



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel de los receptores de dopamina en la troncalidad de células de cáncer de mama

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:  
Arely Rosas Cruz

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez  
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Aliesha González Arenas  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)  
Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez  
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Abril, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Índice

Agradecimientos .....	4
Abreviaturas .....	5
Resumen .....	7
1. Introducción .....	8
1.1  Cáncer .....	8
1.2  Cáncer de mama .....	11
1.2.1  Epidemiología .....	11
1.2.2  Clasificación .....	12
1.2.3  Pronóstico .....	13
1.2.4  Diagnóstico .....	14
1.2.5  Tratamiento .....	14
1.3  Receptores de dopamina .....	15
1.3.1  Localización y función .....	16
1.3.2  Clasificación .....	16
1.3.3  Estructura .....	17
1.3.4  Señalización de los receptores de dopamina .....	18
1.4  Células troncales tumorales .....	21
1.4.1  Definición y características .....	21
1.4.2  Identificación de las células troncales tumorales de mama (CTTM) .....	22
1.4.3  Importancia clínica de las células troncales tumorales de mama .....	23
1.5  Receptores de dopamina en cáncer .....	24
1.5.1  Receptores de dopamina en cáncer de mama .....	25
2. Planteamiento del problema y justificación .....	27
3. Hipótesis .....	28
4. Objetivos .....	28
4.1  Objetivo general .....	28
4.2  Objetivos específicos .....	28
5. Materiales y métodos .....	29
5.1  Líneas y cultivo celulares .....	29
5.2  Producción de lentivirus .....	29
5.3  Transducción de líneas celulares de cáncer de mama .....	31
5.4  Agonistas y antagonista de los receptores a dopamina .....	32

5.5	Identificación de los receptores a dopamina por citometría de flujo .....	32
5.5.1	Tinción de marcadores de membrana .....	32
5.5.2	Tinción de proteínas intracelulares .....	33
5.6	Evaluación de la viabilidad celular .....	34
5.7	Determinación de la fracción troncal (SORE6-GFP+) tras el tratamiento con los fármacos dopaminérgicos .....	34
5.8	Análisis estadístico .....	35
6.	Resultados.....	36
6.1	Los receptores de dopamina se expresan en las muestras de pacientes con cáncer de mama .....	36
6.2	La expresión de algunos RD tiene un impacto en el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama.....	36
6.3	Las líneas celulares de cáncer de mama expresan los receptores de dopamina. 37	
6.4	Una pequeña fracción de las células MCF7 y MDA-MB-231 expresan los genes SOX2 y OCT4. ....	41
6.5	Los RD se expresan diferencialmente en las células CTT de mama. ....	43
6.6	El tratamiento con agonistas o antagonistas de los RD no afecta en la viabilidad celular a bajas concentraciones. ....	45
6.7	El tratamiento con agonistas o antagonistas de los RD no afecta el porcentaje de la población troncal en células de cáncer de mama .....	48
7.	Discusión.....	51
8.	Conclusiones.....	56
9.	Referencias .....	57
10.	ANEXOS .....	68

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca que me permitió realizar mis estudios (1003227).

A PAPIIT UNAM por el apoyo económico recibido mediante el proyecto IN219719.

Al Dr. Marco A. Velasco Velázquez por el conocimiento brindado, su apoyo y contribución a mi formación profesional.

A mi comité tutor, Dra. Aliesha González Arenas y Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, por su asesoramiento, consejos y aportación a mi formación.

A mi familia, por su apoyo incondicional, su amor y por siempre motivarme a seguir mis sueños.

A mi familia del Laboratorio de Farmacología Molecular, por brindarme su amistad y hacer mis días más divertidos. Las risas nunca nos faltaron.

A la Dra. Nohemí Salinas por apoyarme en todo momento durante la realización de este trabajo. Por los buenos momentos, las pláticas y consejos.

A mi novio Edgar, por su apoyo y por darme ánimos para cumplir mis metas. Gracias por creer siempre en mí, por tu comprensión y por todo el amor que me das.

## Abreviaturas

<b>7-AAD</b>	7-Actinomicina D
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico*
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CaMa</b>	Cáncer de mama
<b>CaMKII</b>	Cinasa 2 dependiente de calcio/calmodulina
<b>CDK5</b>	Cinasa dependiente de ciclina 5
<b>CMTN</b>	Cáncer de mama triple negativo
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
<b>CTMN</b>	Células troncales mamarias normales
<b>CTT</b>	Células troncales tumorales
<b>CTTM</b>	Células troncales tumorales de mama
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DARPP-32</b>	Fosfoproteína de 32 kDa regulada por AMPc y dopamina
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DRD1</b>	Receptor de dopamina 1
<b>DRD2</b>	Receptor de dopamina 2
<b>DRD3</b>	Receptor de dopamina 3
<b>DRD4</b>	Receptor de dopamina 4
<b>DRD5</b>	Receptor de dopamina 5
<b>EGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico*
<b>EMEM</b>	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima*
<b>ESC</b>	Células madre embrionarias*
<b>ERK</b>	Cinasa regulada extracelularmente*
<b>GBM</b>	Glioblastoma
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente*
<b>GIRK</b>	Canal de potasio rectificador interno activado por proteína G

<b>GPCR's</b>	Receptores acoplados a proteínas G*
<b>HER2</b>	Receptor del factor epidérmico humano tipo II
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IMF</b>	Intensidad mediana de fluorescencia
<b>IP3</b>	Inositol-1,4,5-trifosfato
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos*
<b>MEK</b>	Proteína cinasa cinasa activada por mitógeno*
<b>mRNA</b>	ARN mensajero*
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolio
<b>NaN3</b>	Azida de sodio
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>PE</b>	Ficoeritrina*
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PKA</b>	Proteína cinasa dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PP1</b>	Proteína fosfatasa 1
<b>PP2B</b>	Proteína fosfatasa 2B dependiente de calmodulina
<b>RD</b>	Receptor de dopamina
<b>RE</b>	Receptor de estrógenos
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>STEP</b>	Tirosina fosfatasa enriquecida en estriatal
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TN</b>	Triple negativo

\*Por sus siglas en inglés

## Resumen

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y primera causa de muerte en la población femenina a nivel mundial. A pesar de los avances en el diagnóstico, clasificación y tratamiento de la enfermedad, actualmente no hay una cura efectiva para el cáncer de mama. Dentro del tumor, las células troncales tumorales (CTT) son las responsables del establecimiento de nuevos tumores en sitios secundarios, de la resistencia a terapias anticancerígenas y de la reaparición del tumor. Hoy en día, no existe una terapia para la erradicación de las CTT; sin embargo, la búsqueda de blancos moleculares que puedan modificar la fracción troncal apunta a los receptores de dopamina (RD). Los RD pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y existen 5 tipos (DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, y DRD5). Estudios recientes han demostrado que estos receptores pueden controlar diversas funciones en células cancerosas como proliferación, supervivencia, migración e invasión. Adicionalmente, se ha reportado que los RD se expresan en CTT mamarias, leucémicas y de carcinoma pulmonar, y que pueden participar en la supervivencia, expansión y/o diferenciación de las CTT. Lo anterior ha llevado a la propuesta de que la modulación farmacológica de RD puede ser eficaz en el desarrollo de nuevas terapias adyuvantes para tumores que expresen estos receptores. Sin embargo, aún no se ha esclarecido el papel que juegan los RD en la biología de células de cáncer de mama. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de expresión de los RD en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, así como analizar el papel de RD en la subpoblación troncal de células MCF7 y MDA-MB-231 mediante el uso del sistema reportero SORE6 para la identificación de la fracción troncal. Se demostró que únicamente el DRD4 se expresa en la membrana de las células MDA-MB-231/SORE6, mientras que, intracelularmente se encontró DRD1 y DRD4 en ambas líneas celulares. Las células MCF7/SORE6+ expresaron mayormente DRD1 y subexpresan DRD4 en comparación con las células MCF7/SORE6-. En la línea MDA-MB-231, no se detectaron cambios en la expresión de los RD entre las células SORE6+ y SORE6-. Finalmente, el tratamiento con agonistas o antagonistas de los RD no modificó la fracción troncal en ninguna línea celular. En conclusión, la señalización de los RD no altera el porcentaje de células troncales tumorales; sin embargo, se sugiere evaluar el papel de los RD en la fracción troncal mediante ensayos funcionales.

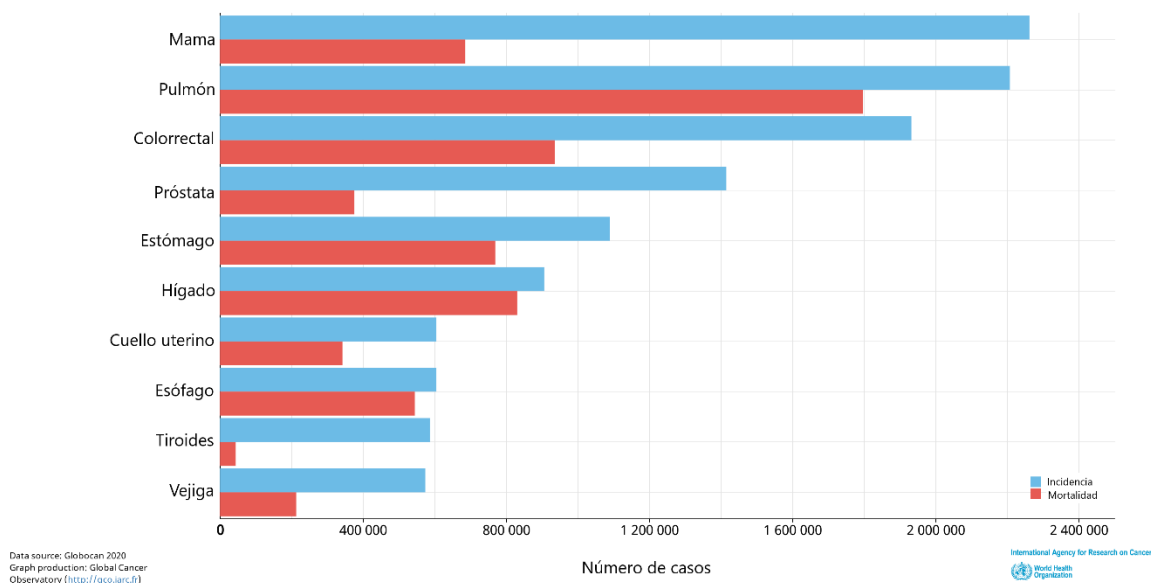


# 1. Introducción

## 1.1 Cáncer

Se define como cáncer a un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier órgano o tejido del cuerpo. Se caracteriza por la proliferación acelerada e incontrolable de células anormales, que pueden invadir sitios adyacentes y/o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son consideradas la principal causa de muerte por la enfermedad (World Health Organization, 2021).

Hasta el 2020, el cáncer era la principal causa de muerte a nivel mundial, con un estimado cerca de 10 millones de fallecimientos (World Health Organization, 2022). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los tipos de cáncer más comunes (en términos de nuevos casos de cáncer) son el cáncer de mama, pulmón y colorrectal (Figura 1), mientras que los que causaron mayor número de muertes en 2020 fueron el cáncer de pulmón, colorrectal y hepático (Figura 1) (Ferlay et al., 2020).



**Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer alrededor del mundo.**

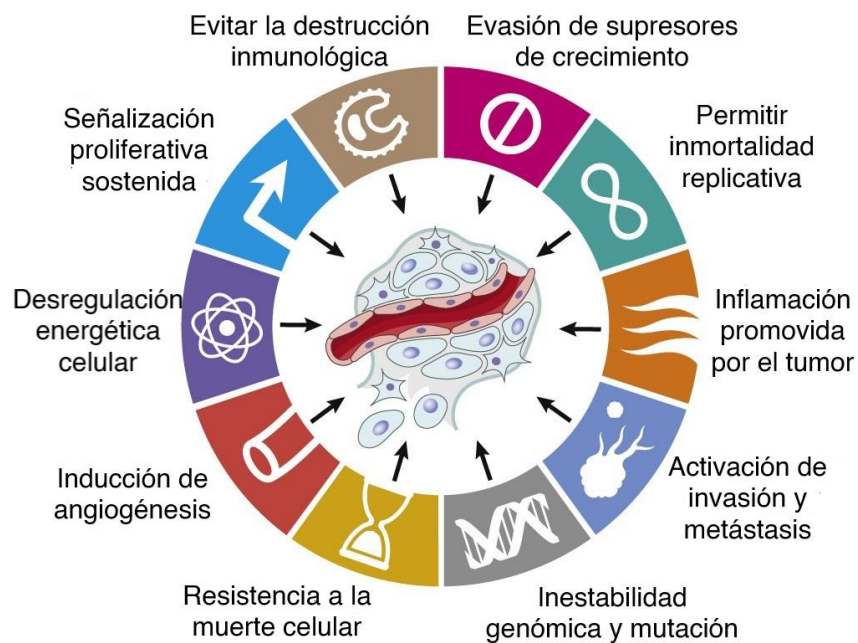
Modificado de GLOBOCAN 2020 (Ferlay et al., 2020).

En términos generales, para dar lugar a la formación y crecimiento del cáncer, se requieren características claves conocidas como “el sello distintivo del cáncer”, dentro de las cuales se encuentran (Figura 2) (Dark, 2020; Hanahan & Weinberg, 2011; Vinay et al., 2020):

- Mantenimiento de las señales proliferativas. Las células cancerosas tienen la capacidad de mantener la proliferación más allá de lo que lo hacen las células normales, ocasionado generalmente por la unión de factores de crecimiento a receptores de superficie que activan una cascada de señalización intracelular, lo que conduce a cambios en la expresión génica, promoviendo la proliferación y el crecimiento celular.
- Evasión de supresores del crecimiento. Los factores inhibidores del crecimiento pueden modular los reguladores del ciclo celular y producir la activación de inhibidores. Sin embargo, en el cáncer las mutaciones dentro de proteínas inhibidoras son comunes, ocasionando que las células tumorales no respondan a moléculas que inhiben la proliferación.
- Evasión de la apoptosis. Las células tumorales habilitan una variedad de mecanismos para limitar o evitar la apoptosis. Lo más común es la pérdida de la función de supresores de tumorales. Asimismo, pueden aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos o de señales de supervivencia, regulando a la baja los factores proapoptóticos.
- Inestabilidad y mutación del genoma. En las células cancerosas, las alteraciones genómicas incrementan la mutabilidad del genoma, acelerando la adquisición de oncogenes mutantes y la pérdida de genes supresores de tumor. Además, la acumulación de mutaciones pone en riesgo los sistemas de vigilancia que normalmente controlan la integridad genómica y obligan a las células dañadas genéticamente a entrar en senescencia o apoptosis. Ciertos genotipos mutantes confieren una ventaja selectiva a subclonas de células, lo que promueve la transformación celular y la posterior progresión del tumor.
- Potencial replicativo ilimitado (inmortalidad). Para dar lugar a tumores macroscópicos, las células tumorales adquieren una capacidad proliferativa ilimitada que les permite evadir la senescencia celular y la catástrofe mitótica.
- Inducción de angiogénesis. Las células tumorales, como las células normales, requieren de una red vascular funcional que aporte nutrientes y oxígeno, y elimine los productos de desecho metabólicos. Esto implica el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proceso conocido como angiogénesis.
- Capacidad para invadir y hacer metástasis. La invasión y la metástasis son procesos complejos que involucran múltiples pasos, comenzando con la invasión local del tejido, seguida de la infiltración de las células cancerosas en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos. Finalmente, las células malignas se transportan a través de la diseminación

hematógena y linfática a sitios distantes dentro del cuerpo, donde forman micrometástasis que eventualmente se convertirán en lesiones metastásicas macroscópicas.

- Capacidad para evadir la respuesta inmune del huésped. Las células cancerosas presentan una serie de alteraciones que les permiten evadir el ataque y la eliminación por parte de las células inmunitarias; estas capacidades facilitan el desarrollo y la progresión del cáncer.
- Inflamación promotora de tumores. El estado inflamatorio de lesiones premalignas y malignas impulsado por células del sistema inmunológico, promueve la progresión tumoral a través del suministro de moléculas bioactivas al microambiente tumoral, como factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores proangiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis.
- Metabolismo celular alterado. La reprogramación del metabolismo energético en las células tumorales apoya el crecimiento y la proliferación celular continua, reemplazando el programa metabólico que opera en la mayoría de los tejidos normales y alimenta las operaciones fisiológicas de las células asociadas.



**Figura 2. Características distintivas del cáncer.** Modificado de Hanahan y Weinberg (Vinay et al., 2020).

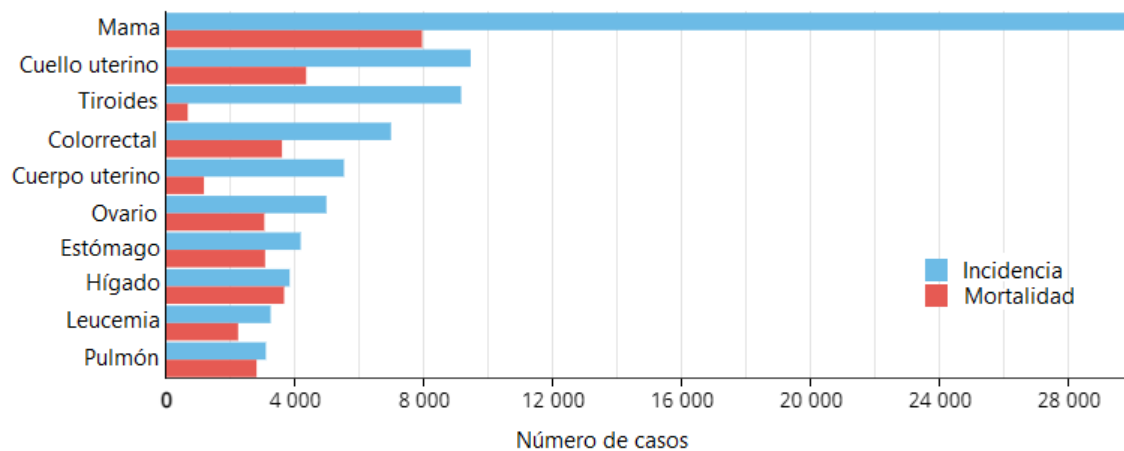
## 1.2 Cáncer de mama

### 1.2.1 Epidemiología

El cáncer de mama (CaMa) se caracteriza por la proliferación anormal y descontrolada de células del epitelio de los conductos o lobulillo mamarios, principalmente. Adicionalmente, esas células tienen la capacidad de diseminarse a otros tejidos (American Cancer Society, 2019).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, es el tipo de cáncer con mayor incidencia y la primera causa de muerte por neoplasia maligna en la población femenina (Ferlay et al., 2020), razón por la cual se considera como una de las problemáticas de salud predominantes a nivel mundial. En el 2020, se estimó que 2.2 millones de mujeres fueron diagnosticadas con CaMa y alrededor de 684,996 mujeres fallecieron por esta neoplasia maligna (Harbeck et al., 2019). Para el año 2050, se pronostica que la incidencia mundial de CaMa alcanzará aproximadamente los 3.2 millones de nuevos casos por año (Tao et al., 2015). Estas cifras son alarmantes debido al impacto que tiene en la sociedad mundial, despertando la necesidad de medidas urgentes tanto de prevención como de tratamiento.

En México, el CaMa ha mostrado un aumento tanto en la tasa de incidencia como en la de mortalidad; esta última derivada del diagnóstico tardío y la poca eficacia del programa de detección oportuna de cáncer (Cárdenas Sánchez et al., 2017). De acuerdo con el reporte del Departamento de Epidemiología de la Secretaría de Salud, la incidencia del CaMa se incrementó entre 2000 y 2013, teniendo de 10.76 casos por 100,000 mujeres a 26.1 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años, estimando 23,873 nuevos casos en 2013 (Cárdenas Sánchez et al., 2019). A partir del 2006, este tipo de cáncer ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino (Cárdenas Sánchez et al., 2015). Al igual que a nivel mundial, actualmente en México el CaMa ocupa el primer lugar en incidencia y causa de muerte por neoplasia maligna en la población femenina (Figura 3) (Ferlay et al., 2020).



**Figura 3. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población femenina de México.** Modificado de GLOBOCAN 2020 (Ferlay et al., 2020).

### 1.2.2 Clasificación

Una de las estrategias más importantes para clasificar al cáncer de mama es la inmunohistoquímica (IHQ), ya que junto con el estudio clínico-patológico, que incluye características del tumor como tamaño y grado, así como afectación ganglionar, es usada convencionalmente para el pronóstico y manejo de las pacientes (Dai & Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, 2015). Esta clasificación se basa en el uso de tres marcadores: receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), organizándose en tres grupos principales (Cárdenas Sánchez et al., 2015; Santos et al., 2020):

- Positivo a receptores hormonales (RE+ y RP+)
- Positivo a HER2
- Triple negativo (TN; no presenta ninguno de los marcadores anteriores)

En la población mexicana, la frecuencia en promedio de estos subgrupos definidos es la siguiente: receptores hormonales positivos: 60%, HER2 positivos: 20.4%, y triples negativos: 23.1% (Cárdenas Sánchez et al., 2017).

Otra de las clasificaciones del CaMa es la molecular, definida mediante genómica, en la cual se han identificado 4 grupos principales: luminal, con sobreexpresión de HER2, fenotipo basal y similar al normal (Cárdenas Sánchez et al., 2019). Existen 2 grupos luminales, A y B, caracterizados por la presencia de RE y RP. El fenotipo basal se distingue por una alta expresión de genes normalmente identificados en células mioepiteliales o

basales, además de ser RE negativo. Finalmente el fenotipo similar al normal, de igual manera pertenece al subgrupo de RE negativo, sin embargo, muestra un perfil de expresión génica variado (Tao et al., 2015). Estos fenotipos moleculares, se han logrado aproximar mediante metodologías más accesibles como la IHQ, tal y como se aprecia en la tabla 1 (Cárdenas Sánchez et al., 2019).

**Tabla 1.** Subtipos Moleculares de cáncer de mama y su aproximación por IHQ.

<b>Subtipo molecular de CaMa</b>	<b>Aproximación por IHQ</b>
Luminal A	RE+, RP > 20% y HER2-
Luminal B	RE+, RP < 20% y HER2 +/-
HER2	HER2+, RE- y RP-
Triple negativo	RE-, RP- y HER2-

### 1.2.3 Pronóstico

El pronóstico de los pacientes con CaMa temprano ha mejorado con el tiempo gracias a mejores pruebas y exploraciones, detección más temprana y la implementación de nuevos avances terapéuticos, aumentando de forma importante el número de sobrevivientes (Cárdenas Sánchez et al., 2017).

Aproximadamente del 70 al 80% de las pacientes con enfermedad no metastásica en estadio temprano es curable, mientras que el CaMa avanzado con metástasis a órganos distantes es considerado incurable con las terapias disponibles actualmente. No obstante, el CaMa avanzado es tratable, buscando prolongar la sobrevida y controlar los síntomas asociados al tratamiento para mantener o mejorar la calidad de vida del paciente (Harbeck et al., 2019).

En general, las pacientes diagnosticadas con CaMa de los subtipos receptores hormonales o HER2 positivo en una etapa temprana y que aún no ha hecho metástasis, tienen un mejor pronóstico (Ahmad, 2019), mientras que las pacientes con subtipo triple negativo tienen el peor pronóstico, la enfermedad es más agresiva y no cuenta con terapia dirigida (Santos et al., 2020).

En el 2018, cerca de 6,8 millones de mujeres en todo el mundo sobrevivieron al CaMa después de ser diagnosticadas en los 5 años previos (Harbeck et al., 2019).

#### 1.2.4 Diagnóstico

Ante la sospecha de cáncer de mama debido a la detección de una anomalía localizada o la aparición de síntomas, el diagnóstico del cáncer de mama se basa en un examen clínico, imágenes (generalmente mamografía y/o ecografía) y biopsia con aguja acompañada del estudio histopatológico para la confirmación del diagnóstico (Harbeck et al., 2019).

Asimismo, se puede realizar un diagnóstico temprano, tomando en cuenta las siguientes recomendaciones (Cárdenas Sánchez et al., 2019):

- Autoexamen mamario mensual a partir de los 18 años (7 días después de terminada la menstruación).
- Examen clínico mamario anual a partir de los 25 años.
- Mastografía anual de tamizaje en mujer asintomática a partir de los 40 años.
- El ultrasonido mamario recomendado como estudio de elección inicial en mujeres menores de 35 años con patología mamaria.
- Uso de la mastografía de detección junto con ultrasonido en mujeres con mama densa mejora la detección de lesiones tempranas de 61.5% a 83.5%.

En general, el cribado busca detectar una enfermedad temprana para la cual existe un tratamiento eficaz, por medio del uso de pruebas no invasivas, precisas y aceptables para los pacientes (Harbeck et al., 2019). El cribado del CaMa se asocia con la detección de tumores más pequeños y con menores posibilidades de metástasis. De esa forma, los tumores hallados son más susceptibles a cirugía axilar limitada y conservadora de la mama, y es menos probable que requieran quimioterapia. Con ello, se reduce la morbilidad relacionada con el tratamiento y mejora la supervivencia del paciente (McDonald et al., 2016).

#### 1.2.5 Tratamiento

El abordaje terapéutico del cáncer de mama es multidisciplinario e incluye la cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica (inmunoterapia). Estas pueden ser de tipo locorregional (cirugía y radioterapia) o de tipo sistémico (quimioterapia, hormonoterapia y terapia biológica) (Harbeck et al., 2019; Yustos et al., 2017).

Para el CaMa no metastásico, los objetivos principales de la terapia son erradicar el tumor y prevenir la recurrencia metastásica, por lo que el tratamiento de elección es la resección

quirúrgica, considerando la radioterapia postoperatoria (Harbeck et al., 2019; Waks & Winer, 2019). No obstante, en la mayoría de los casos se requiere de terapia sistémica, la cual puede administrarse antes de la cirugía (terapia neoadyuvante) sugerida para pacientes con tumores grandes, con la finalidad de reducir la carga tumoral. También se puede administrar el tratamiento posterior a la cirugía (terapia adyuvante) dirigida para pacientes con alto riesgo de recurrencia (Harbeck et al., 2019; McDonald et al., 2016).

Dado que el CaMa metastásico se considera incurable, los objetivos terapéuticos son prolongar la vida del paciente y minimizar los síntomas. Se utiliza la terapia sistémica en primera elección, mientras que la terapia local se usa únicamente como paliativo (McDonald et al., 2016; Waks & Winer, 2019). Asimismo, el tratamiento de la enfermedad metastásica debe realizarse de acuerdo al subtipo, así como las características de la enfermedad (Harbeck et al., 2019).

El subtipo de CaMa orienta la terapia sistémica que será administrada, es por ello la relevancia de un diagnóstico certero. Esta terapia incluye (Waks & Winer, 2019):

- Hormonoterapia: antagonistas de receptores hormonales esteroides, para todos los tumores RE+ y/o RP+ (ej. tamoxifeno e inhibidores de la aromatasas).
- Terapia anti-HER2: anticuerpos dirigidos contra el HER2 (ej. trastuzumab).
- Quimioterapia: se administra junto con las terapias anteriores y es el único tratamiento para el cáncer de mama triple negativo (CMTN) (ej. paclitaxel, doxorubicina, cisplatino).

### 1.3 Receptores de dopamina

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que juega un papel importante en funciones del sistema nervioso central (SNC), así como en diversas funciones periféricas. Este neurotransmisor, señala a través de los receptores de dopamina (RD), que forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Esta familia incluye cinco receptores de dopamina (DRD1, DRD2, DRD3, DRD4 y DRD5), los cuales difieren entre sí por su distribución anatómica, expresión, afinidad y propiedades funcionales (P. Yang et al., 2020).



### 1.3.1 Localización y función

Los RD se encuentran ubicados en varios tejidos del cuerpo humano, expresados ampliamente en cerebro, retina, tracto gastrointestinal, riñones, glándulas suprarrenales, corazón, ganglios y vasos sanguíneos (Ayano, 2016; Turco, 2017; X. Wang et al., 2019).

En homeostasis, los RD regulan diversas funciones a nivel de SNC como la actividad locomotora, el apetito, la cognición, la emoción, la memoria y el aprendizaje (Mishra et al., 2018); por ejemplo, los receptores DRD1 y DRD2 ubicados en el cerebro desempeñan un papel en la memoria y el aprendizaje (Mishra et al., 2018; X. Wang et al., 2019). Asimismo, se ha visto que los RD pueden regular funciones periféricas como la secreción hormonal, funciones cardiovasculares y renales, motilidad gastrointestinal, así como modular el sistema inmune, entre otras (Ayano, 2016; Beaulieu et al., 2015; X. Wang et al., 2019). Se ha visto que los receptores periféricos DRD1, DRD2 y DRD4 están involucrados en la regulación de la función renal, la presión arterial y la motilidad intestinal (Mishra et al., 2018; X. Wang et al., 2019).

Se ha descrito que los DRD3, DRD4 y DRD5 pueden actuar como sensores de actividad de DA y modular la señalización dependiente de DRD1 y DRD2, gracias a las diferencias en su afinidad, niveles de expresión y distribución (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

La principal característica distintiva entre los receptores de dopamina en relación a sus perfiles de unión es la afinidad por la DA, en donde los DRD5 ( $K_i$ : 100 nM) tienen mayor afinidad que los DRD1 ( $K_i$ : 1  $\mu$ M) (Ayano, 2016). Mientras que los receptores DRD3 y DRD4 muestran una afinidad similar por la DA ( $K_i$ : 10 nM), que es más alta que la del receptor DRD2 ( $K_i$ : 100 nM) (Seeman, 2010). Además, cada RD tiene propiedades farmacológicas diferentes (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Seeman, 2010). Se cree que estas diferencias en la afinidad de la DA a los RD se deben a las funciones asociadas a cada receptor (Klein et al., 2019).

Alteraciones en la función de los RD conducen a distintas patologías como la esquizofrenia, enfermedad de Parkinson, síndrome de Tourette, trastorno de déficit de atención e hiperactividad y cáncer (Mishra et al., 2018; X. Wang et al., 2019).

### 1.3.2 Clasificación

De acuerdo con las propiedades bioquímicas, estructurales y farmacológicas de los RD, se dividen en dos grupos principales: tipo D1 y tipo D2. La clasificación bioquímica de los RD

está asociada a la regulación diferencial que ejercen sobre la actividad del adenilato ciclasa (AC). Los receptores tipo D1, que incluye a DRD1 y a DRD5, señalizan a través de proteínas G estimuladoras:  $G\alpha_s$  o  $G\alpha_{olf}$  para activar a la AC y promover la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), un segundo mensajero intracelular derivado de adenosín trifosfato (ATP), importante en la respuesta a los neurotransmisores. Mientras que los receptores tipo D2, que incluye a DRD2, DRD3 y DRD4, se acoplan a la familia  $G\alpha_{i/o}$  de proteínas G inhibitoras, para bloquear la activación de la AC y por lo tanto disminuir la producción AMPC (Ranjbar-Slamloo & Fazlali, 2020; X. Wang et al., 2019).

### 1.3.3 Estructura

Como ya se mencionó, los RD son una familia de receptores pertenecientes a la superfamilia de GPCRs, caracterizados por la presencia de siete dominios transmembrana, que permiten el acoplamiento con las proteínas G y modular su cascada de señalización (Bhatia & Saadabadi, 2019).

Las estructuras tridimensionales de los receptores DRD1, DRD2, DRD3 y DRD4, han sido resueltas experimentalmente y pueden consultarse en *Protein Data Bank* con los códigos 7CKX, 6VMS, 7CMV y 6IQL, respectivamente. En relación con DRD5, no se encontró alguna estructura en el *Protein Data Bank*, sin embargo, es posible observar un modelo de la estructura tridimensional en *Swiss-Model* con el código P21918.

Los RD comparten cierto nivel de homología en sus siete dominios transmembranales ricos en aminoácidos hidrofóbicos (D'Souza, 2010). Los receptores tipo D1 tienen entre sí una homología del 80% en la secuencia de aminoácidos de los dominios transmembrana. Mientras que en la familia tipo D2, la homología en las regiones transmembrana de los DRD2 se comparte en un 75% con los DRD3, y en un 53% con los DRD4 (Rangel-Barajas et al., 2015). Se ha propuesto que los aminoácidos de los dominios transmembrana que diferencian a la familia tipo D1 de la D2 participan en la selectividad y afinidad por el ligando, confiriéndoles distintas propiedades farmacológicas (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Neve, 2010).

La región extracelular amino terminal de todos los RD tienen un número similar de aminoácidos y muestran un número variable de sitios consenso de N-glicosilación, la modificación postranscripcional más importante para DRD2 y DRD3, ya que modula tanto la correcta localización del receptor en la superficie celular, así como su señalización e internalización (Ben-Jonathan, 2020; Martel & Gatti McArthur, 2020).

El extremo carboxilo terminal ubicado en el citoplasma es aproximadamente siete veces más largo en los receptores tipo D1 que en los receptores tipo D2; posiblemente está involucrado en el anclaje de la cola citoplasmática a la membrana (Ben-Jonathan, 2020; Neve, 2010). Contiene sitios de fosforilación y palmitoilación; esta última se ha reportado que funciona como interruptor de la señalización de los RD a través de la ruta de AMPc, específicamente para DRD1, DRD2 y DRD3 (Martel & Gatti McArthur, 2020).

Todos los RD poseen un tercer bucle citoplasmático que contiene sitios de fosforilación; sin embargo, este bucle es diferente dependiendo de la subfamilia. Los receptores tipo D1 presentan un bucle corto, característico de los receptores que interactúan con proteínas G estimuladoras. Mientras que los receptores tipo D2 poseen un tercer bucle largo, típico de receptores que interactúan con proteínas G inhibitoras (Pivonello et al., 2007).

A pesar de que los RD comparten cierta homología proteica, su estructura génica es diferente entre subfamilias. Los genes que codifican a los receptores tipo D1 no poseen intrones en su región codificante. En cambio, los receptores tipo D2 presentan un número variable de intrones dentro de su región codificante. La presencia de intrones dentro de esta región en los receptores tipo 2, permite la generación de variantes de receptor (Klein et al., 2019).

#### 1.3.4 Señalización de los receptores de dopamina

Las funciones de los RD dependen de transmitir señales intracelulares vía proteínas G, aunque también pueden activar vías de señalización alternas mediadas por canales iónicos o proteínas de desensibilización como  $\beta$ -arrestinas (Beaulieu et al., 2015).

Los receptores tipo D1, señalizan a través de  $G\alpha_s/\alpha_{olf}$ , estimulando la activación del AC, para incrementar los niveles intracelulares de AMPc. Entre otras funciones, el AMPc es necesario para la desinhibición de la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), y así estimular su actividad. PKA en respuesta al AMPc, fosforila varias moléculas en la célula, como la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB), la fosfoproteína de 32 KDa regulada por AMPc y dopamina (DARPP-32), receptores de glutamato, y canales iónicos de calcio y potasio (Figura 4) (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Klein et al., 2019). La fosforilación de DARPP-32 por PKA, permite que la proteína fosfatasa 1 (PP1) se desinhiba y lleve a cabo sus funciones: i) desfosforilar histonas para mejorar la expresión génica en respuesta a la estimulación del receptor D1 y ii) regular el estado de fosforilación de varias proteínas efectoras, como factores de transcripción, receptores

ionotrópicos y canales iónicos, que regulan procesos biológicos como la proliferación celular, la apoptosis, regulación de receptores de membrana y canales, entre otros (Bateup et al., 2008).

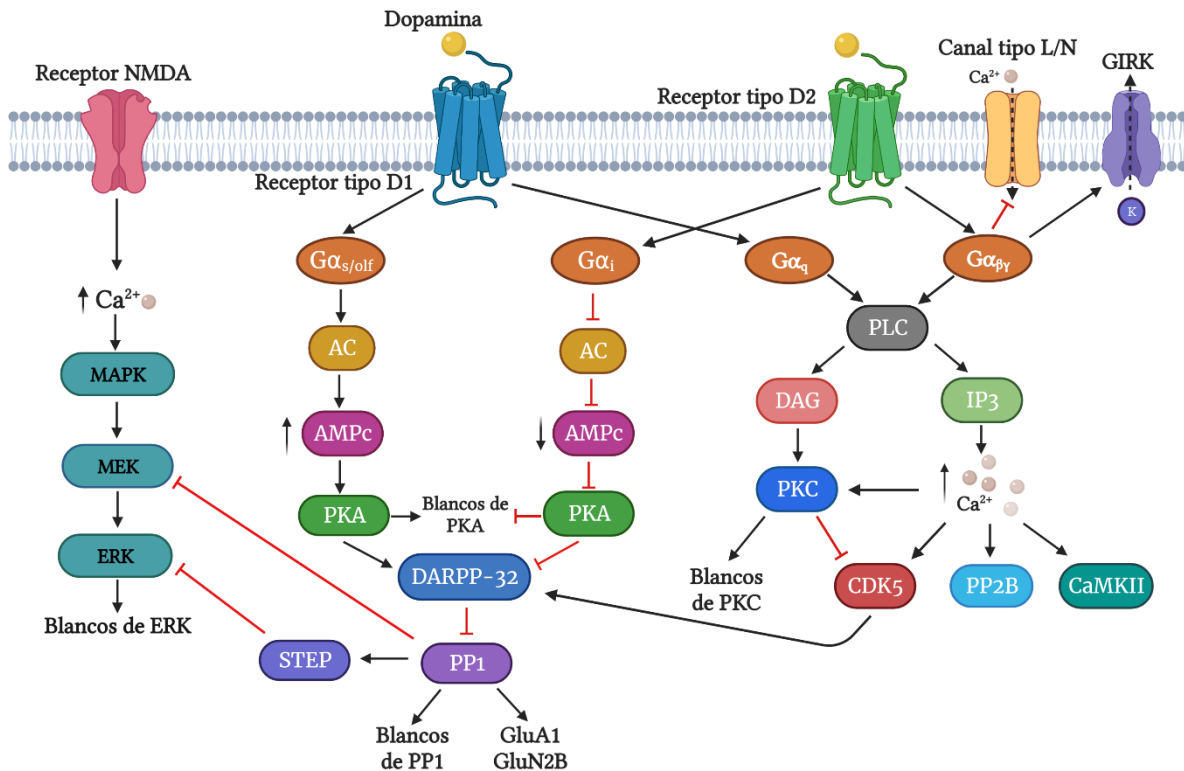
Por lo contrario, los receptores tipo D2 al estar acoplados a  $G_{\alpha i}/\alpha_o$ , inhiben la actividad de AC y disminuyen las concentraciones de AMPc, regulando negativamente la actividad de la PKA y DARPP-32 (Klein et al., 2019; Romanelli et al., 2010). Al estimularse los receptores tipo D2, disminuye la fosforilación de DARPP-32, como resultado de la reducción en la actividad de PKA y/o la desfosforilación de este sitio por la proteína fosfatasa 2B dependiente de calmodulina (PP2B; también conocida como calcineurina). Esta fosfatasa es activada por el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular posterior a la activación de los receptores tipo D2, vía la subunidad  $G\beta\gamma$  (Figura 4) (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Klein et al., 2019).

