



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de inhibidores mitocondriales sobre la
viabilidad de células con fenotipo troncal de
cáncer de mama MCF-7**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Alhelí Adán Ladrón de Guevara

TUTOR:

Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Adán
Ladrón de Guevara
Alhelí
5537309401
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307070757

2. Datos del tutor

Dr.
Juan Carlos
Gallardo
Pérez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Lourdes Teresa
Agredano
Moreno

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Marco Antonio
Velasco
Velázquez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Vilma Araceli
Maldonado
Lagunas

6. Datos del sinodal 4

Dra.
María Cristina
Velasquillo
Martínez

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de inhibidores mitocondriales sobre la viabilidad de células con
fenotipo troncal de cáncer de mama MCF-7
74 p.
2016

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Francisco y Citlali por todo el apoyo que me han dado, por siempre darme el mejor ejemplo para mi crecimiento profesional y personal. Esto no sería posible sin ustedes, los amo infinitamente. Esto es por ustedes y para ustedes.

A mi hermano Rodrigo por nunca dejarme sola, por cuidarme y guiarme en todo momento. Eres mi orgullo y mi mejor ejemplo de perseverancia, gracias por todo.

A mi tutor el Dr. Juan Carlos Gallardo por su paciencia y comprensión, por compartir y transmitirme su pasión por la ciencia. Gracias por darme la oportunidad de seguir aprendiendo y creciendo profesionalmente contigo, pero sobre todo, gracias por todo el apoyo incondicional que me has dado todos estos años. De corazón ¡mil gracias!

A la Dra. Sara Rodríguez por permitirme realizar mis estudios en su laboratorio, gracias por apoyarme a mejorar mi proyecto y mi formación profesional con sus críticas y propuestas. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Rafael Moreno por todas sus enseñanzas en cada seminario, por inculcarme que la disciplina y constancia es muy importante en la ciencia y por siempre impulsarnos a ser críticos.

A todos los integrantes del laboratorio de Bioquímica del INC, en especial al laboratorio de tumores por hacer más divertida nuestra estancia en el laboratorio, por el apoyo en los buenos y malos momentos.

A mis sinodales por aportar su granito de arena con mi formación profesional y al mejoramiento de este trabajo, en especial al Dr. Velasco por tomarse el tiempo para discutir, debatir y analizar a profundidad los datos generados en mi tesis.

Por último, pero no menos importante, a mi segunda familia, a todos mis amigos del Andersen (los amo infinitamente), del INBA y de danza (cuantas risas y sueños no cumplimos juntos), del CCH sur (cuantos momentos inolvidables a su lado) y de la Facultad de Ciencias (definitivamente la mejor etapa de mi vida a su lado). Sin duda no podía dejar de lado a Granizo, Tiger y Mina, ellos vivieron conmigo cada desvelo, cada angustia y cada felicidad, a ellos todo mi amor.

Gracias a todos y cada uno de ustedes he culminado una etapa más de mi vida, pero esto apenas comienza...

Este proyecto de investigación fue apoyado por CONACyT- México (Nos. 243249 Dr. Juan Carlos Gallardo Pérez, 107183 Dra. Sara Rodríguez Enríquez y 239930 Dr. Rafael Moreno Sánchez).

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 CÁNCER.....	3
1.2 CANCER STEM CELLS (CSC).....	8
1.3 RESISTENCIA DE CSC A TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS.....	9
1.4 MARCADORES DE CSC DE MAMA.....	15
1.5 MICROAMBIENTE DE LAS CSC.....	17
1.6 MITOCONDRIAS Y CSC.....	19
1.7 INHIBIDORES MITOCONDRIALES EN CSC.....	23
1.8 INHIBIDORES MITOCONDRIALES.....	25
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.....	27
2.1 HIPÓTESIS	28
2.2 OBJETIVO.....	28
2.2.1 GENERAL.....	28
2.2.2 PARTICULARES	28
CAPÍTULO III. MÉTODOS.	
3.1 CULTIVOS EN MONOCAPA.....	29
3.2 PROTOCOLO DE SELECCIÓN DE CÉLULAS.....	29
3.3 CURVA DE PROLIFERACIÓN.....	29
3.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA Y WESTERN BLOT	30

3.5 ENSAYO DE INVASIÓN EN CÁMARAS DE BOYDEN.....	30
3.6 DETERMINACIÓN DE IC ₅₀ DE VIABILIDAD DE INHIBIDORES.....	31
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	33
4.1 MARCADORES DE CSC EN CÉLULAS DE SELECCIÓN	33
4.2 EXPRESIÓN DE PGP/MDR1	35
4.3 CAPACIDAD DE INVASIÓN	35
4.4 CURVA DE PROLIFERACIÓN.....	37
4.5 IC ₅₀ DE VIABILIDAD DE INHIBIDORES	40
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	42
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXO 1.....	62

ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
2-DG	2-desoxiglucosa
2OGDH	2-oxoglutarato deshidrogenasa
3-BP	3-bromopiruvato
5-FU	5-fluorouracilo
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AC	Antraciclinas y Ciclofosfamidias
AC \rightarrow T	Antraciclinas, Ciclofosfamidias seguidos de Taxanos
ACT	Antraciclinas, Ciclofosfamidias y Taxanos
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ALDO A y C	Aldolasa isoforma A y C
Alfa Tea	α -Tocoferil acetil éter
Alfa Tos	α -Tocoferil succinato
AT	Antraciclinas y Taxanos
ATM	Ataxia telangiectasia mutada (Gen)
ATP	Adenosín trifosfato

BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i> (Proteínas de resistencia en cáncer de mama)
BRCA 1 Y 2	Breast Cancer 1 y 2 (Gen)
CaMa	Cáncer de mama
CasIIgly	Casiopeína IIgly
CD24	<i>Cluster of differentiation 24</i> (Grupo de diferenciación 24)
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i> (Grupo de diferenciación 44)
COX 1 Y 2	Ciclooxigenasa 1 y 2
CSC	<i>cancer stem cells</i> (Células troncales de cáncer)
CTC	células troncales de cáncer
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PKcs	Proteína cinasa dependiente de DNA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMT	Transición epitelio mesénquima
ESA	<i>Epithelial specific antigen</i> (antígeno específico epitelial)
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2

FO	Fosforilación oxidativa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Glc	Glucosa
GLUT 1 Y 3	Transportador de glucosa isoforma 1 e isoforma 3
H2AX	Histona de la familia 2
Her-2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico en humano tipo 2
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HIF-2 α	Factor inducible por hipoxia 2 alfa
HKI y II	Hexocinasa isoforma 1 y 2
IAA	Yodo acetato
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
INCAN	Instituto Nacional de Cancerología
LDH-A	Lactato deshidrogenasa isoforma A
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i> (Resistencia a múltiples fármacos)
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MRP1 y 2	<i>Multidrug resistance-associated protein 1 and 2.</i> (Resistencia a múltiples fármacos asociada a proteína 1 y 2)

MTT	Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
MXR	<i>Mitoxantrone resistance protein</i> (Proteína de resistencia a Mitoxantrona)
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
O ₂	Oxígeno
OCR	Tasa de consumo de oxígeno
Oct 3/4	Factor 3 y 4 de transcripción de unión a octámero
PARP	Poli ADP Ribosa Polimerasa
PBS	Buffer fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PFK-L	Fosfofructocinasa isoforma presente en hígado
PGK-1	Fosfoglicerato cinasa isoforma 1
PGP	Glicoproteína tipo P
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Receptor de estrógenos
RIPA	Buffer de lisis (Radioimmunoprecipitation assay)

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPg	Receptor de progesterona
Rpm	Revoluciones por minuto
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SVLE	Supervivencia libre de enfermedad
TCH	Taxanos, Carboplatinos y Trastuzumab

RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial y en México. Se ha reportado que la recurrencia del CaMa se presenta de 5 a 10 años después del tratamiento quimioterapéutico convencional.

