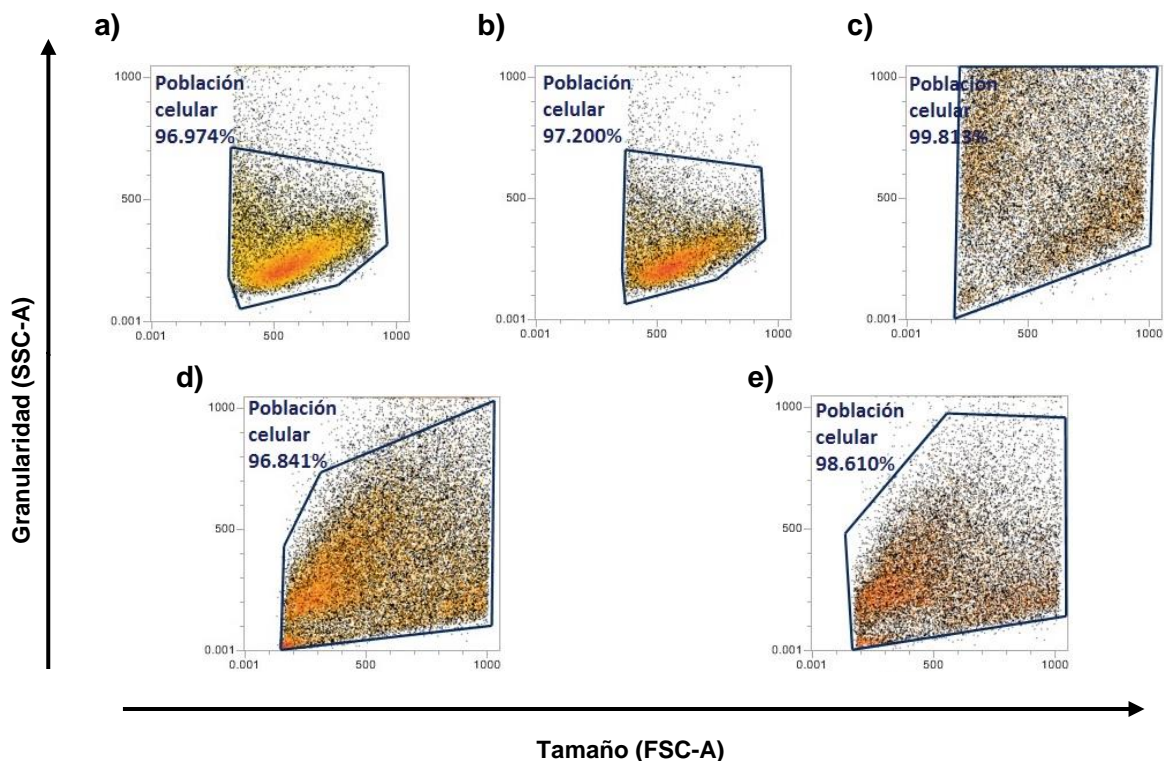


Fig. 9. Poblaciones de células del **a)** control absoluto, **b)** control de disolvente (DMSO al 0.21%), **c)** tratamiento con Cl_{25} de etopósido, **d)** tratamiento con Cl_{50} de etopósido y **e)** tratamiento con Cl_{75} de etopósido. Resultados obtenidos en la adquisición en el citómetro de flujo con el software Attune NxT 2.5. Experimento representativo de dos independientes.

8.5 Ensayos de formación de tumoresferas con células pretratadas con etopósido

Posteriormente a la exposición de las células durante 48 h a las Cl_{25} , Cl_{50} y Cl_{75} de citotoxicidad del etopósido, y dado que en el análisis fenotípico por citometría de flujo se observó un incremento en la población celular que expresó el marcador de troncalidad CD44, se evaluó el efecto del fármaco en la capacidad de formación de tumoresferas a partir de las células vivas que se recuperaron de la exposición de 48 h.

Transcurridos 10 días de incubación, se cuantificaron las tumoresferas formadas por células de las diferentes condiciones evaluadas. En los controles se formaron en promedio 16 tumoresferas por cada 100 células sembradas. De las células

sembradas provenientes de la exposición a la Cl_{25} del etopósido se formó como máximo una tumoroesfera en algunos pozos, mientras que las células provenientes de las Cl_{50} y Cl_{75} no formaron tumoroesferas. Es decir, la previa exposición a Cl_{25} , Cl_{50} y Cl_{75} de citotoxicidad del etopósido reduce $\approx 97.5\%$, 100% y 100% , respectivamente, la formación de tumoroesferas en la línea celular HCT-15. En la figura 10 se observan micrografías representativas de cada condición de los ensayos de tumoroesferas, así como la gráfica de la cuantificación.