La liberación de la subunidad  $G\beta\gamma$  de la proteína G activada por acción de los RD tipo 2, conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC) para promover la hidrólisis del fosfolípido 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), generando inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Ambas moléculas son segundos mensajeros: el IP3, ocasiona la salida de  $Ca^{2+}$  de las reservas intracelulares, y el DAG, con la ayuda del  $Ca^{2+}$ , activa a la proteína cinasa C (PKC) (Feduchi-Canosa et al., 2015). Además, el aumento de  $Ca^{2+}$  conduce a la activación de proteínas dependientes de calcio, como la cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) y la PP2B (calcineurina) (Klein et al., 2019; Romanelli et al., 2010). Adicionalmente, la subunidad  $G\beta\gamma$  se relaciona con la modulación de los canales de potasio rectificadores internos activados por proteína G (GIRK) y los canales de calcio, los cuales disminuyen la entrada de calcio a las células tras la estimulación del receptor tipo D2 (Figura 4) (Beaulieu et al., 2015).

Asimismo, se ha demostrado que los receptores de tipo D1 y D2 se pueden acoplar a proteínas  $G_{\alpha q}$ , estimulando la actividad de las fosfolipasas (Feduchi-Canosa et al., 2015; Romanelli et al., 2010). La señalización de DA mediada por proteínas  $G_{\alpha q}$  puede reducir la fosforilación de DARPP-32 por la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) y potenciar la señalización mediada por PKA (Beaulieu et al., 2015; Klein et al., 2019). De igual manera, la activación de los receptores tipo D1 regula el gradiente electroquímico, inhibiendo la bomba sodio-potasio ( $Na^+/K^+$  ATPasa) a través de la señalización de PKA y PKC (Figura 4) (Mishra et al., 2018).

Además de la señalización mediada por proteínas G, los RD están relacionados con cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), regulando diversos procesos biológicos como proliferación, crecimiento celular, diferenciación y muerte celular. Específicamente las MAPK que responden tras la activación de los RD son las cinasas reguladas extracelularmente (ERK 1/2) (Romanelli et al., 2010).

La activación de ERK por los receptores tipo D1 es promovida por la interacción con los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), un tipo de receptores de glutamato. La estimulación de NMDA ocasiona la activación de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK, que resulta en la regulación de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, entre otros efectos. No obstante, sin la activación de los receptores tipo D1, esta acción es contrarrestada por la tirosina fosfatasa enriquecida en el cuerpo estriado (STEP), la cual desfosforila a ERK (Klein et al., 2019). La actividad de STEP depende de su desfosforilación por PP1. La activación de PKA mediada por receptores D1, ocasiona la inhibición de PP1 y con ello la inactivación de STEP. De esta manera, STEP se mantiene fosforilado, aumenta la fosforilación de ERK y evita la desfosforilación de las proteínas río arriba de la vía de señalización de ERK. Así, la estimulación de receptores tipo D1 por sí sola no modula la fosforilación de ERK, sino que requiere del glutamato endógeno para señalizar la vía MAPK (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Klein et al., 2019; Romanelli et al., 2010). A su vez, ERK activa sustratos distintos tanto en el citosol como en el núcleo para modular la expresión génica (Figura 4) (Romanelli et al., 2010). Por otra parte, el mecanismo de activación de ERK por receptores tipo D2 aún no está completamente definido y se sugiere que está regulado indirectamente por proteínas  $G_{\alpha q}$  y  $G_{\alpha i}$  (Klein et al., 2019; Romanelli et al., 2010).



**Figura 4. Vías de señalización de los receptores a dopamina.** Creado en Biorender. La señalización de la dopamina esta mediada por dos subtipos de receptores, los cuales activan o inhiben diversas cascadas de señalización. Las flechas negras indican activación y las fechas T rojas indican inhibición. AC, adenilato ciclasa; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; CaMKII, cinasa 2 dependiente de calcio/calmodulina; CDK5, cinasa dependiente de ciclina 5; DAG, diacilglicerol; DARPP-32, fosfoproteína de 32 KDa regulada por AMPc y dopamina; ERK, cinasa regulada extracelularmente; GIRK, canal de potasio rectificador interno activado por proteína G; IP3, inositol-1,4,5-trifosfato; MAPK, proteína cinasa activada por mitógenos; MEK, proteína cinasa cinasa activada por mitógeno; NMDA, N-metil-D-aspartato; PKA, proteína cinasa dependiente de AMPc; PKC, proteína cinasa C; PLC, fosfolipasa C; PP1, proteína fosfatasa 1; PP2B, proteína fosfatasa 2B dependiente de calmodulina; STEP, tirosina fosfatasa enriquecida en estriatal.

## 1.4 Células troncales tumorales

### 1.4.1 Definición y características

Dentro de un tumor, existe una subpoblación de células denominada “células troncales tumorales” (CTT; en inglés llamadas “cancer stem cells”) con características biológicas similares a las células troncales normales. La hipótesis de las CTT sugiere que una

subpoblación ubicada en la parte superior de la jerarquía de células tumorales, contribuye a la heterogeneidad del tumor y es capaz de originar nuevos tumores, además de tener un papel crítico en la progresión del cáncer (Shibue & Weinberg, 2017).

Las CTT se caracterizan por poseer una capacidad intrínseca de autorrenovación y el potencial de diferenciación, dando lugar a una variedad de fenotipos dentro de los tumores (Velasco-Velázquez et al., 2019). Estas células son capaces de dividirse asimétricamente, con la finalidad de producir una célula madre, que habilita la capacidad de autorrenovación, y una célula progenitora, la cual permite generar células cancerosas fenotípicamente diversas que constituyen al tumor (Velasco-Velázquez et al., 2012). Es por ello que las CTT son consideradas las responsables del mantenimiento y propagación del tumor (Wu et al., 2020). Además, dada su capacidad para iniciar tumores, las CTT son responsables de la diseminación metastásica, puesto que muestran una mayor movilidad celular, capacidad de invasión y sobreexpresan genes que promueven la metástasis, así como por su plasticidad y promoción de la actividad transición epitelio-mesénquima (EMT) (Taurin & Alkhalifa, 2020; Velasco-Velázquez et al., 2012; Wu et al., 2020). De igual manera, se ha demostrado que las CTT son más resistentes que las que no son CTT, a varios tipos de terapias convencionales (Shibue & Weinberg, 2017) y son las causantes de las recaídas clínicas después de un tratamiento quimioterapéutico inicialmente exitoso (Batlle & Clevers, 2017).

La primera evidencia concluyente de la existencia de CTT fue en leucemia mieloide aguda (LMA) (Bonnet & Dick, 1997). Actualmente, las CTT se han detectado en una variedad de cánceres hematopoyéticos y tumores sólidos, incluido el cáncer de mama (Wu et al., 2020).

#### 1.4.2 Identificación de las células troncales tumorales de mama (CTTM)

Para poder estudiar las características de esta subpoblación, es necesaria su identificación empleando técnicas que permitan distinguirlas del resto de la población de células tumorales. Una de las técnicas más utilizadas es la detección específica de antígenos de superficie por citometría de flujo.

En CaMa, la expresión de los marcadores de superficie CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/bajo</sup> se usa comúnmente para definir a esta subpoblación (Luo et al., 2015). Por otra parte, la actividad del aldehído deshidrogenasa 1 (ADLH1), una enzima responsable de la oxidación de aldehídos intracelulares, se ha utilizado como un marcador de células madre mamarias

humanas tanto normales como malignas y un predictor de un mal pronóstico (X. Zhang et al., 2020).

Otras de las técnicas para la identificación de CTTM son la exclusión de los colorantes, cultivo de tumoresferas, y más reciente, el uso de sistemas reporteros, que se han convertido en herramientas esenciales para analizar la contribución de las CTT a la progresión del cáncer y desarrollar terapias selectivas para esta subpoblación (Luo et al., 2015; Salinas-Jazmín et al., 2021).

#### 1.4.3 Importancia clínica de las células troncales tumorales de mama

Las CTTM son responsables de la resistencia a las terapias estándares, recurrencia y progresión de los tumores de CaMa (Taurin & Alkhalifa, 2020; Velasco-Velázquez et al., 2012). De acuerdo con la evidencia, la resistencia a los agentes quimioterapéuticos que presentan las CTT es resultado de la expresión elevada de transportadores de salida, el aumento de la expresión de proteínas antiapoptóticas (Taurin & Alkhalifa, 2020), así como alteraciones en las vías de señalización de autorrenovación y de determinación del destino celular, incluidas Notch, Wnt, Hedgehog y HER-2 (Velasco-Velázquez et al., 2012). Además, dado que las CTT están inactivas y normalmente tienen ciclos más lentos que las células diferenciadas, esta subpoblación es intrínsecamente más resistente a los fármacos quimioterapéuticos que alteran el ciclo celular (Luo et al., 2015).

Se ha reportado que los diferentes subtipos de cáncer de mama muestran diferentes abundancias de CTTM. Los subtipos de TN y HER2+ comúnmente están mucho más enriquecidas de CTTM en comparación con el subtipo luminal. Particularmente, el CMTN contiene la mayor proporción de CTTM en comparación con otros subtipos, lo que contribuye a su mal pronóstico (Zhou et al., 2019). Actualmente, el único tratamiento establecido contra el CMTN es la quimioterapia citotóxica; sin embargo, un número considerable de pacientes desarrolla resistencia. En el caso del cáncer de mama luminal, la presencia de las CTTM también se considera la principal causa de resistencia a la terapia hormonal (Zhou et al., 2019)

Dada la relevancia de las CTTM, se han propuesto nuevas terapias dirigidas a este grupo de células. La hipótesis de CTT sugiere que el recrecimiento del tumor después de la resección tradicional y/o enfoques de quimio o radioterapia, puede detenerse si las células de repoblación se destruyen con un agente dirigido selectivamente a las CTT (Luo et al.,



2015). Es por ello que, enfocarse en esta subpoblación clínicamente podría conducir a una reducción de la metástasis y de la recidiva clínica (Luo et al., 2015).

A pesar de que los resultados de los ensayos preclínicos y clínicos son prometedores en la selectividad a las CTTM, es necesaria una evaluación adicional de la eficacia y seguridad de estas terapias. Se ha descrito que tanto las CTTM como las células troncales mamarias normales (CTMN), comparten marcadores de vías de señalización; sin embargo, hasta el momento se desconoce si los agentes dirigidos a las CTTM puedan afectar a las CTMN, lo que ocasionaría graves efectos secundarios relacionados con el tratamiento (Zhou et al., 2019).

Por otra parte, los resultados en los ensayos clínicos han demostrado que la combinación de agentes dirigidos a las CTTM con la quimioterapia o la terapia hormonal, mejora la eficacia del tratamiento (Luo et al., 2015; Zhou et al., 2019). Por ejemplo, se ha reportado que el porcentaje de las CTTM identificadas con los marcadores CD44+/CD24-, así como su actividad formadora de mamoesferas, aumentan después de la quimioterapia (Luo et al., 2015). En cambio, la terapia combinada utilizando un inhibidor de HER2 y EGFR, Lapatinib, junto con quimioterapia previno el aumento de CTTM (Luo et al., 2015). No obstante, la combinación de agentes dirigidos a la CTTM y diversas terapias convencionales requiere más investigación (Zhou et al., 2019).

### 1.5 Receptores de dopamina en cáncer

La creciente evidencia sugiere que los RD desempeñan un papel vital en el cáncer, asociándose a la muerte celular, proliferación, invasión y migración de células tumorales (X. Wang et al., 2019).

Estudios recientes han reportado que los RD se expresan en CTT mamarias, leucémicas, y de carcinoma pulmonar, y que pueden participar en la supervivencia, expansión y/o diferenciación de las CTT. Lo anterior ha llevado a la propuesta de que la modulación farmacológica de RD puede ser eficaz en el desarrollo de nuevas terapias adyuvantes para tumores que expresen estos receptores. Sin embargo, aún no se ha esclarecido el papel que juegan los RD en la biología de células de cáncer de mama.

Recientemente, se ha reportado la sobreexpresión de los RD en diferentes tipos de cáncer, entre los cuales se encuentran cáncer gástrico, tumores neuroendocrinos, glioblastoma, carcinoma hepático, entre otros. Asimismo, se ha observado que la presencia de

polimorfismos de RD, que afectan la función y expresión de la proteína, están relacionados con el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer como el cáncer gástrico, colorrectal o de pulmón (células no pequeñas) (X. Wang et al., 2019).

Hasta la fecha, múltiples estudios han demostrado que los RD se expresan diferencialmente en varios tumores y que cada tipo de tumor tiene un patrón específico de expresión de RD. Por ejemplo, *DRD4* se sobreexpresa solo en la LMA, y *DRD3* se expresa solo en glioblastoma (GBM) pero a niveles más bajos que en cerebro normal de acuerdo con datos obtenidos de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), a través de la plataforma UCSC Xena. En otros estudios se ha observado que *DRD2* y *DRD4*, dos miembros de la familia D2, están regulados al alza en los tumores GBM en comparación con el tejido normal adyacente (Dolma et al., 2016; Prabhu et al., 2019). De hecho, se ha propuesto la alta expresión de *DRD2* o *DRD4* como un predictor independiente de supervivencia reducida en pacientes con GBM (Dolma et al., 2016; Prabhu et al., 2019).

Se han reportado alteraciones en la expresión de RD no solo en células cancerosas sino también en células asociadas a tumores (X. Wang et al., 2019). Además, cambios en la expresión de los RD alteran diversas funciones de las células cancerosas, lo que indica que la modulación de la actividad de los receptores impacta en la biología tumoral (X. Wang et al., 2019). Por lo tanto, los RD se han señalado como posibles dianas terapéuticas para mejorar la respuesta clínica en pacientes con cáncer (J. K. Lee et al., 2016; Roney & Park, 2018; Weissenrieder et al., 2019).

En diversos estudios se ha observado que el tratamiento con fármacos dopaminérgicos tiene efecto en funciones celulares de diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, el uso de antagonistas de los RD tipo 2 inhiben la proliferación celular en leucemia (Zhelev et al., 2004), melanoma (Nordenberg et al., 1999) y neuroblastoma (Gil-Ad et al., 2004), y disminuyen la migración en células de cáncer de mama (Zhao et al., 2016).

### 1.5.1 Receptores de dopamina en cáncer de mama

Se ha demostrado que la expresión de los RD es mayor en tumores malignos que en benignos, los cuales a su vez expresan mayores niveles de RD que el tejido mamario normal (Carlo et al., 1986). La administración exógena de DA reduce el crecimiento tumoral y la angiogénesis *in vivo* (Peters et al., 2020; S. Wang et al., 2015). Sin embargo, no está claro si esos efectos están mediados por una subfamilia o un RD específico. Además, los

estudios destinados a dilucidar el papel de receptores específicos en el CaMa han mostrado resultados contradictorios.

Borcherding *et al.* identificaron la expresión de *DRD1* en diversas líneas celulares de cáncer de mama y muestras de pacientes. Los autores observaron que este receptor se encuentra elevado en muestras tumorales en comparación con tejido normal y se asocia con un mal pronóstico y metástasis (Borcherding et al., 2016). En otro estudio, se determinó que *DRD2* se encuentra sobreexpresado en muestras de tumores mamarios de pacientes, así como en líneas celulares, relacionándolo con la progresión tumoral (Gholipour et al., 2018). Sin embargo, resultados preliminares de nuestro grupo utilizando la herramienta bioinformática UCSC Xena, muestran que la expresión de los RD en tumores mamarios humanos se encuentra disminuida en comparación con la expresión en tejido sano, a excepción del *DRD4*, el cual se encuentra sobreexpresado en muestras tumorales.

Por otra parte, existe evidencia que indica que el uso de agonistas o antagonistas de RD tiene un efecto diferente en diversas funciones en células de cáncer de mama. Una de las evidencias, señala que el uso de dopamina o fenoldopam (agonista de *DRD1*), suprime la viabilidad, induce muerte por apoptosis y disminuye la invasión en diferentes líneas celulares de cáncer de mama (Borcherding et al., 2016). En otro estudio, analizaron el efecto inhibitorio de agonistas de *D1* en tumores mamarios, y observaron una disminución en el crecimiento tumoral *in vivo* así como inhibición en la migración de células triple negativo tras el tratamiento (Minami et al., 2017). Esto nos sugiere que la señalización dopaminérgica mediada por *DRD1* es importante para la progresión del cáncer de mama.

## 2. Planteamiento del problema y justificación

El estudio de los RD ha tomado gran relevancia en las CTT, ya que participan en la supervivencia, expansión y/o diferenciación de esta subpoblación. Existe evidencia que demuestra la expresión de todos los RD en las CTT leucémicas, mientras que las células troncales hematopoyéticas carecen de ellos (Sachlos et al., 2012). Además, el bloqueo de los RD con tioridazina, un antagonista de los RD, induce la diferenciación en CTT leucémicas, sin tener ningún efecto sobre células madre pluripotentes o hematopoyéticas normales (Sachlos et al., 2012). Un análisis adicional mostró que la tioridazina tiene un efecto antitumoral *in vivo* en xenotrasplante de células de LMA sin afectar a las células madre hematopoyéticas en modelos murinos (Sachlos et al., 2012). Asimismo, el uso de tioridazina disminuye la formación de esferas y la expresión de genes de troncalidad en células de hepatocarcinoma (Lu et al., 2015) e induce apoptosis en CTT de cáncer colorrectal (C. Zhang et al., 2017).

En otros tipos de cáncer, como los gliomas, se ha identificado la expresión del DRD2 en CTT incrementando la malignidad de los tumores (Caragher et al., 2019; X. Wang et al., 2019). A su vez, el DRD4 (otro miembro de la familia D2), participa en mantenimiento del fenotipo troncal, ya que antagonistas selectivos del receptor disminuyen la proliferación e inhiben su clonogenicidad, sin tener ningún efecto sobre células troncales neuronales normales (Dolma et al., 2016).

En cáncer de mama, se ha determinado que las CTT de muestras de tumores triples negativos de pacientes, expresan los receptores DRD3 (tipo D2) y DRD5 (tipo D1) (Sachlos et al., 2012), lo que sugiere que los RD podrían tener un papel en la biología de las CTT. El tratamiento con dopamina disminuye el porcentaje de células con inmunofenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/bajo</sup>, asociado a CTTM, mientras que el antagonista de la familia D1, SCH-23390, aumenta dicha fracción. Esto sugiere que los receptores del tipo D1 podrían estar implicados en la supervivencia de las CTT de cáncer de mama (S. Wang et al., 2015). Asimismo, se ha visto que la tioridazina inhibe la formación de mamoesferas al alterar la vía STAT3/IL-6 (Tegowski et al., 2018).

Con la evidencia mostrada, se sugiere que los receptores a dopamina juegan un papel importante en la progresión del cáncer en diversos tumores no-neurales, incluidos el cáncer de mama, hepatocarcinoma, leucemia, entre otros. Sin embargo, de acuerdo con los datos mostrados, se requiere dilucidar el papel de cada uno de estos receptores en la biología de

las células de cáncer de mama, ya que se desconoce la expresión de estos receptores, si existe una expresión diferencial en subpoblaciones y cuál es la participación de cada uno de ellos en funciones celulares específicas. Por lo tanto, en este trabajo se busca determinar el papel de los receptores a dopamina en troncalidad de células de cáncer de mama.

### 3. Hipótesis

Las células troncales de cáncer de mama expresarán receptores de dopamina, por lo que la modulación farmacológica de los receptores afectará la troncalidad.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Analizar, en modelos celulares de cáncer de mama, el papel de receptores de dopamina en la troncalidad celular.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la expresión de los receptores de dopamina en líneas celulares de cáncer de mama que representan diferentes subtipos de la enfermedad, diferenciando la expresión en población troncal vs. no troncal.
- Evaluar el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores de dopamina en la viabilidad de células de cáncer de mama. En caso de identificar efecto citotóxico se analizará la susceptibilidad de las subpoblaciones.
- Evaluar el efecto del tratamiento con fármacos agonistas o antagonistas de los receptores de dopamina en la fracción troncal de células de cáncer de mama.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Líneas y cultivo celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama humano, obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). La línea celular MDA-MB-231, del subtipo TN se cultivó en medio *Leibovitz's L-15* (L-15, 41300-039, GIBCO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, GIBCO), en atmósfera 100% de aire a 37°C. La línea celular, MCF7, positiva a receptor de estrógenos, se cultivó en medio *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) (ME-063, In Vitro) con 10% de SFB y 0.01 mg/mL de insulina recombinante humana (sc-360248, Santa Cruz Biotechnology) en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para la producción de lentivirus (ver sección 5.2), se utilizó la línea celular HEK293 obtenida de la ATCC. Esta línea se cultivó en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, 12100-017, GIBCO) suplementado con 10% SFB en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Para la transfección de las células HEK-293 se utilizó el medio de empaquetamiento de lentivirus, el cual contiene medio OptiMEM reducido en suero (31985-070, GIBCO), 5% de SFB y 1 mM de piruvato de sodio (11360-070, GIBCO).

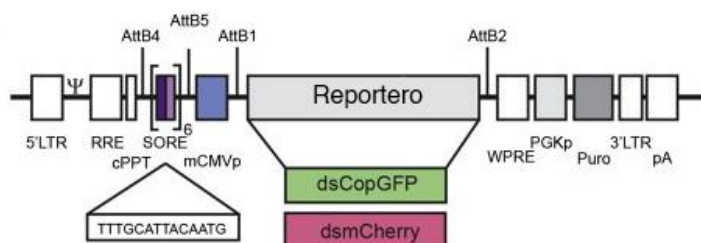
Para realizar el subcultivo de células adheridas, las células se despegaron mediante disgregación enzimática, utilizando tripsina 0.05% EDTA 1X (25300-062, GIBCO) durante 3 min a 37°C.

### 5.2 Producción de lentivirus

Las células HEK293 se transfectaron con la construcción de reportero lentiviral SORE6 (Figura 5). Esta construcción contiene la secuencia del *minigen SORE6*, conformada por 6 repeticiones en tándem del elemento de respuesta compuesto SOX2/OCT4, seguida de la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) desestabilizada. La secuencia del *minigen SORE6* se muestra a continuación, con el elemento de respuesta SOX2/OCT4 en negritas:

5'atctatcgatcagctact**tttgcattacaatggccttggtgcagctacttttgcattacaatggccttggtgcagctacttttgcattacaatggccttggtggaattccagctacttttgcattacaatggccttggtgcagctacttttgcattacaatggccttggtgcagctacttttgcattacaatggccttggtgactagtctta**-3'. Como control de la expresión de fondo de

la GFP debido al promotor mínimo de citomegalovirus (CMV), se utilizó la construcción minCMVp-GFP.



**Figura 5. Esquema del sistema reportero lentiviral SORE6.** Modificado de Tang et al., 2015. AttB1, B2, B4, B5 representan sitios AttB para la clonación recombinante Gateway; SORE es el elemento de respuesta compuesto SOX2/OCT4; mCMVp: promotor mínimo de CMV, control de expresión.

Se sembraron 2,000,000 células HEK293T en placas para cultivo celular de 100 mm, una placa para cada construcción diferente y se incubaron por 24 h. Para la transfección se siguió el protocolo de lipofectamina 3000 (L3000-001, Invitrogen) con algunas modificaciones. En un microtubo Eppendorf (MCT-150-C, Axygen) de 1.5 mL se preparó la mezcla A (Microtubo A, ver tabla 2) y se mezcló con ayuda del vórtex de 2 a 3 veces. En otro microtubo se preparó la mezcla de reacción (Microtubo B, ver tabla 2) y se mezcló bien.

**Tabla 2.** Preparación de mezclas de reacción para la producción de lentivirus.

Microtubo A	Microtubo B		
25 µL de Lipofectamina 3000	Plásmidos/Reactivo	SORE6 GFP (µg)	CMV GFP (µg)
	psPAX2	1.5	1.5
	pMD2.G	0.75	0.75
750 µL de medio OptiMEM	pDest-663	3.0	3.0
	750 µL de medio OptiMEM		
	8 µL del reactivo P3000		

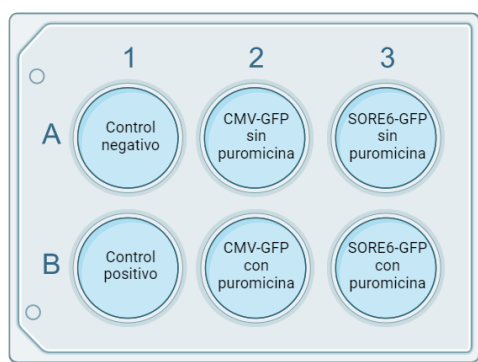
Se añadió el volumen del microtubo A al volumen del microtubo B y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente (TA). Se cambió el medio de las células HEK-293 por 6 mL de medio fresco con los siguientes requerimientos: 3 mL medio DMEM con 5% SFB y 3 mL de medio de empaquetamiento de lentivirus. Posteriormente, se añadió el contenido de cada uno de los microtubos a cada placa de cultivo por medio de goteo, se agitaron las placas con cuidado de manera orbital y se incubaron durante 6 h a 37°C. Después de este

tiempo, se removió y cambió el medio de cada placa por 12 mL de medio de empaquetamiento de lentivirus; se dejó incubar durante toda la noche a 37°C.

Transcurridas 24 h posterior a la transfección, se recolectó el medio de las células HEK-293 en tubos de 50 mL (uno para cada construcción) y se almacenaron a 4°C. Se añadieron 12 mL de medio fresco de empaquetamiento de lentivirus a las células y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, se realizó la segunda recolección del sobrenadante viral (52 h post-transfección) en los mismos tubos de 50 mL utilizados el día anterior y se desecharon las células. Los tubos se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos y se filtró el sobrenadante a través de filtros de membrana de 45 µm. Se alicuotó el sobrenadante viral en microtubos Eppendorf de 1.5 mL, cada uno con 1 mL y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### 5.3 Transducción de líneas celulares de cáncer de mama

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 se transdujeron con el sistema lentiviral SORE6-GFP y su respectivo control (minCMVp-GFP). Se sembraron 100,000 células por pozo (línea MDA-MB-231) y 500,000 células por pozo (línea MCF7) en placas de 6 pozos, incubándose toda la noche a 37°C. Posteriormente, se reemplazó el medio por 1 mL de medio fresco para cada línea celular, y se añadió 1 mL de lentivirus y bromuro de hexadimetrina (107690, SIGMA, concentración final 8 µg/mL) a cada pozo (ver figura 6). Se incubaron por 24 h y se reemplazó el medio por 3 mL medio fresco.



**Figura 6. Diseño experimental para la transducción de células de CaMa.** Control negativo: células con su correspondiente medio de cultivo; control positivo: células con medio de cultivo y puromicina (8 µg/mL). Pozos 2A y 2B: células transducidas con el sistema control minCMV-GFP (sin y con puromicina, respectivamente). Pozos 3A y 3B: células transducidas con el sistema SORE6-GFP (sin y con puromicina, respectivamente).



Se comenzó la selección con puromicina al 0.5 µg/mL (P8833, SIGMA), como se describe en la figura 5, de 3 a 5 días. Después de la selección, se expandieron las células para realizar el *sorting* por medio de citometría de flujo, seleccionando aquellas que expresaban la GFP. Finalmente, se dejaron proliferar las células para realizar los experimentos posteriores. Las líneas transducidas se denominaron sublíneas MDA-MB-231/SORE6 y MCF7/SORE6.

#### 5.4 Agonistas y antagonista de los receptores a dopamina

Se utilizaron 2 fármacos agonistas: SKF-38393 para la familia D1 (sc-264306, Santa Cruz Biotechnology) y Quinpirol para la familia D2 (Q102, SIGMA). Asimismo, se utilizaron 2 fármacos antagonistas: SCH-23390 para la familia D1 (D054, SIGMA) y Haloperidol para la familia D2 (sc-203596, Santa Cruz Biotechnology).

Las soluciones stock de los fármacos fueron preparadas en agua Mili Q a excepción del haloperidol, la cual fue preparada en dimetilsulfóxido al 100% (DMSO, D4540, SIGMA). Todas las soluciones stock se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de membrana de 20 µm y fueron almacenadas a -70°C, protegidas de la luz, hasta su uso.

#### 5.5 Identificación de los receptores a dopamina por citometría de flujo

Para detectar la presencia de 4 de los RD (DRD1, DRD2, DRD4 y DRD5) se realizó una tinción de membrana e intracelular en las sublíneas celulares MCF7/SORE6 y MDA-MB-231/SORE6, en condiciones basales. Se sembraron 450,00 células de la sublínea MDA-MB-231/SORE6 y 500,000 células sublínea MCF7/SORE6 por pozo en placas de 6 pozos para cada tinción. Además, se sembraron 50,000 células de su respectiva sublínea minCMV-GFP para cada tinción; se incubaron durante toda la noche a 37°C. Se lavaron las células con PBS 1X y se añadieron 500 µL PBS/EDTA al 0.02%, incubándose a 37°C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 500 µL de PBS 1X y se recolectaron las células en tubos de 5 mL. Los tubos se centrifugaron a 1200 x g por 5 min y se retiró el sobrenadante.

##### 5.5.1 Tinción de marcadores de membrana

Se añadieron 800 µL de buffer de bloqueo (PBS 1x, 5% SFB) para las sublíneas celulares MCF7/SORE6 y MDA-MB-231/SORE6 y 100 µL para su respectiva sublínea minCMV-GFP; se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se colocaron 100 µL de la suspensión celular en cada uno de los tubos y se tiñeron las células con los anticuerpos

anti-RD e isotipos correspondientes (Tabla 3) durante 30 min a 4°C protegidas de la luz. Las cantidades de los diferentes isotipos se utilizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Finalmente, las células se lavaron en buffer de lavado (PBS 1x, 2% SFB, 0.01% NaN<sub>3</sub>) dos veces y se resuspendieron en 300 µL de PBS 1X. Las muestras se adquirieron en el citómetro Attune-NxT (Life Technologies) y se analizaron utilizando el software FlowJo 10.0.

### 5.5.2 Tinción de proteínas intracelulares

Se resuspendieron completamente las células y se agregaron 200 µL de la solución de fijación/permeabilización (554715, BD) incubando durante 20 minutos a 4°C. Se lavaron las células 2 veces con 400 µL del buffer BD Perm/wash para permeabilizar las células. Posteriormente, se añadieron 400 µL del buffer BD Perm/wash, y se colocaron 50 µL de la suspensión celular por tubo. Se añadió la cantidad indicada en la tabla 3 del anticuerpo o isotipo apropiado y se incubaron a 4°C por 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se lavaron las células con 200 µL del buffer BD Perm/Wash dos veces y se resuspendieron en 300 µL de PBS 1x para el análisis por medio de citometría de flujo. Las muestras se adquirieron en el citómetro Attune-NxT (Life Technologies) y se analizaron utilizando el software FlowJo 10.0.

**Tabla 3.** Anticuerpos anti-RD e isotipos utilizados para citometría de flujo.

Anticuerpo	Marca/Catálogo/Especie	Concentración	Fluorocromo
Anti-DRD1	R&D Systems, FAB8276V, ratón	0.25 µg	Alexa Fluor 405
Anti-DRD2	Santa Cruz Biotechnology, sc-5303, ratón	0.2 µg	Alexa Fluor 647
Anti-DRD4	Santa Cruz Biotechnology, sc-136169, ratón	0.2 µg	PE
Anti-DRD5	Santa Cruz Biotechnology, sc-376088, ratón	0.2 µg	Alexa Fluor 647
Isotipo IgG <sub>2a, k</sub>	R&D Systems, IC003V, ratón	0.5 µL	Alexa Fluor 405
Isotipo IgG <sub>2a, k</sub>	BD Pharmingen, 555574, rata	1 µL	PE
Isotipo IgG <sub>2a, k</sub>	BD Pharmingen, 557857, ratón	0.5 µL	Alexa Fluor 647

## 5.6 Evaluación de la viabilidad celular

Para evaluar el efecto de los fármacos dopaminérgicos en la viabilidad de las células CaMa, se utilizó el ensayo colorimétrico de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolio (MTT) (M5655, SIGMA). En placas de 96 pozos (701001, NEST) se sembraron 2,000 células de CaMa por pozo en 100  $\mu$ L de medio, por sextuplicado para cada condición, y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Se trataron las células con los fármacos (agonistas o antagonistas) a diferentes concentraciones (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100  $\mu$ M) y se incubaron durante 72 h. Como vehículo, se utilizó el disolvente correspondiente para cada fármaco.

Transcurrido el tiempo, se añadió el reactivo de MTT al 0.5% y se incubó durante 2 h a 37°C para la línea celular MCF7 y por 2 h 30 min a 37°C para la línea celular MDA-MB-231. Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu$ L de DMSO, colocando la placa en agitación (150 rpm/5 min/TA) protegida de la luz. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro Epoch (BioTek) con el Software Gen 5. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada uno de los fármacos en cada línea celular.

Para el análisis de datos, las lecturas de absorbancia obtenidas se normalizaron con respecto al vehículo correspondiente. Se calculó la concentración inhibitoria 50, utilizando una regresión no lineal con un modelo de dosis-respuesta de inhibición (log vs respuesta de 4 parámetros) con el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software). El análisis estadístico se determinó mediante ANOVA de una vía, seguido de una comparación múltiple de Dunnet.

## 5.7 Determinación de la fracción troncal (SORE6-GFP+) tras el tratamiento con los fármacos dopaminérgicos

Se sembraron 30,000 células MDA-MB-231 y 35,000 células MCF7 transducidas con el sistema reportero SORE6-GFP y su respectivo control (minCMV-GFP) en placas de 24 pozos, se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se trataron las células con los agonistas o antagonistas de los RD a diferentes concentraciones (10, 1, 0.1 y 0.01  $\mu$ M) y sus respectivos controles (vehículo) durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con PBS 1X y se recogieron mediante digestión enzimática. Posteriormente, se añadió PBS 1X, se centrifugaron a 1,200 x g durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Con la finalidad de verificar que a las concentraciones de los fármacos utilizados no afectaron la viabilidad celular, se utilizó la tinción con 7-AAD (A9400, SIGMA) a una concentración final

de 5 µg/mL. Se incubó durante 20 min y se lavó dos veces con PBS 1X. Finalmente se resuspendieron las células en 300 µL de PBS 1X y se adquirieron las muestras en el citómetro Attune-NxT (Life Technologies) y se analizaron utilizando el software FlowJo 10.0.