Recientemente se propone que existe una subpoblación de células tumorales que son las responsables de la recurrencia del cáncer; a esta subpoblación tumoral se le denomina células troncales de cáncer (CTC) o cancer stem cells (CSC). Las CSC tienen características que le confieren un fenotipo más maligno, algunas de éstas son: resistencia a fármacos antineoplásicos, resistencia a radioterapia, auto-renovación, tienen una baja tasa de proliferación, llevan a cabo transición epitelio-mesénquima (EMT), invasión y tienen capacidad para realizar metástasis. Además presentan marcadores característicos relacionados con un fenotipo más maligno (metastásico) de las células.

Actualmente ninguna terapia convencional es totalmente eficiente para erradicar el riesgo de una recurrencia en CaMa ya que se demostró que los tratamientos convencionales con doxorrubicina y taxol no ocasionan muerte de las CSC e incluso después del tratamiento se encuentra esta población enriquecida lo cual es un factor de pobre pronóstico en pacientes con CaMa.

Es de gran importancia la búsqueda de blancos terapéuticos específicos contra estas células resistentes (CSC) pues la recurrencia del CaMa es la principal causa de muerte en pacientes con ésta enfermedad.

Modificaciones en la regulación del metabolismo energético es un sello característico del cáncer (*hallmark*). A pesar de la heterogeneidad dentro del tumor sólido el suministro de ATP continúa dependiendo de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa (FO). De esta manera, se establece que la inhibición selectiva del metabolismo energético tumoral prevalente puede tener un impacto significativo en el tratamiento del cáncer. Estudios previos han determinado que las CSC de CaMa dependen energéticamente de la FO ya que ésta es la vía que

aporta en mayor proporción ATP sobre la glucólisis. Lo anterior indica la necesidad de realizar una terapia anti-mitocondrial en las CSC de mama ya que el metabolismo energético es la única forma que tiene la célula de adquirir ATP para llevar a cabo sus funciones biológicas. Sin embargo, hasta el momento no se ha inhibido el metabolismo energético mitocondrial y evaluado su efecto sobre la viabilidad en CSC de CaMa.

En este trabajo se mimetizaron las condiciones microambientales en las que se encuentran las CSC (hipoxia, bajas concentraciones de glucosa y exposición a fármacos antineoplásicos) para seleccionar y enriquecer la fracción de estas células a partir de cultivos en monocapa de la línea celular MCF7. Al medir los marcadores de troncalidad y características como, sobreexpresión de P-glicoproteína y su capacidad de invasión, demostramos que las células obtenidas comparten algunas características con las CSC, en este trabajo nos referimos a estas células como “células de selección”.

Se evaluaron diferentes inhibidores mitocondriales, glucolíticos, canónicos y no canónicos para determinar su efecto sobre la viabilidad de las células de selección. De los fármacos utilizados encontramos que casiopeína IIgly, α -Tea, celecoxib y sulindac fueron más potentes para disminuir la viabilidad de las células de selección a bajas concentraciones (IC_{50} de 0.8 a 36 μ M) comparados con los inhibidores glucolíticos ($IC_{50} > 100 \mu$ M) que no tuvieron repercusión en la viabilidad de estas células.

Estos datos demuestran que la terapia anti-mitocondrial es más eficiente que las terapias convencionales para disminuir la viabilidad de las células resultantes del protocolo de selección a bajas concentraciones y que inhibidores glucolíticos no repercuten en la viabilidad de esta subpoblación tumoral.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 CÁNCER

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por tener una proliferación incrementada de células, la cual es producida por una alteración en los procesos de crecimiento, división, diferenciación y muerte celular [Hanahan y Weinberg, 2011]. Mutaciones en genes que mantienen la estabilidad genética o frenan la proliferación celular, contribuyen a la transformación maligna de la célula. Los oncogenes como H-Ras, K-Ras y N-Ras están implicados en la transducción de señales de procesos de proliferación y diferenciación celular [Parikh et al., 2007]. Genes supresores de tumor como p53 inhiben el ciclo celular y estimulan la apoptosis si el DNA se encuentra dañado [Aschauer y Muller, 2016; Ferraiuolo et al., 2016]. Además de genes estabilizadores implicados en la reparación al daño al DNA como ATM, BRCA 1 y 2 [Draga et al., 2015]. El resultado de la alteración génica es el incremento o disminución de proteínas involucradas en la proliferación, resistencia a la apoptosis y en la reparación de daño al DNA [Vogelstein y Kinzler, 2004]. La progresión del tumor está mediada por una secuencia de pasos en donde se lleva a cabo la invasión de tejidos circundantes mediante la ruptura de la membrana basal, la intravasación (entrada a torrente sanguíneo), la circulación de estas células a través del torrente sanguíneo y, finalmente, la extravasación y la colonización, todos estos pasos involucrando a la metástasis la cual se resume en la migración de células tumorales de su órgano inicial hacia otros órganos. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer.

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial. En el 2012 se reportaron 1, 671,149 casos y 521,907 muertes por éste tipo de cáncer [GLOBOCAN, 2012].

En México el CaMa también es la mayor incidencia de cáncer en mujeres; en el 2012 se registró una incidencia de 20,444 nuevos casos y una mortalidad por éste tipo de cáncer de 5,680 casos [GLOBOCAN, 2012].

Existen diferentes subtipos de CaMa, se pueden clasificar de acuerdo a sus características inmunohistoquímicas por la expresión de: Receptor del factor de crecimiento epidérmico en humano tipo 2 (Her 2), receptor de progesterona (RPg) o receptor de estrógenos (RE) [Anders y Carey, 2009]. Los tratamientos que se utilizan actualmente en la clínica a nivel mundial y que son también establecidos en el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) para CaMa son: 1. Cirugía, 2. Radioterapia y 3. Quimioterapia (neoadyuvantes: se administra antes de una cirugía para tratar de disminuir el tamaño del tumor; y adyuvantes: se administra después de un procedimiento quirúrgico para tratar de erradicar las células sobrevivientes a la cirugía). El tipo de terapia se establece con las características clínico-patológicas de la enfermedad como la expresión de los receptores antes mencionados, el tamaño del tumor o el estadio en que se encuentra el tumor (*in situ* o metastásico) [Stankov et al., 2012].

Dentro de los fármacos utilizados (representados algunos esquemas de tratamiento en la Tabla 1), se reporta que el tratamiento con antraciclinas, como doxorubicina, epirubicina y daunorrubicina disminuye 33% la recurrencia y 27% la mortalidad en mujeres menores de 50 años; la administración de taxanos adyuvantes tiene una supervivencia libre de enfermedad (SVLE) a 5 años de 5% [Arce et al., 2011; Morales-Vásquez, 2006]. Dentro de las terapias adyuvantes se encuentra la terapia biológica donde el anticuerpo monoclonal más utilizado es el trastuzumab (reconoce a Her 2) y se reporta que el tratamiento con este anticuerpo disminuye el riesgo de recurrencia en un 38% en CaMa. Por último la terapia endócrina puede ser adyuvante o neoadyuvante, se utilizan como adyuvantes a los tamoxifenos (para mujeres pre-menopáusicas) reduciendo el riesgo de recurrencia en un 40%, e inhibidores de aromatasas como anastrozol, letrozol y exemestane (para mujeres postmenopáusicas que expresan RE o RPg),

disminuyendo el riesgo de recurrencia en un 3% [Arce et al., 2011; Morales-Vásquez, 2006].

Tabla 1. Quimioterapia utilizada actualmente para Cáncer de mama.