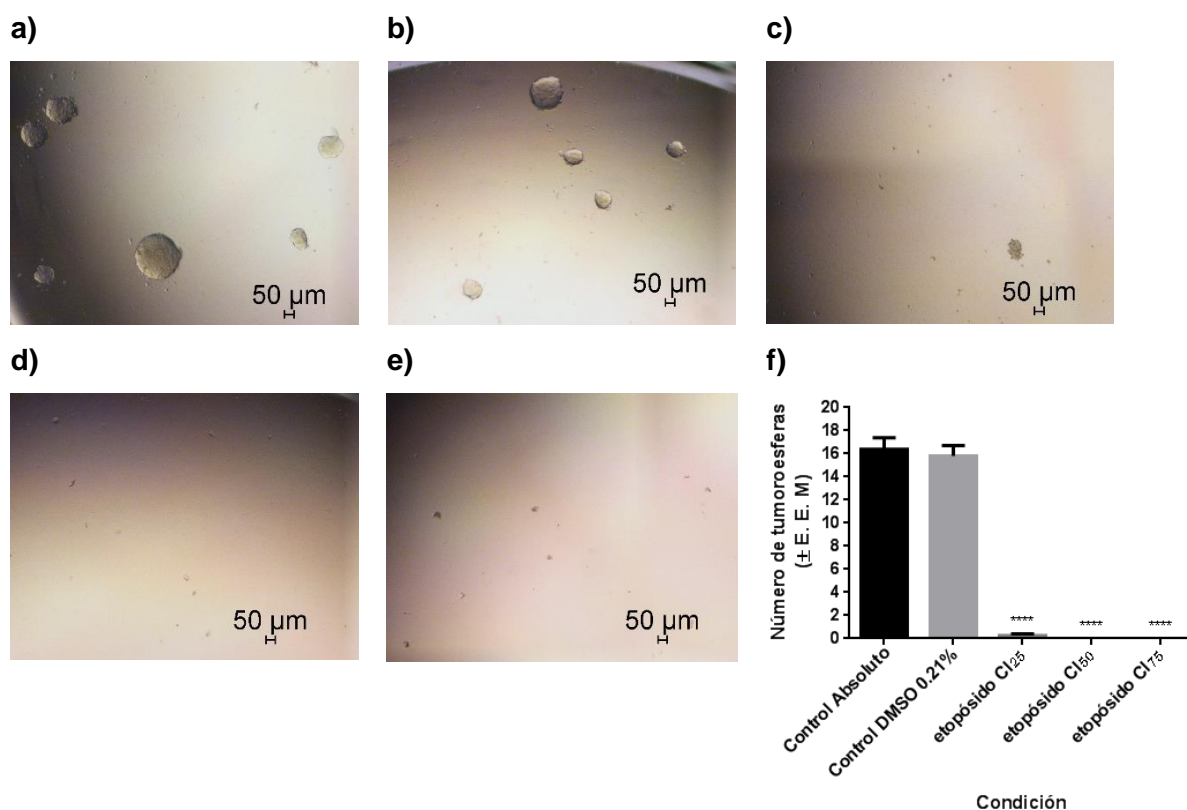


Fig. 10. Micrografías representativas de los ensayos de formación de tumoroesferas con células previamente expuestas a etopósido. **a)** Control absoluto, **b)** control de disolvente (DMSO al 0.21%), **c)** tratamiento con etopósido Cl_{25} , **d)** tratamiento con etopósido Cl_{50} , **e)** tratamiento con etopósido Cl_{75} . **f)** Gráfica del número de tumoroesferas formadas por cada 100 células sembradas por condición, obtenida a partir de cinco experimentos independientes. La comparación estadística se realizó respecto al control de solvente mediante pruebas de ANOVA por el método de Dunnet. Las barras representan la media \pm el E. E. M. (****) $P < 0.0001$.

8.6 Citometría de flujo: coexpresión CD44/ALDH

Debido a la discrepancia observada entre el aumento de la población celular que expresó el marcador CD44 y la disminución en el número de tumoroesferas formadas después de la exposición de las células a etopósido, se decidió hacer una segunda medición de marcadores de troncalidad, cuantificando tanto CD44 como ALDH. La medición de la coexpresión de estos marcadores se realizó en células HCT-15 previamente expuestas 48 h a las CI₂₅, CI₅₀ y CI₇₅ de citotoxicidad del etopósido. La figura 11 muestra los porcentajes de células que expresaron los marcadores obtenidos con el citómetro de flujo en las diferentes condiciones a las que se expusieron las células.

Al cuantificar la población CD44⁺/ALDH⁺, los porcentajes de células ALDH⁺ fueron de 2.580% y 3.634% en el control absoluto y control de disolvente, respectivamente, y de 2.025%, 1.530% y 0.629% en las células tratadas con las CI₂₅, CI₅₀ y CI₇₅ de etopósido, respectivamente.