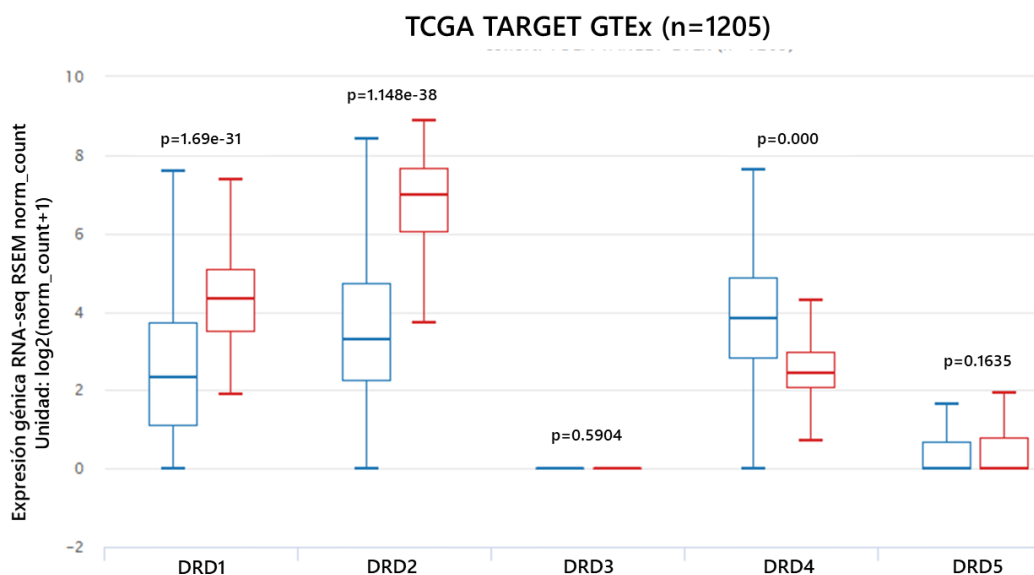
## 5.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Prisma 8.0 (GraphPad) de acuerdo con el tipo de variable y los grupos a comparar. Para determinar diferencias significativas entre dos grupos se utilizó la prueba t de Student con un intervalo de confianza del 95%. Para comparar más de dos grupos se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un intervalo de confianza del 95%, seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunnett. En todos los casos, el valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 6. Resultados

### 6.1 Los receptores de dopamina se expresan en las muestras de pacientes con cáncer de mama

Análisis realizados en la plataforma UCSC Xena (Goldman et al., 2020), a partir de datos obtenidos de TCGA, muestran que los RD se expresan diferencialmente entre tejido normal y tumoral. Tal como se observa en la figura 7, los receptores *DRD1* y *DRD2* se subexpresan en tejido tumoral en comparación con el tejido normal. Además, no hay cambios en la expresión de *DRD3* y *DRD5*; sin embargo, no se observa expresión de *DRD3* en ninguno de los tejidos. Por lo contrario, *DRD4* se sobreexpresa en tejido tumoral en comparación con el tejido normal.



**Figura 7. *DRD4* se sobreexpresa en tejido tumoral en comparación con el tejido sano.** Expresión de los receptores de dopamina en muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama (cajas azules) en comparación con tejido normal adyacente al tumor (cajas rojas). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de t de Welch.

### 6.2 La expresión de algunos RD tiene un impacto en el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama

Existe evidencia que demuestra que la sobreexpresión o subexpresión de los RD se correlaciona con un mal pronóstico para los pacientes con cáncer de mama (X. Wang et al., 2019). Por ello se analizó la expresión de los RD en cáncer de mama y su relación con el impacto clínico, realizando una búsqueda en la plataforma UCSC Xena. En múltiples bases

de datos se encontró que la sobreexpresión de *DRD1* o la baja expresión de *DRD4* se asociaron con una disminución en la sobrevida general del paciente, independientemente del subtipo de la enfermedad. Además, los pacientes con disminución en la expresión de *DRD4* tienen un mayor riesgo de metástasis (Tabla 4). En casos particulares, la sobreexpresión de *DRD2* o la baja expresión de *DRD5* se correlacionó con una menor sobrevida de los pacientes (Tabla 4). Estos resultados sugieren que la expresión de *DRD1* promueve la progresión del cáncer mientras que la expresión de *DRD4* favorece un mejor pronóstico. Asimismo, la expresión de los RD, en especial *DRD1* y *DRD4*, podrían ser un blanco terapéutico para el cáncer de mama.

**Tabla 4.** Expresión de los receptores de dopamina en muestras de pacientes y su valor clínico.

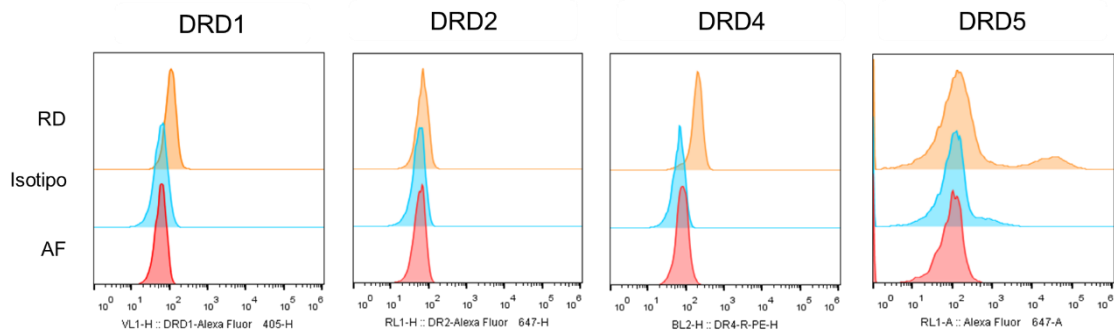
Base de datos	Subtipo de CaMa	RD	Expresión	P (logrank test)	Valor clínico
TCGA	RE+/-	DRD1	Alta	0.04961	Menor sobrevida
TCGA	RE-	DRD4	Baja	0.03067	Menor sobrevida
Caldas, 2007	RE-	DRD1	Alta	1.71E-09	Menor sobrevida
Caldas, 2007	RE-	DRD2	Alta	1.19E-07	Menor sobrevida
Caldas, 2007	RE+	DRD4	Baja	0.03101	Menor sobrevida
Wang, 2005	RE+	DRD4	Baja	0.01242	Recaída
Wang, 2005	RE+	DRD5	Baja	0.007268	Recaída
Vijver, 2002	RE+	DRD4	Baja	0.02894	Metástasis
Yau, 2010	RE+	DRD4	Baja	0.005978	Metástasis distante
Yau, 2010	Luminal AB	DRD4	Baja	0.001011	Metástasis distante
VantVeer, 2002	RE+	DRD4	Baja	0.007752	Metástasis
Chin, 2006	RE+	DRD1	Alta	0.01053	Menor sobrevida

### 6.3 Las líneas celulares de cáncer de mama expresan los receptores de dopamina.

Con el objetivo de determinar la presencia de los receptores de dopamina en las células de cáncer de mama, se midieron los niveles de los receptores de membrana en las diferentes

líneas celulares por medio de análisis de citometría de flujo en células sin permeabilizar. Se analizaron 4 de los 5 RD (DRD1, DRD2, DRD4 y DRD5), ya que, en experimentos preliminares de PCR en tiempo real, no amplificó *DRD3*, además de que en resultados previos utilizando datos provenientes del TCGA (Figura 7), no se encontró diferencia en la expresión de *DRD3* entre tejido tumoral y tejido normal de pacientes.

Para verificar el funcionamiento correcto de los anticuerpos utilizados para este ensayo, se emplearon diversas líneas celulares como controles positivos de la expresión de los RD. Como se observa en la figura 8, todos los anticuerpos empleados para la detección de los RD funcionan adecuadamente y se procedió a la identificación de los RD en las líneas celulares de CaMa.

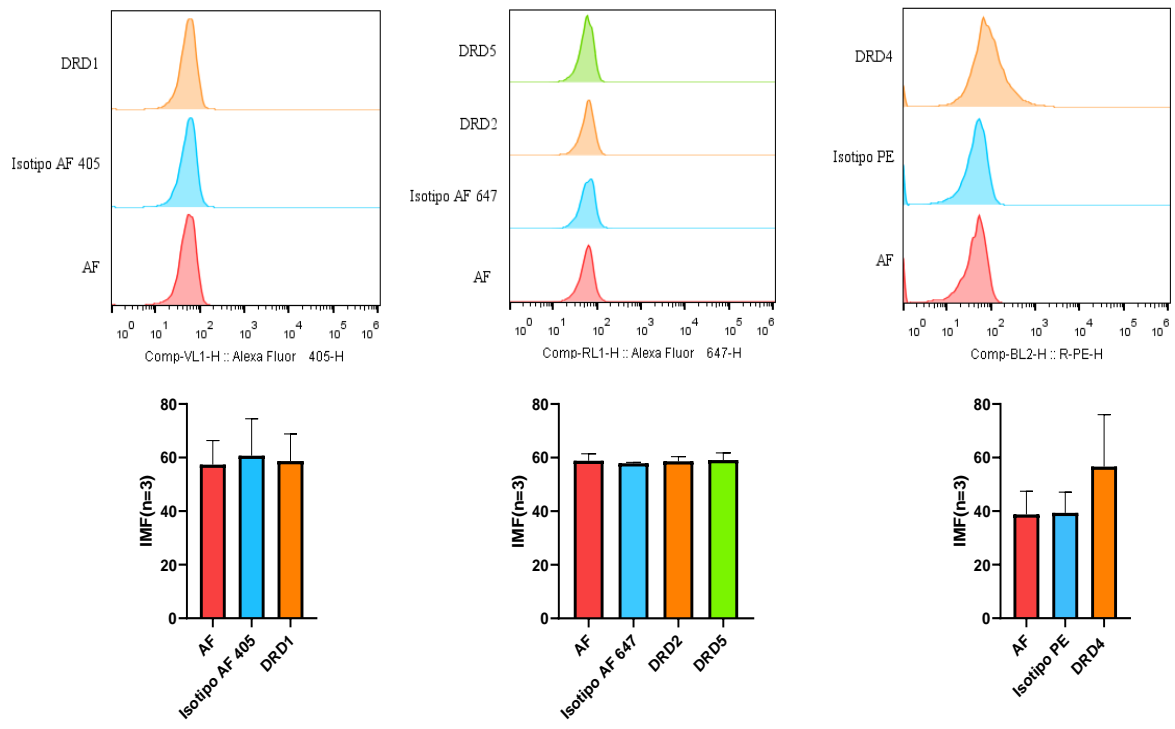


**Figura 8. Los receptores de dopamina se expresan en diversas líneas celulares.** Análisis cuantitativo de la expresión de los RD por citometría de flujo en diferentes líneas celulares, utilizadas como controles positivos: DRD1, U87-MG; DRD2, HepG2; DRD4, HepG2 y DRD5: U87-MG.

Los resultados demostraron que en la sublínea celular MCF7/SORE6 (Figura 9A) no hay cambios significativos en la intensidad mediana de fluorescencia (IMF) en comparación con su respectivo control de isotipo, lo cual sugiere que no se encuentra ninguno de los RD en la membrana celular. Por el contrario, la sublínea celular MDA-MB-231/SORE6 (Figura 9B) muestra un aumento en la IMF únicamente para DRD4, lo cual sugiere que se encuentra este receptor en la membrana. Debido a que los niveles proteicos de los RD son muy bajos en las células de CaMa y solo fue posible detectar cambios en la IMF para establecer la presencia de estos receptores, no se pudo determinar la existencia de subpoblaciones positivas o negativas a estos RD.

A)

MCF7/SORE6



B)

MDA-MB-231/SORE6

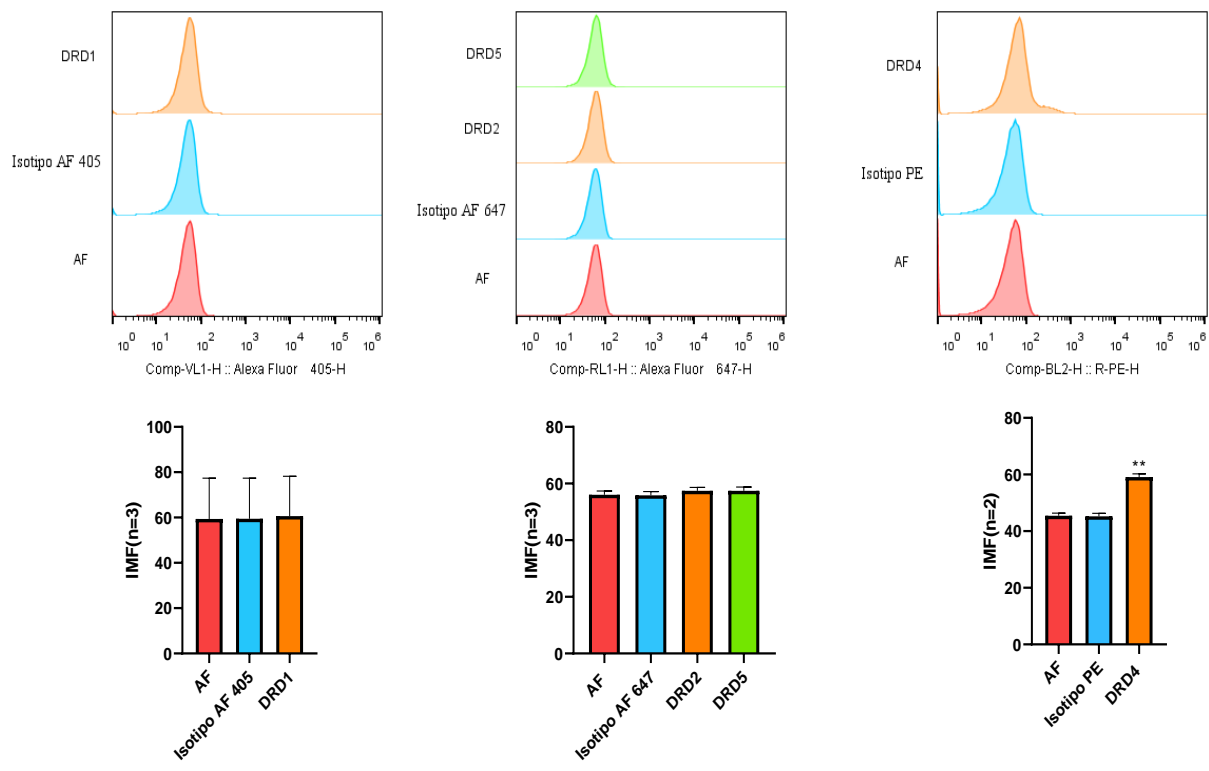
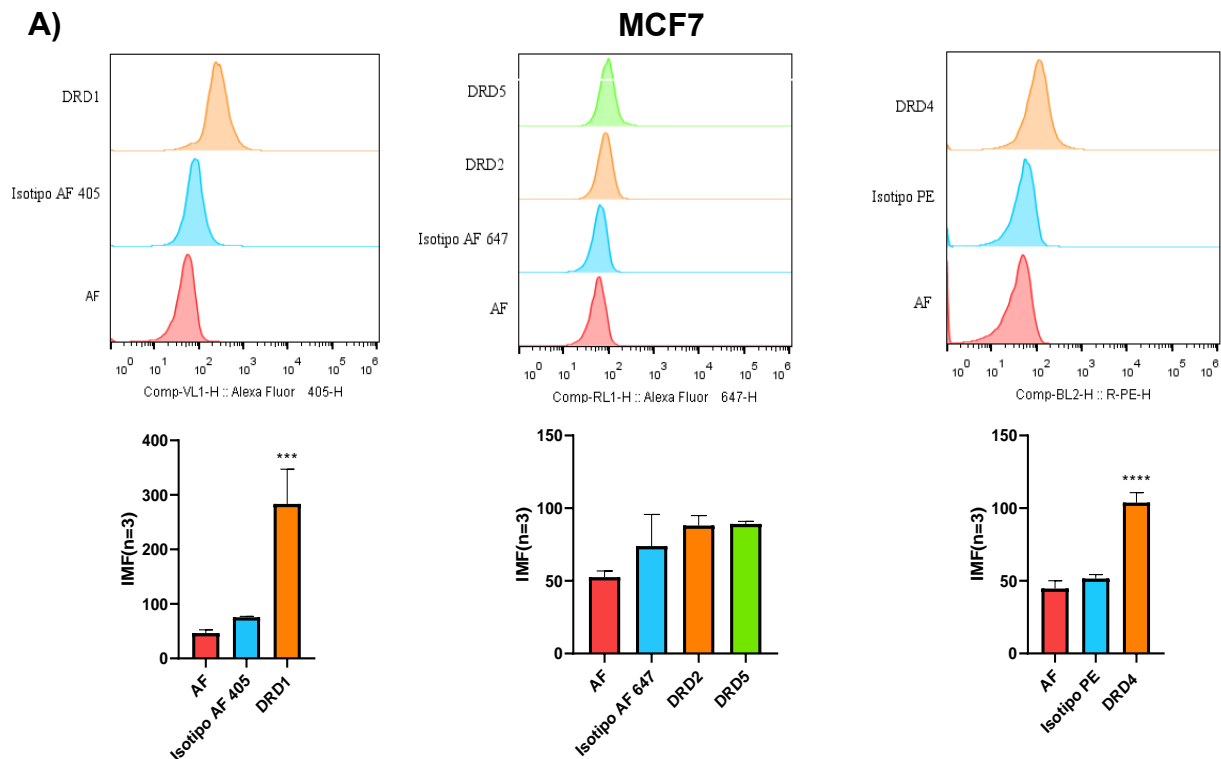


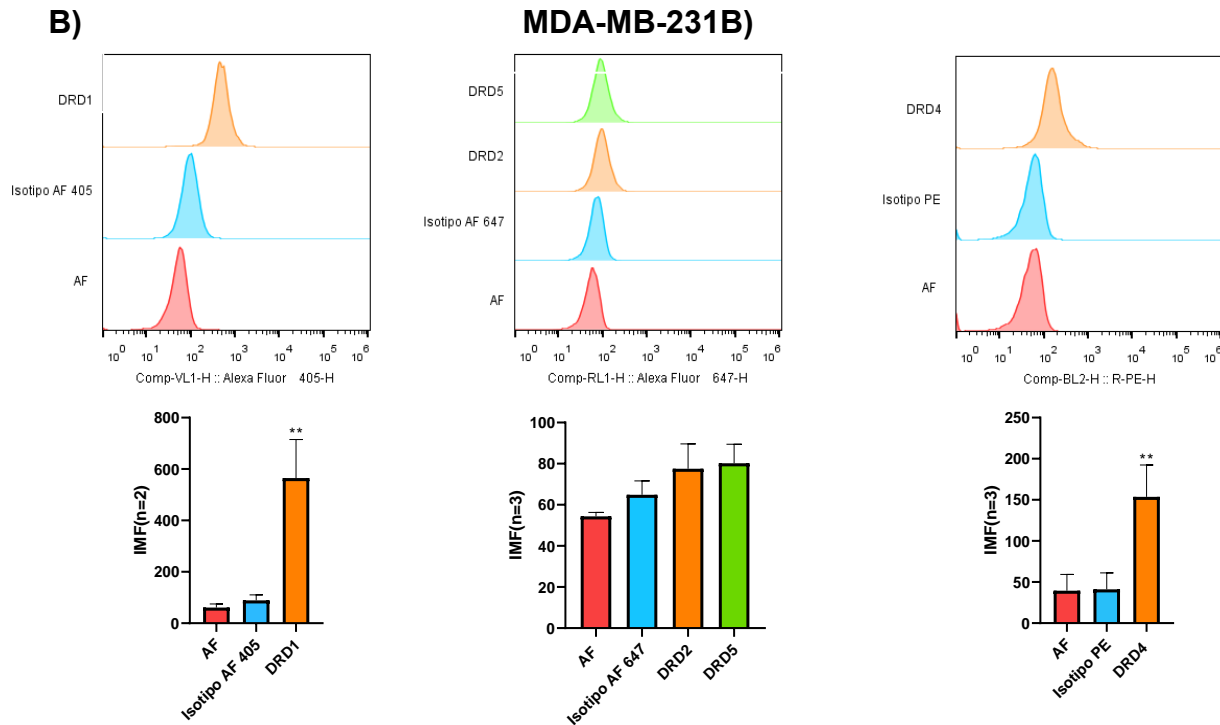
Figura 9. El receptor D4 se expresa en la superficie de las células MDA-MB-231/SORE6 del subtipo triple negativo. Evaluación de la expresión de RD de membrana en células de cáncer de



mama, se muestran los histogramas representativos de la cuantificación por citometría de flujo y las gráficas de los valores de IMF, (media  $\pm$  desviación estándar) de 2 o 3 experimentos independientes para las líneas celulares MCF7 (A) y MDA-MB-231 (B). La comparación de los valores se realizó con respecto al control de isotipo, prueba estadística ANOVA de una vía seguida de una prueba post-test de Dunnett, \*\*,  $p < 0.001$ .

Dado que estudios previos han reportado la presencia tanto del ARNm como de la proteína total de los RD en células de cáncer de mama (Borcherding et al., 2016; Gholipour et al., 2018), decidimos determinar la presencia de los RD intracelularmente en las dos líneas celulares de CaMa empleadas en este estudio. Encontramos que en la sublínea MCF7/SORE6 hay un aumento en la IMF de DRD1 y DRD4 intracelular (Figura 10A). Este mismo comportamiento se observa en la sublínea celular MDA-MB-231/SORE6 (Figura 10B). Estos resultados sugieren que las proteínas DRD1 y DRD4 sí se expresan en las líneas celulares estudiadas, aunque sólo DRD4 se detecta membranalmente (Figura 9B). La IMF de DRD1 intracelular es mayor que la de DRD4 para ambas líneas celulares, lo que sugiere que el nivel de proteína expresada es mayor para DRD1 que para DRD4. Al comparar las dos líneas celulares estudiadas se encontró que los valores de IMF para la línea celular MDA-MB-231 son mayores en comparación con la línea celular MCF7, tanto para DRD1 como DRD4, indicando que la expresión de estos RD es mayor en la línea seleccionada como modelo del subtipo triple negativo.

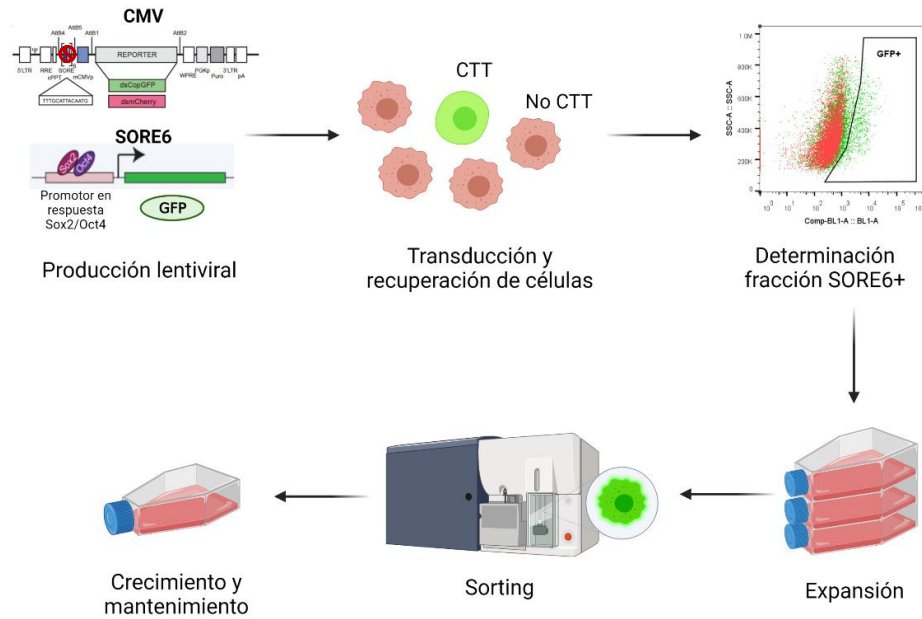




**Figura 10. Los receptores D1 y D4 se localizan intracelularmente en las células MCF7 y MDA-MB-231/SORE6.** Análisis cuantitativo de la expresión de los RD intracelulares en las células de cáncer de mama. Se muestran los histogramas representativos de la cuantificación por citometría de flujo y las gráficas de los valores de IMF, (media  $\pm$  desviación estándar) de 2 o 3 experimentos independientes para las líneas celulares MCF7 (A) y MDA-MB-231 (B). La comparación de los valores se realizó con respecto al control de isotipo, prueba estadística ANOVA de una vía seguida de una prueba post-test de Dunnett, \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

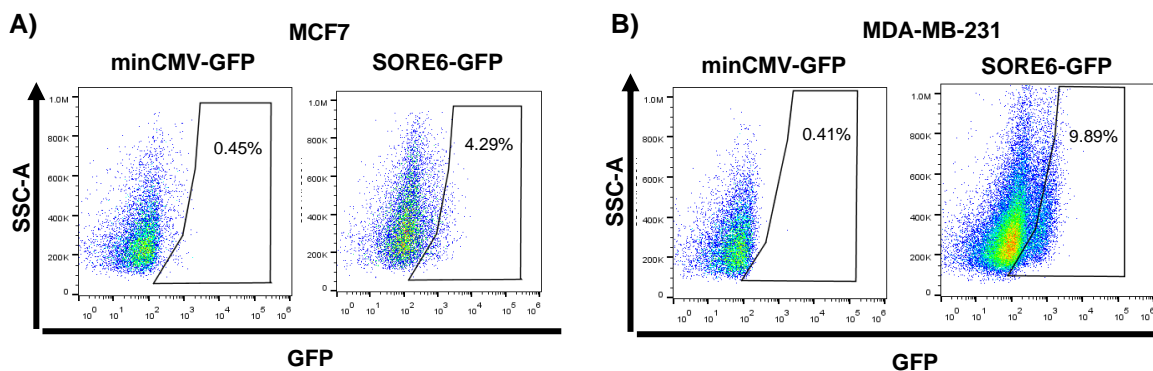
#### 6.4 Una pequeña fracción de las células MCF7 y MDA-MB-231 expresan los genes SOX2 y OCT4.

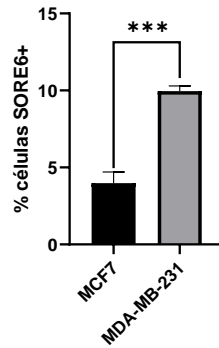
El sistema reportero lentiviral SORE6 tiene el gen reportero GFP bajo el control de elementos de respuesta SOX2 y OCT4, dos de los tres factores reguladores importantes de la troncalidad de células madre embrionarias (ESC) (Tang et al., 2015). Tang y colaboradores demostraron que este sistema reportero identifica una pequeña población de células en líneas celulares de CaMa, la cual posee características esperadas de CTT (Tang et al., 2015). En este trabajo se emplearon sublíneas SORE6 previamente generadas en el laboratorio, como se muestra en la figura 11, utilizadas para la cuantificación indirecta de la fracción troncal.



**Figura 11. Generación de las sublíneas celulares SORE6 de CaMa.** Creado en BioRender.com. Las sublíneas celulares SORE6 se originaron a partir de la transducción con el sistema reportero lentiviral SORE6-GFP y su respectivo control minCMV-GFP. Posteriormente, se comprobó la eficiencia de la transducción por medio de citometría de flujo a partir de la fluorescencia de GFP. Las células que contenían la construcción de manera estable se expandieron para realizar el *sorting* mediante citometría de flujo, seleccionando las células que expresaban la GFP. Finalmente, las células SORE6-GFP+ se crecieron y mantuvieron para los ensayos posteriores.

Como se aprecia en la figura 12A, alrededor de un 4% de la línea celular MCF7 se identifican como CTT (SORE-GFP+). Por otro lado, en la línea celular MDA-MB-231, alrededor de un 9.5% se determina como la fracción troncal (Figura 12B). Estos resultados sugieren que, en las células del subtipo triple negativo (MDA-MB-231), existe una mayor proporción de células con características troncales, que en la línea receptores hormonales positivos (MCF7).



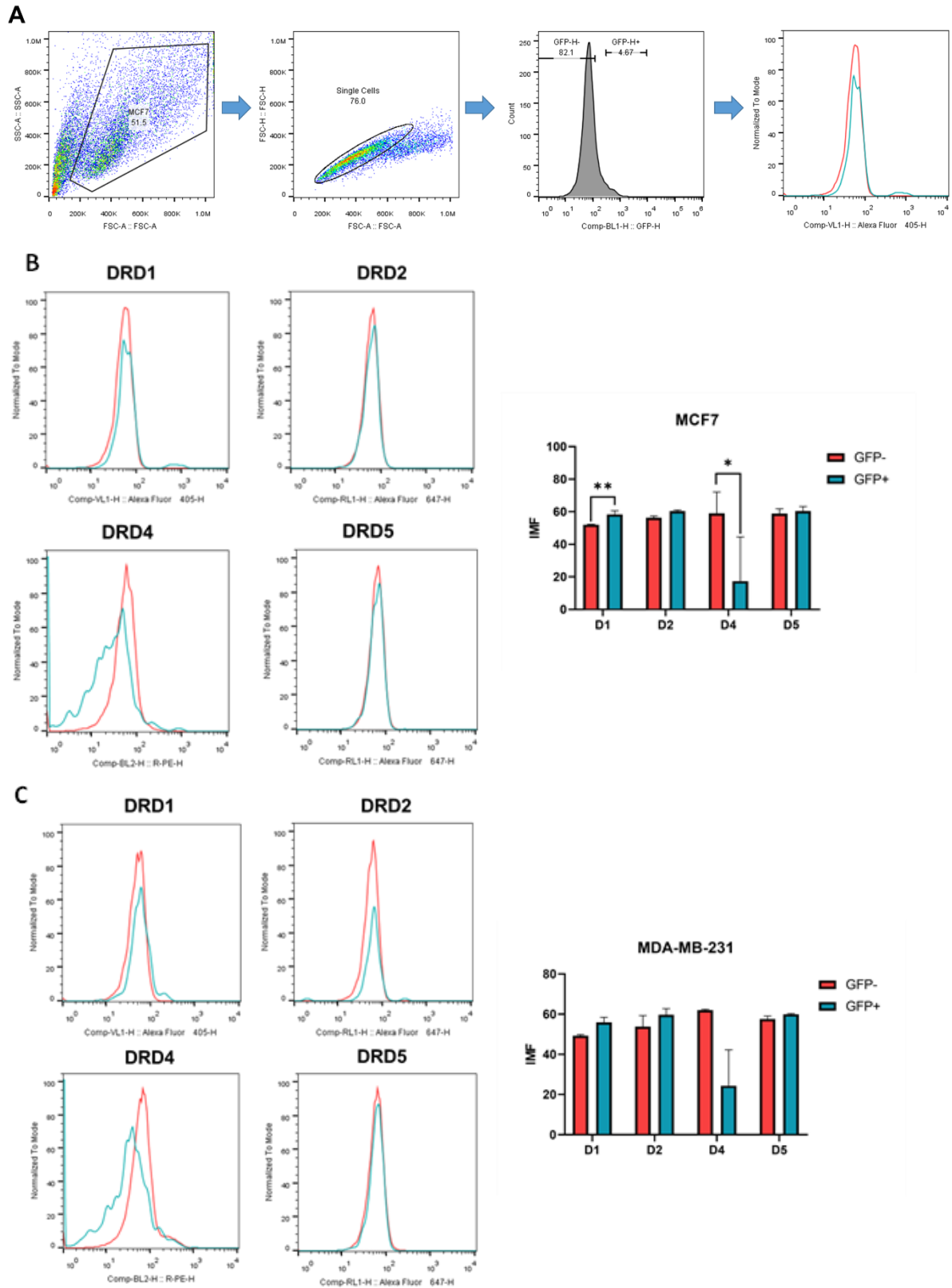


**Figura 12. La fracción troncal (SORE6-GFP+) es diferente en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.** Dot plots representativos de la cuantificación del porcentaje de células SORE6-GFP+ (media  $\pm$  desviación estándar) de 3 experimentos independientes para las líneas celulares MCF7 (A) y MDA-MB-231 (B); minCMV-GFP: control de la expresión de GFP, SORE6-GFP: fracción troncal. C) Cuantificación del porcentaje de células SORE6-GFP+ (SORE6+) (media  $\pm$  desviación estándar) de 3 experimentos independientes en las líneas MCF7 y MDA-MB-231. La comparación de los valores se realizó entre líneas celulares, mediante una prueba de t-student, \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### 6.5 Los RD se expresan diferencialmente en las células CTT de mama.

Tras determinar la fracción troncal de cada una de las líneas celulares, se evaluó si existía alguna diferencia en la expresión de los RD entre la fracción troncal (SORE6-GFP+) y la fracción no troncal (SORE6-GFP-). La estrategia para analizar de forma cuantitativa la expresión diferencial de los RD consistió en seleccionar la región de células de CaMa (MCF7 o MDA-MB-231) de una gráfica tipo “dot-plot” que se definió por características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) (Figura 13A). Posteriormente, se seleccionaron los singuletes con ayuda de una gráfica tipo “dot plot” definida por las características tamaño (FSC-A vs FSC-H). A partir de dicha región se realizó una gráfica de histograma GFP vs. número de eventos, en la cual se delimitó la población SORE-GFP+ o SORE-GFP-. Partiendo de la población SORE-GFP+ o SORE-GFP-, se analizó la expresión de los RD.

Se observó que las células troncales de la línea celular MCF7, expresaban mayormente el DRD1 en comparación con las células no troncales (Figura 13B). Por el contrario, la subpoblación troncal de esta misma línea celular tiene una menor expresión del receptor DRD4 en comparación con el resto de la población (Figura 13B). En relación con la línea celular MDA-MB-231, no se detectaron cambios en la expresión de ninguno de los RD entre la fracción troncal y la no troncal (Figura 13C). Sin embargo, se observa una tendencia al alza en la IMF de los receptores DRD1, así como una tendencia a la baja de DRD4. No obstante, estos cambios no son significativos.



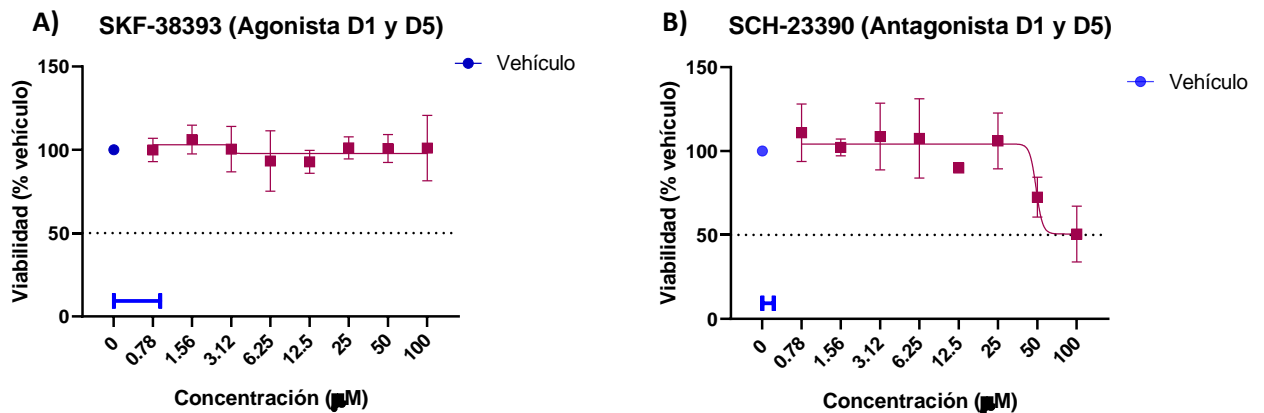
**Figura 13. Los RD se expresan diferencialmente en las células SORE6-GFP+/- de la línea MCF7 pero no en MDA-MB-231. A) Estrategia para el análisis cuantitativo de la expresión de los RD en**

células de cáncer de mama. Histogramas representativos de la cuantificación por citometría de flujo y valores de IMF, (media  $\pm$  desviación estándar) de 2 o 3 experimentos independientes para las líneas celulares MCF7 (B) y MDA-MB-231 (C); línea roja: células SORE6-GFP-; línea verde: células SORE6-GFP+. La comparación de los valores se realizó entre los grupos SORE6-GFP- y SORE6-GFP+ mediante una prueba de t-student, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

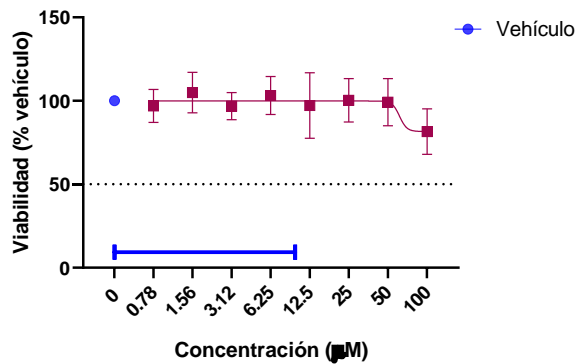
## 6.6 El tratamiento con agonistas o antagonistas de los RD no afecta en la viabilidad celular a bajas concentraciones.

Tras determinar la expresión de los RD en las células de CaMa, se evaluó el efecto de diversos agonistas y antagonistas de los receptores en la viabilidad de las líneas celulares de CaMa, para establecer el rango de concentraciones en el cual la viabilidad celular no se afecta, y así, poder realizar ensayos funcionales posteriormente. Además, al tratar las células con estos fármacos se buscaba establecer si la modificación de la fracción troncal era ocasionada por la acción de los RD.

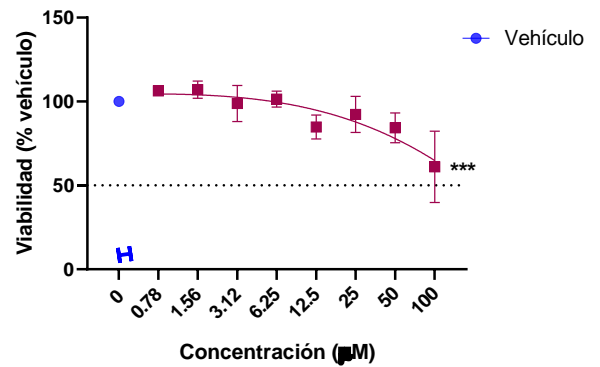
De acuerdo con los resultados obtenidos, en la línea celular MCF7 no se observó una disminución significativa en la viabilidad al tratar con el agonista de la familia D1 SKF-38393 o con el antagonista SCH-23390 (Figura 14A y B). Por el contrario, en la línea celular MDA-MB-231 se encontró que tanto el agonista como el antagonista de esta familia disminuyen la viabilidad celular (Figura 15A y B), observando un mayor efecto con el uso del SCH-23390, antagonista de la familia D1, a concentraciones mayores (a partir de  $\geq 50 \mu\text{M}$ ).