Esquema de combinación de quimioterapia	Fármaco	Dosis	Ciclos	Referencia
Terapia Neoadyuvante				
ACT	Doxorrubicina	60mg/m ²	Repetir el ciclo cada 21 días con un total de 4 ciclos seguido por cirugía	[Chu, 2010]
	Ciclofosfamida	600mg/m ²		
	Docetaxel	100mg/m ²		
Terapia Adyuvante				
Her-2 - negativo (<i>in situ</i>)				
AC	Doxorrubicina	60mg/m ²	Repetir el ciclo cada 21 días con un total de 4 ciclos	
	Ciclofosfamida	600mg/m ²		
AC→T	Doxorrubicina	60mg/m ²	Repetir el ciclo cada 21 días con un total de 4 ciclos Seguido de Paclitaxel	
	Ciclofosfamida	600mg/m ²		
	Paclitaxel	175mg/m ² (semanal 80mg/m ²)	Repetir el ciclo cada 21 días con un total de 4 ciclos	
Her-2 – positivo (<i>in situ</i>)				
AC→T + Trastuzumab	Doxorrubicina	60mg/m ²	Repetir el ciclo cada 21 días con un total de 4 ciclos Seguido de Paclitaxel	
	Ciclofosfamida	600mg/m ²		
	Paclitaxel	Semanal 80mg/m ²	Durante 1hr, seguido de Trastuzumab	
	Trastuzumab	4mg/kg	Repetir semanalmente por 12 semanas,	

			cuando se acabe esta dosis será seguido de Trastuzumab
	Trastuzumab	2mg/Kg	Semanalmente por 40 semanas
TCH	Docetaxel	75mg/m ²	Hasta que se acabe la dosis de Trastuzumab. Repetirel ciclo cada 21 días hasta completar 6 ciclos, al completar los ciclos administrar Trastuzumab.
	Carboplatino		
	Trastuzumab	4mg/Kg	
	Trastuzumab	2mg/Kg	
	Trastuzumab	6mg/Kg	Cada 3 semanas por 1 año.
Combinación de Régimen Hormonal			
	Tamoxifen	20 mg PO	Administrar diariamente por 5 años en pacientes con RE +
	Anastrozol	1 mg PO	Administrar diariamente por 5 años en pacientes con RE +
	Letrozol	2.5 mg PO	Administrar diariamente por 5 años en pacientes con RE + o RPg +
Tamoxifen + Exemestran	Tamoxifen	20 mg PO	Administrar diariamente por 2-3 años seguido de Emextran
	Exemestran	25 mg PO	Administrar diario por 5

			años	
Tamoxifen + Letrozol	Tamoxifen	20 mg PO	Administrar diario por 5 años seguido de Letrozol	
	Letrozol	2.5 mg PO	Administrar diariamente por 5 años	
CaMa Metastásico				
AT	Doxorrubicina	50 mg/m ²	Repetir el ciclo cada 21 días	
	Paclitaxel	150 mg/m ²		
	Otra posible combinación:			
	Doxorrubicina	60 mg/m ²	Repetir el ciclo cada 21 días hasta completar máximo 8 ciclos, seguido de Paclitaxel.	
	Paclitaxel	175 mg/m ²	Repetir el ciclo cada 21 días, incluso si la enfermedad progresa.	

Se ha reportado que la recurrencia del CaMa es >40% y se presenta de 5 a 10 años después del tratamiento, esto puede ser por una disección axilar inadecuada, una práctica quirúrgica incompleta o un tratamiento sistémico no efectivo [Stankov et al., 2012]. Se ha propuesto que existe una subpoblación de células tumorales que son las responsables de la recurrencia del cáncer; a esta subpoblación tumoral se le denomina células troncales de cáncer (CTC) o cancer stem cells (CSC) [Kwon y Shin, 2013]. Los tratamientos actuales representados en la Tabla 1 no están dirigidos a la subpoblación de CSC y debido a que estas células sobreexpresan la P-glicoproteína (una bomba de expulsión de fármacos), la gran mayoría de estos fármacos no alcanzan su blanco dentro de la célula lo que favorece la quimioresistencia [Chen et al., 2016].

Además de no ser efectivos ni dirigidos a la subpoblación de CSC para evitar la recurrencia del cáncer, los tratamientos actuales tienen diversos efectos secundarios. El uso de tamoxifeno está relacionado con el desarrollo de cáncer endometrial y enfermedades tromboembólicas, los inhibidores de aromatasas, antes mencionados, tienen como efectos secundarios la osteoporosis [Arce et al., 2011], las antraciclinas y el trastuzumab provocan enfermedades cardiovasculares y cardiotoxicidad [Geisberg et al., 2012; Mercurio et al., 2016], los taxanos pueden provocar fiebre neutropénica, y neuropatía periférica [Fata et al., 1999] Por último, las ciclofosfamidias provocan inmunosupresión y cardiotoxicidad [Fraisier, 1991].

Es de gran importancia la búsqueda de blancos terapéuticos específicos contra estas células resistentes (CSC) pues la recurrencia del CaMa es la principal causa de muerte en pacientes con ésta enfermedad. [Arce et al., 2011]. También se demostró que los tratamientos convencionales para CaMa, además de tener diversos efectos secundarios, no ocasionan la muerte de las CSC e incluso después del tratamiento se encuentra esta población enriquecida lo cual es un factor de mal pronóstico en pacientes con CaMa [Lee et al., 2011].

1.2 Cancer Stem Cells (CSC)

Se les llama CSC a las células tumorales que tienen la capacidad de auto-renovarse como lo hacen las células troncales embrionarias y las células troncales de adulto. Forman parte de una pequeña subpoblación (0.01 a 2.5% del total de la población) de algunos tumores sólidos y de leucemias [Fillmore y Kupperwaser, 2008; Guo et al., 2006; Han et al., 2013].

Es de gran importancia el estudio de esta subpoblación celular pues diversos estudios sugieren que la recurrencia del cáncer, la formación de nuevos tumores metastásicos y la mortalidad son debido a la presencia y a las características de las CSC [Borovski et al., 2011].

Algunas de las características de las CSC son:

Resistencia a fármacos antineoplásicos, resistencia a radioterapia, auto-renovación, presentan marcadores diferenciales, tienen una baja tasa de proliferación, llevan a cabo transición epitelio-mesénquima (EMT), invasión, y tienen capacidad para realizar o promover la metástasis [Mimeault y Batra, 2013] (Figura 1).

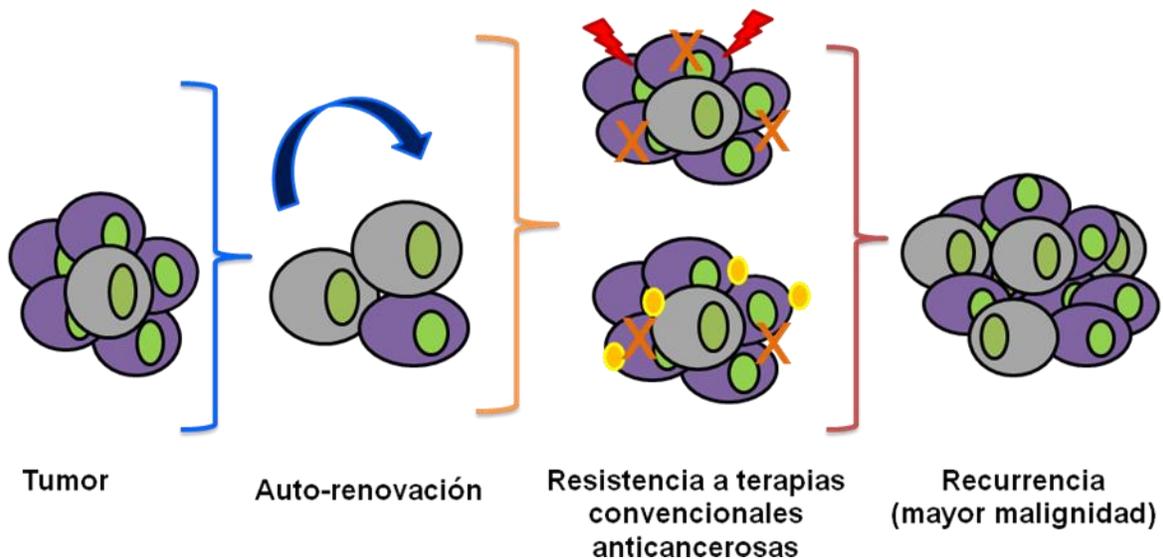


Figura 1. Características de las CSC. La célula gris representa a la CSC y las células moradas son células tumorales no troncales.