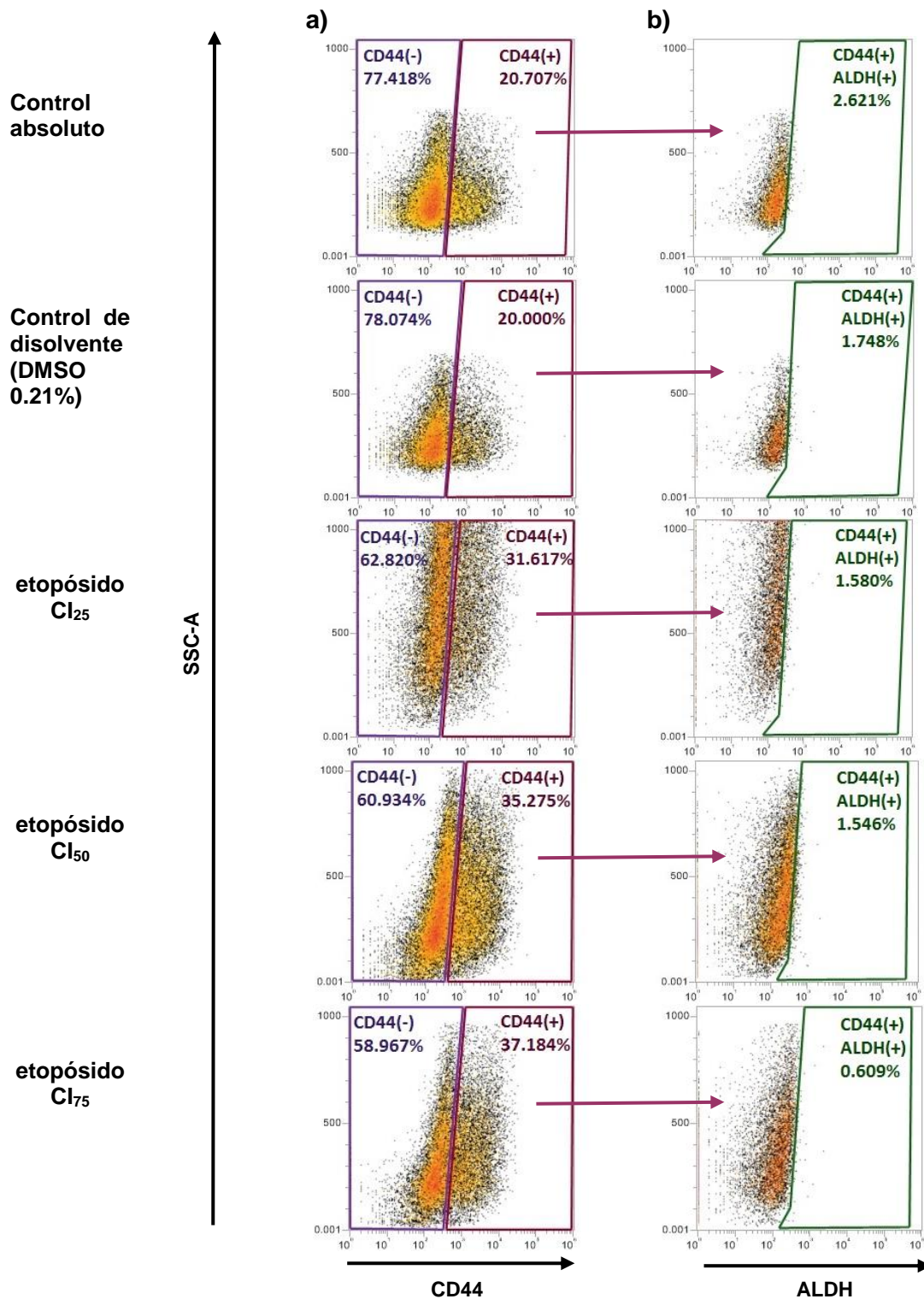


Fig. 11. Porcentajes de células HCT-15 pretratadas 48 h con diferentes concentraciones de etopósido que expresan los marcadores CD44 y ALDH. **a)** Regiones CD44⁻ y CD44⁺ y **b)** regiones CD44⁺/ALDH⁺. Resultados de un experimento representativo obtenidos en la adquisición en el citómetro de flujo con el software Attune NxT 2.5.

La figura 12 muestra la cuantificación de los porcentajes de células CD44⁺/ALDH⁺. El porcentaje de células que coexpresaron los marcadores CD44 y ALDH disminuyó 1.609%, 2.104% y 3.025% en las células pretratadas con las CI₂₅, CI₅₀ y CI₇₅ de etopósido, respectivamente. A pesar de los cambios en los porcentajes de células dobles positivas, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, respecto al control.

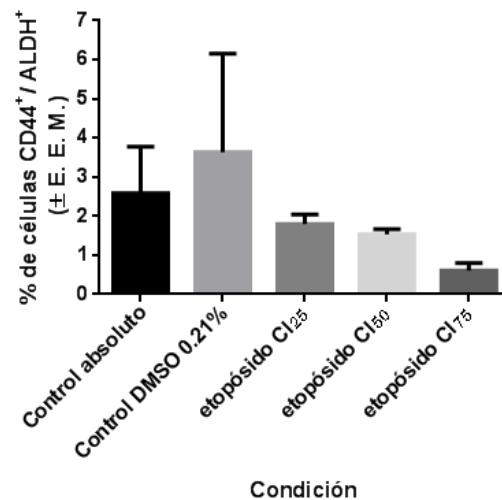


Fig. 12. Gráfica de los porcentajes de células HCT-15 CD44⁺/ALDH⁺ en las diferentes condiciones evaluadas. Experimento representativo de tres independientes. La comparación estadística se realizó respecto al control de disolvente mediante pruebas de ANOVA por el método de Dunnet. Las barras representan la media ± el E. E. M.

9. DISCUSIÓN

El descubrimiento de las CTC ha cambiado la visión del desarrollo de terapias contra el cáncer, ya que estas células juegan un papel fundamental en la iniciación tumoral, progresión, metástasis y recurrencia (Yu et al., 2015). Por esto, la erradicación de las CTC podría ser útil en la cura del cáncer (Chen et al., 2012). Como ya se ha mencionado previamente, estudios recientes han demostrado que las CTC-Co pueden ser aisladas usando CD44 como único marcador de selección

(Chu et al., 2009; Du et al., 2008). Por esta razón en el presente trabajo se evaluó el bloqueo de CD44 en la línea celular de Ca-Co HCT-15 con tres fármacos antagonistas del receptor: pictilisib, etopósido y emetina. Los fármacos fueron seleccionados previamente en nuestro laboratorio por cribado virtual (Aguirre-Alvarado et al., 2016).

Para caracterizar el nivel de expresión de CD44 en la línea celular HCT-15 se realizaron ensayos de citometría de flujo. La población CD44⁺ fue de aproximadamente 20%. Este valor se encuentra dentro del rango esperado, el cual se ha reportado entre 14.1% y 32.4% en esa línea celular (S. Ju et al., 2015; S. Y. Ju et al., 2014; Stuelten et al., 2010).