C) Quinpirol (Agonista D2, D3 y D4)

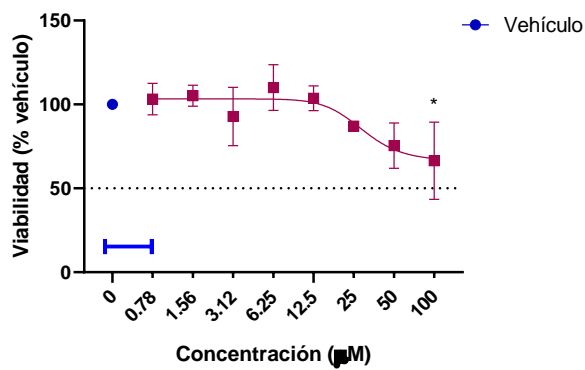


D) Haloperidol (Antagonista D2, D3 y D4)

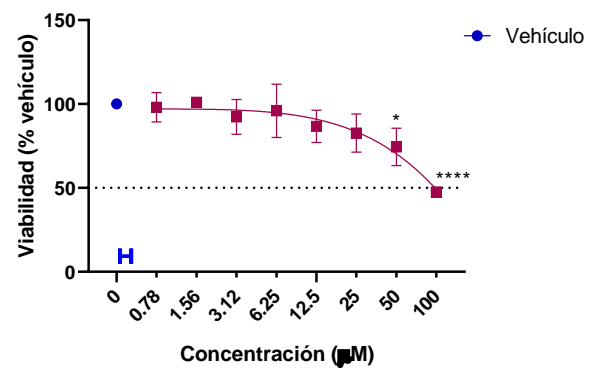


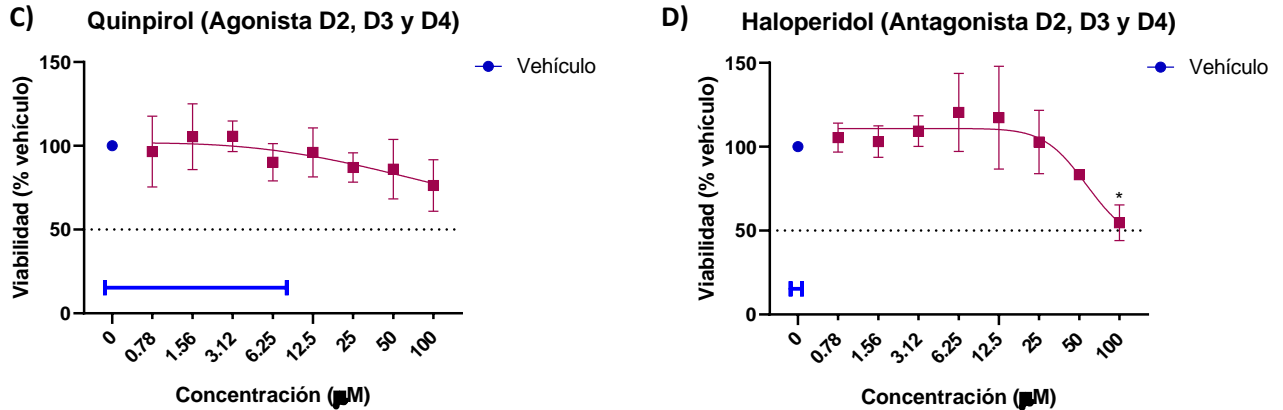
**Figura 14. Evaluación del efecto de agonistas o antagonistas de los receptores de dopamina en la viabilidad de células MCF7.** Curvas de concentración representativas del porcentaje de viabilidad obtenidas para cada fármaco contra la respuesta observada en el control. Se muestra la media  $\pm$  D.E de 2 o 3 experimentos independientes. La comparación de los valores se realizó mediante ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-test de Dunnett.\*\*\*,  $p < 0.001$ . La línea azul representa el rango reportado de concentraciones en el cual se une con especificidad el fármaco al receptor.

A) SKF-38393 (Agonista D1 y D5)



B) SCH-23390 (Antagonista D1 y D5)





**Figura 15. Evaluación del efecto de agonistas o antagonistas de los receptores de dopamina en la viabilidad de células MDA-MB-231.** Curvas de concentración representativas del porcentaje de viabilidad obtenidas para cada fármaco contra la respuesta observada en el control. Se muestra la media  $\pm$  D.E de 3 experimentos independientes. La comparación de los valores se realizó mediante ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-test de Dunnett; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . La línea azul representa el rango reportado de concentraciones en el cual se une con especificidad el fármaco al receptor.

Las gráficas A y B de las figuras 14 (MCF7) y 15 (MDA-MB-231) permiten determinar que en el rango de concentraciones en las cuales los fármacos se unen con especificidad a su receptor (línea azul de las gráficas), no disminuye la viabilidad de las células de CaMa. Estos rangos de concentraciones se muestran en la tabla 5, especificando los valores de  $K_i$ , en los cuales se sabe que el fármaco se une con especificidad al receptor. Con base en lo anterior, se establecieron los rangos de concentraciones a emplear en ensayos posteriores. Asimismo, al evaluar el efecto del agonista y antagonista de los receptores de la familia D1, se observó que la  $IC_{50}$ , tanto en la línea celular MDA-MB-231 como en la MCF7, es mayor o igual a 100  $\mu$ M.

**Tabla 5.** Evaluación del efecto de agonistas y antagonistas de receptores a dopamina en células de cáncer de mama.

Fármaco	Familia	Acción	$K_i^*$ (M)	% Viabilidad a 10 $\mu$ M	
				MDA-MB-231	MCF7
SKF-38393	D1 (DRD1, DRD5)	Agonista	D <sub>1</sub> : $10^{-6.2} - 10^{-6.8}$ D <sub>5</sub> : $10^{-7.0}$	100	100
SCH-23390		Antagonista	D <sub>1</sub> : $10^{-7.4} - 10^{-9.5}$	>90	>90



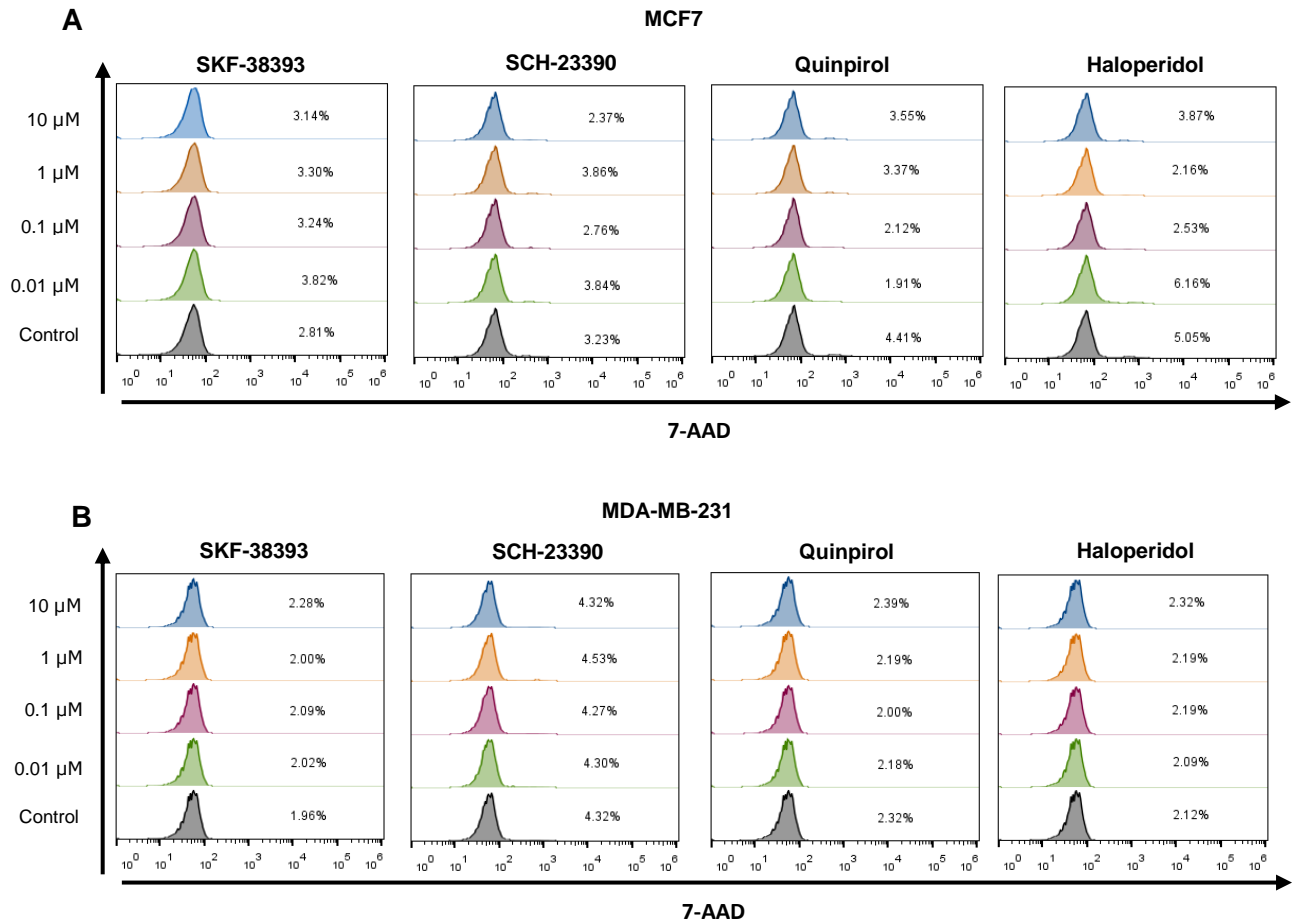
			D <sub>5</sub> : 10 <sup>-7.5</sup> – 10 <sup>-9.5</sup>		
Quinpirol	D2 (DRD2, DRD3, DRD4)	Agonista	D <sub>2</sub> : 10 <sup>-4.9</sup> – 10 <sup>-7.7</sup> D <sub>3</sub> : 10 <sup>-6.4</sup> – 10 <sup>-8.0</sup> D <sub>4</sub> : 10 <sup>-7.5</sup>	>90	100
Haloperidol		Antagonista	D <sub>2</sub> : 10 <sup>-7.4</sup> – 10 <sup>-8.8</sup> D <sub>3</sub> : 10 <sup>-7.5</sup> – 10 <sup>-8.6</sup> D <sub>4</sub> : 10 <sup>-8.7</sup> – 10 <sup>-8.8</sup>	100	100

\*Obtenido de IUPHAR (Beaulieu et al., 2019).

Por otra parte, el tratamiento con el haloperidol, antagonista de la familia D2, disminuyó la viabilidad de las células únicamente a 100  $\mu$ M tanto en la línea MCF7 (Figura 14D) como en MDA-MB-231 (Figura 15D). Mientras que el quinpirol, agonista de la familia D2, no afectó significativamente la viabilidad aún a la concentración más alta en ambas líneas celulares (Figura 14C y 14C). En el rango de concentraciones donde se sabe que el fármaco se une con especificidad a su receptor, no se observó una disminución en la viabilidad para ninguna de las líneas celulares (Figura 14 y 15). Con respecto a la IC<sub>50</sub> del agonista o antagonista de la familia D2, se observó que para ambas líneas celulares es mayor a 100  $\mu$ M. Asimismo, en la tabla 5 se muestra que a una concentración de 10  $\mu$ M de cada fármaco, la viabilidad de las células puede disminuir en un 90% aproximadamente, sugiriendo que a concentraciones menores no afectará su viabilidad y que, además, el fármaco se unirá con especificidad a su receptor. De esta manera, se determinó que a concentraciones menores o iguales a 10  $\mu$ M se llevarían a cabo los ensayos posteriores.

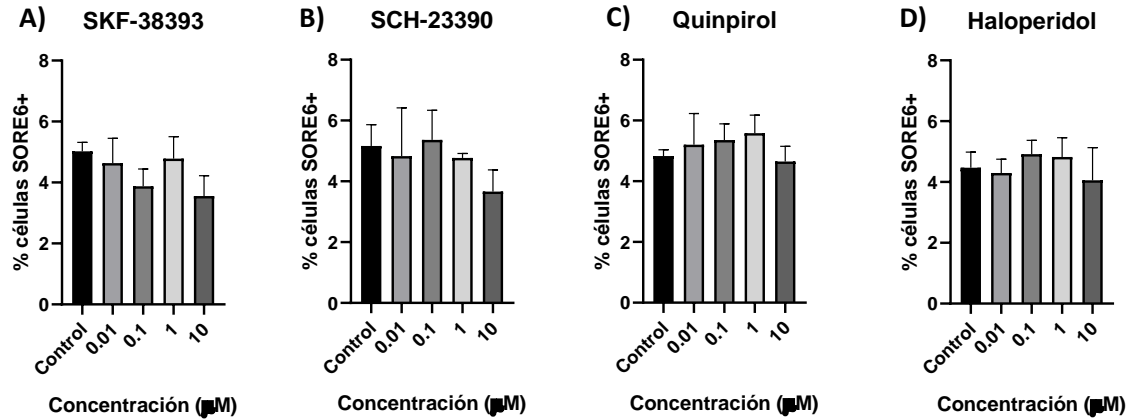
### 6.7 El tratamiento con agonistas o antagonistas de los RD no afecta el porcentaje de la población troncal en células de cáncer de mama

Posteriormente, se evaluó el efecto de los agonistas o antagonistas en la fracción troncal mediante el sistema reportero SORE6-GFP. Con la finalidad de corroborar que a las concentraciones de fármaco utilizadas no había una muerte celular ocasionada por el tratamiento, se realizó una tinción con 7-AAD, un colorante de viabilidad celular fluorescente que penetra en las células muertas o dañadas y se une al DNA por lo que las células vivas con membranas íntegras son 7-AAD negativas (Technologies, 2018). Posterior al tratamiento con los diferentes fármacos dopaminérgicos a bajas concentraciones, no hubo un aumento en la muerte con respecto a su control para ninguna de las sublíneas celulares (Figura 16), lo cual corrobora nuestros resultados previos (Figuras 14 y 15).

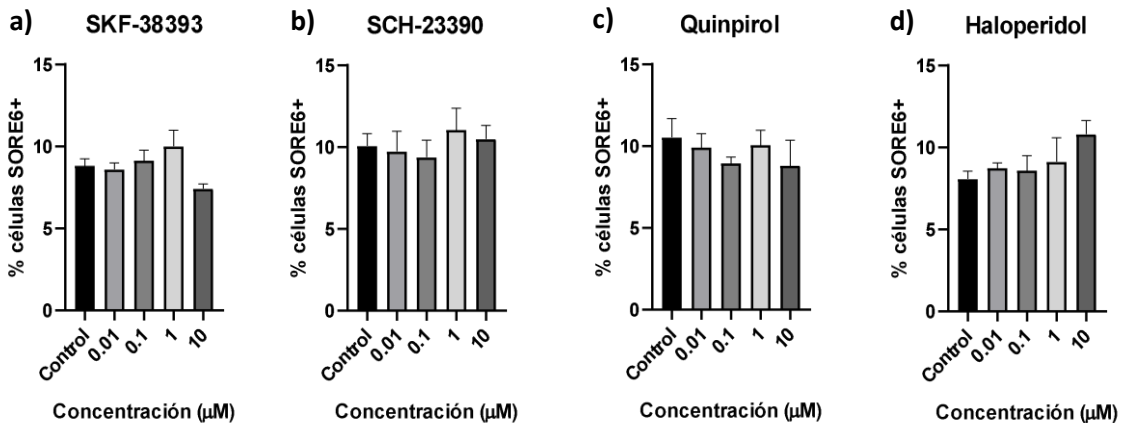


**Figura 16. El tratamiento con fármacos dopaminérgicos a bajas concentraciones no ocasiona un aumento en la muerte de las células de cáncer de mama.** Histogramas representativos de la cuantificación de células 7-AAD+ por citometría de flujo en las sublíneas celulares MCF7/SORE6 (A) y MDA-MB-231/SORE6 (B).

Tras el tratamiento con los fármacos, tanto el agonista como el antagonista de la familia D1 no tienen un efecto en la fracción troncal de la sublínea celular MCF7/SORE6 (Figura 17A y B), al igual que en la sublínea MDA-MB-231/SORE6 (Figura 18A y B). Cabe mencionar que a pesar de no haber encontrado cambios significativos con el tratamiento con SKF-38393 en la línea MCF7 (Figura 17A), se observó una tendencia a la baja al incrementar la concentración del fármaco. Por otra parte, el tratamiento con quinpirol (agonista de la familia D2) o SCH-23390 (antagonista de la familia D2), no modificó la fracción troncal tanto en la sublínea MCF7/SORE6 (Figuras 17C y D) como en la sublínea celular MDA-MB-231/SORE6 (Figura 18C y D). Estos resultados sugieren que el tratamiento con los fármacos dopaminérgico no afecta a la fracción troncal de ambas líneas celulares de CaMa.



**Figura 17. Los agonistas o antagonistas de los RD no tienen efecto en la fracción troncal de células MCF7/SORE6.** Cuantificación de la fracción troncal (SORE6-GFP+) mostrando la media  $\pm$  D.E de 3 o 4 experimentos independientes; la comparación de valores entre el grupo control (vehículo) y los grupos tratados se realizó mediante ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-test de Dunnett. SKF-38393: agonista de la familia D1; SCH-23390: antagonista de la familia D1; quinpirol: agonista de la familia D2; haloperidol: antagonista de la familia D2.



**Figura 18. El tratamiento con agonistas o antagonistas de los RD no tiene efecto en la fracción troncal de células MDA-MB-231/SORE6.** Cuantificación de la fracción troncal (SORE6-GFP+) mostrando la media  $\pm$  D.E de 3 o 4 experimentos independientes; la comparación de valores entre el grupo control (vehículo) y los grupos tratados se realizó mediante ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-test de Dunnett. SKF-38393: agonista de la familia D1; SCH-23390: antagonista de la familia D1; quinpirol: agonista de la familia D2; haloperidol: antagonista de la familia D2.

## 7. Discusión

En este estudio se exploró la expresión de los RD en dos modelos de CaMa que representan los subtipos RE+ y TN de la enfermedad. Nuestros resultados demostraron que la línea celular RE+, MCF7, no presenta ninguno de los RD en la membrana celular, mientras que la línea celular del subtipo TN, MDA-MB-231, presenta únicamente el DRD4 en la membrana. Asimismo, intracelularmente se identificaron los receptores DRD1 y DRD4 en ambas líneas celulares. En varias bases de datos se encontró que la expresión de *DRD1* está disminuida en tumores de mama humanos. Sin embargo, se observó que la sobreexpresión de este receptor se ha correlacionado con una menor sobrevida en pacientes con cáncer de mama. Estos resultados concuerdan con un estudio en donde se determinó que las muestras de pacientes que sobreexpresan DRD1, tienen una sobrevida global y libre de recurrencia reducida en comparación con los pacientes que no expresan el receptor (Borcherding et al., 2016). En estudios previos se ha reportado que los niveles de la proteína DRD1 son menores en la línea MCF7 que en líneas celulares del subtipo TN (Borcherding et al., 2016). Además, se han identificado altos niveles de DRD1 en células triple negativo por medio de western blot o inmunohistoquímica, sugiriendo que la señalización de este receptor es importante para las células de cáncer triple negativo (Borcherding et al., 2016; Minami et al., 2017; Yong et al., 2021). A pesar de que en nuestros datos no se detectó el DRD1 en la superficie de células íntegras, su identificación en otros estudios ha sido posible gracias a la cuantificación de la proteína total o los niveles ARNm. Nuestros resultados sugieren que DRD1 no se localiza membranalmente en células en cultivo. Con respecto al receptor D4, se encontró presente en la membrana de células MDA-MB-231. Además, se ha identificado una alta expresión de *DRD4* en tumores mamarios; no obstante, la baja expresión de este receptor se ha asociado a un mal pronóstico. Estos resultados nos sugieren que tanto el receptor D1 como el D4, podrían tener un papel importante en la biología de las células de cáncer de mama, además de ser posibles blancos terapéuticos.

Como otros GPCR de membrana, los RD posterior a su síntesis intracelular, requieren su transporte hacia la superficie celular para la unión con agonistas o antagonistas extracelulares (Martinez et al., 2020). Posiblemente, los niveles intracelulares de los RD detectados en las células de CaMa son mayores que los de membrana, ya que pueden ser necesarios para responder a un estímulo externo.

En este trabajo también analizamos la expresión de los RD en la subpoblación de CTT. Se ha propuesto que las CTT son las encargadas de la iniciación y desarrollo de tumores, metástasis y recurrencia de muchos tipos de cáncer, incluido el CaMa, debido a su capacidad para repoblar la heterogeneidad tumoral (Huang et al., 2020; L. Yang et al., 2020). Para identificar las CTT de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, utilizamos el sistema reportero SORE6. La construcción comprende 6 repeticiones concatenadas de los elementos de respuesta SOX2 y OCT4 del promotor NANOG humano proximal, controlando la expresión de GFP (Tang et al., 2015). Este sistema reportero ha sido propuesto como una herramienta en varios modelos de CaMa *in vitro* e *in vivo*, demostrando que identifica una subpoblación que posee características esperadas de las CTT, como la autorrenovación, generación de descendencia heterogénea, capacidad para iniciar tumores y metástasis, plasticidad y mayor resistencia a la quimioterapia (Tang et al., 2015).

De acuerdo con nuestros resultados, la línea del subtipo triple negativo, MDA-MB-231, posee un porcentaje mayor de la subpoblación troncal con 9.5% de CTT, en comparación con las células MCF7 del subtipo RE+ (alrededor del 4%), comportamiento que correlaciona con lo informado por Tang *et al.* (Tang et al., 2015). No obstante, el porcentaje de células SORE6-GFP+ fue diferente a lo reportado por Tang y colaboradores, probablemente debido al número de pasajes del cultivo celular utilizado para los ensayos y a la criopreservación de las células, los cuales pueden propiciar a la disminución de esta subpoblación. Dependiendo del método seleccionado para la identificación de las CTT, el porcentaje de la subpoblación troncal puede variar en cada línea celular. Por ejemplo, al utilizar los marcadores de superficie CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/low</sup> (el subconjunto comúnmente reportado como CTT de mama) se ha informado que alrededor del 80% de las células MDA-MB-231 se catalogan como CTT (Croker et al., 2009; Liu et al., 2015). Mientras que en la línea MCF7, menos del 0.5% de las células presentan este fenotipo (Bidan et al., 2019; Croker et al., 2009). Por otro lado, al utilizar la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) como marcador para CTT, las células MCF7 muestran una actividad muy baja (0.5%-1.7%) (Bidan et al., 2019; Vares et al., 2013), mientras que las células MDA-MB-231 tienen una actividad aumentada de ALDH (alrededor del 7%) (Croker et al., 2009; Liu et al., 2015). Esto nos sugiere que no hay marcadores universales para la identificación de CTT en el CaMa, y que las estrategias existentes para detectar CTT no son totalmente concordantes, ya que la superposición de las subpoblaciones es variable.

Al identificar los RD de membrana que se expresaban en las CTT, encontramos que en la sublínea celular MCF7/SORE6, las CTT expresaron mayores niveles de DRD1 en comparación con las células no troncales. En estudios previos se ha reportado que células MCF7 con inmunofenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> sobreexpresan DRD1 (Sobczuk et al., 2020; S. Wang et al., 2015). De igual manera, las células MCF7 resistentes a la adriamicina o doxorubicina (MCF7/Adr) y las CTTM crecidas como agrupaciones esféricas de células no adherentes identificadas como células resistentes a los fármacos, sobreexpresaban DRD1 (S. Wang et al., 2015). Además, nuestros datos correlacionan con lo reportado en las bases de datos, en donde la alta expresión de *DRD1* se asocia con una menor sobrevida para los pacientes con CaMa. Por lo contrario, las CTT presentaban menores niveles de DRD4 en comparación con las no troncales. Hasta el momento, no hay reportes que indiquen la expresión de DRD4 en la fracción troncal en esta línea celular. Sin embargo, nuestros resultados se correlacionan con lo encontrado en las bases de datos, donde los pacientes con baja expresión de *DRD4* se asocian con una menor sobrevida y mayor probabilidad de desarrollo de metástasis, especialmente los del subtipo RE+. Por otra parte, se ha reportado que del 5-15% de las células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> en la línea MCF7/Adr expresan de DRD2 (S. Wang et al., 2015), datos que no son concordantes con nuestros resultados.

Pese a que no se observó una expresión diferencial a nivel de proteína de los RD entre las CTT y las no troncales en la línea MDA-MB-231 del subtipo TN, existe evidencia que demuestra que el receptor D1 aumenta después de la formación de mamoesferas de células MDA-MB-231 (Yong et al., 2021), sugiriendo que puede tener un papel en la troncalidad. Por otra parte, estudios previos sugieren que la activación de DRD2 es esencial para mantener la reserva de CTT, especialmente en células TN, ya que el silenciamiento de DRD2 o la exposición a diferentes antagonistas de D2 inhiben la formación de mamoesferas al alterar la activación de la vía STAT3 / IL-6 (Tegowski et al., 2018). Sin embargo, no encontramos una expresión diferencial significativa de DRD2 en las CTT frente al resto de la población.

Con respecto a la detección de los receptores de dopamina intracelulares en las CTT, en primera instancia, no fue posible identificar a la población SORE6-GFP+, ya que la señal de la proteína GFP disminuía al grado de ser indetectable. Una de las soluciones del kit utilizada para la tinción intracelular contiene formaldehído, compuesto que tiene un pH ácido (BD, 2017). Posiblemente la disminución de la señal de GFP sea ocasionada por dicha

solución, pues existe evidencia que demuestra que la GFP es sensible al pH, ya que la fluorescencia disminuye en condiciones ácidas (Roberts et al., 2016).

Por otra parte, se ha reportado que el tratamiento con fármacos agonistas o antagonistas de los RD tiene diversos efectos en las células de CaMa. En este trabajo, se emplearon 4 fármacos dopaminérgicos para los ensayos: SKF-38393, agonista de familia D1; SCH-23390, antagonista de familia D1; Quinpirol, agonista de familia D2; y haloperidol, antagonista de familia D2. Estos fármacos se seleccionaron de acuerdo con la especificidad para cada familia de RD. No obstante, a pesar de no ser específicos para cada receptor dentro de la misma familia, nos ayudaron a evaluar la participación de las familias D1 o D2 en funciones de las células cancerosas. Sabiendo la relevancia de cada familia, se podrían utilizar fármacos más selectivos para cada RD en ensayos posteriores.

Nuestros resultados demostraron que a concentraciones mayores a 50  $\mu\text{M}$  se tuvo un efecto significativo en la viabilidad de células RE+ o TN. Se sabe que estos fármacos se unen específicamente a los RD a bajas concentraciones, como se muestra en la tabla 5 en el rango de valores de  $K_i$ . Los fármacos utilizados tienen una especificidad moderada o baja, lo que sugiere que la disminución en la viabilidad se relaciona con las altas concentraciones (50  $\mu\text{M}$ ), y su actividad en otros RD, otros GPCRs u otros blancos celulares. Por ejemplo, haloperidol, antagonista de la familia D2, se une también a los receptores de serotonina 5-HT7 (IUPHAR/BPS, 2020). Mientras que, a bajas concentraciones, el fármaco se une con especificidad al RD y no afecta la viabilidad de las células de CaMa.

En previos estudios se ha visto que el uso de agonistas de DRD1 a bajas dosis nM (dopamina, fenoldopam, SKF38393, A68930, A77636) disminuyen la viabilidad celular, inhiben la invasión y motilidad e induce apoptosis y autofagia en células TN (Borcherding et al., 2016; Minami et al., 2017) sin tener efecto en células luminales MCF7 (Borcherding et al., 2016) ni en células epiteliales normales (Minami et al., 2017). Sin embargo, en nuestros resultados no se observó el mismo efecto en la viabilidad celular. Por otro lado, el tratamiento con antagonistas de la familia D1 promueve la progresión del cáncer y revierte el efecto ocasionado por los agonistas de la familia D1 tanto *in vitro* (J. D. Yang et al., 2019) como *in vivo* (S. Wang et al., 2015). No obstante, el tratamiento con antagonistas de D1 a concentraciones menores a 50  $\mu\text{M}$ , no afectó la viabilidad celular.

En algunos estudios se ha demostrado que el uso de los agonistas de la familia D2, carece de efecto en la viabilidad de células de CMTN (Borcherding et al., 2016), mismo resultado

observado en nuestros datos. Mientras que en las células RE+, se ha visto que los agonistas de la familia D2 ejercen una acción citotóxica y mejora la radiosensibilidad (H. Lee et al., 2019); sin embargo, nuestros resultados son discrepantes con esta información. Por otra parte, se ha reportado que los antagonistas de la familia D2 inhiben el crecimiento de células de CaMa (J. K. Lee et al., 2016). Mientras que otro estudio reciente demostró que diversos antagonistas no afectan el crecimiento de células MCF7 (Maeshima et al., 2021), lo cual concuerda con nuestros resultados.

Debido a que no se observó un efecto tóxico notable en los cultivos bidimensionales tras el tratamiento con los fármacos dopaminérgicos, una posible explicación es que el tratamiento esté afectando a una pequeña población, sugiriendo que pueda estar dirigida a las CTT. Al tratar las células TN y RE+, ninguno de los fármacos dopaminérgicos tuvo efecto en la fracción troncal, lo cual se puede correlacionar con la baja expresión de los RD de membrana. Estudios previos informaron que la activación de DRD1 con agonistas disminuye la frecuencia de CTT en las células MCF/Adr (S. Wang et al., 2015) y MDA-MB-231 (Liang Yang et al., 2019), mientras que la inhibición de DRD1 con el antagonista SCH-23390 aumenta dicha fracción (S. Wang et al., 2015). Nuestros resultados difieren de estos informes, ya que aún en concentraciones bajas (micromolar) el agonista de DRD1 no modificó la fracción SORE6-GFP+. Estas diferencias posiblemente sean causadas por la estrategia utilizada para la identificación de CTT, ya que la subpoblación troncal cambia dependiendo de la herramienta empleada. Asimismo, el tratamiento con quinpirol (agonista de familia D2), aumenta la eficiencia de formación de mamoesferas en células TN (Tegowski et al., 2018). En contraste, la exposición a diferentes antagonistas de la familia D2 inhibe la formación de mamoesferas (Tegowski et al., 2018). Con los resultados obtenidos, se comprueba que el tratamiento con fármacos dopaminérgicos no modifica el porcentaje de CTT y tampoco se correlaciona con lo reportado previamente. Sin embargo, se requieren ensayos funcionales para descartar que la activación o inhibición de los RD tienen un efecto en la subpoblación troncal.



## 8. Conclusiones

- Los receptores *DRD1* y *DRD2* se subexpresan en tejido tumoral en comparación con el tejido normal. Mientras que *DRD4* se sobreexpresa en tejido tumoral en comparación con el tejido normal.
- La sobreexpresión de *DRD1* o la baja expresión de *DRD4* se asoció con un peor pronóstico para los pacientes con cáncer de mama, independientemente del subtipo de la enfermedad.
- La sublínea celular MCF7/SORE6 no presenta ninguno de los RD en la membrana celular. Por el contrario, la sublínea celular MDA-MB-231/SORE6 únicamente presenta DRD4 en la membrana.
- DRD1 y DRD4 están presentes intracelularmente tanto en la sublínea MCF7/SORE6 como en la sublínea MDA-MB-231/SORE6.
- En la línea celular MDA-MB-231 (subtipo TN), el porcentaje de la población troncal es mayor en comparación con la línea celular MCF7 (subtipo RE+).
- Las células troncales de la línea celular MCF7, expresan mayormente el DRD1 y subexpresan DRD4 en comparación con las células no troncales.
- No se detectaron cambios en la expresión de ninguno de los RD entre la fracción troncal y la no troncal de la línea celular MDA-MB-231.
- Al tratar las células MCF7 con un agonista o antagonista de los receptores tipo D1, no disminuyó la viabilidad celular a ninguna de concentraciones evaluadas.
- En la línea celular MDA-MB-231, el tratamiento tanto con el agonista como con el antagonista de los RD de la familia D1 disminuye la viabilidad celular, observándose un mayor efecto con el uso del antagonista de esta familia ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ).
- El uso del agonista o antagonista de los receptores tipo D2, afecta la viabilidad de las células MDA-MB-231 y MCF7 a concentraciones  $\geq 100 \mu\text{M}$ .
- El tratamiento con los agonistas o antagonistas de los RD no modificaron la fracción troncal tanto en la línea celular MDA-MB-231 como MCF7.

## 9. Referencias

- Ahmad, A. (2019). Breast Cancer Statistics: Recent Trends. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1152, pp. 1–7). Springer New York LLC.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_1)
- American Cancer Society. (2019). *What is breast cancer?*  
<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
- Ayano, G. (2016). Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment*, 2(2), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2471-271x.1000120>
- Bateup, H. S., Svenningsson, P., Kuroiwa, M., Gong, S., Nishi, A., Heintz, N., & Greengard, P. (2008). Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nature Neuroscience*, 11(8), 932–939.  
<https://doi.org/10.1038/nn.2153>
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. In *Nature Medicine* (Vol. 23, Issue 10, pp. 1124–1134). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- BD. (2017). *Kit Manual BD Cytotfix/Cytoperm Plus. 554714.*
- Beaulieu, J. M., Borrelli, Emiliana Carlsson, Arvid Caron, Marc G. Civelli, Olivier Espinoza, S., Fisone, Gilberto Gainetdinov, R. R., Grandy, David K. Kebebian, J. W., Langer, Saloman Z. Missale, M. C., Neve, Kim A. Scatton, B., Schwartz, Jean-Charles Sedvall, G., Seeman, Philip Sibley, D. R., Sokoloff, Pierre Spano, P. F., & Van Tol, H. H. M. (2019). Dopamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE, 2019(4)*.  
<https://doi.org/10.2218/gtopdb/F20/2019.4>
- Beaulieu, J. M., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR review 13. *British Journal of Pharmacology*, 172(1), 1–23.  
<https://doi.org/10.1111/bph.12906>
- Beaulieu, J. M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217.  
<https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Ben-Jonathan, N. (2020). *Dopamine : Endocrine and Oncogenic Functions*. CRC Press.