Su capacidad de auto-renovación se lleva a cabo por su división celular asimétrica, como resultado dan origen a una CSC y a una célula tumoral no troncal, manteniendo así, la heterogeneidad del tumor [Beck y Blanpain, 2013].

1.3 RESISTENCIA DE CSC A TERAPIAS ANTINEOPLÁSICAS

Las CSC tienen diversos mecanismos intrínsecos los cuales les permiten tener resistencia a quimioterapias y radioterapias, como son:

1. La expresión de P-glicoproteína (PGP)/MDR1 la cual les permite expulsar los fármacos de la célula. Es una proteína que pertenece a una familia de transportadores de bombas de expulsión llamada “ATP-binding cassette” (Transportadores ABC), estos transportadores son dependientes de ATP y tienen un cambio conformacional cuando el sustrato se une y el ATP es hidroliza lo cual permite la expulsión del fármaco de la célula [Chen et al., 2016]. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos utilizados en la clínica para CaMa son sustrato de estas bombas (Tabla 2), los cuales al momento de ingresar a la célula son inmediatamente expulsados lo que dificulta la efectividad de las terapias anticancerosas y favorecen la resistencia tumoral.

Tabla 2. Transportadores ABC relacionados con la resistencia a fármacos antineoplásicos

Gen	Proteína (transportador ABC)	Sustratos quimioterapéuticos	Tipo de cáncer	Referencia
ABCB 1	PGP/MDR1	Antraciclinas:		[Dean et al., 2005; Chen et al., 2016; Chu, 2010]
		• Doxorubicina	Mama: Her-2 (-),(+), Metastásicos, Osteosarcoma , Ovario	
		• Epirubicina	Mama: Metastásico	
		• Daunorubicina	Leucemias	

		Taxanos:	
		• Paclitaxel	Mama: Her-2 (-),(+), Metastásicos
		• Docetaxel	Mama: Her-2 (-),(+), Páncreas, Próstata
		EPIPODOFILOTOXINAS:	
		• Etoposidos	Cervicouterino, Osteosarcoma , Próstata
		PLATINOS:	
		• Cisplatino	Cervicouterino, Gástrico, Pulmón de células no pequeñas
		ANTI-FOLATOS:	
		• Metotrexato	Mama: Her-2 (-), Metastásico, Osteosarcoma

		Alcaloides de la Vinca	
		<ul style="list-style-type: none"> • Vinblastina 	Pulmón de células no pequeñas, Cabeza-cuello, Linfoma de Hodgkin Testicular
ABCC 1	MRP1	Antraciclinas:	
		<ul style="list-style-type: none"> • Doxorubicina 	Mama: Her-2 (-),(+), Metastásicos
		<ul style="list-style-type: none"> • Daunorrubicina 	Leucemias
		Anti-folatos:	
		<ul style="list-style-type: none"> • Metotrexato 	Mama: Her-2 (-), Metastásico
		Epidodofilotoxinas:	
		<ul style="list-style-type: none"> • Etoposidos 	Cervicouterino, Osteosarcoma ,Próstata,

			Pulmón de células no pequeñas	
		Vinca – Alcaloides		
		<ul style="list-style-type: none"> Vinblastina 	Pulmón de células no pequeñas, Cabeza-cuello, Linfoma de Hodgkin Testicular	
ABCC 2	MRP2	Antraciclinas:		
		<ul style="list-style-type: none"> Doxorrubicina 	Mama: Her-2 (-),(+), Metastásicos	
		Anti-folatos:		
		<ul style="list-style-type: none"> Metotrexato 	Mama: Her-2 (-), Metastásico	
		Platinos:		
		<ul style="list-style-type: none"> Cisplatino 	Cervicouterino, Gástrico	

ABCG 2	MXR/BCRP	Antraciclina:	
		• Doxorubicina	Mama: Her-2 (-),(+), Metastásicos
		Inhibidores de tirosina-quinasa	
		• Imatinib	Leucemias

2. La sobreexpresión de la enzima ALDH está involucrada con la resistencia a la radioterapia al proteger a las células de aldehídos tóxicos y de los radicales libres de oxígeno (ROS). La ALDH convierte a los aldehídos tóxicos (producidos por la radiación ionizante) a sus respectivos ácidos carboxílicos. Al tener una alta actividad de esta enzima las CSC pueden sobrevivir a este tipo de terapia [Tomita et al., 2015; Peitzsch et al., 2013; Kim et al., 2013].

3. También presentan mecanismos para la reparación del daño al DNA sobreexpresando proteínas como: BRCA1, ATM, PCNA, PARP, DNA-PKcs y H2AX [Kim et al., 2013; Draga et al., 2015; Wang, 2015]. La radiación genera ruptura de doble cadena del DNA, ATM es el primero en reconocer el daño y activa proteínas (como BRCA1) para reparar el daño por recombinación homóloga, en este tipo de reparación se necesita una cadena de DNA intacta como base para poder usarla como molde y reparar la cadena dañada [Zentella et al., 2007].

4. Activan vías de señalización como Wnt/ β -catenina, Notch, Sonic hedgehog (implicadas en la auto-renovación), Oct 3/4 (marcador de pluripotencia involucrado con la activación de Wnt/ β -catenina), Sox2 (pluripotencia y auto-renovación) y Nanog (Pluripotencia y auto-renovación) las cuales están implicadas en el mantenimiento de su fenotipo troncal y en el incremento de su malignidad [Maugeri-Saccá et al., 2011; Velasco-Velázquez et al., 2012].

1.4 MARCADORES DE CSC DE MAMA

Algunos de los marcadores que se utilizan para CSC de CaMa son CD44+, CD24-, Oct 3/4 y ALDH1+, ESA+, CD133+, CD90 entre otros [Fillmore y Kuperwasser, 2008; Al-Hajj et al., 2003; Schwarz-Cruz et al., 2016]. Para nuestro trabajo de investigación usaremos los primeros cuatro (Figura 2).

Para aislar a las CSC de una población heterogénea se utiliza la técnica de citometría de flujo que a través de anticuerpos que reconocen marcadores de superficie de las CSC como CD44 y CD24 para CaMa y se pueden separar por *cell sorting* a esta subpoblación [Ajani et al., 2015; Greve et al., 2012]. También se pueden utilizar marcadores intracelulares como la actividad de la enzima ALDH al marcarla con un fluoróforo y así con el citómetro de flujo identificar a la subpoblación que esté viable y que exprese a dicha enzima [Gehlot et al., 2016].

Diversos estudios sugieren que la presencia de estos marcadores está relacionado con un fenotipo más maligno (metastásico) de las células tumorales. Se ha observado en estudios *in vivo* que células que expresan éstos marcadores tienen un mayor potencial metastásico [Croker et al., 2008] esto es de gran importancia pues actualmente no existe un tratamiento para evitar el proceso de metástasis y ésta representa el 90% de mortalidad en personas con cáncer (Li et al., 2007).

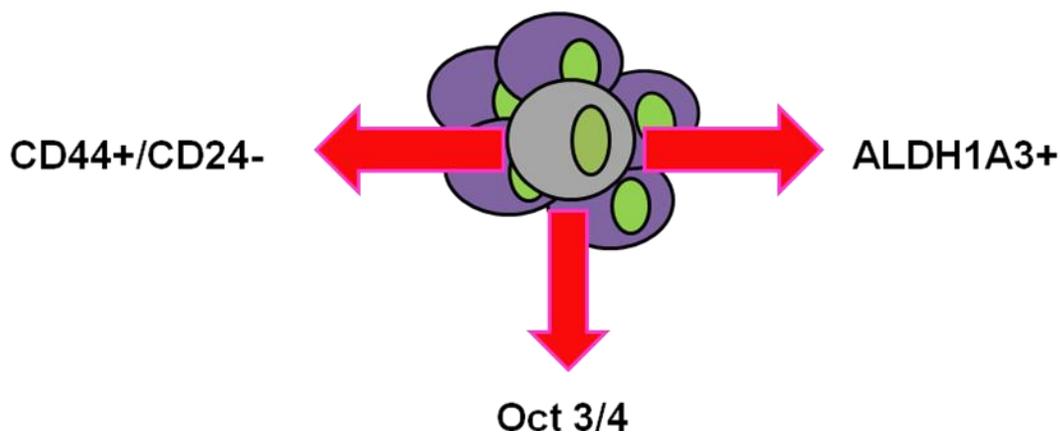


Figura 2. Marcadores de interés en este trabajo para células troncales de CaMa.