El potencial clonogénico en condiciones no adherentes se ha descrito como una característica de las células con propiedades de troncalidad (Calvet, André, & Mir, 2014), es por esto que decidimos realizar ensayos de formación de tumoresferas para evaluar el efecto de los fármacos en una de las funciones de las CTC. El etopósido disminuyó la formación de tumoresferas a concentraciones menores a las requeridas para producir citotoxicidad en cultivos adherentes, los cuales están enriquecidos con células no troncales. Por esta razón se eligió al etopósido como el fármaco con mayor selectividad hacia las CTC-Co y como el mejor candidato para los experimentos posteriores.

El etopósido es un agente antineoplásico semisintético derivado de la podofilotoxina, sustancia extraída de la raíz de la planta *Podophyllum peltatum* (D. D. NCI, 2017), cuyo mecanismo de acción es inhibir la función de la enzima topoisomerasa II (Topo-II), induciendo el rompimiento de la doble cadena de DNA (Law et al., 2014; M. F. Siddiqui, Muqaddas, & Sarwar, 2015) al evadir la formación del complejo de corte Topo-II-DNA, que evita el sobreenrollamiento de la cadena (Baldwin & Osheroff, 2005). Este tipo de daño al DNA es uno de los principales causantes de la activación de la apoptosis (Karpinich, Tafani, Rothman, Russo, & Farber, 2002; J. M. Lee & Bernstein, 1995). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que este fármaco disminuye la unión del HA a CD44 (Wang, Peyrollier, & Bourguignon, 2007) con la misma eficiencia que un anticuerpo

bloqueador monoclonal (Aguirre-Alvarado et al., 2016), es decir, bloquea al receptor.

Después de 48 h de exposición al etopósido, la población celular CD44⁺ aumentó significativamente. Esto podría indicar que el bloqueo farmacológico de CD44 estimula la expresión del mismo. Existen evidencias que demuestran que el microambiente que rodea a las células tumorales puede influir en su fenotipo (Ladeda, 1998). Otra posibilidad es que la población CD44⁺ sea más resistente al fármaco. Se ha reportado que las CTC pueden presentar mayor resistencia a fármacos quimioterapéuticos a través de diferentes mecanismos, por ejemplo: quiescencia, capacidad de reparación del DNA, o por la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, de transportadores para expulsión del fármaco o de enzimas detoxificantes (Vinogradov & Wei, 2012). Con base en nuestros resultados sugerimos que las células HCT-15 CD44⁺ son más resistentes al etopósido, pues a mayor concentración de fármaco a la que se expusieron las células, menor fue la proporción de la viabilidad celular y mayor el porcentaje de células CD44⁺.

Por otro lado, la exposición previa al etopósido también inhibe significativamente la capacidad de las células HCT-15 para formar tumoroesferas. Efectos similares se han reportado en células de cáncer de mama MDA-MB-231, donde la formación de tumoroesferas disminuye en más del 90% (Aguirre-Alvarado et al., 2016).

El tratamiento con etopósido también incrementó el rango del tamaño y granularidad en las células que fueron expuestas a las tres concentraciones del fármaco, lo que podría ser consecuencia de un arresto en el ciclo celular producido por este, ya que actúa principalmente en las fases G₂ y S del ciclo e impide la entrada en la fase mitótica (Law et al., 2014). Se ha demostrado en células leucémicas que el rompimiento del DNA inducido por la inhibición de la Topo-II puede conducir al arresto del ciclo celular y posteriormente a la apoptosis (Dubrez, Goldwasser, Genne, Pommier, & Solary, 1995).

El arresto en el ciclo celular y la inducción de apoptosis por el etopósido requiere de la proteína p53 (Tang, Luo, Zhang, & Gu, 2006). Como ya se mencionó anteriormente, p53 es una proteína supresora de tumores que juega un papel

importante en la apoptosis inducida por el daño al DNA, actuando como un factor de transcripción para dirigir la expresión de mediadores apoptóticos (Jamil, Lam, Majd, Tsai, & Duronio, 2015). Se ha reportado que las células tumorales que expresan p53 mutante son más resistentes a efectos citotóxicos de fármacos quimioterapéuticos, ya que pueden evadir la apoptosis inducida por los daños causados por estos (Blandino, Levine, & Oren, 1999). A pesar que las células HCT-15 expresan p53 mutante (Bottone, Baek, Nixon, & Eling, 2002), el etopósido es citotóxico en esa línea celular desde concentraciones de 1.5 μM después de 48 h de exposición. En contraste, en otras líneas celulares que también expresan p53 mutante, como MDA-MB-231, se ha observado que el etopósido disminuye significativamente la viabilidad celular a partir de concentraciones mayores a 30 μM (Guerrero-Rodríguez, 2015).

No hay suficiente información que demuestre que el bloqueo de CD44 en células de Ca-Co induzca muerte celular, pero sí afecta la formación de colonias, la regulación positiva de genes marcadores de troncalidad y la regulación negativa de inhibidores de troncalidad (S. Y. Ju et al., 2014).

Sin embargo, nuestros resultados muestran una discrepancia en considerar a CD44 como único marcador de troncalidad en células de Ca-Co, ya que con el aumento en el porcentaje de las poblaciones CD44⁺ esperaríamos también un aumento en el número de tumoroesferas formadas. Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto del etopósido en la expresión de ALDH.