<https://doi.org/10.1201/9780429402272>

- Bhatia, A., & Saadabadi, A. (2019). Biochemistry, Dopamine Receptors. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855830>
- Bidan, N., Bailleul-Dubois, J., Duval, J., Winter, M., Denoulet, M., Hannebicque, K., El-Sayed, I. Y., Ginestier, C., Forissier, V., Charafe-Jauffret, E., Macario, M., Matsunaga, Y. T., Meignan, S., Anquez, F., Julien, S., Bonnefond, A., Derhourhi, M., Le Bourhis, X., & Lagadec, C. (2019). Transcriptomic Analysis of Breast Cancer Stem Cells and Development of a pALDH1A1:mNeptune Reporter System for Live Tracking. *PROTEOMICS*, *19*(21–22), 1800454. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800454>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* *1997* *3*:7, *3*(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/NM0797-730>
- Borcherding, D. C., Tong, W., Hugo, E. R., Barnard, D. F., Fox, S., Lasance, K., Shaughnessy, E., & Ben-Jonathan, N. (2016). Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer. *Oncogene*, *35*(24), 3103–3113. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.369>
- Caragher, S. P., Shireman, J. M., Huang, M., Miska, J., Atashi, F., Baisiwala, S., Park, C. H., Saathoff, M. R., Warnke, L., Xiao, T., Lesniak, M. S., David James, C., Meltzer, H., Tryba, A. K., & Ahmed, A. U. (2019). Activation of dopamine receptor 2 prompts transcriptomic and metabolic plasticity in glioblastoma. *Journal of Neuroscience*, *39*(11), 1982–1993. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1589-18.2018>
- Cárdenas Sánchez, J., Bargalló Rocha, E., Erazo Valle, A., Poitevin Chacón, A., Valero Castillo, V., & Pérez Sánchez, V. (2015). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. In *Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 14).
- Cárdenas Sánchez, J., Bargalló Rocha, J. E., Bautista Piña, V., Cervantes Sánchez, G., Erazo Valle-Solís, A. A., Flores Balcázar, C. H., Maffuz Aziz, A., Pérez Sánchez, V. M., Poitevin Chacón, A., Salas González, E., Torrecillas Torres, L., & Valero Castillo, V. (2017). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cancer mamario. Séptima revisión - Colima 2017. In *Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 16, Issue 1). <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M18000133>

- Cárdenas Sánchez, J., Erazo Valle-Solís, A. A., Arce-Salinas, C., Bargalló-Rocha, J. E., Bautista-Piña, V., Cervantes-Sánchez, G., Flores-Balcázar, C. H., Lluch-Hernández, A., Maffuz-Aziz, A., Pérez-Sánchez, V. M., Poitevin-Chacón, A., Salas-González, E., Torrecillas-Torres, L., & Valero-Castillo, V. (2019). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Octava revisión. Colima 2019. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 18(3), 141–231. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M19000180>
- Carlo, R. Di Muccioli, G., Bellusi, G., Portaleone, P., Ghi, P., Racca, S., & Carlo, F. Di. (1986). Steroid, Prolactin, and Dopamine Receptors in Normal and Pathologic Breast Tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 464(1), 559–562. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb16068.x>
- Crocker, A. K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B. D., Hess, D. A., & Allan, A. L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8b), 2236. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2008.00455.X>
- D'Souza, U. M. (2010). Gene and Promoter Structures of the Dopamine Receptors. In *The Dopamine Receptors* (pp. 23–46). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6_2)
- Dai, X., & Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American Journal of Cancer Research*, 5(10), 2929–2943.
- Dark, G. (2020). Oncology. In *Davidson's Principles and Practice of Medicine* (23rd ed., pp. 1313–1336). <https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/book/3-s2.0-B9780702070280000330>
- Dolma, S., Selvadurai, H. J., Lan, X., Lee, L., Kushida, M., Voisin, V., Whetstone, H., So, M., Aviv, T., Park, N., Zhu, X., Xu, C. J., Head, R., Rowland, K. J., Bernstein, M., Clarke, I. D., Bader, G., Harrington, L., Brumell, J. H., ... Dirks, P. B. (2016). Inhibition of Dopamine Receptor D4 Impedes Autophagic Flux, Proliferation, and Survival of Glioblastoma Stem Cells. *Cancer Cell*, 29(6), 859–873. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.002>
- Feduchi-Canosa, E., Omero-Magdalena, C., Yáñez-Conde, E., Blasco-Castiñeyra, I., &

- García-Hoz-Jiménez, C. (2015). *Bioquímica: conceptos esenciales* (2a ed.).
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today>
- Gholipour, N., Ohradanova-Repic, A., & Ahangari, G. (2018). A novel report of MiR-4301 induces cell apoptosis by negatively regulating DRD2 expression in human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(8), 6408–6417. <https://doi.org/10.1002/JCB.26577>
- Gil-Ad, I., Shtauf, B., Levkovitz, Y., Dayag, M., Zeldich, E., & Weizman, A. (2004). Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines. *Journal of Molecular Neuroscience*, 22(3), 189–198. <https://doi.org/10.1385/JMN:22:3:189>
- Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repečka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., Zhu, J., & Haussler, D. (2020). Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. In *Nature Biotechnology* (Vol. 38, Issue 6, pp. 675–678). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Huang, T., Song, X., Xu, D., Tiek, D., Goenka, A., Wu, B., Sastry, N., Hu, B., & Cheng, S.-Y. (2020). Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics*, 10(19), 8721. <https://doi.org/10.7150/THNO.41648>
- IUPHAR/BPS. (2020). *Guide to Pharmacology*. <https://www.guidetopharmacology.org/>
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 39, Issue 1, pp. 31–59). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>

- Lee, H., Kang, S., Sonn, J. K., & Lim, Y. (2019). Dopamine receptor D<sub>2</sub> activation suppresses the radiosensitizing effect of aripiprazole via activation of AMPK. *FEBS Open Bio*, 9(9), 1580–1588. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12699>
- Lee, J. K., Nam, D. H., & Lee, J. (2016). Repurposing antipsychotics as glioblastoma therapeutics: Potentials and challenges (Review). In *Oncology Letters* (Vol. 11, Issue 2, pp. 1281–1286). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4074>
- Liu, Y., Chen, C., Qian, P., Lu, X., Sun, B., Zhang, X., Wang, L., Gao, X., Li, H., Chen, Z., Tang, J., Zhang, W., Dong, J., Bai, R., Lobie, P. E., Wu, Q., Liu, S., Zhang, H., Zhao, F., ... Zhao, Y. (2015). Gd-metallofullerenol nanomaterial as non-toxic breast cancer stem cell-specific inhibitor. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS6988>
- Lu, M., Li, J., Luo, Z., Zhang, S., Xue, S., Wang, K., Shi, Y., Zhang, C., Chen, H., & Li, Z. (2015). Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 8, 1543–1551. <https://doi.org/10.2147/OTT.S77373>
- Luo, M., Clouthier, S. G., Deol, Y., Liu, S., Nagrath, S., Azizi, E., & Wicha, M. S. (2015). Breast cancer stem cells: Current advances and clinical implications. *Methods in Molecular Biology*, 1293, 1–49. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2519-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2519-3_1)
- Maeshima, T., Iijima, R., Watanabe, M., Yui, S., & Itagaki, F. (2021). Effect of antipsychotics on breast tumors by analysis of the Japanese Adverse Drug Event Report database and cell-based experiments. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40780-021-00199-7/FIGURES/2>
- Martel, J. C., & Gatti McArthur, S. (2020). Dopamine Receptor Subtypes, Physiology and Pharmacology: New Ligands and Concepts in Schizophrenia. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11, p. 1003). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01003>
- Martinez, V. J., Asico, L. D., Jose, P. A., & Tiu, A. C. (2020). Lipid rafts and dopamine receptor signaling. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 23, pp. 1–18). <https://doi.org/10.3390/ijms21238909>
- McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P., & Freedman, G. M. (2016). Clinical diagnosis and management of breast cancer. *Journal of Nuclear Medicine*,

57(Supplement 1), 9S-16S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>

- Minami, K., Liu, S., Liu, Y., Chen, A., Wan, Q., Na, S., Li, B. Y., Matsuura, N., Koizumi, M., Yin, Y., Gan, L., Xu, A., Li, J., Nakshatri, H., & Yokota, H. (2017). Inhibitory Effects of Dopamine Receptor D 1 Agonist on Mammary Tumor and Bone Metastasis. *Scientific Reports*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep45686>
- Mishra, A., Singh, S., & Shukla, S. (2018). Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *Journal of Experimental Neuroscience*, 12.
- Neve, K. A. (Ed.). (2010). *The Dopamine Receptors*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6>
- Nordenberg, J., Fenig, E., Landau, M., Weizman, R., & Weizman, A. (1999). Effects of psychotropic drugs on cell proliferation and differentiation. *Biochemical Pharmacology*, 58(8), 1229–1236. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00156-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00156-2)
- Peters, M. A. M., Meijer, C., Fehrmann, R. S. N., Walenkamp, A. M. E., Kema, I. P., de Vries, E. G. E., Hollema, H., & Oosting, S. F. (2020). Serotonin and Dopamine Receptor Expression in Solid Tumours Including Rare Cancers. *Pathology and Oncology Research*, 26(3), 1539–1547. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00734-w>
- Pivonello, R., Ferone, D., Lombardi, G., Colao, A., Lamberts, S. W. J., & Hofland, L. J. (2007). Novel insights in dopamine receptor physiology. *European Journal of Endocrinology, Supplement*, 156(1). <https://doi.org/10.1530/eje.1.02353>
- Prabhu, V. V., Madhukar, N. S., Gilvary, C., Leah Kline, C. B., Oster, S., El-Deiry, W. S., Elemento, O., Doherty, F., VanEngelenburg, A., Durrant, J., Tarapore, R. S., Deacon, S., Charter, N., Jung, J., Park, D. M., Gilbert, M. R., Ruser, J., Wechsler-Reya, R., Arrillaga-Romany, I., ... Allen, J. E. (2019). Dopamine receptor D5 is a modulator of tumor response to dopamine receptor D2 antagonism. *Clinical Cancer Research*, 25(7), 2305–2313. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2572>
- Rangel-Barajas, C., Coronel, I., & Florán, B. (2015). Dopamine receptors and neurodegeneration. In *Aging and Disease* (Vol. 6, Issue 5, pp. 349–368). International Society on Aging and Disease. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.0330>
- Ranjbar-Slamloo, Y., & Fazlali, Z. (2020). Dopamine and Noradrenaline in the Brain;

- Overlapping or Dissociate Functions? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(21).  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00334>
- Roberts, T. M., Rudolf, F., Meyer, A., Pellaux, R., Whitehead, E., Panke, S., & Held, M. (2016). Identification and Characterisation of a pH-stable GFP. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep28166>
- Romanelli, R. J., Williams, J. T., & Neve, K. A. (2010). Dopamine Receptor Signaling: Intracellular Pathways to Behavior. In *The Dopamine Receptors* (pp. 137–173). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6_6)
- Roney, M. S. I., & Park, S. K. (2018). Antipsychotic dopamine receptor antagonists, cancer, and cancer stem cells. In *Archives of Pharmacal Research* (Vol. 41, Issue 4, pp. 384–408). Pharmaceutical Society of Korea. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1017-3>
- Sachlos, E., Risueño, R. M., Laronde, S., Shapovalova, Z., Lee, J. H., Russell, J., Malig, M., McNicol, J. D., Fiebig-Comyn, A., Graham, M., Levadoux-Martin, M., Lee, J. B., Giacomelli, A. O., Hassell, J. A., Fischer-Russell, D., Trus, M. R., Foley, R., Leber, B., Xenocostas, A., ... Bhatia, M. (2012). Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell*, 149(6), 1284–1297. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.049>
- Salinas-Jazmín, N., Rosas-Cruz, A., & Velasco-Velazquez, M. (2021). Reporter gene systems for the identification and characterization of cancer stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 13(7), 861. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V13.I7.861>
- Santos, J., Arantes, J., Carneiro, E., Ferreira, D., Silva, S. M., de Sousa, S. P., & Arantes, M. (2020). Brain metastases from breast cancer. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 106150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106150>
- Seeman, P. (2010). Historical Overview: Introduction to the Dopamine Receptors. In *The Dopamine Receptors* (pp. 1–21). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-333-6_1)
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 611–629). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>



- Sobczuk, P., Łomiak, M., & Cudnoch-Jędrzejewska, A. (2020). Dopamine d1 receptor in cancer. *Cancers*, 12(11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers12113232>
- Tang, B., Raviv, A., Esposito, D., Flanders, K. C., Daniel, C., Nghiem, B. T., Garfield, S., Lim, L., Mannan, P., Robles, A. I., Smith, W. I., Zimmerberg, J., Ravin, R., & Wakefield, L. M. (2015). A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells. *Stem Cell Reports*, 4(1), 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.11.002>
- Tao, Z. Q., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>
- Taurin, S., & Alkhalifa, H. (2020). Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses. In *Neoplasia (United States)* (Vol. 22, Issue 12, pp. 663–678). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.09.009>
- Technologies, S. (2018). *Dyes and stains 7-AAD (7-Aminoactinomycin D)*. [www.stemcell.com/dyesandstains](http://www.stemcell.com/dyesandstains)
- Tegowski, M., Fan, C., & Baldwin, A. S. (2018). Thioridazine inhibits self-renewal in breast cancer cells via DRD2-dependent STAT3 inhibition, but induces a G1 arrest independent of DRD2. *Journal of Biological Chemistry*, 293(41), 15977–15990. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003719>
- Turco, R. (2017). Dopamine Receptor. In *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1–5). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6\\_1256-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1256-1)
- Vares, G., Cui, X., Wang, B., Nakajima, T., & Neno, M. (2013). Generation of Breast Cancer Stem Cells by Steroid Hormones in Irradiated Human Mammary Cell Lines. *PLOS ONE*, 8(10), e77124. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0077124>
- Velasco-Velázquez, M. A., Homs, N., De La Fuente, M., & Pestell, R. G. (2012). Breast cancer stem cells. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 44, Issue 4, pp. 573–577). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.020>
- Velasco-Velázquez, M. A., Velázquez-Quesada, I., Vásquez-Bochm, L. X., & Pérez-Tapia, S. M. (2019). Targeting Breast Cancer Stem Cells: A Methodological Perspective.

*Current Stem Cell Research & Therapy*, 14(5), 389–397.

<https://doi.org/10.2174/1574888x13666180821155701>

Vinay, K., Abbas, A., & Aster, J. (2020). Neoplasia. In *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* (10th ed., pp. 267–338). Elsevier, Inc. <https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/book/3-s2.0-B9780323531139000078?scrollTo=%23hl0002170>

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 321, Issue 3, pp. 288–300). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

Wang, S., Mou, Z., Ma, Y., Li, J., Li, J., Ji, X., Wu, K., Li, L., Lu, W., & Zhou, T. (2015). Dopamine enhances the response of sunitinib in the treatment of drug-resistant breast cancer: Involvement of eradicating cancer stem-like cells. *Biochemical Pharmacology*, 95(2), 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.03.013>

Wang, X., Wang, Z. Bin, Luo, C., Mao, X. Y., Li, X., Yin, J. Y., Zhang, W., Zhou, H. H., & Liu, Z. Q. (2019). The prospective value of dopamine receptors on bio-behavior of tumor. *Journal of Cancer*, 10(7), 1622–1632. <https://doi.org/10.7150/jca.27780>

Weissenrieder, J. S., Neighbors, J. D., Mailman, R. B., & Hohl, R. J. (2019). Cancer and the dopamine D2 receptor: A pharmacological perspective. In *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Vol. 370, Issue 1, pp. 111–126). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.256818>

World Health Organization. (2021). *Cancer*. [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)

World Health Organization. (2022, February 3). *Cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Wu, Y., Zhang, J., Zhang, X., Zhou, H., Liu, G., & Li, Q. (2020). Cancer Stem Cells: A Potential Breakthrough in HCC-Targeted Therapy. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11, p. 198). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00198>

Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., & Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. In

- Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 589–604). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y>
- Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., & Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5(1), 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-01110-5>
- Yang, Liang, Yao, Y., Yong, L., Feng, Y., Su, H., Yao, Q., Xue, J., Lu, W., & Zhou, T. (2019). Dopamine D1 receptor agonists inhibit lung metastasis of breast cancer reducing cancer stemness. *European Journal of Pharmacology*, 859, 172499. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172499>
- Yang, P., Perlmutter, J. S., Benzinger, T. L. S., Morris, J. C., & Xu, J. (2020). Dopamine D3 receptor: A neglected participant in Parkinson Disease pathogenesis and treatment? In *Ageing Research Reviews* (Vol. 57, p. 100994). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100994>
- Yong, L., Yao, Y., Chen, G., Yan, X., Guo, Y., Han, M., Xue, J., Jian, W., & Zhou, T. (2021). QAP14 suppresses breast cancer stemness and metastasis via activation of dopamine D1 receptor. *Acta Pharmacologica Sinica* 2021, 1–12. <https://doi.org/10.1038/S41401-021-00701-9>
- Yustos, M. A., Angulo, M. M., & Soto, M. Á. (2017). Cáncer de mama. *Revista de La Educación Superior*, 12(34), 2011–2023.
- Zhang, C., Gong, P., Liu, P., Zhou, N., Zhou, Y., & Wang, Y. I. (2017). Thioridazine elicits potent antitumor effects in colorectal cancer stem cells. *Oncology Reports*, 37(2), 1168–1174. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5313>
- Zhang, X., Powell, K., & Li, L. (2020). Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond. *Cancers*, 12(12), 1–28. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12123765>
- Zhao, W., Prijic, S., Urban, B. C., Tisza, M. J., Zuo, Y., Li, L., Tan, Z., Chen, X., Mani, S. A., & Chang, J. T. (2016). Candidate antimetastasis drugs suppress the metastatic capacity of breast cancer cells by reducing membrane fluidity. *Cancer Research*, 76(7), 2037–2049. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1970>

- Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y., & Baba, Y. (2004). Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 53(3), 267–275. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0738-1>
- Zhou, J., Chen, Q., Zou, Y., Chen, H., Qi, L., & Chen, Y. (2019). Stem cells and cellular origins of breast cancer: Updates in the rationale, controversies, and therapeutic implications. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Issue AUG, p. 820). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00820>

## 10. ANEXOS


Artículo de revisión


Rosas-Cruz, A., Salinas-Jazmín, N., & Velázquez, M. A. V.-. (2021). Dopamine Receptors in Cancer: Are They Valid Therapeutic Targets? *Technology in Cancer Research & Treatment*, 20, 1-13.

Artículo de revisión

Salinas-Jazmín, N., Rosas-Cruz, A., & Velasco-Velázquez, M. (2021). Reporter gene systems for the identification and characterization of cancer stem cells. *World journal of stem cells*, 13(7), 861–876.

# Dopamine Receptors in Cancer: Are They Valid Therapeutic Targets?

Arely Rosas-Cruz, BSc<sup>1,2</sup>, Nohemí Salinas-Jazmín, PhD<sup>1</sup>, and Marco A. Velasco-Velázquez, PhD<sup>1,3</sup> 

Technology in Cancer Research & Treatment  
Volume 20: 1-13  
© The Author(s) 2021  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/15330338211027913  
journals.sagepub.com/home/tct  


## Abstract

The dopamine receptors (DRs) family includes 5 members with differences in signal transduction and ligand affinity. Abnormal DRs expression has been correlated multiple tumors with their clinical outcome. Thus, it has been proposed that DRs-targeting drugs—developed for other diseases as schizophrenia or Parkinson's disease—could be helpful in managing neoplastic diseases. In this review, we discuss the role of DRs and the effects of DRs-targeting in tumor progression and cancer cell biology using multiple high-prevalence neoplasms as examples. The evidence shows that DRs are valid therapeutic targets for certain receptor/disease combinations, but the data are inconclusive or contradictory for others. In either case, further studies are required to define the precise role of DRs in tumor progression and propose better therapeutic strategies for their targeting.

## Keywords

dopamine, dopamine receptor, DRD1, DRD2, thioridazine, glioblastoma, breast cancer, NSCLC

Received: October 30, 2020; Revised: April 27, 2021; Accepted: May 18, 2021.

## Introduction

The family of dopamine receptors (DRs) includes 5 G protein-coupled receptors—DRD1, DRD2, DRD3, DRD4, and DRD5—with different anatomical distribution, expression levels, and functional properties.<sup>1</sup> For example, DRD1 and DRD2 located in the brain play a role in memory and learning, but peripheral DRD1, DRD2, and DRD4 regulate renal function, blood pressure, and intestinal motility.<sup>2,3</sup> Alterations in DR-signaling have been identified in schizophrenia, Parkinson's disease, Tourette's syndrome, and attention deficit hyperactivity disorder.<sup>3,4</sup> Thus, multiple drugs that target the dopaminergic system have been developed.<sup>1,2,5</sup>

The DRs are classified into 2 subfamilies based on the G proteins that mediate their signal transduction.<sup>1,6</sup> The D1-like subfamily includes DRD1 and DRD5, which are coupled to  $G_{\alpha_s}$  or  $G_{\alpha_{olf}}$  proteins, controlling the activation of the enzyme adenylyl cyclase (AC). The D2-like subfamily comprises DRD2, DRD3, and DRD4, coupled to  $G_{\alpha_{i/o}}$ , govern AC inhibition. Because of their opposite signaling, each subfamily seems to play contrary roles in cellular functions. For example, in neurons, DRD1 stimulation triggers PKA activation, leading to the phosphorylation of cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32).<sup>7,8</sup> DARPP-32 phosphorylation is coupled to the de-inhibition of the phosphatase PPI, which

dephosphorylate histones, regulating gene expression and the activity of multiple effector proteins such as transcription factors, ionotropic receptors, and ionic channels.<sup>8</sup> On the contrary, activation of D2-like receptors negatively regulates PKA and DARPP-32.<sup>6,9</sup>

The interplay between DRs is further complicated by the differences in ligand affinity within the members of the subfamilies. DRD1 binds dopamine with 10-times lower affinity than DRD5 ( $K_i$ : 1  $\mu$ M vs. 100 nM).<sup>10</sup> DRD3 and DRD4 display a similar affinity for dopamine ( $K_i$ : 10 nM) which is higher than that of DRD2 ( $K_i$ : 100 nM).<sup>10</sup> Furthermore, each DR has different pharmacological properties.<sup>1,10</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, México

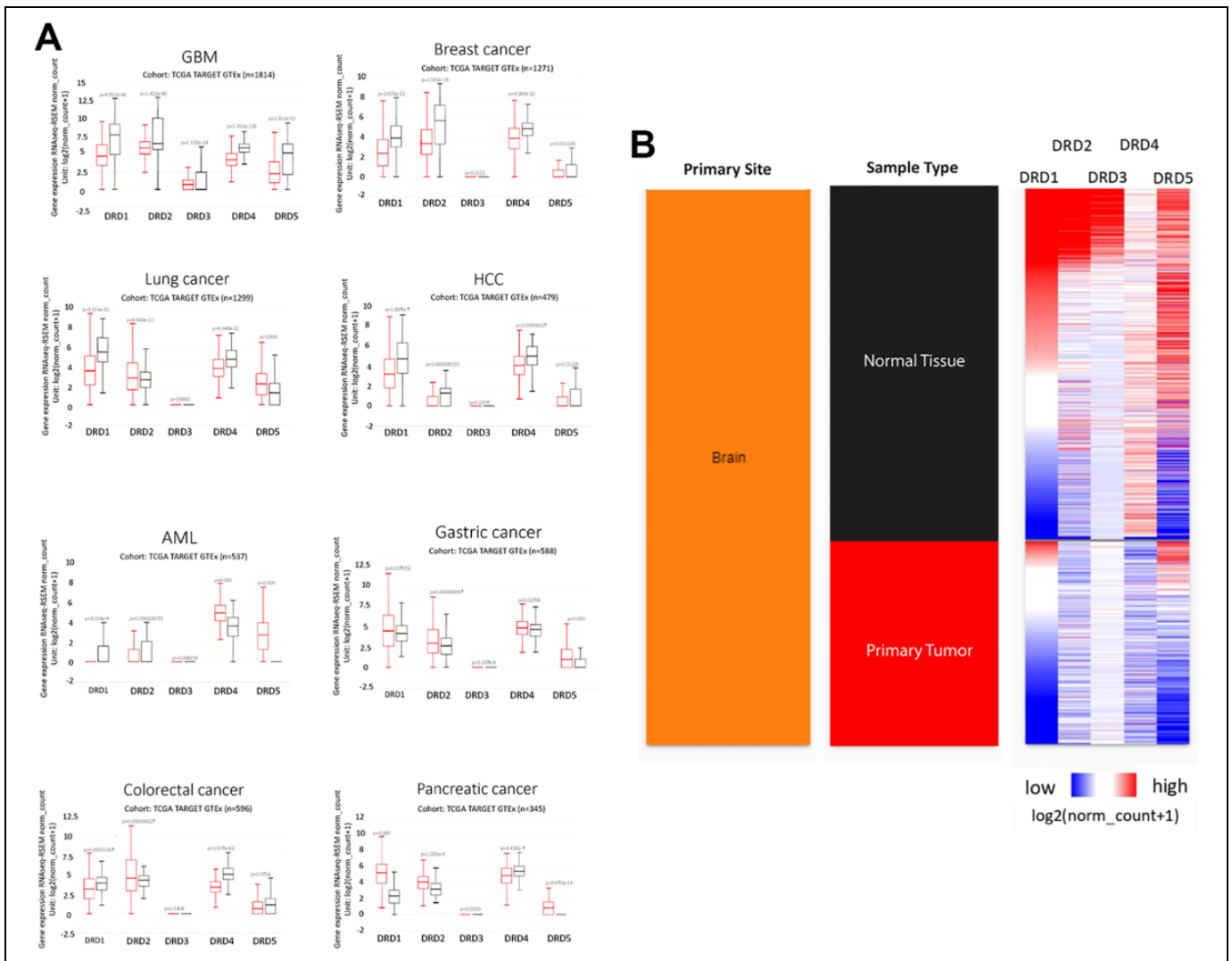
<sup>3</sup> Unidad Periférica de Investigación en Biomedicina Traslacional, Centro Médico Nacional 20 de noviembre ISSSTE / Facultad de Medicina, UNAM, México

## Corresponding Authors:

Marco A. Velasco-Velázquez, PhD, and Nohemí Salinas-Jazmín, PhD, Facultad de Medicina, UNAM, Circuito interno s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 CDMX, México.

Email: marcovelasco@unam.mx or nohemysj@unam.mx





**Figure 1.** Dopamine receptors (DRs) gene expression in tumors. A, mRNA expression of DRs in different tumors (red boxes) and their corresponding normal tissues (black boxes). Statistical analysis was performed using Welch's t-test. B, Comparison of the expression of DRs in brain tumors vs. normal tissue. Plots were generated using the UCSC Xena platform with data from the TCGA TARGET GTEx database.

The idea that DRs could be playing key roles in tumor progression was first supported by the finding that cancer patients that consumed antipsychotic drugs simultaneously to the antineoplastic treatment displayed better clinical responses.<sup>5,11</sup> Further studies showed that schizophrenic or Parkinson's disease patients who receive ziprasidone, asenapine, quetiapine, clozapine, or aripiprazole (agonists or non-selective antagonist of DRs),<sup>11</sup> or levodopa (a prodrug that yields a non-selective agonism of DRs)<sup>12</sup> have a lower risk of developing diverse types of cancer compared to the general population.<sup>13,14</sup> However, female schizophrenic patients treated with DRD2 antagonists of variable selectivity (haloperidol, risperidone, paliperidone, or amisulpride) have a higher risk of developing breast cancer.<sup>15,16</sup>

To date, multiple studies have shown that DRs are differentially expressed in several tumors and that each tumor type has a specific pattern of DRs expression. For example, DRD4 is

overexpressed only in Acute Myeloid Leukemia (AML), and DRD3 is expressed only in glioblastoma but at lower levels than in normal brain (Figure 1). Alterations in the expression of DRs have been reported not only in cancer cells but also in tumor-associated cells. Furthermore, forced changes in DRs expression alters diverse functions of cancer cells, indicating that modulation of the receptors' activity impacts tumor biology (Table 1). Thus, DRs have been pointed as potential therapeutic targets to improve clinical response in cancer patients.<sup>2,5,11,14</sup>

However, the possible application of drugs that target DRs in cancer therapy is still unclear. We found that most of the drugs studied have moderate or low specificity, suggesting that the reported biological effects may be (at least partially) caused by the activity of the drugs on other DRs, other GPCRs, or other cellular targets (see Table 2). For example, pimozide, a DRD2 antagonist employed as second-line therapy for

**Table 1.** Reported Effects of Dopamine Receptor-Targeting in Cancer.

Target	Stimulus	Tumor type (reference)	Biological response elicited
All DRs	Receptor activation with dopamine	Multiple tumor types (lymphoblastoma, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, and breast adenocarcinoma) <sup>17</sup> Colorectal cancer <sup>18</sup> Gastric cancer <sup>19</sup>	Decreased cell viability Increased cell viability Reduced invasive capacity Decreased migration ability Inhibition of cell proliferation
DRD2	Receptor silencing or knock-out	Gastric cancer <sup>20</sup> Breast cancer <sup>21</sup>	Reduction in tumorsphere formation in some triple-negative cells without changes in cellular proliferation No effect on cell viability
DRD2	Receptor blockage by thioridazine	Colorectal cancer <sup>18</sup> Pancreatic cancer <sup>22</sup> Acute myeloid leukemia <sup>23</sup>  Acute myeloid leukemia <sup>24</sup> Lung <sup>25</sup>  Gastric cancer <sup>26</sup> Glioblastoma <sup>27</sup>	Cancer cell growth inhibition <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Decreased clonogenicity in leukemic stem cells Differentiation of leukemic stem cells No effects on normal HSCs Decreased leukemic burden in patients following 5-day treatment (effect associated with DRD2 expression at baseline) Decreased cell viability Decreased clonogenicity and self-renewal Chemotherapy sensitization Induction of proliferation (reduction of quiescent status) Impaired tumorigenicity in xenografts Decreased cell viability Decreased cell viability Decreased clonogenicity Reduced DRD2 expression Autophagy and apoptosis induction <i>in vitro</i> Impaired tumorigenicity in xenografts Autophagy induction <i>in vivo</i>
	Receptor blockage by haloperidol	Multiple tumor types (lymphoblastoma, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, and breast adenocarcinoma) <sup>17</sup> Glioblastoma <sup>28</sup>	Decreased cell viability Decreased cell viability Decreased clonogenic capacity Sensitization to EGFR inhibition <i>in vitro</i> Inhibition of tumor growth in <i>xenografts</i> and increased survival
	Receptor blockage by pimozide	Glioblastoma <sup>27</sup> Multiple tumor types (lymphoblastoma, neuroblastoma, non-small cell lung cancer, and breast adenocarcinoma) <sup>17</sup> Pancreatic cancer <sup>22</sup>	No change in cell viability Decreased cell viability Decreased clonogenicity Cell-cycle arrest <i>in vitro</i> Apoptosis induction
	Receptor blockage by ONC201	Glioblastoma <sup>29</sup>	Apoptosis induction <i>in vitro</i> Chemo- and radio-sensitization Inhibition of tumor growth <i>in vivo</i>
	Receptor inhibition by trifluoperazine	Colorectal cancer <sup>18</sup> Glioblastoma <sup>27</sup>	Decrease cell viability Decreased cell viability Decreased clonogenicity
DRD2	Receptor activation by quinpirole	Lung <sup>30</sup>	Reduced DRD2 expression Inhibition of cell proliferation Decreased clonogenicity Reduced invasive capacity Inhibition of tumor growth in <i>xenografts</i>
	Receptor activation by bromocriptine	Breast <sup>21</sup> Gastric <sup>20</sup> Glioblastoma <sup>28</sup> Acute myeloid leukemia <sup>31</sup>	Inhibited self-renewal capacity in CSCs Inhibition of cell proliferation Increased cell proliferation Decreased cell viability Decreased clonogenicity Differentiation (CD11b upregulation)

(continued)



Table I. (continued)

Target	Stimulus	Tumor type (reference)	Biological response elicited
DRD4	Receptor silencing	Glioblastoma <sup>32</sup>	Decreased cell proliferation Cytotoxicity (associated with accumulation of autophagic vacuoles)
DRD4	Receptor blockage by L-741742	Glioblastoma <sup>32</sup>	Decreased cell viability Decreased clonogenicity Sensitization to temozolomide in clonogenic assays Cell cycle arrest and apoptosis induction Inhibition of tumor growth in xenografts Increased survival of tumor-bearing mice (in combination with temozolomide)
	Receptor blockage by PNU 96145E	Glioblastoma <sup>28</sup> Glioblastoma <sup>32</sup>	Decreased clonogenicity Decreased cell viability Decreased clonogenicity Sensitization to temozolomide in clonogenic assays Cell cycle arrest and apoptosis induction Inhibition of tumor growth in <i>xenografts</i> Increased survival of tumor-bearing mice (in combination with temozolomide)

Tourette's Disorder that has shown antineoplastic effects, can also bind to  $\sigma$  receptors, the serotonin receptor 5-HT7, or calmodulin.<sup>33</sup> Despite their reduced specificity, some of the drugs that target DRs have advantages that make them attractive candidates for developing new anti-cancer therapies, like FDA-approval or specific biodistribution patterns.

Herein we compile and discuss evidence of the role of DRs in cancer. We mainly focused on: i) the expression of the DRs in high-prevalence human tumors and its correlation with the clinical outcome; ii) the functions that DRs can modulate in cancer cells; iii) the differences in DRs expression/function between specific subtypes of a particular tumor; and iv) the role of DRs in the subpopulation of cancer stem cells (CSCs).

### DRs in Glioblastoma (GBM)

Gliomas represent 80% of the malignant tumors from the brain. GBM, the most frequent and aggressive form of glioma, has a 1-year survival rate of 37.4% and a median survival time of 18 months.<sup>60</sup> Analysis performed using gene-expression data from *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) showed that increased expression of DRs and enzymes participating in dopamine synthesis correlate with GMB patients survival.<sup>34</sup>

The 2 members of the D2 family, *DRD2* and *DRD4*, are upregulated in GBM tumors compared to adjacent normal tissue.<sup>32,61</sup> High expression of *DRD2* or *DRD4* is an independent predictor of reduced survival in GBM patients.<sup>32,61</sup> Increased *DRD2* expression is found more frequently in primary GBM than in secondary GBM—which presents a significantly better prognosis.<sup>61,62</sup>

Mechanistic studies have shown that: i) *DRD2* expressed by GBM cells is activated through autocrine signaling by dopamine, and ii) *DRD2* activation triggers mitogenic signals and induces phenotypic changes that favor tumor

progression.<sup>2,18,28,34</sup> Accordingly, *DRD2* silencing inhibits proliferation of patient-derived GBM cells in culture and reduces the growth of xenografts in mice.<sup>28</sup>

The importance of D2-like receptors in GBM progression has been corroborated in studies employing the antipsychotic drug trifluoperazine, a *DRD2/DRD4* antagonist. *In vitro*, trifluoperazine reduces the proliferation and motility of GBM cells by a calmodulin-dependent mechanism.<sup>53</sup> Trifluoperazine is also effective in GBM xenografts, where it inhibits tumor growth and reduces the number of metastatic lesions.<sup>53</sup> Similarly, the small molecule *ONC201*, a competitive antagonist of *DRD2* and *DRD3*,<sup>29,63</sup> induces apoptosis of GBM cells, including those resistant to temozolomide, bevacizumab, or radiation.<sup>29</sup> In mouse models, *ONC201* crosses the blood-brain barrier, inhibiting GBM growth and increasing the median survival time when combined with radiotherapy.<sup>29,64</sup> To date, clinical trials using *ONC201* have shown signs of efficacy in biomarker-defined recurrent GBM patients,<sup>64,65</sup> as well as in pediatric and adult H3 K27M-mutant glioma.<sup>65-67</sup> Noteworthy, *ONC201* is also in Phase II clinical trials for AML,<sup>68,69</sup> breast cancer,<sup>69,70</sup> colorectal cancer,<sup>69,71</sup> lung cancer,<sup>71</sup> endometrial cancer,<sup>69-71</sup> and multiple myeloma.<sup>72</sup>

The key role of D2-like receptors in GBM progression led to the analysis of their participation in CSCs biology. *DRD2* is expressed in glioma stem cells incrementing the malignancy of tumors.<sup>2,62</sup> *DRD2* silencing,<sup>62</sup> but also *DRD4* silencing<sup>32</sup> or trifluoperazine treatment,<sup>53</sup> reduces the clonogenicity of GBM cells, an *in vitro* subrogate measurement of the CSC content. *ONC201* reduces the self-renewal of glioblastoma CSCs *in vitro*<sup>64</sup> and inhibits the proliferation of CSCs in 3D neurospheres culture established from freshly isolated human glioblastoma tumors.<sup>29</sup> Similarly, the *DRD4*-selective antagonists L-741742 and PNU-96415E decrease GBM stem cell viability and block their clonogenicity but do not affect normal neural

**Table 2.** Selectivity of Dopamine Receptor-Targeting Drugs Employed in Cancer Studies.

Drug	Main target	Action	pKi for DRs *	pKi for other targets *	Studied in
Dopamine	DRs	Non-selective agonist	D4: 7.6 (full) D3: 6.4-7.3 (full) D5: 6.6 (full) D2: 4.7-7.2 (full) D1: 4.3-5.6 (full)	None	GBM <sup>34</sup> BC <sup>34-37</sup> NSCLC <sup>38</sup> HCC <sup>39</sup>
Chlorprothixene	DRs	Non-selective antagonist	No data	No data	AML <sup>40</sup>
Clozapine	DRs	Non-selective antagonist	D4: 7.5 D1: 6.9 D5: 6.6 D2: 5.8-6.9 D3: 5.2-6.3	H <sub>1</sub> : 8.8-9.6 5-HT <sub>2B</sub> : 8.0-8.8 5-HT <sub>2A</sub> : 7.6-9.0 (inverse agonist) 5-HT <sub>2C</sub> : 7.4-8.7 (inverse agonist) 5-HT <sub>6</sub> : 7.8-8.1 (inverse agonist) 5-HT <sub>1D</sub> : 8.0 (inverse agonist) 5-HT <sub>1A</sub> : 6.8-6.9 (full agonist) 5-HT <sub>1B</sub> : 6.2 (full)	AML <sup>23</sup> BC <sup>11</sup>
A77636	D <sub>1</sub>	Selective agonist	D1: 8.7 (full)	None	BC <sup>41</sup>
Fenoldopam	D <sub>1</sub>	Selective agonist	D1: 6.5-7.9 (full) D4: 6.5 (full)	None	BC <sup>37</sup>
SCH-23390	D <sub>1</sub>	Selective agonist	D1: 7.5-9.5 D5: 7.4-9.5	Ion channels (K <sub>ir</sub> 2.3 y K <sub>ir</sub> 3.2)	BC <sup>36,42</sup>
SCH-39166	D <sub>1</sub>	Antagonist	D1: 8.3 D5: 8.3	None	BC <sup>37</sup>
Bromocriptine	D <sub>2</sub>	Agonist	D2: 7.3-8.3 (full) D1: 7.6-8.2 (partial) D3: 7.1-8.2 (partial) D4: 6.4 # D5: 6.3 (full)	5-HT <sub>2B</sub> : 8.9 (full) 5-HT <sub>2A</sub> : 8.2 (full) 5-HT <sub>1D</sub> : 8.0 (partial) $\alpha_{2A}$ -AR: 8.0 # 5-HT <sub>1A</sub> : 7.9 (partial) $\alpha_{2C}$ -AR: 7.6 # 5-HT <sub>6</sub> : 7.5 (full) $\alpha_{2B}$ -AR: 7.5 # 5-HT <sub>1B</sub> : 6.5 (partial) 5-HT <sub>2C</sub> : 6.1 (partial)	HCC <sup>43,44</sup> AML <sup>31,45,46</sup> NSCLC <sup>47</sup>
Quinpirole	D <sub>2</sub>	Specific agonist	D4: 7.5 (full) D3: 6.4-8.0 (full) D2: 4.9-7.7 (full)	5-HT <sub>1A</sub> : 5.8 (full) 5-HT <sub>2B</sub> : 5.0-6.5 (full) 5-HT <sub>2A</sub> : 5.0-5.5 (full) 5-HT <sub>2C</sub> : 5.0-5.5 (full)	GBM <sup>28</sup> BC <sup>48</sup> NSCLC <sup>30,49,38</sup>
Aripiprazole	D <sub>2</sub>	Agonist	D2: 9.1 (partial)	5-HT <sub>1A</sub> : 8.2 (partial) 5-HT <sub>2A</sub> : 7.5-8.1 (partial) 5-HT <sub>2C</sub> : 7.6 (partial) H <sub>1</sub> : 7.5 # 5-HT <sub>1D</sub> : 7.2 (full) 5-HT <sub>1B</sub> : 6.1 (full)	BC <sup>11,48</sup>
Cabergoline	D <sub>2</sub>	Agonist	D2: 9.0-9.2 (partial) D3: 9.1 (partial) D5: 7.7 (full) D4: 7.3 (full) D1: 6.7 (full)	5-HT <sub>2B</sub> : 8.9 (full) 5-HT <sub>2A</sub> : 8.2 (full) 5-HT <sub>1D</sub> : 8.1 (partial) $\alpha_{2A}$ -AR: 7.9 # $\alpha_{2C}$ -AR: 7.7 # 5-HT <sub>1A</sub> : 7.7 (full) $\alpha_{2B}$ -AR: 7.1 # 5-HT <sub>1B</sub> : 6.3 (full) 5-HT <sub>2C</sub> : 6.2 (full)	BC <sup>37</sup> NSCLC <sup>38</sup>
Apomorphine	D <sub>2</sub>	Agonist	D4: 8.4 (partial) D5: 6.4-7.8 (partial) D3: 6.1-7.6 (partial) D2: 5.7-7.5 (partial) D1: 5.3-6.2 (full)	$\alpha_{2C}$ -AR: 7.4 # $\alpha_{2B}$ -AR: 7.2 # 5-HT <sub>2C</sub> : 7.0 # 5-HT <sub>1A</sub> : 6.9 (partial) 5-HT <sub>2A</sub> : 6.9 # 5-HT <sub>2B</sub> : 6.9 # $\alpha_{2A}$ -AR: 6.9 (partial)	NSCLC <sup>50</sup>