CD44 es una glicoproteína transmembranal que se une a componentes de la matriz extracelular, como son fibronectina, laminina, colágena y es receptor al ácido hialurónico. Se ha relacionado con la resistencia a fármacos, proliferación celular, transición epitelio-mesénquima, invasión y metástasis. Se encuentra sobre-expresado en CSC de CaMa y lo han correlacionado con un mal pronóstico de la enfermedad [Aguirre-Alvarado et al., 2016; Xu et al., 2016]. También sirve como marcador para cáncer de próstata, ovario, páncreas y colorectal. Sin embargo, se ha observado que la presencia de este marcador de superficie es diferente a lo largo de la progresión tumoral y la metástasis, sobre-expresándose en los estadios más agresivos del tumor [Jaggupilli y Elkord, 2012].

CD24 es una glicoproteína que se encuentra expresada en tejido sano de mama, es una molécula de adhesión que se encuentra en la superficie de la célula, sin embargo en las CSC de CaMa no se encuentra expresado este marcador [Al-Hajj et al., 2003]. Existen algunos reportes donde también se ha relacionado la sobreexpresión de CD24 en diversos tumores humanos con estadios más agresivos del tumor [Schwarz et al., 2016]

ALDH1 es una enzima encargada de la desintoxicación celular, oxidando los aldehídos intracelulares producidos durante procesos metabólicos, a sus carboxilos correspondientes [Marcato et al., 2015]. La isoforma 1A3 se encuentra sobre expresada en células tumorales de mama y CSC de CaMa, glioblastomas, cáncer de páncreas y cáncer de cabeza y cuello [Tomita et al., 2015; Marcato et al., 2015]. Kurt et al., en el año 2015 demostraron que existe una relación con la sobre expresión de la ALDH1A3 y la resistencia a la radioterapia en las líneas celulares FaDu y Ca133 de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Ellos encontraron que las células que sobreexpresan esta isoforma correlaciona con los marcadores de CSC y después de la radioterapia las células que sobreviven sobre expresan ALDH1A3.

Oct 3/4 es un factor de transcripción que regula la capacidad de auto-renovación y pluripotencia en células troncales no tumorales, sin embargo en CSC también se

encuentra expresado. Está involucrado con procesos de transición epitelio-mesénquima (EMT), metástasis y quimioresistencia [Wang y Herlyn, 2015].

Estudios como el de Li y colaboradores [2008] demuestran que después de administrar fármacos como docetaxel y doxorrubicina/ciclofosfamida en pacientes con CaMa Her-2 (-) y lapatinib para pacientes con Her-2 (+), se incrementa la presencia de éstos marcadores y se relaciona con un mal pronóstico de la enfermedad.

1.5 MICROAMBIENTE DE LAS CSC

El microambiente hace referencia a las condiciones que rodean a las células tumorales como gradientes de glucosa, oxígeno, citocinas y otras moléculas [Borovski et al., 2011]. Las CSC tienen diversas interacciones con los componentes del microambiente tumoral, los cuales promueven su crecimiento, proliferación, diferenciación, invasión y migración, así como su capacidad de auto-renovación, resistencia a fármacos antineoplásicos y a la radiación. Estas interacciones se llevan a cabo con células mesenquimales, adipocitos, fibroblastos asociados a tumores, células endoteliales, células del sistema inmune, citocinas y factores de crecimiento [Reya et al., 2001; Schwarz-Cruz et al., 2016]. En este microambiente tumoral se encuentran diferentes gradientes de concentraciones de oxígeno dependiendo de la distancia a la que se encuentren de los vasos sanguíneos, los más cercanos a éstos presentan una concentración de 30 a 50 μM de O_2 y los más lejanos (500 μm de distancia) de 3 a 7 μM de O_2 (hipoxia). También hay gradientes de glucosa, las células más cercanas a los vasos sanguíneos tienen una concentración de 5 a 10 mM y los más alejados tienen una concentración menor de 0.5 mM [Rodríguez-Enríquez, et al., 2014]. Además de la exposición a fármacos antineoplásicos como paclitaxel y doxorrubicina en células de CaMa. Todos estos componentes del microambiente tumoral intervienen en la expresión de diferentes factores de transcripción y la activación de diferentes vías

de señalización de las CSC, como las que se mencionaron anteriormente, que le confiere a las CSC una mayor malignidad y resistencia a terapias convencionales [Rapp et al., 2008]. Recientemente se reportó que en fibroblastos normales de dermis de adulto humano no se encontraba expresado el factor de pluripotencia Oct 4, sin embargo al someter a los fibroblastos a condiciones de hipoxia y en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2), inducen la expresión de Oct 4, manteniendo a la célula en un estado indiferenciado, esto indica que el microambiente en el que se encuentran las células participa en la regulación de la expresión o inhibición de diferentes factores de transcripción [Jez et al., 2014]. Dentro de un tumor sólido las CSC son estimuladas por señales que proceden de su microambiente las cuales incluyen restricciones de glucosa (2.5 mM) y nutrientes, acidosis, hipoxia (1% de oxígeno) y, además, fármacos antineoplásicos como taxol o doxorrubicina para CaMa [Ahmad, 2013; Mohyeldin et al., 2010; Li et al., 2013]. Se ha demostrado que estas condiciones de estrés provenientes del microambiente, inducidas individualmente, favorecen el enriquecimiento de marcadores de CSC [Ahmad, 2013; Flavahan et al., 2013; Prud'homme et al., 2010; Bar et al., 2010; Harrison et al., 2013]. Bajo estas condiciones estresantes las CSC son estimuladas y encienden: 1) la activación de vías de señalización del fenotipo troncal (Wnt, BMP, Notch, Sonic hedgehog) [Li et al., 2013]; 2) factores de transcripción del fenotipo troncal (Oct4) [Covello et al., 2006]; 3) la adquisición del fenotipo de transición epitelio-mesénquima [Ahmad, 2013]; 4) la resistencia a fármacos mediante la sobreexpresión P-glicoproteína, transportadores ABC y la activación de citocromos p450 [Myung et al., 2012; Alison et al., 2012]; 5) la recurrencia tumoral responsable de la agresividad tumoral y metástasis; y, 6) la capacidad de auto-renovación [Alison et al., 2012]. Lo anterior indica que el fenotipo troncal puede ser estimulado en condiciones *in vitro*. Para este estudio se recurrió a la estandarización de un protocolo de aislamiento y enriquecimiento de células que comparten algunas características con las CSC basado en condiciones de estrés microambiental *in vitro*, debido a que con el método de citometría de flujo no se alcanza la densidad celular adecuada para estudios posteriores [Ponti et al., 2005] y porque los marcadores

de superficie muestran promiscuidad y alta inespecificidad [Tosoni et al., 2012; Medema, 2013] por lo que podría evitar un análisis adecuado de esta subpoblación. Finalmente, la disposición de muestras de biopsias de pacientes para aislar CSC no es de fácil alcance para muchos protocolos.

De esta manera, al someter a células MCF-7 de CaMa cultivadas en monocapa a condiciones de estrés (hipoxia, baja concentración de glucosa y exposición a fármacos antineoplásicos) ha permitido enriquecer la fracción de células que comparten características de CSC (Anexo 1) con lo que se puede obtener una fracción de células *in vitro* para realizar búsqueda de terapias dirigidas [Gallardo-Pérez, et al., manuscrito en preparación; Tesis de Licenciatura de Marco Antonio García Amezcua, 2016]. La ventaja de este novedoso método para seleccionar estas células cultivadas en monocapa es que las células obtenidas enriquecen marcadores de troncalidad, clonogenicidad, formación de mamoesferas, migración e invasión (Anexo 1) y activan vías de señalización inducidas por esas condiciones de estrés microambiental. Lo anterior es difícil obtener de un cultivo en monocapa que siempre ha estado en condiciones de altas concentraciones de glucosa (25 mM), oxigenación adecuada y sin el estrés por exposición a fármacos.