En otros tipos de carcinomas mucoepidérmicos se ha observado que las subpoblaciones CD44⁺/ALDH⁺ presentan propiedades de troncalidad y mayor potencial tumorigénico (A. Adams et al., 2015). Al medir la coexpresión de CD44 y ALDH encontramos que el etopósido disminuyó la población CD44⁺/ALDH⁺ en células HCT-15, sin embargo, la disminución no fue estadísticamente significativa. A pesar de esto, identificamos un patrón en el que a mayor concentración de etopósido a la que se expusieron las células, menor fue el porcentaje de células dobles positivas. La disminución no significativa podría deberse a que la línea celular HCT-15 expresa normalmente niveles bajos de actividad de la enzima ALDH, menores del 1% (Stuelten et al., 2010).

Todo lo anterior sugiere que el etopósido afecta la proliferación y/o viabilidad de los subtipos troncal y no troncal de la línea celular HCT-15. El efecto sobre las CTC representa una ventaja, pues no existen terapias dirigidas para atacar las CTC en el Ca-Co.

El etopósido está aprobado por la FDA para uso en humanos en el tratamiento del cáncer testicular y cáncer de pulmón de células pequeñas. Además también ha mostrado actividad contra otras neoplasias malignas como linfoma, leucemia y glioblastoma (Law et al., 2014; Sinkule, 1984), y se ha demostrado que revierte el fenotipo mesenquimal en células de cáncer de mama (Aguirre-Alvarado et al., 2016), sin embargo son escasos los estudios de su actividad contra el Ca-Co.

Para conocer más acerca de los efectos del etopósido en las células de Ca-Co hace falta realizar diversos estudios, entre ellos, la determinación de la fase del ciclo celular en la que posiblemente arresta a las células para saber si induce quiescencia o senescencia; el análisis de los niveles de expresión de marcadores asociados a diferenciación, como CDX2 o CK20 (Du et al., 2008), para saber si está induciendo a las células a diferenciarse; así como el efecto del fármaco sobre la migración e invasión de las células y en la expresión de otros supresores tumorales, como microRNAs asociados a la vía de señalización de CD44. Además, para corroborar los efectos del etopósido obtenidos *in vitro* contra el Ca-Co, es necesario realizar experimentos *in vivo* para confirmar las ventajas del uso del fármaco contra esta neoplasia, y así poder proponer su reposicionamiento o combinación con otros agentes terapéuticos para erradicar el Ca-Co con mayor efectividad.

10. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que considerar a CD44 como único marcador no es suficiente para identificar a la población de CTC-Co, sino que su coexpresión con ALDH puede ser un marcador más confiable.

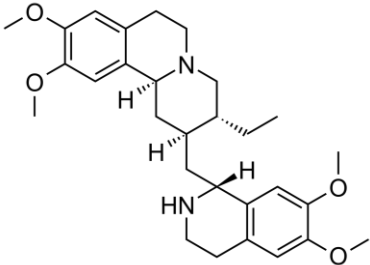
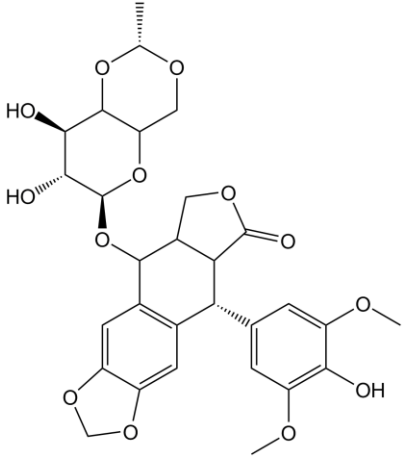
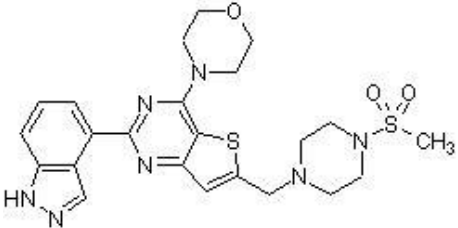
El bloqueo de CD44 por etopósido en células de Ca-Co HCT-15 disminuye la clonogenicidad de las células y la población CD44⁺/ALDH⁺. Además, este fármaco tiene un efecto citotóxico en las células, por lo que podría afectar directamente a las CTC-Co.

Los efectos del etopósido en células de Ca-Co no solo son consecuencia del bloqueo de CD44, sino que pueden involucrar otras vías de supervivencia y/o proliferación celular.

El uso y/o combinación del etopósido con otros agentes antineoplásicos potenciaría la efectividad quimioterapéutica contra el Ca-Co, evitando su recurrencia y favoreciendo la esperanza de vida de los pacientes.

11. ANEXO

Tabla A1. Información complementaria de los tres fármacos evaluados. Información obtenida de (Kim et al., 2016; Law et al., 2014; www.druginfosys.com, 2016).

Nombre	Estructura	Uso	Efectos secundarios
emetina		Tratamiento contra la amebiasis.	Debilidad muscular, mareos, náuseas, vómitos, dolor de cabeza y de articulaciones, fatiga, diarrea, trastorno gastrointestinal, taquicardia, formación de abscesos, neurosis, miocarditis.
etopósido		Tratamiento de tumores testiculares refractarios, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma, leucemia no linfocítica y glioblastoma multiforme.	Alopecia, estreñimiento, diarrea, náuseas, vómito, y neoplasias secundarias (como leucemias).
pictilisib		Estudio en el tratamiento contra el cáncer de mama, linfoma no Hodgkin y otros tumores sólidos.	No determinado.