(continued)

**Table 2.** (continued)

Drug	Main target	Action	pKi for DRs *	pKi for other targets *	Studied in
Haloperidol	D <sub>2</sub>	Antagonist	D4: 8.7-8.8 D2: 7.4-8.8 D3: 7.5-8.6 D5: 6.3 D1: 6.2	5-HT <sub>2A</sub> : 6.7-7.3 5-HT <sub>1D</sub> : 6.6 5-HT <sub>7</sub> : 6.3-6.6 5-HT <sub>2B</sub> : 5.8-6.4 H <sub>1</sub> : 5.7-6.1 5-HT <sub>1A</sub> : 5.7-5.8	GBM <sup>28</sup> AML <sup>14</sup> NSCLC <sup>14</sup> BC <sup>14</sup>
Ziprasidone	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 8.6	5-HT <sub>2A</sub> : 8.8-9.5 5-HT <sub>1D</sub> : 9.0 (full agonist) 5-HT <sub>2C</sub> : 7.9-9.0 (inverse agonist) 5-HT <sub>1A</sub> : 7.9-8.9 (partial agonist) 5-HT <sub>7</sub> : 8.4 (inverse agonist) 5-HT <sub>1B</sub> : 8.3 (full agonist) H <sub>1</sub> : 7.4-7.8	BC <sup>11</sup>
Amisulpride	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 7.8-8.0	None	BC <sup>15</sup>
Paliperidone	D <sub>2</sub>	Antagonist	No data	No data	BC <sup>15</sup>
Asenapine	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 8.9	5-HT <sub>2A</sub> : 10.2 H <sub>1</sub> : 9.8 5-HT <sub>1D</sub> : 8.4 (full agonist) 5-HT <sub>2C</sub> : 6.1 (inverse agonist) 5-HT <sub>1A</sub> : 8.0-8.3 (full agonist) 5-HT <sub>1B</sub> : 8.1 (full agonist)	BC <sup>11</sup>
Quetiapine	D <sub>2</sub>	Antagonist	D <sub>2</sub> receptor: 7.2	H <sub>1</sub> : 8.0-8.7 5-HT <sub>2A</sub> : 6.4-7.0 5-HT <sub>1A</sub> : 6.5-6.6 (full agonist) 5-HT <sub>1D</sub> : 5.7 (full agonist)	BC <sup>11</sup>
Thioridazine	D <sub>2</sub>	Antagonist	D1: 7.0 D5: 5.6	5-HT <sub>2A</sub> : 7.4-8.0 5-HT <sub>2C</sub> : 7.2-7.3 5-HT <sub>6</sub> : 7.2 (inverse agonist) 5-HT <sub>1A</sub> : 7.1	GBM <sup>28</sup> HCC <sup>43</sup> BC <sup>21,51</sup> AML <sup>23,24,46</sup> NSCLC <sup>25,52</sup>
Risperidone	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 9.4 D3: 7.0	5-HT <sub>2A</sub> : 9.3-10.0 (inverse agonist) $\alpha_{1A}$ -AR: 8.4 5-HT <sub>1D</sub> : 7.8-8.0 5-HT <sub>2C</sub> : 6.1 (inverse agonist) 5-HT <sub>1B</sub> : 6.6-7.3 5-HT <sub>1A</sub> : 6.4-6.5 5-HT <sub>6</sub> : 5.6	GBM <sup>28</sup> BC <sup>15</sup>
Trifluoperazine	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 8.9-9.0 D4: 7.4	5-HT <sub>2A</sub> : 7.9 H <sub>1</sub> : 7.2 5-HT <sub>2C</sub> : 6.4	GBM <sup>53,54</sup> HCC <sup>55,56</sup> NSCLC <sup>57</sup> BC <sup>42</sup> HCC <sup>39</sup>
l-Stepholidine	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 7.9	None	BC <sup>42</sup>
Domperidone	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 7.9-8.4 D3: 7.1-7.6	None	HCC <sup>39</sup>
Pimozide	D <sub>2</sub>	Antagonist	D2: 7.0-8.8 D3: 7.0-8.6	5-HT <sub>2A</sub> : 7.1-7.7 5-HT <sub>1A</sub> : 6.8 H <sub>1</sub> : 6.2 Ion channels (K <sub>ir</sub> 3, Ca <sub>v</sub> 3.1, Ca <sub>v</sub> 3.3, Ca <sub>v</sub> 3.2)	GBM <sup>14,33</sup> HCC <sup>33,56</sup> BC <sup>14,33,58</sup> AML <sup>33</sup> NSCLC <sup>33,58</sup>
L-741742	D <sub>4</sub>	Antagonist	D4: 8.5	None	GBM <sup>32</sup>
PNU 9641E	D <sub>4</sub>	Antagonist	No data	No data	GBM <sup>32</sup>

Abbreviations: 5-HT<sub>x</sub>, 5-hydroxytryptamine receptors; H<sub>x</sub>, histamine receptors; K<sub>ir</sub>, Inwardly-rectifier potassium channel; Ca<sub>v</sub>, voltage-gated calcium channels;  $\alpha$ -AR, alpha-adrenoceptors; GBM, Glioblastoma multiforme; BC, Breast cancer; NSCLC, Non-small cell lung cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; AML, acute myeloid leukemia.

\* The pKi values were obtained from IUPHAR website<sup>59</sup> and are ordered from highest to lowest.

# The drug functions as antagonist.

stem cells.<sup>32</sup> Furthermore, L-741742 and PNU-96415E display a synergic effect when combined with the first-line cytotoxic agent temozolomide.<sup>32</sup>

Altogether, the above evidence shows that DRD2 and DRD4 can be considered therapeutic targets in GBM and suggest that DRD2/DRD4 antagonist as adjuvant therapy would be

beneficial for GBM patients. The efficacy of ONC21 in clinical trials supports this hypothesis, but other drugs are still to be tested in patients.

On the other hand, the role of the D1-like receptors in GBM is much less clear. GBM cell lines overexpress *DRD1*, *DRD2*, and *DRD5* in culture.<sup>2,18,34</sup> Thus, it is possible that the overexpression of those receptors promotes aggressive phenotypes. It has been reported that reduced levels of *DRD1* and *DRD5* mRNAs favor the survival of GBM patients.<sup>34</sup> However, *DRD5* activation functions as an anti-oncogenic signal in GBM cells, inducing autophagic cell death.<sup>73</sup> This contradictory evidence shows that there is not enough information to consider that modulation of D1-like receptors would be beneficial for GBM patients and calls for further studies.

### DRs in Breast Cancer

Breast cancer is the most frequent cancer type in women worldwide, causing more than 600,000 deaths per year.<sup>74</sup> Expression of DRs is higher in malignant breast tumors than in benign ones, which, in turn, have increased levels of the receptors than normal mammary tissue.<sup>13</sup> Exogenous administration of dopamine (the natural agonist for all DRs) reduces tumor growth and angiogenesis *in vivo*.<sup>35,36,75</sup> However, it is unclear if those effects are mediated by a subfamily or a specific dopamine receptor. Moreover, studies aimed to elucidate the role of specific receptors in breast cancer have shown contradictory results.

Breast cancer patients with tumoral *DRD1* overexpression have reduced overall and recurrence-free survival compared to patients that do not express the receptor.<sup>37</sup> *DRD1* is overexpressed in breast cancer cell lines negative for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), suggesting that its signaling is important for the biology of triple-negative (TN) cancer cells.<sup>37,41</sup> Accordingly, the compound A77636, a *DRD1* selective antagonist, inhibits proliferation and motility, and triggers apoptosis and autophagy in TN breast cancer cells, but lacks effect in normal epithelial cells. A77636 also reduces osteolytic metastasis *in vivo*, indicating that the D1-mediated dopaminergic signaling is essential for establishing bone metastasis.<sup>41</sup>

However, other authors report that *DRD1*-signaling impairs breast cancer progression. Dopamine or D1-like agonists reduce the viability and promote apoptosis in TN breast cancer cells, but not in the luminal MCF-7 cells.<sup>37</sup> Apoptosis induction is dependent on *DRD1* since it is blocked by the *DRD1* silencing or by the addition of the antagonist SCH39166.<sup>37</sup> Furthermore, the *DRD1* agonist fenoldopam (which has only peripheral effects due to its absence of brain penetration) inhibits the growth of TN xenotransplants by activating the *DRD1*/cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG) pathway.<sup>37</sup>

In luminal breast cancer cells, the use of fenoldopam or l-stepholidine reduces migration and invasion in a *DRD1*-dependent manner.<sup>42</sup> The same study demonstrated that fenoldopam or l-stepholidine administration to mice isotransplanted

with 4T1 breast cancer cells blocks lung metastasis but does not change tumor growth.<sup>42</sup> On the other hand, administration of the *DRD1* antagonist SCH-23390 to mice xenotransplanted with doxorubicin-resistant luminal breast cancer cells promotes tumor growth and blocks the synergic inhibitory effect of dopamine and sunitinib (a multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor) on tumor growth.<sup>36</sup> These results suggest that the role of *DRD1* may be different in TN than in luminal breast cancer cells.

Besides, effects elicited by *DRD1* activation may vary in different subsets of cancer cells. Dopamine decreases the fraction of cells with the CSC-associated immunophenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> in MCF/Adr cells,<sup>36</sup> whereas the *DRD1* antagonist SCH-23390 increases such fraction. In agreement, activation of the *DRD1* with fenoldopam reduces the CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, ALDH<sup>+</sup>, and mammosphere-forming fractions in 4T1 cells.<sup>42</sup> Thus, it has been suggested that the population of breast cancer stem cells within luminal cell lines is particularly sensitive to the *DRD1* activation, an idea supported by the fact that the large majority of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> cells express *DRD1*.<sup>36</sup> However, additional studies are still required to fully clarify the role of *DRD1* in luminal breast CSCs. Such studies must evaluate the effect of *DRD1* activation on transcriptional and functional responses displayed only by breast CSCs, using proper methodologies beyond immunophenotype.<sup>76</sup> Additionally, the role of *DRD1* in CSCs from TN or HER2<sup>+</sup> tumors is still to be clarified.

*DRD2* also plays an important role in breast cancer progression. *DRD2* is overexpressed in breast cancer human samples, as well as in cell lines with different ER, PR, and HER2 expression.<sup>13</sup> However, the TN cells displayed the highest *DRD2* levels.<sup>13</sup> The inhibition of *DRD2* expression with a microRNA (miR-4301) suppresses the proliferation and induces apoptosis in diverse human breast cancer cell lines, suggesting that *DRD2* favors breast cancer progression.<sup>13</sup> Yet, the administration of cabergoline, a *DRD2* agonist, lacks effect in xenotransplants of TN breast cancer cells.<sup>37</sup>

Additional evidence suggests that *DRD2* activation is essential for maintaining the CSC pool, especially in TN cell lines. Quinpirole, a *DRD2*/*DRD3* agonist, increases the mammosphere-forming efficiency in SUM-149 cells.<sup>21</sup> Congruously, *DRD2* silencing or the exposure to different D2-like antagonists, including thioridazine, inhibits mammosphere formation by impairing activation of STAT3/IL-6 pathway.<sup>21</sup> Interestingly, thioridazine, an antipsychotic drug employed before 2005, is active against leukemia<sup>23</sup> and colorectal cancer stem cells,<sup>77</sup> suggesting that *DRD2* may play similar roles in CSC maintenance in other tumor types. Thus, multiple authors have proposed the use of thioridazine or other *DRD2*-blocking drugs as adjuvant therapy for breast cancer. Nonetheless, it is unclear if those therapies would equally benefit all different subtypes of breast cancer. For example, in the luminal MCF-7/Adr cells, only 5%-15% of the CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> cells express *DRD2*,<sup>36</sup> suggesting that only a small fraction of cells within the CSC pool would respond to *DRD2* inhibition.

### DRs in Lung Cancer

Lung cancer is the most common cancer, and it causes more deaths than any other cancer worldwide.<sup>78</sup> Approximately 85% of the human lung tumors are non-small cell lung cancers (NSCLC); for those patients, the 5-year survival rate is below 20%.<sup>79</sup> Lung tumors express DRD2 and DRD4,<sup>49,80</sup> but DRD2 expression is reduced in NSCLC compared to normal lung tissue.<sup>49</sup> Furthermore, low DRD2 expression correlates with increased risk for larger tumors and more advanced TNM stages.<sup>49</sup> *In vitro*, DRD2 silencing by shRNA promotes cell proliferation and colony formation, whereas DRD2 overexpression has the opposite effect.<sup>49</sup> In agreement, DRD2-activation by apomorphine<sup>50</sup> or nanoparticled bromocriptine<sup>47</sup> decreases NSCLC cell proliferation. *In vivo*, activation of DRD2-signaling in cancer cells, either by DRD2 forced overexpression or by the administration of agonists, reduces tumor growth<sup>38,49</sup> and inhibits brain metastasis.<sup>50</sup> Similar effects have been reported in the subpopulation of lung CSCs. DRD2 is expressed in the majority of CD133<sup>+</sup> CSCs from NSCLC human tumor samples and human cell lines, and the activation of the receptor reduces their viability, clonogenicity, and invasiveness, as well as *in vivo* tumor growth.<sup>30</sup>

DRD2-signaling can also be triggered in non-cancer tumor cells, affecting NSCLC progression. DRD2 is overexpressed in the endothelium of NSCLC tumors, and such expression correlates with tumor stage and smoking history.<sup>38</sup> Administration of dopamine or DRD2 agonists (quinpirole or cabergoline) impairs the *in vivo* tumor growth of NSCLC iso- and xenotransplants.<sup>38</sup> Such effect is associated with reduced tumor angiogenesis and decreased infiltration of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs).<sup>38</sup> So, it seems that endothelial DRD2 plays an anti-tumoral role in NSCLC.

The evidence above demonstrates that DRD2 activation may be beneficial for NSCLC patients since it reduces proliferation and stemness in cancer cells and may impair the activation of endothelial cells required for angiogenesis.

However, other reports have found favorable effects of DRD2 blockage, particularly with the drug thioridazine. Thioridazine reduces viability and clonogenicity, induces cell cycle arrest, and promotes apoptosis in NSCLC cell lines, and impairs tumor initiation and growth *in vivo*.<sup>25,52</sup> The drug also increases the sensitivity of NSCLC cells to non-targeted chemotherapy.<sup>25</sup> However, those studies did not analyze whether thioridazine effects are caused only by DRD2 blockage or by additional DRD2-independent mechanisms, as previously suggested.<sup>37</sup> Clarification of the thioridazine mechanism of action will promote the identification of drugs with similar activities.

### DRs in Hepatocellular Carcinoma (HCC)

HCC is the most frequent hepatic cancer and is the fourth cause of cancer-related deaths worldwide.<sup>81</sup> HCC patients usually have a poor prognosis, with the exemption of those diagnosed early, for whom the 5-year survival rate is above 70%.<sup>82</sup> Only a few studies have analyzed the role of DRs in HCC progression.

Normal hepatic cells and HCC cells express all dopamine receptors.<sup>39</sup> DRD5 is overexpressed in HCC tumor samples compared to normal adjacent tissue, whereas DRD1 expression is decreased.<sup>43</sup> However, the functional roles of such changes are still unclear.

On the other hand, there is enough evidence to support the anti-tumoral role of DRD2 in HCC. DRD2 activation inhibits proliferation and invasion,<sup>39,44</sup> promotes apoptosis, and blocks migration of HCC cells.<sup>44</sup> *In vivo*, dopamine reduces tumor growth and lung metastasis in a DRD2-dependent fashion since the effects are reverted by the simultaneous administration of dopamine and the DRD2 antagonist domperidone.<sup>39</sup> In agreement, the DRD2 agonist bromocriptine reduces tumor mass and increases overall survival of HCC-bearing mice.<sup>39</sup>

As for other tumor types, it has been shown that thioridazine impairs tumorsphere formation and reduces the expression of CSC-associated genes,<sup>43</sup> suggesting that the DRD2 signaling may be different in CSCs and tumor-bulk HCC cells.

### DRs in Acute Myeloid Leukemia (AML)

AML is the most common (62%) leukemia and generally has a poor prognosis.<sup>83</sup> It has been reported that human AML cell lines overexpress DRD2 and DRD4 and have low DRD1 and DRD3 expression.<sup>45</sup> Similar results have been found in animal models of myelodysplastic syndrome,<sup>45</sup> a condition associated with an increased risk of developing AML. Chlorprothixene, a wide-spectrum antagonist of DRs, reduces growth and induces apoptosis of AML cells from different subtypes and impairs tumor progression *in vivo*.<sup>40</sup>

The available evidence points to DRD2 as a regulator of cell proliferation and cell death in AML, particularly in leukemia CSCs. Sachlos and collaborators identified that the DRD2 antagonist thioridazine induces differentiation in neoplastic pluripotent stem cells and AML blasts, but lacks effect on normal pluripotent or hematopoietic stem cells.<sup>23</sup> Further analysis showed that thioridazine reduces the engraftment of AML cells but not that of hematopoietic stem cells; such differential effect is caused by the absence of DRs expression in normal cells and the expression of multiple DRs in AML blast.<sup>23</sup> This landmark study showed that: i) leukemic stem cells overexpress DRs, ii) DRs expression in leukemic cells could be a prognosis marker, and iii) altering the dopaminergic signaling could be helpful in a subset of AML patients.<sup>23</sup>

Subsequent reports analyzed the efficacy and safety of thioridazine, combined with cytarabine, in patients with recurrent or refractory AML. Oral administration of thioridazine gives rise to plasma concentrations similar to those employed *in vitro* by Sachlos *et al*, inducing partial responses in the fraction of patients with DRD2-positive disease at the beginning of the trial.<sup>24</sup> Even when thioridazine causes multiple toxic effects that limit its use, the study demonstrates that DR-mediated signaling is important for AML clinical progression. Nevertheless, as discussed above, thioridazine may not elicit its effects only through DRs. Therefore, these data should not be considered definitive proof that DRD2 (or any other DR) is a

universal target in leukemia. For example, the treatment of cultures of AML cells with the DRD2 agonist bromocriptine induces apoptosis, reducing cell viability and colony formation.<sup>45</sup> Likewise, the combined treatment with bromocriptine and cytarabine has a synergistic cytotoxic effect in AML cells.<sup>45</sup> Thus, the specific role of DRD2 in AML is still to be clarified. Further studies should analyze the participation of DRD2 using different models of AML with special focus on the CSC population.

### DRs in Gastric Cancer

Normal gastric cells and gastric cancer cells express all dopamine receptors.<sup>19</sup> DRD2 is overexpressed in tumor samples compared to adjacent healthy tissues, correlating with a shorter survival of patients.<sup>26</sup> In contrast, gastric cancer cells in culture display reduced levels of DRD2.<sup>19,84</sup> *In vitro* activation of DRD2 with quinpirole, a specific agonist, inhibits the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1 R)/Protein kinase B (PKB) pathway reducing cell proliferation.<sup>19</sup> Likewise, exogenous administration of dopamine to tumor-bearing mice inhibits tumor growth by activating DRD2 on endothelial cells, leading to activity suppression in the vascular endothelial growth factor-A receptor-2 (VEGFR2).<sup>84</sup> However, inhibition of DRD2 with thioridazine, a DRD2 antagonist, has also been reported to decrease gastric cancer cell growth.<sup>26</sup>

In addition, DRD5 has been associated with cell growth of gastric cancer cells. The activation of DRD5 by the agonist SKF83959 suppresses cell growth by inhibiting mTOR functions and inducing autophagy, followed by cell death.<sup>73</sup> Thus, is it possible that DRD5 become a therapeutic target for gastric cancer in the future.

### DRs in Colorectal Cancer (CRC)

In CRC, DRD2 is overexpressed in tumor samples.<sup>18</sup> *In vitro*, DRD2 activation with dopamine or the D2-like agonist sumanirole increase CRC cell number, whereas transient knockdown of DRD2 or DRD2 inhibition with antagonists (L-741626 or PG01037) generate the opposite effect.<sup>18</sup> ONC201, another selective antagonist of DRD2 and DRD3, also reduces cell viability. However, the effect of ONC201 is not altered by DRD2 knockout, indicating a DRD2-independent mechanism of action.<sup>18</sup>

In a subgroup of CRC patients, the existence of DRD2 polymorphisms reduces protein expression<sup>85</sup> and is associated with an increased risk of CRC.<sup>85,86</sup> Furthermore, the dopamine content in malignant human colon tissue is reduced 3- to 10-fold compared to normal tissue, depending on the tumor stage.<sup>85</sup> The progressive reduction of dopamine and DRD2 levels caused by the polymorphisms leads to a reduction of intracellular cyclic AMP, an inhibitor of cell growth, promoting CRC progression.<sup>85,86</sup>

### DRs in Pancreatic Cancer

In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), DRD2 protein levels are increased in tumor samples compared with normal tissue.<sup>22</sup> DRD2 silencing by shRNA inhibits pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. Similarly, treatment of pancreatic cancer cell lines with pimozone, an FDA-approved DRD2 antagonist, induces cell-cycle arrest and apoptosis.<sup>22</sup> L-741626, another DRD2 antagonist, generates similar effects, suggesting that pharmacologic blockade of DRD2 may be a promising therapeutic strategy for pancreatic cancer. A third DRD2 antagonist, olanzapine, sensitizes pancreatic CSCs to chemotherapeutic agents *in vitro*, but it is unclear if such effect is mediated exclusively by DRD2 inhibition.<sup>87</sup> Thus, independent studies report that DRD2-targeting could be beneficial for pancreatic cancer patients. On the contrary, no reports analyze the role of other DRs in this tumor type, suggesting that future research should focus on receptors beyond DRD2.

### Conclusions and Final Considerations

We conclude that certain DRs can be considered therapeutic targets for specific tumor types. For example, DRD2/DRD4 inhibition in GBM or DRD1 activation in luminal breast cancer produces antitumoral effects. In such cases, future efforts should focus on: i) analyzing the efficacy of specific DR-targeting drugs in relevant models of disease; ii) identifying pertinent pharmacodynamic variables for the evaluation of therapeutic and adverse effects in future clinical trials; and iii) developing new drugs with increased specificity for the target.

On the other hand, the evidence is either inconclusive or contradictory for other receptor/disease combinations. For example, the roles of DRD5 in GBM or DRD1 in TN breast cancer need further clarification. Additional studies should define: i) whether DRs expression is associated with tumor stage and/or clinical outcomes; ii) the differences in DRs expression between tumor-bulk cells and CSCs; and iii) the functional consequences of genetic or pharmacological modulation of DRs in cancer cells. We recommend that when performing those studies, researchers take into consideration that: a) the same receptor can generate opposite responses in different subpopulations of cancer cells; b) the receptor expression levels may be crucial for the induction of specific responses; and c) available DRs-modulating drugs generate off-target effects and, thus, additional controls are required to demonstrate their specificity in the model of study. These considerations will increase the relevance of the data generated and facilitate the development of specific therapies for cancer patients.

### Authors' Note

All authors made substantial contributions to conception and design, compilation of published information, or interpretation of data; took part in drafting the article or revising it critically for important intellectual content; gave final approval of the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work.


## Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by UNAM-PAPIIT IN219719 (M.A.V-V.) and UNAM-PAPIIT IA205421 (N.S.-J.). A.R.-C. is recipient of a M.Sc. fellowship from CONACYT (1003227).

## ORCID iD

Marco A. Velasco-Velázquez, PhD  <https://orcid.org/0000-0001-9717-0265>

## References

- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011; 63(1):182-217. Sibley DR, ed. doi:10.1124/pr.110.002642
- Wang X, Wang Z-B, Luo C, et al. The prospective value of dopamine receptors on bio-behavior of tumor. *J Cancer.* 2019; 10(7):1622-1632. doi:10.7150/jca.27780
- Mishra A, Singh S, Shukla S. Physiological and functional basis of dopamine receptors and their role in neurogenesis: possible implication for Parkinson's disease. *J Exp Neurosci.* 2018;12. doi:10.1177/1179069518779829
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;24(1):125-132. doi:10.1016/S0149-7634(99)00063-9
- Weissenrieder JS, Neighbors JD, Mailman RB, Hohl RJ. Cancer and the dopamine D2 receptor: a pharmacological perspective. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;370(1):111-126. doi:10.1124/jpet.119.256818
- Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2019;39(1): 31-59. doi:10.1007/s10571-018-0632-3
- Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors—IUPHAR review 13. *Br J Pharmacol.* 2015;172(1): 1-23. doi:10.1111/bph.12906
- Bateup HS, Svenningsson P, Kuroiwa M, et al. Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci.* 2008;11(8):932-939. doi:10.1038/nn.2153
- Romanelli RJ, Williams JT, Neve KA. Dopamine receptor signaling: intracellular pathways to behavior. In: *The Dopamine Receptors.* Humana Press; 2010:137-173. doi:10.1007/978-1-60327-333-6\_6
- Seeman P. Historical overview: introduction to the dopamine receptors. In: *The Dopamine Receptors.* Humana Press; 2010: 1-21. doi:10.1007/978-1-60327-333-6\_1
- Roney MSI, Park SK. Antipsychotic dopamine receptor antagonists, cancer, and cancer stem cells. *Arch Pharm Res.* 2018;41(4): 384-408. doi:10.1007/s12272-018-1017-3
- Tacik P, Curry S, Fujioka S, et al. Cancer in Parkinson's disease. *Park Relat Disord.* 2016;31:28-33. doi:10.1016/j.parkreldis.2016.06.014
- Gholipour N, Ohradanova-Repic A, Ahangari G. A novel report of MiR-4301 induces cell apoptosis by negatively regulating *DRD2* expression in human breast cancer cells. *J Cell Biochem.* 2018;119(8):6408-6417. doi:10.1002/jcb.26577
- Lee JK, Nam DH, Lee J. Repurposing antipsychotics as glioblastoma therapeutics: potentials and challenges. *Oncol Lett.* 2016; 11(2):1281-1286. doi:10.3892/ol.2016.4074
- Wu Chou AI, Wang YC, Lin CL, Kao CH. Female schizophrenia patients and risk of breast cancer: a population-based cohort study. *Schizophr Res.* 2017;188:165-171. doi:10.1016/j.schres.2017.01.019
- De Hert M, Peuskens J, Sabbe T, et al. Relationship between prolactin, breast cancer risk, and antipsychotics in patients with schizophrenia: a critical review. *Acta Psychiatr Scand.* 2016; 133(1):5-22. doi:10.1111/acps.12459
- Wiklund ED, Catts VS, Catts SV, et al. Cytotoxic effects of antipsychotic drugs implicate cholesterol homeostasis as a novel chemotherapeutic target. *Int J Cancer.* 2010;126(1):28-40. doi:10.1002/ijc.24813
- Kline CLB, Luff MD, Lulla AR, et al. Role of dopamine receptors in the anticancer activity of ONC201. *Neoplasia.* 2018;20(1): 80-91. doi:10.1016/j.neo.2017.10.002
- Huang H, Wu K, Ma J, Du Y, Cao C, Nie Y. Dopamine D2 receptor suppresses gastric cancer cell invasion and migration via inhibition of EGFR/AKT/MMP-13 pathway. *Int Immunopharmacol.* 2016;39:113-120. doi:10.1016/j.intimp.2016.07.002
- Ganguly S, Basu B, Shome S, et al. Dopamine, by acting through its D2 receptor, inhibits insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced gastric cancer cell proliferation via up-regulation of Krüppel-like factor 4 through down-regulation of IGF-IR and AKT phosphorylation. *Am J Pathol.* 2010;177(6):2701-2707. doi:10.2353/ajpath.2010.100617
- Tegowski M, Fan C, Baldwin AS. Thioridazine inhibits self-renewal in breast cancer cells via DRD2-dependent STAT3 inhibition, but induces a G1 arrest independent of DRD2. *J Biol Chem.* 2018;293(41):15977-15990. doi:10.1074/jbc.RA118.003719
- Jandaghi P, Najafabadi HS, Bauer AS, et al. Expression of DRD2 is increased in human pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibitors slow tumor growth in mice. *Gastroenterology.* 2016; 151(6):1218-1231. doi:10.1053/j.gastro.2016.08.040
- Sachlos E, Risueño RM, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell.* 2012;149(6):1284-1297. doi:10.1016/j.cell.2012.03.049
- Aslostovar L, Boyd AL, Almakadi M, et al. A phase 1 trial evaluating thioridazine in combination with cytarabine in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2018;2(15): 1935-1945. doi:10.1182/bloodadvances.2018015677
- Yue H, Huang D, Qin L, et al. Targeting lung cancer stem cells with antipsychological drug thioridazine. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:6709828. doi:10.1155/2016/6709828

26. Mu J, Huang W, Tan Z, et al. Dopamine receptor d2 is correlated with gastric cancer prognosis. *Oncol Lett.* 2017;13(3):1223-1227. doi:10.3892/ol.2017.5573
27. Cheng HW, Liang YH, Kuo YL, et al. Identification of thioridazine, an antipsychotic drug, as an antiglioblastoma and anticancer stem cell agent using public gene expression data. *Cell Death Dis.* 2015;6(5):e1753-e1753. doi:10.1038/cddis.2015.77
28. Li J, Zhu S, Kozono D, et al. Genome-wide shRNA screen revealed integrated mitogenic signaling between Dopamine Receptor D2 (DRD2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in glioblastoma. *Oncotarget.* 2014;5(4):882-893. doi:10.18632/oncotarget.1801
29. Ralff MD, Lulla AR, Wagner J, El-Deiry WS. ONC201: a new treatment option being tested clinically for recurrent glioblastoma. *Transl Cancer Res.* 2017;6(suppl 7):S1239-S1243. doi:10.21037/tcr.2017.10.03
30. Roy S, Lu K, Nayak MK, et al. Activation of D2 dopamine receptors in CD133+ve cancer stem cells in non-small cell lung carcinoma inhibits proliferation, clonogenic ability, and invasiveness of these cells. *J Biol Chem.* 2017;292(2):435-445. doi:10.1074/jbc.M116.748970
31. Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Etxabe A, et al. Repositioning of bromocriptine for treatment of acute myeloid leukemia. *J Transl Med.* 2016;14(1):261. doi:10.1186/s12967-016-1007-5
32. Dolma S, Selvadurai HJ, Lan X, et al. Inhibition of dopamine receptor D4 impedes autophagic flux, proliferation, and survival of glioblastoma stem cells. *Cancer Cell.* 2016;29(6):859-873. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.002
33. Elmaci I, Altinoz MA. Targeting the cellular schizophrenia. Likely employment of the antipsychotic agent pimozide in treatment of refractory cancers and glioblastoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;128:96-109. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.06.004
34. Caragher SP, Hall RR, Ahsan R, Ahmed AU. Monoamines in glioblastoma: complex biology with therapeutic potential. *Neuro Oncol.* 2018;20(8):1014-1025. doi:10.1093/neuonc/nox210
35. Peters MAM, Meijer C, Fehrmann RSN, et al. Serotonin and dopamine receptor expression in solid tumours including rare cancers. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(3):1539-1547. doi:10.1007/s12253-019-00734-w
36. Wang S, Mou Z, Ma Y, et al. Dopamine enhances the response of sunitinib in the treatment of drug-resistant breast cancer: involvement of eradicating cancer stem-like cells. *Biochem Pharmacol.* 2015;95(2):98-109. doi:10.1016/j.bcp.2015.03.013
37. Borcherding DC, Tong W, Hugo ER, et al. Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer. *Oncogene.* 2016;35(24):3103-3113. doi:10.1038/ncr.2015.369
38. Hoepfner LH, Wang Y, Sharma A, et al. Dopamine D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells. *Mol Oncol.* 2015;9(1):270-281. doi:10.1016/j.molonc.2014.08.008
39. Zhang QB, Zhang BH, Zhang KZ, et al. Moderate swimming suppressed the growth and metastasis of the transplanted liver cancer in mice model: with reference to nervous system. *Oncogene.* 2016;35(31):4122-4131. doi:10.1038/ncr.2015.484
40. Du Y, Li K, Wang X, Kaushik AC, Junaid M, Wei D. Identification of chlorprothixene as a potential drug that induces apoptosis and autophagic cell death in acute myeloid leukemia cells. *FEBS J.* 2020;287(8):1645-1665. doi:10.1111/febs.15102
41. Minami K, Liu S, Liu Y, et al. Inhibitory effects of dopamine receptor D1 agonist on mammary tumor and bone metastasis. *Sci Rep.* 2017;7:1-12. doi:10.1038/srep45686
42. Yang L, Yao Y, Yong L, et al. Dopamine D1 receptor agonists inhibit lung metastasis of breast cancer reducing cancer stemness. *Eur J Pharmacol.* 2019;859:172499. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172499
43. Lu M, Li J, Luo Z, et al. Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *Oncotargets Ther.* 2015;8:1543-1551. doi:10.2147/OTT.S77373
44. Liu XF, Long HJ, Miao XY, Liu GL, Yao HL. Fisetin inhibits liver cancer growth in a mouse model: relation to dopamine receptor. *Oncol Rep.* 2017;38(1):53-62. doi:10.3892/or.2017.5676
45. Liberante FG, Pouryahya T, McMullin MF, Zhang SD, Mills KI. Identification and validation of the dopamine agonist bromocriptine as a novel therapy for high-risk myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(6):6609-6619. doi:10.18632/oncotarget.6773
46. Wojcicki AV, Kadapakkam M, Frymoyer A, Lacayo N, Chae HD, Sakamoto KM. Repurposing drugs for acute myeloid leukemia: a worthy cause or a futile pursuit? *Cancers (Basel).* 2020;12(2):441. doi:10.3390/cancers12020441
47. Sheikhpour M, Sadeghizadeh M, Yazdian F, et al. Co-administration of curcumin and bromocriptine nano-liposomes for induction of apoptosis in lung cancer cells. *Iran Biomed J.* 2020;24(1):24-29. doi:10.29252/ibj.24.1.24
48. Lee H, Kang S, Sonn JK, Lim Y. Dopamine receptor D<sub>2</sub> activation suppresses the radiosensitizing effect of aripiprazole via activation of AMPK. *FEBS Open Bio.* 2019;9(9):1580-1588. doi:10.1002/2211-5463.12699
49. Wu X-Y, Zhang C-X, Deng L-C, et al. Overexpressed D2 dopamine receptor inhibits non-small cell lung cancer progression through inhibiting NF-κB signaling pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(6):2258-2272. doi:10.1159/000492644
50. Singh M, Venugopal C, Tokar T, et al. Therapeutic targeting of the premetastatic stage in human lung-to-brain metastasis. *Cancer Res.* 2018;78(17):5124-5134. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1022
51. Yin T, HE S, Shen G, YE T, GUO F, Wang Y. Dopamine receptor antagonist thioridazine inhibits tumor growth in a murine breast cancer model. *Mol Med Rep.* 2015;12(3):4103-4108. doi:10.3892/mmr.2015.3967
52. Shen J, Ma B, Zhang X, et al. Thioridazine has potent antitumor effects on lung cancer stem-like cells. *Oncol Lett.* 2017;13(3):1563-1568. doi:10.3892/ol.2017.5651
53. Kang S, Hong J, Lee JM, et al. Trifluoperazine, a well-known antipsychotic, inhibits glioblastoma invasion by binding to calmodulin and disinhibiting calcium release channel IP3 R. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(1):217-227. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0169-T
54. Pinheiro T, Otrocka M, Seashore-Ludlow B, et al. Reprint of: a chemical screen identifies trifluoperazine as an inhibitor of