1.6 MITOCONDRIAS Y CSC

El metabolismo energético de las células tumorales está alterado, el flujo glucolítico se incrementa hasta 10 veces en comparación con células sanas por la sobreexpresión de todas las enzimas glucolíticas y del transportador de glucosa. HIF-1 α (activo en tumores y en zonas hipóxicas) induce la expresión de isoformas de enzimas glucolíticas como GLUT1, GLUT3, HKI Y HKII, PFK-L, ALDO- A Y C, PGK-1 y LDH-A. En células normales no es común encontrar expresadas estas isoformas al mismo tiempo [Marín-Hernández et al., 2011]. También existe una diferencia en la composición bioquímica mitocondrial (véase más adelante) [Moreno-Sánchez et al 2007] en comparación con células normales, esto resulta

en una característica importante que puede ser utilizada como posible blanco terapéutico [Hanahan y Weinberg, 2011]. En años anteriores se pensaba que la glucólisis era la principal vía energética de las células tumorales, siendo ésta la dominante sobre la fosforilación oxidativa, aún en condiciones de normoxia (efecto Warburg) y se proponía que la mitocondria se encontraba dañada [Warburg, 1956]. En la actualidad existe evidencia experimental que demuestra que la mitocondria es funcional en células tumorales y que algunos tipos de tumores (como mama, cervicouterino, hueso, pulmón e hígado) dependen energéticamente de la fosforilación oxidativa (FO) [Moreno-Sánchez et al., 2007].

Zu y Guppy [2004] hacen una recopilación de la contribución de ATP proveniente de la glucólisis de diferentes tipos de células tumorales en condiciones de normoxia y reportan que el hepatoma de Novikoff es el que tiene el mayor aporte de ATP proveniente de la degradación de glucosa con un 64%. Sin embargo los demás tipos de células tumorales tienen un bajo aporte de ATP proveniente de la glucólisis, ellos estiman una media de la contribución de ATP proveniente de la glucólisis de un 17% de los 27 tipos de células tumorales evaluadas, lo que nos indica que la FO tiene un aporte importante de ATP para las células tumorales.

En las CSC no se han realizado estudios sistemáticos en donde evalúen el aporte de ATP de glucólisis y de FO. Se han medido actividades de enzimas o contenidos de proteínas pero no el flujo total de las vías metabólicas. Esto no permite dilucidar cuál es la vía que aporta mayor cantidad de ATP para las funciones celulares pues se ha reportado que los niveles de expresión de mRNA no siempre correlacionan con la cantidad de proteína codificada y su actividad tampoco correlaciona con el flujo de la vía [Moreno-Sánchez et al., 2016]. Por ejemplo, en células de cáncer de mama MCF-7 en condiciones de hipoxia (1% de O₂) el factor de transcripción HIF-1 α presenta los mismos niveles de expresión de mRNA que en condiciones de normoxia, sin embargo el contenido de proteína es mayor en hipoxia (50 a 70 veces) que en normoxia [Helczynska et al., 2008]. Por lo que es de gran importancia medir los flujos completos de las vías para poder conocer el aporte

total de ATP proveniente de glucólisis y de FO [Moreno-Sánchez et al., 2016] y con esto diseñar estrategias terapéuticas dirigidas hacia estas vías.

Vlashi et al., [2014] sugieren que las CSC de líneas celulares de CaMa MCF7, MDA MB-231, T47D, SUM159PT dependen más del aporte de ATP proveniente de la FO que de la glucólisis, sin embargo, su análisis no fue completo. Ellos evalúan la glucólisis mediante la producción de lactato, sin embargo la producción de lactato puede provenir de otras vías metabólicas como la glutaminólisis [Chen y Russo, 2012]. Para la respiración mitocondrial lo hacen a través del consumo de oxígeno y determinan que dependen de la FO porque tienen una mayor tasa de consumo de oxígeno (OCR) y producen poco lactato, para revelar el OCR utilizan oligomicina para evidenciar el consumo de oxígeno total proveniente de la mitocondria, rotenona y un desacoplante (FCCP) para dilucidar la funcionalidad de la cadena transportadora de electrones. Finalmente, Vlashi y colaboradores no reportan el aporte de ATP proveniente de cada vía. Este trabajo nos permite tener un acercamiento al posible metabolismo de las CSC de CaMa sin embargo es necesario medir los flujos completos de ambas vías metabólicas. Otros trabajos también solo miden proteína o mRNA con lo que no se puede deducir qué vía metabólica es la predominante en CSC [Moreno-Sánchez et al., 2016].

En la tesis de licenciatura de Marco Antonio García Amezcua (2016) se determinó el aporte de ATP resultante de los flujos de la glucólisis y FO en las células provenientes de MCF-7 seleccionadas con el protocolo de estrés antes mencionado, encontrando que en general existe una disminución del metabolismo energético tanto del flujo de la FO como de la glucólisis. No obstante, con esta disminución en el metabolismo energético, la FO es la vía que aporta un 87% del ATP mientras que la glucólisis contribuye solamente con un 13%, siendo la mitocondria la que aporta mayor energía para las funciones celulares de las células de selección de CaMa. Lo anterior indica la necesidad de realizar una terapia anti-mitocondrial en las CSC de mama.

La mitocondria no sólo es la encargada de suministrar la mayor cantidad de ATP en la población heterogénea y en CSC de mama, también está involucrada en

otras funciones celulares como el crecimiento tumoral, la generación de metabolitos para otras vías metabólicas, muerte celular (apoptosis), migración y metástasis [Neuzil y Moreno-Sánchez, 2013; Rodríguez-Enríquez, et al., 2011].

El grupo de trabajo de Farnie G, et al [2015] relacionó el incremento en el número de mitocondrias con las CSC, utilizando dos líneas celulares de CaMa MDA-MB 231 y MCF-7 marcando a las mitocondrias con Mito tracker de color rojo y se les midieron marcadores de troncalidad (ESA+/CD24-/ALDH+) y se separaron las poblaciones por citometría de flujo. Ellos encontraron que las células que expresaban estos marcadores contenían una mayor masa mitocondrial. Esta subpoblación fue más eficiente para formar mamoesferas (evidenciando la expansión clonal y no a la capacidad que tengan de autoagregación de células tumorales de CaMa) que la población con baja masa mitocondrial. Evaluaron la sensibilidad de las mamoesferas de CSC a paclitaxel, observaron que a una concentración de 0.5 μM las mamoesferas de las CSC no mostraban una reducción en el diámetro en comparación con las mamoesferas de las células con baja masa mitocondrial que tuvieron una reducción de dos veces en presencia de paclitaxel 0.5 μM . Esto sugiere que la mitocondria podría ser un buen blanco terapéutico para hacer más sensible a las células troncales cancerígenas a los agentes antineoplásicos.

Los autores concluyen que la cantidad de masa mitocondrial está relacionada con varias características de las CSC como son la resistencia a fármacos, su capacidad de formar mamoesferas y su capacidad de iniciar un tumor [Farnie et al., 2015]. Sin embargo, hasta el momento no se ha inhibido el metabolismo energético mitocondrial y evaluado su efecto sobre la viabilidad en CSC de CaMa.