12. REFERENCIAS

- ACS. (2017). What is colorectal cancer? Retrieved 11 de Octubre del 2017, 2017, from <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html>
- Adams, A., Warner, K., Pearson, A. T., Zhang, Z., Kim, H. S., Mochizuki, D., . . . Nor, J. E. (2015). ALDH/CD44 identifies uniquely tumorigenic cancer stem cells in salivary gland mucoepidermoid carcinomas. *Oncotarget*, 6(29), 26633-26650. doi: 10.18632/oncotarget.5782
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337. doi: 10.1038/sj.onc.1210220
- Adrouny, A. R. (2002). *Understanding Colon Cancer*. University Press of Mississippi.
- AECC. (2014). Cáncer de colon: anatomía. Retrieved 09 de noviembre de 2017, 2017, from <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/CANCERDECOLON/Paginas/anatomia.aspx>
- Aguirre-Alvarado, C., Segura-Cabrera, A., Velázquez-Quesada, I., Hernández-Esquivel, M. A., García-Pérez, C. A., Guerrero-Rodríguez, S. L., . . . Velasco-Velázquez, M. A. (2016). Virtual screening-driven repositioning of etoposide as CD44 antagonist in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(17), 23772.
- Alvarez, J., & Shoichet, B. (2005). *Virtual Screening in Drug Discovery*. CRC Press.
- Anderson, E. C., Hessman, C., Levin, T. G., Monroe, M. M., & Wong, M. H. (2011). The role of colorectal cancer stem cells in metastatic disease and therapeutic response. *Cancers*, 3(1), 319-339. doi: 10.3390/cancers3010319
- Baccelli, I., & Trumpp, A. (2012). The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *The Journal of Cell Biology*, 198(3), 281-293. doi: www.jbc.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201202014
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329-337. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>
- Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005). Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 5(4), 363-372.
- Basakran, N. S. (2015). CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Medical Journal*, 36(3), 273-279. doi: 10.15537/smj.2015.3.9622
- Black, K. (2009). *Business Statistics: Contemporary Decision Making*. John Wiley & Sons.
- Blandino, G., Levine, A. J., & Oren, M. (1999). Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene*, 18(2).

- Boticario, C. B., & Angosto, M. C. (2009). *Innovaciones en Cáncer*. UNED.
- Bottone, F. G., Baek, S. J., Nixon, J. B., & Eling, T. E. (2002). Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *The Journal of nutrition*, 132(4), 773-778.
- Calvet, C. Y., André, F. M., & Mir, L. M. (2014). The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. *PLoS One*, 9(2), e89644.
- Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4, 118. doi: 10.1038/nrc1276
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, 17(3), 313-319. doi: 10.1038/nm.2304
- Coleman, W. B., & Tsongalis, G. J. (2001). *The Molecular Basis of Human Cancer*. Humana Press.
- Chen, L.-S., Wang, A.-X., Dong, B., Pu, K.-F., Yuan, L.-H., & Zhu, Y.-M. (2012). A new prospect in cancer therapy: targeting cancer stem cells to eradicate cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 31(12), 564-572. doi: 10.5732/cjc.011.10444
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*, 6(10), 1521-1533. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-07-2203
- Chu, P., Clanton, D. J., Snipas, T. S., Lee, J., Mitchell, E., Nguyen, M. L., . . . Peach, R. J. (2009). Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *International journal of cancer*, 124(6), 1312-1321.
- Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*, 58, 267-284. doi: 10.1146/annurev.med.58.062105.204854
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., . . . Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(24), 10158-10163. doi: 10.1073/pnas.0703478104
- de Baptista, G. A., & Melo, C. M. (2014). Cáncer-vitaminas-minerales: Relación compleja. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(4), 220.
- Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5(4), 275-284. doi: 10.1038/nrc1590
- Devi, P. U. (2004). Basics of carcinogenesis. *Health Adm*, 17(1), 16-24.
- Donehower, R. C. (2007). *Colon Cancer 2007*: Univ Health Pub.

- Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., . . . Chen, Q. (2008). CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, *14*(21), 6751-6760. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-1034
- Dubrez, L., Goldwasser, F., Genne, P., Pommier, Y., & Solary, E. (1995). The role of cell cycle regulation and apoptosis triggering in determining the sensitivity of leukemic cells to topoisomerase I and II inhibitors. *Leukemia*, *9*(6), 1013-1024.
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, *281*(5381), 1317-1322.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759-767.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., . . . Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Retrieved 10 de agosto, 2017, from <http://globocan.iarc.fr>
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(6), 789-791. doi: 10.1161/atvbaha.108.179663
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 453-458. doi: 10.1038/nrc1098
- Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, *1*(1), 55-67. doi: 10.1038/35094067
- Franco, A., Sikalidis, A. K., & Solis Herruzo, J. A. (2005). Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. *Rev Esp Enferm Dig*, *97*(6), 432-448.
- Gallegos, F. (2004). *Cáncer en el Aparato Digestivo*: Elsevier España.
- Giancotti, F. G., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, *285*(5430), 1028-1032.
- Gires, O. (2011). Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci*, *68*(24), 4009-4022. doi: 10.1007/s00018-011-0772-9
- Goodison, S., Urquidi, V., & Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology*, *52*(4), 189-196.
- Graham, D. M., Coyle, V. M., Kennedy, R. D., & Wilson, R. H. (2016). Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, *12*, 141-150. doi: 10.1007/s11888-016-0312-y
- Guerrero-Rodríguez, S. L. (2015). *Evaluación in vitro de compuestos con posible actividad antagonista de CD44 en células de cáncer de mama*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., . . . Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, *21*, 1350. doi: 10.1038/nm.3967