- glioblastoma growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 499(2):136-142. doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.001
55. Jiang J, Huang Z, Chen X, et al. Trifluoperazine activates FOXO1-related signals to inhibit tumor growth in hepatocellular carcinoma. *DNA Cell Biol.* 2017;36(10):813-821. doi:10.1089/dna.2017.3790
  56. Chen M-H, Yang W-LR, Lin K-T, et al. Gene expression-based chemical genomics identifies potential therapeutic drugs in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2011;6(11):e27186. Agoulnik I, ed. doi:10.1371/journal.pone.0027186
  57. Yeh CT, Wu ATH, Chang PMH, et al. Trifluoperazine, an anti-psychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186(11):1180-1188. doi:10.1164/rccm.201207-1180OC
  58. Dakir E-H, Pickard A, Srivastava K, et al. The anti-psychotic drug pimozide is a novel chemotherapeutic for breast cancer. *Oncotarget.* 2018;9(79):34889-34910. doi:10.18632/oncotarget.26175
  59. IUPHAR/BPS. Guide to pharmacology. Published 2020. Accessed April 27, 2021. <https://www.guidetopharmacology.org/>
  60. Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT, Cote D. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2018;36(3):395-419. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.001
  61. Prabhu VV, Madhukar NS, Gilvary C, et al. Dopamine receptor D5 is a modulator of tumor response to dopamine receptor D2 antagonism. *Clin Cancer Res.* 2019;25(7):2305-2313. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-2572
  62. Caragher SP, Shireman JM, Huang M, et al. Activation of dopamine receptor 2 prompts transcriptomic and metabolic plasticity in glioblastoma. *J Neurosci.* 2019;39(11):1982-1993. doi:10.1523/JNEUROSCI.1589-18.2018
  63. Allen JE, Kline CLB, Prabhu VV, et al. Discovery and clinical introduction of first-in-class imipridone ONC201. *Oncotarget.* 2016;7(45):74380-74392. doi:10.18632/oncotarget.11814
  64. He L, Bhat K, Ioannidis A, et al. Synergistic effects of the DRD2/3 antagonist ONC201 and radiation in glioblastoma. *BioRxiv.* 2020. doi:10.1101/2020.07.23.218446.
  65. Arrillaga-Romany I, Chi AS, Allen JE, Oster W, Wen PY, Batchelor TT. A phase 2 study of the first imipridone ONC 201, a selective DRD 2 antagonist for oncology, administered every three weeks in recurrent glioblastoma. *Oncotarget.* 2017;8(45): 79298-79304. doi:10.18632/oncotarget.17837
  66. Chi AS, Tarapore RS, Hall MD, et al. Pediatric and adult H3 K27M-mutant diffuse midline glioma treated with the selective DRD2 antagonist ONC201. *J Neurooncol.* 2019;145(1):97-105. doi:10.1007/s11060-019-03271-3
  67. Hall MD, Oda Y, Allen JE, et al. First clinical experience with DRD2/3 antagonist ONC201 in H3 K27M-mutant pediatric diffuse intrinsic pontine glioma: a case report. *J Neurosurg Pediatr.* 2019;23(6):719-725. doi:10.3171/2019.2.PEDS18480
  68. Borthakur G, Ishizawa J, DiNardo CD, et al. A phase I/II clinical trial of the first-in-class GPCR antagonist ONC201 in relapsed/refractory acute leukemias. *Blood.* 2016;128(22):3997-3997. doi: 10.1182/blood.v128.22.3997.3997
  69. Prabhu VV, Morrow S, Rahman Kawakibi A, et al. ONC201 and imipridones: anti-cancer compounds with clinical efficacy. *Neoplasia (United States).* 2020;22(12):725-744. doi:10.1016/j.neo.2020.09.005
  70. Gatti-Mays M, Greer Y, Steinberg S, et al. Abstract OT2-07-04: a phase 2 study of ONC201 in recurrent/refractory metastatic breast cancer and advanced endometrial carcinoma. In: *Cancer Research. Vol 78.* American Association for Cancer Research (AACR); 2018: OT2-07-04-OT2-07-04. doi:10.1158/1538-7445.sabcs17-ot2-07-04
  71. Stein MN, Bertino JR, Kaufman HL, et al. First-in-human clinical trial of oral ONC201 in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2017;23(15):4163-4169. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2658
  72. Tu Y, sheng He J, Liu H, et al. The imipridone ONC201 induces apoptosis and overcomes chemotherapy resistance by up-regulation of Bim in multiple myeloma. *Neoplasia (United States).* 2017;19(10):772-780. doi:10.1016/j.neo.2017.07.009
  73. Leng ZG, Lin SJ, Wu ZR, et al. Activation of DRD5 (dopamine receptor D5) inhibits tumor growth by autophagic cell death. *Autophagy.* 2017;13(8):1404-1419. doi:10.1080/15548627.2017.1328347
  74. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(1):1-31. doi:10.1038/s41572-019-0111-2
  75. Sarkar C, Chakroborty D, Chowdhury UR, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2008;14(8): 2502-2510. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1778
  76. Velasco-Velázquez MA, Velázquez-Quesada I, Vásquez-Bochm LX, Pérez-Tapia SM. Targeting breast cancer stem cells: a methodological perspective. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019;14(5): 389-397. doi:10.2174/1574888x13666180821155701
  77. Zhang C, Gong P, Liu P, Zhou N, Zhou Y, Wang YI. Thioridazine elicits potent antitumor effects in colorectal cancer stem cells. *Oncol Rep.* 2017;37(2):1168-1174. doi:10.3892/or.2016.5313
  78. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
  79. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, et al. Non-small-cell lung cancer. In: *The Lancet, Vol 378.* Elsevier BV; 2011:1727-1740. doi:10.1016/S0140-6736(10)62101-0
  80. Campa D, Zienolddiny S, Lind H, et al. Polymorphisms of dopamine receptor/transporter genes and risk of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2007;56(1):17-23. doi:10.1016/j.lungcan.2006.11.007
  81. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019; 16(10):589-604. doi:10.1038/s41575-019-0186-y
  82. Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, Saito K, Uemura Y, Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015;21(37):10573-10583. doi:10.3748/wjg.v21.i37.10573
  83. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 2019;36:70-87. doi:10.1016/j.blre.2019.04.005

84. Chakroborty D, Sarkar C, Mitra RB, Banerjee S, Dasgupta PS, Basu S. Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004;10(13):4349-4356. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0059
85. Gemignani F, Landi S, Moreno V, et al. Polymorphisms of the dopamine receptor gene DRD2 and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(7):1633-1638.
86. Murphy G, Cross AJ, Sansbury LS, et al. Dopamine D2 receptor polymorphisms and adenoma recurrence in the polyp prevention trial. *Int J Cancer.* 2009;124(9):2148-2151. doi:10.1002/ijc.24079
87. Sanomachi T, Suzuki S, Kuramoto K, et al. Olanzapine, an atypical antipsychotic, inhibits survivin expression and sensitizes cancer cells to chemotherapeutic agents. *Anticancer Res.* 2017; 37(11):6177-6188. doi:10.21873/anticancerres.12067

## Reporter gene systems for the identification and characterization of cancer stem cells

Nohemí Salinas-Jazmín, Arely Rosas-Cruz, Marco Velasco-Velázquez

**ORCID number:** Nohemí Salinas-Jazmín 0000-0002-9870-8650; Arely Rosas-Cruz 0000-0002-0702-5118; Marco Velasco-Velázquez 0000-0001-9717-0265.

**Author contributions:** Salinas-Jazmín N, Rosas-Cruz A and Velasco-Velázquez M made substantial contributions to conception and design, compilation of published information, or interpretation of data; Salinas-Jazmín N, Rosas-Cruz A and Velasco-Velázquez M took part in drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and gave final approval of the version to be published.

**Supported by** UNAM-PAPIIT, No. IN219719 and No. IA205421; CONACYT, No. A1-S-18285.

**Conflict-of-interest statement:** Authors declare no conflict of interests for this article.

**Open-Access:** This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially,

**Nohemí Salinas-Jazmín, Arely Rosas-Cruz, Marco Velasco-Velázquez,** Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico

**Corresponding author:** Marco Velasco-Velázquez, PhD, Professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000. Cd. Universitaria, Mexico City 04510, Mexico. [marcovelasco@unam.mx](mailto:marcovelasco@unam.mx)

### Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are tumor cells that share functional characteristics with normal and embryonic stem cells. CSCs have increased tumor-initiating capacity and metastatic potential and lower sensitivity to chemo- and radiotherapy, with important roles in tumor progression and the response to therapy. Thus, a current goal of cancer research is to eliminate CSCs, necessitating an adequate phenotypic and functional characterization of CSCs. Strategies have been developed to identify, enrich, and track CSCs, many of which distinguish CSCs by evaluating the expression of surface markers, the initiation of specific signaling pathways, and the activation of master transcription factors that control stemness in normal cells. We review and discuss the use of reporter gene systems for identifying CSCs. Reporters that are under the control of aldehyde dehydrogenase 1A1, CD133, Notch, Nanog homeobox, Sex-determining region Y-box 2, and POU class 5 homeobox can be used to identify CSCs in many tumor types, track cells in real time, and screen for drugs. Thus, reporter gene systems, in combination with *in vitro* and *in vivo* functional assays, can assess changes in the CSCs pool. We present relevant examples of these systems in the evaluation of experimental CSCs-targeting therapeutics, demonstrating their value in CSCs research.

**Key Words:** Cancer; Gene reporter systems; Cancer stem cells; Pluripotency transcription factors; Anticancer drugs; Preclinical analysis; Cancer stem cells marker

©The Author(s) 2021. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core Tip:** Controversial cancer stem cells (CSCs) research has caused confusion in this discipline. CSCs should be analyzed based on their function with regard to their ability to generate serially transplantable tumors. However, such evaluations are expensive

and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Invited manuscript

**Specialty type:** Oncology

**Country/Territory of origin:** Mexico

**Peer-review report's scientific quality classification**

Grade A (Excellent): 0  
Grade B (Very good): B, B  
Grade C (Good): 0  
Grade D (Fair): 0  
Grade E (Poor): 0

**Received:** March 8, 2021

**Peer-review started:** March 8, 2021

**First decision:** March 29, 2021

**Revised:** April 19, 2021

**Accepted:** July 5, 2021

**Article in press:** July 5, 2021

**Published online:** July 26, 2021



and time-consuming and are fraught with ethical issues. Gene reporter assays can be used as a surrogate measure of the presence of CSCs in a sample. When combined with immunophenotyping and functional assays, reporter systems improve the quality of the evidence. However, there is no standard system; thus, the selection of an appropriate system must carefully consider its utility in previous works for the tumor type that is to be analyzed.

**Citation:** Salinas-Jazmin N, Rosas-Cruz A, Velasco-Velázquez M. Reporter gene systems for the identification and characterization of cancer stem cells. *World J Stem Cells* 2021; 13(7): 861-876

**URL:** <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v13/i7/861.htm>

**DOI:** <https://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v13.i7.861>

## INTRODUCTION

Cancer stem cells (CSCs) constitute a small population in the heterogeneous tumor mass and have characteristics and functions of cancer cells and stem cells. In addition to the hallmark alterations of cancer cells, CSCs have the capacity to self-renew and generate a pool of transit-amplifying cells that produce tumor-bulk cells. Accordingly, CSCs can seed tumors when transplanted into immunocompromised or syngeneic animals. Also, CSCs mediate metastasis and the resistance to cytotoxic treatments, including radio- and chemotherapy, leading to minimal residual disease and cancer relapse[1-4].

CSCs differ from tumor-bulk cells with regard to phenotype and function. CSCs have a different gene expression profile and, thus, differentially expressed proteins that can be used as markers. CSCs are quiescent, and when they proliferate, they frequently undergo asymmetric cell division. The gene expression and consequent functional characteristics of CSCs are regulated in part by several key transcription factors that control stemness in embryonic and adult stem cells, including POU class 5 homeobox 1 (POU5F1; OCT4), Nanog homeobox (NANOG), Sex-determining region Y-box 2 (SOX2), Kruppel-like factor 4 (KLF4), and MYC proto-oncogene [5,6].

CSCs have been proposed to be the "seeds" for tumor initiation and development, metastasis, and recurrence in many tumors, based on their ability to repopulate tumor heterogeneity[2,7]. Given their critical function in tumor progression and clinical importance, many strategies for identifying CSCs have been described, including the quantification of the fraction of cancer cells that express markers that are associated with the CSCs phenotype; evaluation of the ability of cancer cells to form colonies *in vitro*; and assessment of their tumor-initiating potential in xenograft models, the gold standard approach for examining CSCs[8-10].

CSCs are identified by immunophenotyping by analyzing the expression of cell-surface markers. Although this approach is used extensively, it has limited specificity, because dissimilar markers might be expressed in CSCs from disparate tumor subtypes and, in some cases, even between samples of the same subtype[7,11]. Conversely, analyzing tumor-initiating capacity by limiting-dilution xenotransplantation (LDX) is expensive and time-consuming and requires many animals, posing an ethical dilemma for researchers. Further, LDX is unsuitable for high-throughput drug screening[9,12,13].

To supplement existing tools for identifying, isolating, and characterizing CSCs, several reporter gene systems have been developed, having proven to be useful in substituting or complementing the identification of CSCs by immunophenotyping[14, 15]. Reporter gene systems have become essential tools in analyzing the contribution of CSCs to cancer progression and developing CSCs-selective therapies. In this report, we provide integral information on the advantages and drawback of reporter gene systems for analyzing and studying CSCs. In addition, we review and discuss their use in the development of CSCs-targeting drugs, providing specific examples.

### The use of biomarkers in analyzing CSCs

The classical strategy for identifying, analyzing, isolating, and enriching CSCs entails the analysis of cell surface markers that are differential expressed between CSCs and non-CSCs[16-19]. The first CSCs markers were identified in acute myelogenous

leukemia (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>)[20]. Subsequently, markers that are shared between CSCs and normal human stem cells have been used to identify self-renewing CSCs in solid tumors (see[7,11] for reviews).

Immunophenotyping is widely used because it is easy and fast, and can be performed without special training. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) and magnetic-activated cell sorting (MACS) with surface markers are the primary strategies for isolating CSCs[21]. FACS can sort by multiple biomarkers simultaneously, has robust specificity, and can be combined with other strategies to analyze the functional characteristics of CSCs, such as fluorescence screening of Hoechst 33342 exclusion[22]. However, FACS requires sterile conditions, and cell sorting is stressful to cells, which can impact their behavior. Further, given that CSCs are a rare population, their sorting requires an excessive number of cells, leading to high experimental costs, and treating cell cultures with trypsin can affect their expression of surface markers[8,23,24].

MACS is a simple antibody-based separation technique that does not require specialized equipment; however, the number of biomarkers that can be used is limited, and thus, it might be unsuitable for complex CSCs immunophenotypes. The resulting purity is typically higher with FACS, but cell survival rates are better with MACS[14]. Both methods are invaluable in CSCs immunophenotyping. For example, leukemia stem cells have been able to be isolated and characterized by FACS[20,25].

However, the expression of CSCs surface markers depends on the type of tumor and the cell of tumor origin, showing heterogeneity between samples[26]. Thus, the immunophenotype of CSCs from a particular tumor can not be applied to all samples. Moreover, the expression of CSC surface markers can change over time or become susceptible to culture conditions[23,24]. For example, enzymatic dissociation of glioblastoma cells modifies the retention of CD133 at their surface[23], and in “stem-like” pancreatic cancer cells, CD133 is upregulated under hypoxic culture conditions [24]. In addition, the use of different commercial monoclonal antibodies (each with a different specificity) complicates the reproducibility of results[15,27]. Given these caveats, surface marker profiles of CSCs are frequently inconsistent between cancer types. Thus, immunophenotyping alone is considered to be insufficient to demonstrate changes in the CSCs pool and has limited use in developing new prognostic and therapeutic options for cancer[11,28,29].

To overcome these issues, non-membrane CSCs biomarkers have been identified, the most prominent of which is aldehyde dehydrogenase (ALDH). ALDH1 catalyzes the oxidation of aldehydes to carboxylic acids and retinol to retinoic acid, allowing detoxification from drugs and reactive oxygen species[30,31]. ALDH is expressed by normal stem cells, and high levels of ALDH1 activity are observed in CSCs, representing a reliable biomarker for identifying this subset of cells in tumors from many tissues, including breast, bladder, embryonal rhabdomyosarcoma, head and neck squamous cell carcinoma, and lung cancer[30]. Higher ALDH1 expression confers resistance to several chemotherapeutic agents, such as cisplatin, etoposide, fluorouracil, and gefitinib[32]. The selection of a population of interest must be based on the expression levels of the enzyme in the tumor cells, given the heterogeneity in CSCs phenotype between tumors[11]. For example, in breast tumors, 2 subpopulations of CSCs have been identified, but only one is ALDH<sup>+</sup>[33]. Thus, it is possible that different methods enrich distinct subpopulations of CSCs.

ALDH-based staining is also transient and depends on the presence of its substrate, rendering the system suitable only for a limited period[34,35]. To mitigate these disadvantages, Anorma *et al*[34] developed and tested a turn-on fluorescent probe (AIDeSense) *in vitro* and *ex vivo*. The methyl acetate (MA) group of AIDeSense MA is hydrolyzed by an intracellular esterase to form AIDeSense, and its aldehyde group is then oxidized to carboxylic acid by ALDH1A1 in CSCs, emitting fluorescence. The authors observed a 3-fold increase in fluorescence in spheres that were formed by purified CSCs. For the *ex vivo* evaluation, they analyzed the lungs of mice that had been injected intravenously with CSCs or non-CSCs through the tail vein to generate metastases. When the lungs were perfused with AIDeSense solution, the signal in the lungs from CSCs-injected mice was higher than in non-CSCs-injected mice. When AIDeSense was injected intratumorally, intratumoral CSCs could be observed *in vivo* using a whole-body fluorescence imager-but only for 2 weeks postimplantation.

These limitations and the need to track CSCs *in vivo* during metastasis, angiogenesis, and CSC-stroma interactions, have prompted the development of new tools, including reporter gene systems.

## REPORTER GENE SYSTEMS TO STUDY CSCs

A reporter gene system comprises an easily detectable reporter gene and a regulatory complex of transcriptional control (promoters or enhancers that are constitutive or inducible). The expression of the reporter gene reflects the direct activation of the latter in response to the binding of transcription factors to response elements. Reporters that are under constitutive promoters are used primarily to track cells that have been transduced with the construct[36]. Conversely, inducible reporters are used to monitor biological processes. When a reporter gene construct includes transcriptional control components, it functions as a molecular-genetic sensor that responds to endogenous transcription factors and transcription-regulating complexes that initiate and control reporter gene expression[36,37].

The design and development of reporting systems to analyze such properties as phenotypic plasticity and response to therapy require expertise in genetic engineering [36,38,39]. Moreover, because reporter systems are usually designed to trigger the expression of fluorescent proteins, the incorporation of additional fluorescent dyes into the experiment should be planned carefully to prevent cross-contamination between the signals. Fortunately, there are various fluorescent proteins with a range of excitation and emission spectra (from blue to far red) and distinct structural properties and stability. The selection of the fluorescent protein must also consider its maturation time and half-life in the cell to match the desired application[36,37,40,41]. Alternatively, bioluminescent reporter genes with increased sensitivity can be used for *in vivo* applications[36]. The combination of luciferase genes with fluorescent protein-coding genes into a single sequence has provided an additional tool for analyzing cell populations *in vivo* and *ex vivo*, because this strategy allows 2 signals to be monitored independently[36,37].

In CSCs research, reporter gene systems have many advantages, because they allow live detection and isolation of CSCs from several tumor types. Further, these systems can be combined (simultaneously or sequentially) with other methods that analyze cell viability or the expression of other biomarkers, strengthening the distinction of CSCs *vs* non-CSCs and increasing the reliability of the evaluation of effects of stimuli on either population.

However, the value of a particular reporter gene systems in tracking a particular type of CSCs is directly proportional to its validation using *in vitro* and *in vivo* functional assays. Several reporting systems have been used to identify CSCs from various tumors (Table 1) and have thus become important tools for the study of CSCs biology[12,42-45].

### Reporter gene systems based on CSCs biomarkers

As discussed, CSCs can be characterized by their expression of various differential markers, including: (1) Cell surface proteins, such as CD133; (2) Enzymes, such as ALDH1; and (3) Transcription factors[7,11]. Many reports support that self-renewal markers, including ALDH1A1, POU5F1, and SOX2, reliably distinguish CSCs several cancers[29,38,46,47]. However, because these molecules are intracellular, antibody-based screens are not compatible with functional assays.

To overcome this limitation, reporter systems that are based on ALDH1A1 expression have been developed by cloning fluorescent proteins under the control of the ALDH1A1 promoter[29,31,35]. These systems have been used to identify CSCs in breast cancer[31,35], colon cancer[35], and oral squamous cell carcinoma[29]. They can live track CSCs, allowing one to study CSCs dynamics in their microenvironment, increasing our understanding of CSCs involvement in the formation of metastases, resistance to therapy, and cancer recurrence. For example, a fluorescent reporter system that is based on control of the fusion protein mNeptune-TK by the ALDH1A1 promoter was used to identify a population (mNeptune<sup>high</sup>) in breast cancer cells that were pluripotent, had high sphere-forming capacity, and were more resistant to chemotherapy and radiotherapy[31]. These mNeptune<sup>high</sup> cells were more tumorigenic in immunodeficient mice and generated highly resistant tumors. The reporter system efficiently identified and tracked CSCs in several luminal and mesenchymal breast cancer cell lines[31] and thus might be useful in studying CSCs dynamics in tumors.

A different approach exploits the finding that the glycoprotein CD133 is a CSCs surface marker in various cancers, including breast[11,48], colon[11,49], lung[11], and brain[11,16]. A reporter system that is based on CD133 expression has been developed and used to detect CSCs. Guerra-Rebollo *et al*[16] transduced human glioblastoma U87 tumor cells with a trifunctional chimeric reporter that expresses *Renilla reniformis* luciferase, red fluorescent protein, and a truncated version of the herpes simplex virus thymidine kinase sr39tk (tTK), driven by the CD133 promoter. This strategy allowed



Table 1 Studies using reporter system based on known cancer stem cells biomarkers

Promoter gene/element response	Reporter gene	Tumor type	Functional assays performed for validation
ALDH	Far red fluorescent protein (mNeptune)	Breast cancer[31]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Reprogramming of non-CSCs to CSCs after cytotoxic treatments Extravasation potential Drug sensitivity <i>in vivo</i>
	tdTomato fluorescent protein	Breast and colon cancer[35]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vivo</i>
	DsRed2 fluorescent protein	Oral squamous cell carcinoma[29]	Sphere formation Xenotransplantation assays Drug sensitivity <i>in vitro</i>
CD133	Luciferase/RFP	Glioma[16]	Sphere formation Transactivation assay Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vivo</i> Drug sensitivity <i>in vitro</i>
AFP	GFP	Liver (cholangiocarcinoma) [94]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vitro</i>
		Pancreatic cancer[95]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vitro</i>
Notch	GFP	Breast cancer[51]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vivo</i>
	Luminescent protein	Lung cancer[52]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vivo</i> Drug sensitivity <i>in vitro</i>
TERT	GFP	Osteosarcoma[53]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Extravasation potential Drug sensitivity <i>in vitro</i>
s-SHIP	GFP	Prostate cancer[96]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vitro</i>
DACH1	GFP	Breast cancer[97,98]	Sphere formation Xenotransplantation assay Transactivation assay

LGR5	GFP	Colorectal cancer[99]	Sphere formation Gene expression profiling of flow-sorted cells
------	-----	-----------------------	--

ALDH: Aldehyde dehydrogenase; AFP: Alpha-fetoprotein; TERT: Telomerase reverse transcriptase; s-SHIP: Stem-SH2-domain-containing 5'-inositol phosphatase; LGR5: G-protein-coupled receptor 49, Gpr49; GFP: Green fluorescent protein; RFP: Red fluorescent protein.

them to independently monitor the entire tumor population or tumor cell subpopulations with an active CD133 promoter by bioluminescence imaging or confocal microscopy[16]. When culturing U87 cells that were transduced with this reporter, an increase in the formation of tumorspheres was observed. The expression of the tTK gene from the construct selectively killed replicating cells with an active CD133 promoter on treatment with ganciclovir[16].

Other reporter systems center on the activation of specific signaling pathways in CSCs. The Notch pathway, which maintains pluripotent hematopoietic stem cells by inhibiting their differentiation, is specifically involved in preserving self-renewal and amplification in CSCs, supporting tumor formation and mediating resistance to chemotherapeutic agents and recurrence in various tumor types[50]. However, the function and activity of Notch signaling is context-dependent in many tumors[49] and thus can not be considered a universal marker for CSCs. The use of reporter genes that respond to Notch signaling has facilitated the identification of a subset of cells with stem cell activity in breast[51] and lung cancer[52], in which the function of Notch signaling has been examined extensively. These reporter systems detect and monitor CSCs *in vitro* and *in vivo*, allowing the study of drug resistance in diverse experimental models. Hassan *et al*[52] used a Notch-green fluorescent protein (GFP) reporter construct that is activated when Notch intracellular domain translocate to the nucleus. They identified a subset of lung cancer cells with high Notch activity (GFP<sup>bright</sup>) with increased ability to form tumorspheres and generate GFP<sup>bright</sup> and GFP<sup>dim</sup> cell populations. Similarly, GFP<sup>bright</sup> cells were resistant to chemotherapy and tumorigenic in serial xenotransplantation assays, demonstrating that only cells with active Notch signaling could self-renew[52].

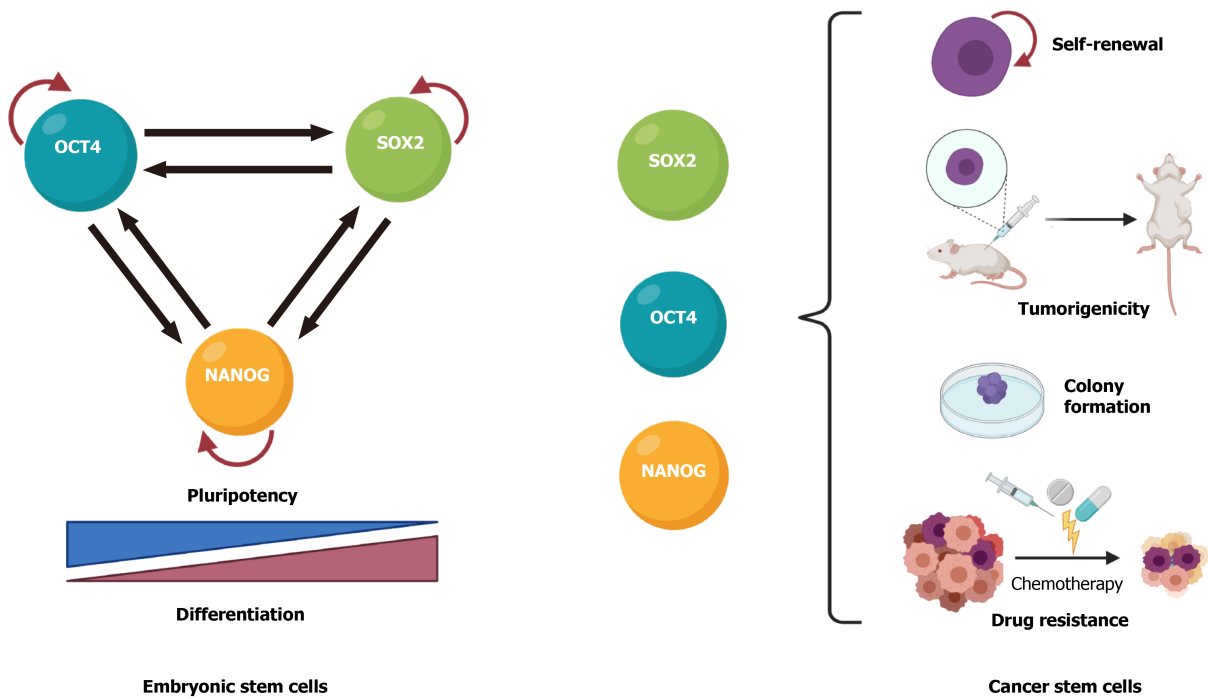
Another reporter gene system has been developed to detect CSCs, in which GFP is driven by the telomerase reverse-transcriptase (TERT) promoter, successfully enriching human osteosarcoma stem cells[53]. These GFP<sup>+</sup> cells had greater sphere-forming ability and enhanced stem cell-like properties, such as invasiveness, metastatic activity, and resistance to chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo*[53]. Further, the subpopulation in which the hTERT promoter was activated had significantly higher tumorigenic activity *in vivo*. In orthotopic and ectopic transplantations, the GFP<sup>+</sup> cells consistently formed tumors at a lower number of injected cells; these tumors were phenotypically diverse and could initiate new tumors after serial transplantation[53]. However, certain osteosarcoma cell lines and two-thirds of clinical osteosarcoma samples are telomerase-negative, rendering TERT-dependent labeling unsuitable for some patients.

### Reporter gene systems based on CSCs transcription factors

The transcription factors that regulate stemness in normal stem cells are also involved in cancer progression and CSC biology. In mouse embryonic stem cells, these factors form interconnected feed-forward transcriptional loops to establish and reinforce cell type-specific gene expression programs[54,55] (Figure 1A). The ensemble of core transcription factors and their regulatory loops constitutes core transcriptional regulatory circuitry in many signaling pathways that regulate CSCs functions[56] (Figure 1B).

High expression of OCT4 correlates with self-renewal, chemoresistance, and tumorigenic potential of bladder, breast, and glial cells[57-59] and an unfavorable prognosis in cervical, breast, and esophageal squamous cancers[58,60,61]. SOX2 is important in maintaining self-renewal and tumorigenesis and inhibiting differentiation in CSCs from melanoma, lung adenocarcinoma, and lymphoma tissue[62-64], and its elevated expression correlates positively with drug resistance and poor survival in prostate, breast, and glioma cancer patients[65-69]. Overexpression of NANOG in CSCs promotes tumorigenicity by regulating self-renewal and proliferation in prostate, ovarian, and head and neck squamous cells[4,70-72] and is an unfavorable prognostic marker in colorectal, renal, and rectal cancer patients[73-75]. KLF4 is a bifunctional transcription factor that can be an oncogenic or tumor suppressor signal, depending on the type of cancer[76]; lower KLF4 expression





**Figure 1 The pluripotency transcription factors POU class 5 homeobox 1, Sex-determining region Y box-2 and Nanog homeobox control stemness.** A: In embryonic stem cells, POU class 5 homeobox 1, Sex-determining region Y box-2 and Nanog homeobox form a transcription network that maintain pluripotency and inhibits differentiation. B: In cancer cells, those transcription factors play key roles in controlling the functional characteristics that define cancer stem cells. OCT4: POU class 5 homeobox 1; SOX2: Sex-determining region Y box-2; NANOG: Nanog homeobox.

contributes to cellular hyperproliferation and malignant transformation in meningioma and prostate cancer[77,78], but upregulation of KLF4 promotes tumor progression in osteosarcoma, breast, and gastrointestinal cancer[79-81]. MYC is usually dysregulated in human cancers, in which it cooperates with other factors during tumorigenesis and promotes invasiveness in CSCs[7,82,83].

Based on their relevance in cancer progression, pluripotent stem cell transcription factors have been used to develop reporter gene systems that are based on their promoters (Table 2). Several promoter-reporter constructs that incorporate portions of the *Oct4*, *Sox2*, and *Nanog* promoters have been used widely to monitor the reprogramming of murine somatic cells into an induced pluripotent state[38]. However, the expression levels of these transcription factors might be lower in CSCs and vary significantly between samples[84-88]. Moreover, the large promoter regions that are used in such constructs invariably contain response elements for other transcription factors, potentially reducing reporter specificity, limiting their application in identifying CSCs. Further, some of these genes, such as *Oct4*, have alternate transcripts and pseudogenes, complicating their detection[38,39].

Thus, systems that use reporter genes under the transcriptional control of promoters that are active specifically in human CSCs have been generated[15,35]. For example, a GFP reporter that is driven by the NANOG promoter was developed to enrich and track ovarian CSCs[72,89]. Wiechert *et al*[89] introduced this reporter into cisplatin-naïve, high-grade, serous ovarian cancer patient-derived xenografts and ovarian cancer cell lines. GFP<sup>+</sup> cells expressed higher levels of stem cell transcription factors (NANOG, SOX2, and POU5F1) and CSC surface markers (CD44, CD133, CD117, CD49f, and CD24) and showed increased tumor-initiating potential. GFP<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup> patient-derived cells were enriched using the reporter system and CD49f staining. Further, the reporter system allowed the group to visualize dynamic changes in stemness in response to cisplatin treatment and to analyze the self-renewing capacity of cisplatin resistant cells[89].

Another example is a lentiviral reporter system, called SORE6, that was developed by Tang *et al*[38]. The system comprises 6 concatenated repeats of the SOX2 and OCT4 response elements from the proximal human NANOG promoter, controlling the expression of reporter genes (GFP or mCherry). This tool was validated *in vitro* and *in*

Table 2 Studies using reporter system based on CSCs transcription factors.

Promoter gene/element response	Reporter gene	Tumor type	Functional assays performed for validation		
NANOG	GFP; Luminescent protein	Breast cancer[100]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Extravasation potential <i>In vitro</i> limiting-dilution assays		
		Breast cancer[98]	Transactivation assay		
		Prostate cancer[70]	Sphere formation Extravasation potential Drug sensitivity <i>in vitro</i> Limiting-dilution xenotransplantation		
		Nasopharynx cancer [101]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Extravasation potential Drug sensitivity <i>in vivo</i> Drug sensitivity <i>in vitro</i>		
		Liver (hepatocellular carcinoma)[45]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Extravasation potential Drug sensitivity <i>in vitro</i>		
		Ovary cancer[89]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vitro</i>		
		Ovary cancer[72]	Sphere formation Xenotransplantation assay Drug sensitivity <i>in vitro</i> Extravasation potential		
		SOX2	tdTomato fluorescent protein/ Luminescent protein; GFP; Luminescent protein	Breast cancer[17]	Sphere formation
				Breast cancer[102]	Sphere formation
				Breast cancer[43]	Sphere formation Drug sensitivity <i>in vitro</i> Transactivation assay
				Breast cancer[98]	Transactivation assay
				Glioma[46]	Sphere formation Xenotransplantation assay <i>In vitro</i> limiting-dilution assays
				Skin cancer[103]	Limiting-dilution xenotransplantation Drug sensitivity <i>in vivo</i>
				Cervical cancer[104]	Sphere formation Limiting-dilution xenotransplantation
				Cervical cancer[105]	Sphere formation Transactivation assay

OCT4	GFP; Luminescent protein	Thyroid cancer[106]	Transactivation assay
		Teratomas from neoplastic hPSCs[12]	Transactivation assay
			Drug sensitivity <i>in vivo</i>
			Progenitor assays (clonogenic and multilineage hematopoietic differentiation)
		Liver (hepatocellular carcinoma)[47]	Sphere formation
			Limiting-dilution xenotransplantation
		Melanoma[92]	Drug sensitivity <i>in vitro</i>
			Sphere formation
			Xenotransplantation assay
		Sarcoma[18]	Xenotransplantation assay
Drug sensitivity <i>in vitro</i>			
Drug sensitivity <i>in vivo</i>			
Breast cancer[43]	Sphere formation		
	Drug sensitivity <i>in vitro</i>		
	Transactivation assay		
Teratomas from neoplastic hPSCs[12]	Transactivation assay		
	Drug sensitivity <i>in vitro</i>		
	Progenitor assays (clonogenic and multilineage hematopoietic differentiation)		
SOX2-OCT4	GFP; mCherry fluorescent protein; Luminescent protein; Luminescent protein/RFP	Breast cancer[38]	Sphere formation
			Limiting-dilution xenotransplantation
			Drug sensitivity <i>in vitro</i>
		Sarcoma[42]	Sphere formation
			Limiting-dilution xenotransplantation
			Drug sensitivity <i>in vitro</i>
		Prostate cancer[107]	Sphere formation
			Limiting-dilution xenotransplantation
			Drug sensitivity <i>in vivo</i>
		Gastric cancer[44]	Drug sensitivity <i>in vitro</i>
			Sphere formation
			Limiting-dilution xenotransplantation
		Malignant mesothelioma [108]	Drug sensitivity <i>in vitro</i>
			Sphere formation
			Limiting-dilution xenotransplantation
		Head and neck squamous cancer[109]	Drug sensitivity <i>in vitro</i>
Sphere formation			
Limiting-dilution xenotransplantation			
Glioma[16]	Drug sensitivity <i>in vitro</i>		
	Sphere formation		
	Transactivation assay		
	Limiting-dilution xenotransplantation		
	Drug sensitivity <i>in vitro</i>		

hPSCs: Human pluripotent stem cells; GFP: Green fluorescent protein; RFP: Red fluorescent protein

*in vivo* in several models of breast cancer, tracking self-renewal, the generation of heterogeneous offspring, tumor- and metastasis-initiating activity, CSCs plasticity, and the response to therapeutics in real time. SORE6<sup>+</sup> cells underwent asymmetrical cell division, generated SORE6<sup>-</sup> cells, and initiate tumors in serial transplantation, demonstrating that they have tumor-initiating ability and long-term self-renewal[38]. However, no CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells (the subset commonly reported as breast CSCs) were enriched in the SORE6<sup>+</sup> fraction, and there was no overlap with the ALDH1-positive population, suggesting that heterogeneity exists even within stem cell populations, as published[90]. Thus, CSCs detection with SORE6 in breast cancer is more robust than with typical biomarkers, rendering the system ideal for the preclinical evaluation of new drugs.

These examples indicate that systems that report the expression and activity of NANOG, SOX2, and OCT4 are valuable tools for studying CSCs, accelerating the development of more efficient and specific reporter systems and transgene delivery strategies. As discussed, the validation of such systems will require extensive and meticulously planned preclinical testing.