Para determinar la importancia de la mitocondria en la viabilidad de las CSC, De Luca et al., [2015] usaron un inhibidor experimental que es agonista inverso de $\text{ERR}\alpha$ (cofactor de $\text{PGC1}\alpha/\beta$ que es requerido para la biogénesis mitocondrial) llamado XCT790, con una IC_{50} de 10 μM de este compuesto. Ellos observan una disminución en la formación de mamoesferas en un 50% de la línea celular MCF-7. Para validar el efecto del inhibidor por medio de inmuno blot observaron una

disminución en el contenido de proteína de PGC1 α en un 70-80%. Evaluaron el contenido de los marcadores CD44/CD24 y observaron que a una concentración de 10 μ M disminuye 50% la expresión de éstos. También evaluaron la viabilidad de las MCF7 con este compuesto en un modelo de cultivo en monocapa por 3 y 5 días a concentraciones exponenciales (0, 5 y 10 μ M). No observaron un cambio significativo pues con 20 μ M solo disminuye la viabilidad de las MCF7 en un 20%. Los autores concluyen que la biogénesis mitocondrial es importante para el mantenimiento de las CSC por la inhibición de la formación de mamoesferas en presencia de XCT790.

1.7 INHIBIDORES MITOCONDRIALES EN CSC

Las terapias que actualmente se administran para pacientes con CaMa son dirigidas para las células con rápida proliferación (no distinguen entre células tumorales y células sanas) y para detener o inhibir la división celular. Las CSC tienen una baja proliferación, ésta es una característica que no permite que los agentes antineoplásicos tengan efecto en esta subpoblación [Song et al., 2015]. Lo anterior aunado a la sobreexpresión de bombas de eflujo de fármacos favorece la multiresistencia de las CSC [Alison et al., 2012].

Recientemente se propuso a la mitocondria como posible blanco terapéutico pues tiene diferencias intrínsecas con las mitocondrias de células no tumorales, La mitocondria es la principal fuente de aporte de ATP para algunos tipos de tumores, por lo que se establece la necesidad de inhibir su funcionamiento. Además se relacionan diversas características de las CSC (como se mencionó anteriormente su resistencia a fármacos o su capacidad de formar mamoesferas) con la mitocondria por lo que inhibidores mitocondriales podrían ser una alternativa terapéutica para esta subpoblación tumoral.

Se han evaluado diversos inhibidores en las CSC, pero muy pocos trabajos han evaluado inhibidores mitocondriales.

Fu et al., [2014] evaluaron resveratrol en CSC de CaMa. El resveratrol es un compuesto con propiedades antitumorales pero no se ha dilucidado su mecanismo de acción; se propone que uno de sus blancos es la mitocondria pues ayuda a contener el estrés oxidante generado especialmente por ROS. Las líneas celulares que evaluaron fueron MCF7 y SUM159 encontrando que a una concentración de 40 μ M por 24 horas inhiben el 40% de su viabilidad. También evaluaron el efecto del resveratrol sobre la expresión de uno de los marcadores de CSC de mama, ALDH+ por citometría de flujo y observaron un decremento del 40% de ALDH positivo en las CSC de SUM159 por lo que concluyen que el resveratrol podría ser un buen inhibidor para erradicar la subpoblación de CSC. Sin embargo, con estas concentraciones de resveratrol no logran obtener una concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) de la población de las CSC y esto implica que para erradicar las CSC se necesitan concentraciones mayores de resveratrol las cuales no se evaluaron en este trabajo.

Lamb y colaboradores 2014, utilizaron un inhibidor mitocondrial (oligomicinA) para reducir el tamaño de mamoesferas provenientes de la línea celular MCF-7. La oligomicinA es un inhibidor de la subunidad F0 de la ATP sintasa. Ellos encontraron que la IC_{50} de este inhibidor es de 100 nM y que esta concentración reduce significativamente la formación de la mamoesferas de MCF-7 un 50%. Al ser más sensibles a un inhibidor mitocondrial se espera que las CSC de las MCF-7 dependan en mayor proporción del aporte de ATP mitocondrial, sin embargo en este trabajo no se midieron marcadores de CSC y el inhibidor se evaluó en la población heterogénea.

Los antecedentes anteriores demuestran que es importante evaluar diferentes inhibidores mitocondriales sobre la viabilidad de las CSC para erradicar a esta subpoblación y así poder proponer terapias específicas para dichas células.

1.8 INHIBIDORES MITOCONDRIALES

Existen inhibidores con características específicas que les permite unirse preferencialmente a las mitocondrias tumorales como los cationes lipofílicos; esta unión se lleva a cabo por la característica de las mitocondrias tumorales de tener un potencial eléctrico mayor al de las células no tumorales [Rodríguez-Enríquez et al., 2012]. Una de las posibles explicaciones del incremento en el potencial eléctrico en las mitocondrias tumorales es por su composición bioquímica ya que tiene alto contenido del lípido cardiolipina lo que aumenta la densidad de cargas negativas en la membrana interna y también su alto contenido de colesterol repercutiendo en el bombeo de protones a través de la membrana [Rodríguez-Enríquez et al., 2009]. El incremento en el potencial de membrana eléctrico mitocondrial ayuda a la acumulación de cationes por lo que moléculas cargadas positivamente pueden acumularse con mayor facilidad y preferentemente a las mitocondrias tumorales.

CASIOPEINA IIGLY: Es un compuesto sintetizado con centro metálico de cobre, contiene un dimetil fenantrolina, un aminoácido glicina y dos ligantes de tipo imina (Cu(N-N=4,7-dm-1,10-fenantrolina, N-O= glicina) [Reyes et al., 2003]. Es un inhibidor de la FO y tiene como blancos a las enzimas PDH, 2OGDH y SDH (a concentraciones menores a 10 μM). Se ha evaluado en líneas celulares como HeLa (cáncer cervicouterino), encontrando que a una concentración de 5 μM por 24 horas inhibe a la FO (PDH, 2OGDH Y SDH) en un 80% y a la glucólisis (HKII) en un 40%, mostrando un efecto en ambas vías metabólicas aunque tiene una mayor repercusión en la FO. También se ha evaluado en otras líneas celulares como MCF-7, PC3, SKLU, U87MG Y HTC15 obteniendo una IC_{50} entre 2 y 7 μM en comparación con células no tumorales como linfocitos y la línea celular HUVEC que muestran una IC_{50} mayor a 100 μM [Marín-Hernández et al., 2003]. Como ya se ha mencionado, las CSC de CaMa dependen energéticamente en mayor proporción de la FO por lo que podrían ser más sensibles al fármaco Casiopeína Iigly y así repercutir en funciones celulares de esta subpoblación.

Alfa Tea (α -Tocoferil acetil éter) y Alfa Tos (α -Tocoferil succinato): Son análogos de la Vitamina E, la diferencia entre ellos es que Alfa Tea es un éter y Alfa Tos es un éster [Neuzil et al., 2001]. Se ha reportado para ambos que tienen una gran actividad antitumoral ya que promueven la apoptosis por medio de su unión a la ubiquinona estimulando la producción de ROS por el complejo II de la cadena transportadora de electrones [Rodríguez-Enríquez et al., 2012]. Se evaluó Alfa Tos en A549 (adenocarcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma mamario), CaCo2 y HCT-116 (carcinoma de colon) a una concentración de 50 μ M y se observó una activación de la apoptosis en un 30 – 60 % más que las células control (sin Alfa Tos). También evaluaron este inhibidor en células no tumorales como fibroblastos de piel de humano, células de endotelio de cordón umbilical y monocitos humanos derivados de macrófagos, en estas células no encontraron una diferencia significativa de la activación de la apoptosis con una concentración de 50 μ M [Neuzil et al., 2001]. Esto indica que es más específico para inducir apoptosis en células tumorales que en células no tumorales.

En la búsqueda de nuevos posibles fármacos contra el tratamiento del cáncer se propone que los antiinflamatorios no esteroideos podrían tener efecto sobre la mitocondria tumoral [Moreno-Sánchez et al., 1999]. El modo de acción de éstos fármacos es bloqueando la generación de prostaglandinas por la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 [Liggett et al., 2014]. Sin embargo, se ha observado que su capacidad pro- apoptótica y anti- proliferativa no está relacionada con su actividad en las ciclooxigenasas y se propone que está mediada por una alteración en la función mitocondrial [Ralph et al., 2015]. Por lo que evaluar el efecto sobre las mitocondrias de las CSC puede ser atractivo para su uso en la clínica.