<https://www.nature.com/articles/nm.3967#supplementary-information>

- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17(6), 1187-1198.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*, 62(11), 1180-1190.
- Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry : AABC*, 8, 37-47. doi: 10.2147/AABC.S70333
- Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., . . . Boman, B. M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*, 69(8), 3382-3389. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-4418
- Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, 45(1), 177-182. doi: 10.1021/ci049714+
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A. W., & Raff, M. C. (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol Biol Cell*, 6(11), 1443-1458.
- Jamil, S., Lam, I., Majd, M., Tsai, S.-H., & Duronio, V. (2015). Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53. *Cancer cell international*, 15(1), 79.
- Jänne, P. A., & Mayer, R. J. (2000). Chemoprevention of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 342(26), 1960-1968. doi: 10.1056/nejm200006293422606
- Ju, S., Huang, C.-Y., Huang, W., & Su, Y. (2015). Identification of thiostrepton as a novel therapeutic agent that targets human colon cancer stem cells. *Cell death & disease*, 6(7), e1801.
- Ju, S. Y., Chiou, S. H., & Su, Y. (2014). Maintenance of the stemness in CD44(+) HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. *Stem Cell Res*, 12(1), 86-100. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.011
- Karpinich, N. O., Tafani, M., Rothman, R. J., Russo, M. A., & Farber, J. L. (2002). The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to

- mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16547-16552.
- Khalek, F. J. A., Gallicano, G. I., & Mishra, L. (2010). Colon Cancer Stem Cells. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR(Suppl 1)*, S16-S23.
- Khorrami, S., Zavarán Hosseini, A., Mowla, S. J., & Malekzadeh, R. (2015). Verification of ALDH Activity as a Biomarker in Colon Cancer Stem Cells-Derived HT-29 Cell Line. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 8(5), e3446. doi: 10.17795/ijcp-3446
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., . . . Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, 44(Database issue), D1202-D1213. doi: 10.1093/nar/gkv951
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell*, 87(2), 159-170. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81333-1
- Kusewitt, D. F., & Ley, R. D. (1996). Animal models of melanoma. *Cancer Surv*, 26, 35-70.
- Ladeda, V. E. (1998). *Expresión de CD44 en tumores murinos y humanos y su relación con el proceso metastásico*. Universidad de Buenos Aires. Retrieved from http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd1-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_3005_Ladeda
- Law, V., Knox, C., Djoumbou, Y., Jewison, T., Guo, A. C., Liu, Y., . . . Wishart, D. S. (2014). DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D1091-1097. doi: 10.1093/nar/gkt1068
- Lee, J. M., & Bernstein, A. (1995). Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer and Metastasis Reviews*, 14(2), 149-161. doi: 10.1007/bf00665797
- Lee, S.-J., & Yun, C. C. (2010). Colorectal cancer cells – proliferation, survival and invasion by lysophosphatidic acid. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(12), 1907-1910. doi: 10.1016/j.biocel.2010.09.021
- Loeb, L. A., & Harris, C. C. (2008). Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer Research*, 68(17), 6863-6872. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-2852
- Louderbough, J. M. V., & Schroeder, J. A. (2011). Understanding the Dual Nature of CD44 in Breast Cancer Progression. *Molecular Cancer Research*, 9(12), 1573.
- Macarulla, T., Élez, E., Capdevila, J., & Tabernero, J. (2011). *Comprender el cáncer de colon y recto*: Amat Editorial.
- Mbeunkui, F., & Johann, D. J. (2009). Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 63(4), 571-582. doi: 10.1007/s00280-008-0881-9
- Moore, K. L., Dalley, A. F., & Agur, A. M. R. (2009). *Anatomía con orientación clínica*: Panamericana.

- Moore, P. S., & Chang, Y. (2010). Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature Reviews Cancer*, 10, 878. doi: 10.1038/nrc2961
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods Mol Biol*, 443, 365-382. doi: 10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Müller, M. F., Ibrahim, A. E. K., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469, 125-134. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3
- Munkholm, P. (2003). Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 18 Suppl 2, 1-5. doi: 10.1046/j.1365-2036.18.s2.2.x
- Muraro, M. G., Mele, V., Däster, S., Han, J., Heberer, M., Cesare Spagnoli, G., & Iezzi, G. (2012). CD133+, CD166+CD44+, and CD24+CD44+ Phenotypes Fail to Reliably Identify Cell Populations with Cancer Stem Cell Functional Features in Established Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(8), 592-603. doi: 10.5966/sctm.2012-0003
- Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., & Faitelson, Y. (2002). CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 39(6), 527-579. doi: 10.1080/10408360290795574
- Naor, D., Sionov, R. V., & Ish-Shalom, D. (1997). CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process. In G. F. Vande Woude & G. Klein (Eds.), *Advances in Cancer Research* (Vol. 71, pp. 241-319): Academic Press.
- Nature.com. (2017). Virtual screening. Retrieved 11 de agosto, 2017, from <https://www.nature.com/subjects/virtual-screening>
- NCI. (2015). What is cancer? Retrieved July, 25, 2017, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- NCI, D. D. (2017). etoposide. Retrieved 30 de agosto, 2017, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?CdrID=39207>
- NCI, D. o. C. T. (2018). Apoptosis. Retrieved 03 de Abril, 2018, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/apoptosis>
- Nieto, C. S., & Suárez Nieto, G. C. G. M. A. M. O. Á. T. P. (2015). *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello (eBook online)*: Editorial Médica Panamericana S.A.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106-110. doi: 10.1038/nature05372
- OMS. (2017). Cáncer. Retrieved 09 de agosto, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