## USE OF REPORTER GENE SYSTEMS IN THE EVALUATION OF NEW THERAPIES

The number of CSCs affects tumor progression, disease recurrence, promotion of angiogenesis, evasion of the immune system, and resistance to conventional anticancer therapies[1,2,18,91]. Increased CSC content in a tumor has also been associated with a more aggressive form and metastatic type[10,33,92,93]. Although certain therapeutic agents that target CSCs have been described[1,10,11,28], it is evident that new selective treatments should be developed. Several studies have demonstrated the value of reporter gene systems in identifying drugs that target CSCs and determining their mechanisms of action (Table 2). For example, the combination of reporting systems with cell viability-tracking dyes can distinguish agents that induce differentiation and the loss of self-renewing pluripotency *vs* those cause direct cytotoxicity.

In sarcomas, stemness is coordinated by the expression of the pluripotency factor SOX2. Accordingly, the SORE6 reporter system has been used to study the response of CSCs to therapeutics agents in patient-derived cell lines from undifferentiated pleomorphic sarcoma[42]. The simultaneous analysis of SORE6 and caspase-3 activation identified the differential mechanism that was associated with the ability of trabectedin and EC-8042 to reduce the CSC fraction. Trabectedin is an efficient inducer of apoptosis in SORE6<sup>+</sup> and SORE6<sup>-</sup> cells, but EC-8042 reduces the percentage of SORE6<sup>+</sup> cells before the apoptotic effect becomes evident, suggesting that EC-8042 switches off SORE6-related transcriptional activity and CSC-associated properties[42].

Similarly, Pádua *et al*[44] used the SORE6 reporter system to characterize CSCs from gastric cancer and evaluate small molecules in a high-throughput screen[44]. SORE6<sup>+</sup> gastric cancer cells from the AGS and Kato III cell lines underwent increased sphere formation and tumorigenicity. Kato III SORE6<sup>+</sup> cells had higher levels of ALDH1 compared with SORE6<sup>-</sup> cells, but AGS cells did not express ALDH1. No other CSC-marker was enriched in SORE6<sup>+</sup> cells from either cell line, consistent with several reports that have demonstrated that stemness transcription factors are better markers of CSCs. In the same work, the authors screened 1200 compounds from the Prestwick chemical library in SORE6<sup>+</sup> or SORE6<sup>-</sup> cells and observed that monensin induces a reduction in cell number selective towards the SORE6<sup>+</sup> population[44]. Given that SORE6<sup>+</sup> cells are resistant to 5-FU, the identification of monensin as a gastric CSC-targeting drug might guide the development of future adjuvant therapies.

These examples, with those in Table 2, demonstrate that the transcriptional activity of pluripotency transcription factors can be used as a marker of CSCs in various tumor types. Thus, reporter systems can be implemented as a core component of analyses that identify compounds and molecules that target CSCs.

## CONCLUSION

In summary, the appropriate selection of a gene reporter system eliminates common obstacles in the CSCs research, based on their ability to:

Allow direct quantification and isolation of cells with CSCs properties in preclinical tumor models and freshly excised tumors.

Track cells in time and space (*in vitro* and *in vivo*) in the analysis of CSCs niches, interactions between CSCs and their microenvironment, and interactions with neighboring cells.

Circumvent direct cell staining procedures and avoid issues with label dilution phenomena.

Track functional properties of CSCs, such as their phenotypic plasticity.

Identify selective agents that target CSCs and could be useful for preclinical testing of anticancer drugs with high sensitivity.

Lastly, it is expected that new reporter gene systems will be generated in the coming years, after the identification of additional CSCs-specific promoters and response elements. Those reporter gene systems could be combined with genetic-editing strategies, such as the CRISPR/Cas9 system, to improve their specificity and reliability by reducing genomic instability due to the integration of indirect genetic markers through viral vectors.

## REFERENCES

- 1 **Zeng X**, Liu C, Yao J, Wan H, Wan G, Li Y, Chen N. Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 2021; **163**: 105320 [PMID: 33271295 DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105320]
- 2 **Huang T**, Song X, Xu D, Tiek D, Goenka A, Wu B, Sastry N, Hu B, Cheng SY. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics* 2020; **10**: 8721-8743 [PMID: 32754274 DOI: 10.7150/thno.41648]
- 3 **Zakrzewski W**, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* 2019; **10**: 68 [PMID: 30808416 DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5]
- 4 **Pedregal-Mallo D**, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Montoro-Jiménez I, Allonca E, Pozo-Agundo E, Álvarez-Fernández M, Álvarez-Marcos C, García-Pedrero JM, Rodrigo JP. Prognostic Significance of the Pluripotency Factors NANOG, SOX2, and OCT4 in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)* 2020; **12**: 1794 [PMID: 32635524 DOI: 10.3390/cancers12071794]
- 5 **Neph S**, Stergachis AB, Reynolds A, Sandstrom R, Borenstein E, Stamatoyannopoulos JA. Circuitry and dynamics of human transcription factor regulatory networks. *Cell* 2012; **150**: 1274-1286 [PMID: 22959076 DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.040]
- 6 **Boyer LA**, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; **122**: 947-956 [PMID: 16153702 DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.020]
- 7 **Yang L**, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, Zhang G, Wang X, Dong Z, Chen F, Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2020; **5**: 8 [PMID: 32296030 DOI: 10.1038/s41392-020-0110-5]
- 8 **Liu L**, Borlak J. Advances in Liver Cancer Stem Cell Isolation and their Characterization. *Stem Cell Rev Rep* 2021; epub ahead of print [PMID: 33432485 DOI: 10.1007/s12015-020-10114-6]
- 9 **Velasco-Velázquez MA**, Velázquez-Quesada I, Vásquez-Boehm LX, Pérez-Tapia SM. Targeting Breast Cancer Stem Cells: A Methodological Perspective. *Curr Stem Cell Res Ther* 2019; **14**: 389-397 [PMID: 30147014 DOI: 10.2174/1574888X13666180821155701]
- 10 **Agliano A**, Calvo A, Box C. The challenge of targeting cancer stem cells to halt metastasis. *Semin Cancer Biol* 2017; **44**: 25-42 [PMID: 28323021 DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.03.003]
- 11 **Walcher L**, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dlucecz S, Strauß A, Blandszun AR, Yevsa T, Fricke S, Kossatz-Boehlert U. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* 2020; **11**: 1280 [PMID: 32849491 DOI: 10.3389/fimmu.2020.01280]
- 12 **Sachlos E**, Risueño RM, Laronde S, Shapovalova Z, Lee JH, Russell J, Malig M, McNicol JD, Fiebig-Comyn A, Graham M, Levadoux-Martin M, Lee JB, Giacomelli AO, Hassell JA, Fischer-Russell D, Trus MR, Foley R, Leber B, Xenocostas A, Brown ED, Collins TJ, Bhatia M. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell* 2012; **149**: 1284-1297 [PMID: 22632761 DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.049]
- 13 **Gupta PB**, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009; **138**: 645-659 [PMID: 19682730 DOI: 10.1016/j.cell.2009.06.034]
- 14 **Torre-Healy LA**, Berezovsky A, Lathia JD. Isolation, characterization, and expansion of cancer

- stem cells. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 2017: 133–143
- 15 **Saygin C**, Samour M, Chumakova A, Jarrar A, Lathia JD, Reizes O. Reporter Systems to Study Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol* 2016; **1516**: 319-333 [PMID: [27221339](#) DOI: [10.1007/7651\\_2016\\_360](#)]
  - 16 **Guerra-Rebollo M**, Garrido C, Sánchez-Cid L, Soler-Botija C, Meca-Cortés O, Rubio N, Blanco J. Targeting of replicating CD133 and OCT4/SOX2 expressing glioma stem cells selects a cell population that reinitiates tumors upon release of therapeutic pressure. *Sci Rep* 2019; **9**: 9549 [PMID: [31267022](#) DOI: [10.1038/s41598-019-46014-0](#)]
  - 17 **Liang S**, Furuhashi M, Nakane R, Nakazawa S, Goudarzi H, Hamada J, Iizasa H. Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **437**: 205-211 [PMID: [23796710](#) DOI: [10.1016/j.bbrc.2013.06.038](#)]
  - 18 **Sangiolo D**, Mesiano G, Gammaitoni L, Leuci V, Todorovic M, Giraudo L, Cammarata C, Dell'Aglio C, D'Ambrosio L, Pisacane A, Sarotto I, Miano S, Ferrero I, Carnevale-Schianca F, Pignochino Y, Sassi F, Bertotti A, Piacibello W, Fagioli F, Aglietta M, Grignani G. Cytokine-induced killer cells eradicate bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Res* 2014; **74**: 119-129 [PMID: [24356422](#) DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-13-1559](#)]
  - 19 **Auffinger B**, Tobias AL, Han Y, Lee G, Guo D, Dey M, Lesniak MS, Ahmed AU. Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ* 2014; **21**: 1119-1131 [PMID: [24608791](#) DOI: [10.1038/cdd.2014.31](#)]
  - 20 **Bonnet D**, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; **3**: 730-737 [PMID: [9212098](#) DOI: [10.1038/nm0797-730](#)]
  - 21 **de Wynter EA**, Coutinho LH, Pei X, Marsh JC, Hows J, Luft T, Testa NG. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells* 1995; **13**: 524-532 [PMID: [8528102](#) DOI: [10.1002/stem.5530130510](#)]
  - 22 **Montanaro F**, Liadaki K, Schianda J, Flint A, Gussoni E, Kunkel LM. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res* 2004; **298**: 144-154 [PMID: [15242769](#) DOI: [10.1016/j.yexcr.2004.04.010](#)]
  - 23 **Lv D**, Ma QH, Duan JJ, Wu HB, Zhao XL, Yu SC, Bian XW. Optimized dissociation protocol for isolating human glioma stem cells from tumorspheres via fluorescence-activated cell sorting. *Cancer Lett* 2016; **377**: 105-115 [PMID: [27091400](#) DOI: [10.1016/j.canlet.2016.04.022](#)]
  - 24 **Hashimoto O**, Shimizu K, Semba S, Chiba S, Ku Y, Yokozaki H, Hori Y. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology* 2011; **78**: 181-192 [PMID: [21778785](#) DOI: [10.1159/000325538](#)]
  - 25 **Al-Hajj M**, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 3983-3988 [PMID: [12629218](#) DOI: [10.1073/pnas.0530291100](#)]
  - 26 **Immervoll H**, Hoem D, Sakariassen PØ, Steffensen OJ, Molven A. Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2008; **8**: 48 [PMID: [18261235](#) DOI: [10.1186/1471-2407-8-48](#)]
  - 27 **Osmond TL**, Broadley KW, McConnell MJ. Glioblastoma cells negative for the anti-CD133 antibody AC133 express a truncated variant of the CD133 protein. *Int J Mol Med* 2010; **25**: 883-888 [PMID: [20428792](#) DOI: [10.3892/ijmm\\_00000418](#)]
  - 28 **Duan H**, Liu Y, Gao Z, Huang W. Recent advances in drug delivery systems for targeting cancer stem cells. *Acta Pharm Sin B* 2021; **11**: 55-70 [PMID: [33532180](#) DOI: [10.1016/j.apsb.2020.09.016](#)]
  - 29 **Shanmugam G**, Mohan A, Kumari K, Louis JM, Soumya Krishnan U, Balagopal PG, George NA, Sebastian P, Maliekal TT. A novel reporter construct for screening small molecule inhibitors that specifically target self-renewing cancer cells. *Exp Cell Res* 2019; **383**: 111551 [PMID: [31401066](#) DOI: [10.1016/j.yexcr.2019.111551](#)]
  - 30 **Tomita H**, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 11018-11032 [PMID: [26783961](#) DOI: [10.18632/oncotarget.6920](#)]
  - 31 **Bidan N**, Bailleul-Dubois J, Duval J, Winter M, Denoulet M, Hannebicque K, El-Sayed IY, Ginestier C, Forissier V, Charafe-Jauffret E, Macario M, Matsunaga YT, Meignan S, Anquez F, Julien S, Bonnefond A, Derhourhi M, Le Bourhis X, Lagadec C. Transcriptomic Analysis of Breast Cancer Stem Cells and Development of a pALDH1A1:mNeptune Reporter System for Live Tracking. *Proteomics* 2019; **19**: e1800454 [PMID: [31430054](#) DOI: [10.1002/pmic.201800454](#)]
  - 32 **Huang CP**, Tsai MF, Chang TH, Tang WC, Chen SY, Lai HH, Lin TY, Yang JC, Yang PC, Shih JY, Lin SB. ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Lett* 2013; **328**: 144-151 [PMID: [22935675](#) DOI: [10.1016/j.canlet.2012.08.021](#)]
  - 33 **Luo M**, Brooks M, Wicha MS. Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance. *Curr Pharm Des* 2015; **21**: 1301-1310 [PMID: [25506895](#) DOI: [10.2174/1381612821666141211120604](#)]
  - 34 **Anorma C**, Hedhli J, Bearrood TE, Pino NW, Gardner SH, Inaba H, Zhang P, Li Y, Feng D, Dibrell SE, Kilian KA, Dobrucki LW, Fan TM, Chan J. Surveillance of Cancer Stem Cell Plasticity Using an Isoform-Selective Fluorescent Probe for Aldehyde Dehydrogenase 1A1. *ACS Cent Sci* 2018; **4**:



- 1045-1055 [PMID: 30159402 DOI: 10.1021/acscentsci.8b00313]
- 35 **Gener P**, Gouveia LP, Sabat GR, de Sousa Rafael DF, Fort NB, Arranja A, Fernández Y, Prieto RM, Ortega JS, Arango D, Abasolo I, Videira M, Schwartz S Jr. Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment sensitivity of breast and colon cancer stem cells. *Nanomedicine* 2015; **11**: 1883-1892 [PMID: 26238079 DOI: 10.1016/j.nano.2015.07.009]
- 36 **Serganova I**, Blasberg RG. Molecular Imaging with Reporter Genes: Has Its Promise Been Delivered? *J Nucl Med* 2019; **60**: 1665-1681 [PMID: 31792128 DOI: 10.2967/jnumed.118.220004]
- 37 **Li M**, Wang Y, Liu M, Lan X. Multimodality reporter gene imaging: Construction strategies and application. *Theranostics* 2018; **8**: 2954-2973 [PMID: 29896296 DOI: 10.7150/thno.24108]
- 38 **Tang B**, Raviv A, Esposito D, Flanders KC, Daniel C, Nghiem BT, Garfield S, Lim L, Mannan P, Robles AI, Smith WI Jr, Zimmerberg J, Ravin R, Wakefield LM. A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells. *Stem Cell Reports* 2015; **4**: 155-169 [PMID: 25497455 DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.11.002]
- 39 **Jarrar A**, Chumakova A, Hitomi M, Lathia JD. Enrichment and Interrogation of Cancer Stem Cells. In: *Cancer Stem Cells*. Elsevier, 2016: 59-98
- 40 **Mohammadi Z**, Karamzadeh A, Tabatabaiefar MA, Khanahmad H, Shariati L. Evidence for expression of promoterless GFP cassette: Is GFP an ideal reporter gene in biotechnology science? *Res Pharm Sci* 2019; **14**: 351-358 [PMID: 31516512 DOI: 10.4103/1735-5362.263559]
- 41 **Shaner NC**, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2005; **2**: 905-909 [PMID: 16299475 DOI: 10.1038/nmeth819]
- 42 **Menendez ST**, Rey V, Martinez-Cruzado L, Gonzalez MV, Morales-Molina A, Santos L, Blanco V, Alvarez C, Estupiñan O, Allonca E, Rodrigo JP, García-Castro J, García-Pedrero JM, Rodriguez R. SOX2 Expression and Transcriptional Activity Identifies a Subpopulation of Cancer Stem Cells in Sarcoma with Prognostic Implications. *Cancers (Basel)* 2020; **12**: 964 [PMID: 32295077 DOI: 10.3390/cancers12040964]
- 43 **Vásquez-Boehm LX**, Velázquez-Paniagua M, Castro-Vázquez SS, Guerrero-Rodríguez SL, Mondragon-Peralta A, De La Fuente-Granada M, Pérez-Tapia SM, González-Arenas A, Velasco-Velázquez MA. Transcriptome-based identification of lovastatin as a breast cancer stem cell-targeting drug. *Pharmacol Rep* 2019; **71**: 535-544 [PMID: 31026757 DOI: 10.1016/j.pharep.2019.02.011]
- 44 **Pádua D**, Barros R, Amaral AL, Mesquita P, Freire AF, Sousa M, Maia AF, Caiado I, Fernandes H, Pombinho A, Pereira CF, Almeida R. A SOX2 Reporter System Identifies Gastric Cancer Stem-Like Cells Sensitive to Monensin. *Cancers (Basel)* 2020; **12**: 495 [PMID: 32093282 DOI: 10.3390/cancers12020495]
- 45 **Shan J**, Shen J, Liu L, Xia F, Xu C, Duan G, Xu Y, Ma Q, Yang Z, Zhang Q, Ma L, Liu J, Xu S, Yan X, Bie P, Cui Y, Bian XW, Qian C. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; **56**: 1004-1014 [PMID: 22473773 DOI: 10.1002/hep.25745]
- 46 **Stoltz K**, Sinyuk M, Hale JS, Wu Q, Otvos B, Walker K, Vasanji A, Rich JN, Hjelmeland AB, Lathia JD. Development of a Sox2 reporter system modeling cellular heterogeneity in glioma. *Neuro Oncol* 2015; **17**: 361-371 [PMID: 25416826 DOI: 10.1093/neuonc/nou320]
- 47 **Wu G**, Wilson G, Zhou G, Hebbard L, George J, Qiao L. Oct4 is a reliable marker of liver tumor propagating cells in hepatocellular carcinoma. *Discov Med* 2015; **20**: 219-229 [PMID: 26562475]
- 48 **Brugnoli F**, Grassilli S, Al-Qassab Y, Capitani S, Bertagnolo V. CD133 in Breast Cancer Cells: More than a Stem Cell Marker. *J Oncol* 2019; **2019**: 7512632 [PMID: 31636668 DOI: 10.1155/2019/7512632]
- 49 **Kim WT**, Ryu CJ. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep* 2017; **50**: 285-298 [PMID: 28270302 DOI: 10.5483/bmbrep.2017.50.6.039]
- 50 **Meisel CT**, Porcheri C, Mitsiadis TA. Cancer Stem Cells, *Quo Vadis? Cells* 2020; **9**: 1879 [PMID: 32796631 DOI: 10.3390/cells9081879]
- 51 **D'Angelo RC**, Ouzounova M, Davis A, Choi D, Tchuenkam SM, Kim G, Luther T, Quraishi AA, Senbabaoglu Y, Conley SJ, Clouthier SG, Hassan KA, Wicha MS, Korkaya H. Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity. *Mol Cancer Ther* 2015; **14**: 779-787 [PMID: 25673823 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0228]
- 52 **Hassan KA**, Wang L, Korkaya H, Chen G, Maillard I, Beer DG, Kalemkerian GP, Wicha MS. Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 1972-1980 [PMID: 23444212 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0370]
- 53 **Yu L**, Liu S, Zhang C, Zhang B, Simões BM, Eyre R, Liang Y, Yan H, Wu Z, Guo W, Clarke RB. Enrichment of human osteosarcoma stem cells based on hTERT transcriptional activity. *Oncotarget* 2013; **4**: 2326-2338 [PMID: 24334332 DOI: 10.18632/oncotarget.1554]
- 54 **De Kumar B**, Parker HJ, Parrish ME, Lange JJ, Slaughter BD, Unruh JR, Paulson A, Krumlauf R. Dynamic regulation of Nanog and stem cell-signaling pathways by Hoxa1 during early neuroectodermal differentiation of ES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: 5838-5845 [PMID: 28584089 DOI: 10.1073/pnas.1610612114]
- 55 **Wang J**, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2006; **444**: 364-368 [PMID: 17093407 DOI: 10.1038/nature05284]
- 56 **Chen Y**, Xu L, Lin RY, Müschen M, Koeffler HP. Core transcriptional regulatory circuitries in

- cancer. *Oncogene* 2020; **39**: 6633-6646 [PMID: [32943730](#) DOI: [10.1038/s41388-020-01459-w](#)]
- 57 **Lu CS**, Shieh GS, Wang CT, Su BH, Su YC, Chen YC, Su WC, Wu P, Yang WH, Shiau AL, Wu CL. Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 30844-30858 [PMID: [27244887](#) DOI: [10.18632/oncotarget.9602](#)]
- 58 **Gwak JM**, Kim M, Kim HJ, Jang MH, Park SY. Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. *Oncotarget* 2017; **8**: 36305-36318 [PMID: [28422735](#) DOI: [10.18632/oncotarget.16750](#)]
- 59 **Du Z**, Jia D, Liu S, Wang F, Li G, Zhang Y, Cao X, Ling EA, Hao A. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* 2009; **57**: 724-733 [PMID: [18985733](#) DOI: [10.1002/glia.20800](#)]
- 60 **Zhao X**, Lu H, Sun Y, Liu L, Wang H. Prognostic value of octamer binding transcription factor 4 for patients with solid tumors: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020; **99**: e22804 [PMID: [33080755](#) DOI: [10.1097/MD.00000000000022804](#)]
- 61 **Li C**, Yan Y, Ji W, Bao L, Qian H, Chen L, Wu M, Chen H, Li Z, Su C. OCT4 positively regulates Survivin expression to promote cancer cell proliferation and leads to poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2012; **7**: e49693 [PMID: [23185410](#) DOI: [10.1371/journal.pone.0049693](#)]
- 62 **Santini R**, Pietrobono S, Pandolfi S, Montagnani V, D'Amico M, Penachioni JY, Vinci MC, Borgognoni L, Stecca B. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene* 2014; **33**: 4697-4708 [PMID: [24681955](#) DOI: [10.1038/onc.2014.71](#)]
- 63 **Bora-Singhal N**, Mohankumar D, Saha B, Colin CM, Lee JY, Martin MW, Zheng X, Coppola D, Chellappan S. Novel HDAC11 inhibitors suppress lung adenocarcinoma stem cell self-renewal and overcome drug resistance by suppressing Sox2. *Sci Rep* 2020; **10**: 4722 [PMID: [32170113](#) DOI: [10.1038/s41598-020-61295-6](#)]
- 64 **Chen J**, Ge X, Zhang W, Ding P, Du Y, Wang Q, Li L, Fang L, Sun Y, Zhang P, Zhou Y, Zhang L, Lv X, Zhang X, Zhang Q, Xue K, Gu H, Lei Q, Wong J, Hu W. PI3K/AKT inhibition reverses R-CHOP resistance by destabilizing SOX2 in diffuse large B cell lymphoma. *Theranostics* 2020; **10**: 3151-3163 [PMID: [32194860](#) DOI: [10.7150/thno.41362](#)]
- 65 **Yu X**, Cates JM, Morrissey C, You C, Grabowska MM, Zhang J, DeGraff DJ, Strand DW, Franco OE, Lin-Tsai O, Hayward SW, Matusik RJ. SOX2 expression in the developing, adult, as well as, diseased prostate. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2014; **17**: 301-309 [PMID: [25091041](#) DOI: [10.1038/pcan.2014.29](#)]
- 66 **Gao J**, Zhang JY, Li YH, Ren F. Decreased expression of SOX9 indicates a better prognosis and inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**: 10130-10138 [PMID: [26617720](#)]
- 67 **Lei B**, Zhang Y, Liu T, Li Y, Pang D. Sox9 upregulation in breast cancer is correlated with poor prognosis and the CD44 + /CD24 - /Low phenotype. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; **9**: 7345-7351
- 68 **Grimm D**, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, Infanger M, Corydon TJ. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2020; **67**: 122-153 [PMID: [30914279](#) DOI: [10.1016/j.semcancer.2019.03.004](#)]
- 69 **Zhang S**, Xiong X, Sun Y. Functional characterization of SOX2 as an anticancer target. *Signal Transduct Target Ther* 2020; **5**: 135 [PMID: [32728033](#) DOI: [10.1038/s41392-020-00242-3](#)]
- 70 **Jeter CR**, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, Repass J, Zaehres H, Shen JJ, Tang DG. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 2011; **30**: 3833-3845 [PMID: [21499299](#) DOI: [10.1038/onc.2011.114](#)]
- 71 **Mahalaxmi I**, Devi SM, Kaavya J, Arul N, Balachandar V, Santhy KS. New insight into NANOG: A novel therapeutic target for ovarian cancer (OC). *Eur J Pharmacol* 2019; **852**: 51-57 [PMID: [30831081](#) DOI: [10.1016/j.ejphar.2019.03.003](#)]
- 72 **Ling K**, Jiang L, Liang S, Kwong J, Yang L, Li Y, Ping Yin, Deng Q, Liang Z. Nanog interaction with the androgen receptor signaling axis induce ovarian cancer stem cell regulation: studies based on the CRISPR/Cas9 system. *J Ovarian Res* 2018; **11**: 36 [PMID: [29716628](#) DOI: [10.1186/s13048-018-0403-2](#)]
- 73 **Rasti A**, Mehrazma M, Madjd Z, Abolhasani M, Saeednejad Zanjani L, Asgari M. Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. *Sci Rep* 2018; **8**: 11739 [PMID: [30082842](#) DOI: [10.1038/s41598-018-30168-4](#)]
- 74 **You L**, Guo X, Huang Y. Correlation of Cancer Stem-Cell Markers OCT4, SOX2, and NANOG with Clinicopathological Features and Prognosis in Operative Patients with Rectal Cancer. *Yonsei Med J* 2018; **59**: 35-42 [PMID: [29214774](#) DOI: [10.3349/ymj.2018.59.1.35](#)]
- 75 **Meng HM**, Zheng P, Wang XY, Liu C, Sui HM, Wu SJ, Zhou J, Ding YQ, Li J. Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 2010; **9**: 295-302 [PMID: [20026903](#) DOI: [10.4161/cbt.9.4.10666](#)]
- 76 **Rowland BD**, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* 2005; **7**: 1074-1082 [PMID: [16244670](#) DOI: [10.1038/ncb1314](#)]
- 77 **Tang H**, Zhu H, Wang X, Hua L, Li J, Xie Q, Chen X, Zhang T, Gong Y. KLF4 is a tumor suppressor in anaplastic meningioma stem-like cells and human meningiomas. *J Mol Cell Biol* 2017; **9**: 315-324 [PMID: [28651379](#) DOI: [10.1093/jmcb/mjx023](#)]
- 78 **Chang YL**, Zhou PJ, Wei L, Li W, Ji Z, Fang YX, Gao WQ. MicroRNA-7 inhibits the stemness of



- prostate cancer stem-like cells and tumorigenesis by repressing KLF4/PI3K/Akt/p21 pathway. *Oncotarget* 2015; **6**: 24017-24031 [PMID: 26172296 DOI: 10.18632/oncotarget.4447]
- 79 **Qi XT**, Li YL, Zhang YQ, Xu T, Lu B, Fang L, Gao JQ, Yu LS, Zhu DF, Yang B, He QJ, Ying MD. KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2019; **40**: 546-555 [PMID: 29930276 DOI: 10.1038/s41401-018-0050-6]
- 80 **Yu F**, Li J, Chen H, Fu J, Ray S, Huang S, Zheng H, Ai W. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene* 2011; **30**: 2161-2172 [PMID: 21242971 DOI: 10.1038/onc.2010.591]
- 81 **Wei D**, Kanai M, Huang S, Xie K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis* 2006; **27**: 23-31 [PMID: 16219632 DOI: 10.1093/carcin/bgi243]
- 82 **Liu Z**, He Q, Ding X, Zhao T, Zhao L, Wang A. SOD2 is a C-myc target gene that promotes the migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma involving cancer stem-like cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; **60**: 139-146 [PMID: 25578561 DOI: 10.1016/j.biocel.2014.12.022]
- 83 **Cheng CC**, Shi LH, Wang XJ, Wang SX, Wan XQ, Liu SR, Wang YF, Lu Z, Wang LH, Ding Y. Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. *Int J Oncol* 2018; **53**: 339-348 [PMID: 29750424 DOI: 10.3892/ijo.2018.4399]
- 84 **Munro MJ**, Wickremesekera SK, Peng L, Marsh RW, Itinteang T, Tan ST. Cancer stem cell subpopulations in primary colon adenocarcinoma. *PLoS One* 2019; **14**: e0221963 [PMID: 31491003 DOI: 10.1371/journal.pone.0221963]
- 85 **Upadhyay VA**, Shah KA, Makwana DP, Raval AP, Shah FD, Rawal RM. Putative stemness markers octamer-binding transcription factor 4, sex-determining region Y-box 2, and NANOG in non-small cell lung carcinoma: A clinicopathological association. *J Cancer Res Ther* 2020; **16**: 804-810 [PMID: 32930122 DOI: 10.4103/jcr.tjcr.213\_18]
- 86 **Sodja E**, Rijavec M, Koren A, Sadikov A, Korošec P, Cufer T. The prognostic value of whole blood SOX2, NANOG and OCT4 mRNA expression in advanced small-cell lung cancer. *Radiol Oncol* 2016; **50**: 188-196 [PMID: 27247551 DOI: 10.1515/raon-2015-0027]
- 87 **van Schaijik B**, Davis PF, Wickremesekera AC, Tan ST, Itinteang T. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *J Clin Pathol* 2018; **71**: 88-91 [PMID: 29180509 DOI: 10.1136/jclinpath-2017-204815]
- 88 **Kim JW**, Chung JY, Ylaya K, Park Y, Jun SY, Hong SM, Hewitt SM. Prognostic implication of SOX2 expression in small intestinal adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2020; **478**: 1049-1060 [PMID: 33103210 DOI: 10.1007/s00428-020-02946-x]
- 89 **Wiechert A**, Saygin C, Thiagarajan PS, Rao VS, Hale JS, Gupta N, Hitomi M, Nagaraj AB, DiFeo A, Lathia JD, Reizes O. Cisplatin induces stemness in ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 30511-30522 [PMID: 27105520 DOI: 10.18632/oncotarget.8852]
- 90 **Ginestier C**, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; **1**: 555-567 [PMID: 18371393 DOI: 10.1016/j.stem.2007.08.014]
- 91 **Koual M**, Tomkiewicz C, Cano-Sancho G, Antignac JP, Bats AS, Coumoul X. Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance. *Environ Health* 2020; **19**: 117 [PMID: 33203443 DOI: 10.1186/s12940-020-00670-2]
- 92 **Gammaitoni L**, Giraudo L, Leuci V, Todorovic M, Mesiano G, Picciotto F, Pisacane A, Zaccagna A, Volpe MG, Gallo S, Caravelli D, Giaccone E, Venesio T, Balsamo A, Pignochino Y, Grignani G, Carnevale-Schianca F, Aglietta M, Sangiolo D. Effective activity of cytokine-induced killer cells against autologous metastatic melanoma including cells with stemness features. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 4347-4358 [PMID: 23794732 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0061]
- 93 **Adorno-Cruz V**, Kibria G, Liu X, Doherty M, Junk DJ, Guan D, Hubert C, Venere M, Mulkearns-Hubert E, Sinyuk M, Alvarado A, Caplan AI, Rich J, Gerson SL, Lathia J, Liu H. Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Cancer Res* 2015; **75**: 924-929 [PMID: 25604264 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3225]
- 94 **Ishii T**, Yasuchika K, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Alpha-fetoprotein producing cells act as cancer progenitor cells in human cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2010; **294**: 25-34 [PMID: 20149523 DOI: 10.1016/j.canlet.2010.01.019]
- 95 **Sasaki N**, Ishii T, Kamimura R, Kajiwara M, Machimoto T, Nakatsuji N, Suemori H, Ikai I, Yasuchika K, Uemoto S. Alpha-fetoprotein-producing pancreatic cancer cells possess cancer stem cell characteristics. *Cancer Lett* 2011; **308**: 152-161 [PMID: 21616586 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.04.023]
- 96 **Bauderlique-Le Roy H**, Vennin C, Brocqueville G, Spruyt N, Adriaenssens E, Bourette RP. Enrichment of Human Stem-Like Prostate Cells with s-SHIP Promoter Activity Uncovers a Role in Stemness for the Long Noncoding RNA H19. *Stem Cells Dev* 2015; **24**: 1252-1262 [PMID: 25567531 DOI: 10.1089/scd.2014.0386]
- 97 **Wu K**, Li A, Rao M, Liu M, Dailey V, Yang Y, Di Vizio D, Wang C, Lisanti MP, Sauter G, Russell RG, Cvekl A, Pestell RG. DACH1 is a cell fate determination factor that inhibits cyclin D1 and breast tumor growth. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 7116-7129 [PMID: 16980615 DOI: 10.1128/MCB.00268-06]
- 98 **Wu K**, Jiao X, Li Z, Katiyar S, Casimiro MC, Yang W, Zhang Q, Willmarth NE, Chepelev I, Crosariol M, Wei Z, Hu J, Zhao K, Pestell RG. Cell fate determination factor Dachshund reprograms

- breast cancer stem cell function. *J Biol Chem* 2011; **286**: 2132-2142 [PMID: 20937839 DOI: 10.1074/jbc.M110.148395]
- 99 **Hirsch D**, Hu Y, Ried T, Moll R, Gaiser T. Transcriptome profiling of LGR5 positive colorectal cancer cells. *Genom Data* 2014; **2**: 212-215 [PMID: 26484096 DOI: 10.1016/j.gdata.2014.06.005]
- 100 **Thiagarajan PS**, Hitomi M, Hale JS, Alvarado AG, Otvos B, Sinyuk M, Stoltz K, Wiechert A, Mulkearns-Hubert E, Jarrar A, Zheng Q, Thomas D, Egelhoff T, Rich JN, Liu H, Lathia JD, Reizes O. Development of a Fluorescent Reporter System to Delineate Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Stem Cells* 2015; **33**: 2114-2125 [PMID: 25827713 DOI: 10.1002/stem.2021]
- 101 **Wei F**, Rong XX, Xie RY, Jia LT, Wang HY, Qin YJ, Chen L, Shen HF, Lin XL, Yang J, Yang S, Hao WC, Chen Y, Xiao SJ, Zhou HR, Lin TY, Chen YS, Sun Y, Yao KT, Xiao D. Cytokine-induced killer cells efficiently kill stem-like cancer cells of nasopharyngeal carcinoma *via* the NKG2D-ligands recognition. *Oncotarget* 2015; **6**: 35023-35039 [PMID: 26418951 DOI: 10.18632/oncotarget.5280]
- 102 **Zhang Y**, Eades G, Yao Y, Li Q, Zhou Q. Estrogen receptor  $\alpha$  signaling regulates breast tumor-initiating cells by down-regulating miR-140 which targets the transcription factor SOX2. *J Biol Chem* 2012; **287**: 41514-41522 [PMID: 23060440 DOI: 10.1074/jbc.M112.404871]
- 103 **Boumahdi S**, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, Delatte B, Caauwe A, Lenglez S, Nkusi E, Brohé S, Salmon I, Dubois C, del Marmol V, Fuks F, Beck B, Blanpain C. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 2014; **511**: 246-250 [PMID: 24909994 DOI: 10.1038/nature13305]
- 104 **Liu XF**, Yang WT, Xu R, Liu JT, Zheng PS. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One* 2014; **9**: e87092 [PMID: 24489842 DOI: 10.1371/journal.pone.0087092]
- 105 **Yang WT**, Zhao ZX, Li B, Zheng PS. NF- $\kappa$ B transcriptionally activates the expression of SOX2 in cervical cancer stem cells. *PLoS One* 2019; **14**: e0215494 [PMID: 31365524 DOI: 10.1371/journal.pone.0215494]
- 106 **Lu Y**, Zhu Y, Deng S, Chen Y, Li W, Sun J, Xu X. Targeting the Sonic Hedgehog Pathway to Suppress the Expression of the Cancer Stem Cell (CSC)-Related Transcription Factors and CSC-Driven Thyroid Tumor Growth. *Cancers (Basel)* 2021; **13**: 418 [PMID: 33499351 DOI: 10.3390/cancers13030418]
- 107 **Vaddi PK**, Stamnes MA, Cao H, Chen S. Elimination of SOX2/OCT4-Associated Prostate Cancer Stem Cells Blocks Tumor Development and Enhances Therapeutic Response. *Cancers (Basel)* 2019; **11**: 1331 [PMID: 31500347 DOI: 10.3390/cancers11091331]
- 108 **Blum W**, Pecze L, Felley-Bosco E, Wu L, de Perrot M, Schwaller B. Stem Cell Factor-Based Identification and Functional Properties of In Vitro-Selected Subpopulations of Malignant Mesothelioma Cells. *Stem Cell Reports* 2017; **8**: 1005-1017 [PMID: 28285878 DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.02.005]
- 109 **Keysar SB**, Le PN, Miller B, Jackson BC, Eagles JR, Nieto C, Kim J, Tang B, Glogowska MJ, Morton JJ, Padilla-Just N, Gomez K, Warnock E, Reisinger J, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Wakefield LM, Gao D, Tan AC, Serracino H, Vasiliou V, Roop DR, Wang XJ, Jimeno A. Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *J Natl Cancer Inst* 2017; **109**: djw189 [PMID: 27634934 DOI: 10.1093/jnci/djw189]



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton, CA 94566, USA  
**Telephone:** +1-925-3991568  
**E-mail:** [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
**Help Desk:** <https://www.f6publishing.com/helpdesk>  
<https://www.wjgnet.com>