- Orian-Rousseau, V., & Ponta, H. (2008). Chapter 4 Adhesion Proteins Meet Receptors: A Common Theme? *Advances in Cancer Research* (Vol. 101, pp. 63-92): Academic Press.
- Polyak, K., & Hahn, W. C. (2006). Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med*, 12(3), 296-300. doi: 10.1038/nm1379
- Rajasekhar, V. K. (2014). *Cancer Stem Cells*: Wiley.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/35102167>
- Ricci-Vitiani, L., Fabrizio, E., Palio, E., & De Maria, R. (2009). Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)*, 87(11), 1097-1104. doi: 10.1007/s00109-009-0518-4
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111-115. doi: 10.1038/nature05384
- Ruddon, R. W. (1995). *Cancer Biology* (Third ed.). New York: Oxford University Press.
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer Biology*: Oxford University Press, USA.
- Saiki, Y., Ishimaru, S., Mimori, K., Takatsuno, Y., Nagahara, M., Ishii, H., . . . Mori, M. (2009). Comprehensive analysis of the clinical significance of inducing pluripotent stemness-related gene expression in colorectal cancer cells. *Ann Surg Oncol*, 16(9), 2638-2644. doi: 10.1245/s10434-009-0567-5
- Sanders, M. A., & Majumdar, A. P. N. (2011). Colon cancer stem cells: implications in carcinogenesis. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 16, 1651-1662.
- SEER, T. M. (2017). Cancer classification. Retrieved July 31, 2017, from <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Segarra, E. (2006). *Fisiología de los aparatos y sistemas*: Universidad de Cuenca.
- Shibamoto, T., & Bjeldanes, L. F. (2009). *Introduction to Food Toxicology*: Elsevier Science.
- Siddiqui, I., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). *Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy* (Vol. 1348).
- Siddiqui, M. F., Muqaddas, M., & Sarwar, S. (2015). Biochemical mechanisms of etoposide; upshot of cell death. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(12), 4920.
- Sinkule, J. A. (1984). Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy*, 4(2), 61-73.
- Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J. V., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., . . . Wolf, C. R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic

- pathways to colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9433-9438. doi: 10.1073/pnas.122612899
- Sneath, R. J., & Mangham, D. C. (1998). The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Molecular Pathology*, 51(4), 191-200.
- Stokes, M. (2005). *Colon Cancer: Current and Emerging Trends in Detection and Treatment*. Rosen Publishing Group.
- Stuelten, C. H., Mertins, S. D., Busch, J. I., Gowens, M., Scudiero, D. A., Burkett, M. W., . . . Shoemaker, R. H. (2010). Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem cells*, 28(4), 649-660.
- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, 70(14), 5649-5669. doi: 10.1158/0008-5472.can-10-1040
- Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8(1), 5-5. doi: 10.4103/1477-3163.49014
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., & Gu, W. (2006). Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Mol Cell*, 24(6), 827-839. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.021>
- Teriete, P., Banerji, S., Noble, M., Blundell, C. D., Wright, A. J., Pickford, A. R., . . . Jackson, D. G. (2004). Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44. *Mol Cell*, 13(4), 483-496.
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.
- Vaiopoulos, A. G., Kostakis, I. D., Koutsilieris, M., & Papavassiliou, A. G. (2012). Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem cells*, 30(3), 363-371. doi: 10.1002/stem.1031
- Vinogradov, S., & Wei, X. (2012). Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (London, England)*, 7(4), 597-615. doi: 10.2217/nnm.12.22
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., . . . Bos, J. L. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525-532. doi: 10.1056/nejm198809013190901
- Vuorio, J. (2013). *Binding of Hyaluronic Acid to its CD44 Receptor*. (Master of Science), Tampere University of Technology, Finlandia. Retrieved from <https://dspace.cc.tut.fi/dpub/handle/123456789/22288>
- Waalkes, M. P. (1994). *Carcinogenesis*: CRC Press.
- Wang, S. J., Peyrollier, K., & Bourguignon, L. Y. (2007). The influence of hyaluronan-CD44 interaction on topoisomerase II activity and etoposide cytotoxicity in head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 133(3), 281-288.

- Weston, A., & Harris, C. (2003). *Multistage Carcinogenesis*. (6th ed.): B.C. Decker.
- Whiffin, N., Hosking, F. J., Farrington, S. M., Palles, C., Dobbins, S. E., Zgaga, L., . . . Dunlop, M. G. (2014). Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Human molecular genetics*, 23(17), 4729-4737. doi: 10.1093/hmg/ddu177
- Wolpin, B. M., & Mayer, R. J. (2008). Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 134(5), 1296-1310. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.098
- www.bbccoloniac.ca. (2016). How colonic therapy works? Retrieved 10 de noviembre del 2017, 2017, from <http://www.bbccoloniac.ca/index.php/colonic/colonic-procedure/how-colonic-works>
- www.cancerenpositivo.org. (2015). Colon y recto, partes del sistema digestivo. Retrieved 06 de Octubre del 2017, 2017, from <http://www.cancerenpositivo.org/wp-content/uploads/2017/03/ig.png>
- www.druginfosys.com. (2016). Emetine. Retrieved 05 de Abril, 2018, from <http://www.druginfosys.com/>
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., & Currie, A. R. (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. In G. H. Bourne, J. F. Danielli & K. W. Jeon (Eds.), *International Review of Cytology* (Vol. 68, pp. 251-306): Academic Press.
- Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Wu, H., Liu, Q., Pestell, R. G., & Wu, K. (2015). The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development. *Oncotargets and therapy*, 8, 3783-3792. doi: 10.2147/OTT.S95470
- Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R., & Bodmer, W. F. (2010). Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(8), 3722-3727. doi: 10.1073/pnas.0915135107
- Yu, Y., Nangia-Makker, P., Farhana, L., Rajendra, S. G., Levi, E., & Majumdar, A. P. (2015). miR-21 and miR-145 cooperation in regulation of colon cancer stem cells. *Molecular cancer*, 14(1), 98.