Las células tumorales al estar sometidas a condiciones de estrés tienen la capacidad de activar mecanismos compensatorios por lo que en este trabajo evaluamos también inhibidores glucolíticos para dilucidar el efecto que podrían tener sobre esta subpoblación.

CAPÍTULO II.

JUSTIFICACIÓN

La recurrencia del CaMa representa la principal causa de muerte en mujeres con esta enfermedad; actualmente no se cuenta con una terapia efectiva para evitar la recurrencia del cáncer en la cual están involucradas las CSC. Además, las terapias que se les administran a las pacientes no son específicas para las células tumorales provocando diversos efectos secundarios y deteriorando la calidad de vida de los pacientes.

Por lo que es de gran importancia la búsqueda de blancos terapéuticos específicos contra estas células resistentes a las terapias convencionales (CSC) para erradicarlas y así evitar la recurrencia de la enfermedad.

Modificaciones en la regulación del metabolismo energético es un sello característico del cáncer (*hallmark*). A pesar de la heterogeneidad dentro del tumor sólido el suministro de ATP continúa siendo dependiente de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa (FO). De esta manera, se establece que la inhibición selectiva del metabolismo energético tumoral prevalente puede tener un impacto significativo en el tratamiento del cáncer. El metabolismo energético puede ser un blanco terapéutico ya que las funciones celulares como la división, crecimiento y mantenimiento del tumor, así como las características de malignidad de las CSC (transición epitelio-mesénquima y resistencia a drogas por PGP/MDR1) dependen de la producción de ATP. Las células de selección de CaMa tienen una mayor dependencia por la FO por lo que inhibidores dirigidos a ésta vía energética podría comprometer la viabilidad de esta subpoblación.

2.1 HIPÓTESIS

Las condiciones de estrés microambiental favorecerán el enriquecimiento de células con fenotipo troncal de CaMa y la inhibición de la función mitocondrial en estas células disminuirá su viabilidad.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 General

Caracterizar a las células resultantes del protocolo de selección y analizar el efecto de inhibidores mitocondriales sobre la viabilidad de estas células.

2.2.2 Particulares

1. Seleccionar células en condiciones experimentales basadas en estímulos de estrés microambiental (hipoxia, hipoglucemia y uso de fármacos antineoplásicos) para la estimulación del fenotipo troncal en la línea celular de CaMa MCF-7.
2. Evaluar el contenido de proteínas de marcadores de troncalidad (CD44, CD24, ALDH1A3, Oct 3/4) en células de selección de CaMa MCF-7.
3. Evaluar características de las células con fenotipo troncal como son su capacidad de invasión y su contenido de P-glicoproteína en células de selección.
4. Determinar IC₅₀ de viabilidad de inhibidores glucolíticos, mitocondriales, canónicos y no canónicos (antiinflamatorios) en células de selección de CaMa y MCF-7.

CAPÍTULO III

MÉTODOS

3.1 CULTIVOS EN MONOCAPA

Células de carcinoma mamario MCF-7 estadio III, se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB); 10,000 unidades de penicilina/estreptomicina y 25 mM de glucosa. El cultivo celular se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire.

3.2 PROTOCOLO DE SELECCIÓN DE CÉLULAS

Cuando el cultivo en monocapa alcanzó una confluencia del 80% se le cambió el medio por DMEM 2.5 mM de glucosa, añadiendo taxol (100 nM) por 12 hrs a 37°C, 5% CO₂ y 95% de aire. Posteriormente se realizó un recambio de medio, DMEM 25 mM y se añadió doxorubicina (100 nM) e inmediatamente se sometieron las células a hipoxia severa (0.1% de oxígeno) durante 12 hrs; después de las 12 hrs de hipoxia severa se les cambió el medio a las células y se les añadió medio DMEM 25 mM de glucosa sin SFB 24 hrs [Gallardo-Pérez et al., manuscrito en preparación; García-Amezcuca, 2016].

3.3 CURVA DE PROLIFERACIÓN

Se realizó una curva de proliferación de 7 días de las células MCF-7 y de las células de selección obtenidas del protocolo anterior. Se sembraron 500,000 células en cajas Petri de 60 x 15 mm con DMEM 25 mM de glucosa y se contaron las células en cámara de Neubauer.

Las células se expusieron a los inhibidores en el segundo día saliendo del protocolo de selección.

3.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA Y WESTERN BLOT

Las células de selección y el control se resuspendieron en buffer de lisis RIPA (SDS AL 25% con 0.05% de deoxicolato de sodio, 1% de IGEPAL y 10 μ L de PMSF (100 mM). Las células se disociaron y homogeneizaron con una jeringa de insulina, éstas se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se guardó a - 20°C hasta su uso. La proteína se cuantificó por el método colorimétrico Biuret. Para Western blot, se mezclaron 40 μ g de la proteína con buffer de carga. Las proteínas se hirvieron y se cargaron en geles SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF a 300 mA, 15 volts, 30 minutos. La membrana se bloqueó con 5% de leche libre de grasa y 0.1% de tween-20 en TBS 1x durante 1 hora. Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos monoclonales y/o policlonales (todos con una dilución 1:500): CD44, CD24, ALDH1, Oct3/4, MDR1 y α -Tubulina durante toda la noche en refrigeración a 4°C.

Después de transcurrido este tiempo se hicieron cuatro lavados a las membranas de 15 minutos cada uno, con TBS 1x/Tween-20 y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios por una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Se lavaron durante una hora con cambios cada 10 minutos de TBS 1x/Tween-20. Para revelar, se añadió solución de quimioluminiscencia y en cuarto oscuro se expusieron las membranas a placas de revelado en tiempos de 1 a 10 minutos.

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

3.5 ENSAYO DE INVASIÓN EN CÁMARAS DE BOYDEN

Para el ensayo de invasión en cámaras de Boyden de 96 pozos (Cultrex BME Cell Invasion Assay) se pre-hidrataron las membranas de la cámara por 24 hrs con DMEM 25 mM de glc sin SFB y las células de selección y MCF-7 se dejaron 24 hrs con DMEM 25 mM sin SFB. Después de transcurrido este tiempo se colocaron

50,000 células de selección y MCF-7 respectivamente, en el compartimento de la parte superior con medio DMEM 25 mM de glc sin SFB. Se dejaron por 24 hrs en incubación a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂. Después de 24 hrs se le añadió 100 µL de buffer de disociación y 60 nM de calceína a las células que migraron al compartimento de la parte inferior y se dejaron incubando durante una hora a 37°C. Después de transcurrido este tiempo se leyó a una fluorescencia de 485 nm de excitación, 520 nm de emisión en un lector de micro placas.

3.6 DETERMINACIÓN DE IC₅₀ DE VIABILIDAD DE INHIBIDORES

Se tripsinizó el cultivo resultante de la selección con 5 ml de tripsina/EDTA 0.25% durante 3 minutos. Se inhibió la actividad de la tripsina con 1 ml de DMEM 25 mM y se centrifugaron las células a 2,200 rpm por 3 minutos. Se sembraron las células de la selección y controles en cajas de 96 pozos (20,000 células por pozo) y después de 24 hrs se les añadieron concentraciones exponenciales (0, 0.1, 1, 10 y 100 µM) de diferentes inhibidores mitocondriales, glucolíticos, canónicos y no canónicos (antiinflamatorios) durante 24 hrs.

Mitocondriales	Glucolíticos	Canónicos	No canónicos
Oligomicin A	Gossipol	Doxorrubicina	Sulindac
Casiopeína Ilgly	Yodoacetato	Paclitaxel	Celecoxib
Alfa Tea	3- Bromopiruvato	5- Fluorouracilo	
Alfa Tos	2- Desoxiglucosa	Cisplatino	

Posteriormente se midió su viabilidad con el ensayo de MTT el cual consiste en la conversión de la sal de tetrazolio en cristales de formazan por enzimas deshidrogenasas y así reflejarlo como actividad enzimática a la viabilidad celular.

Los cristales de formazan se diluyen con DMSO y se lee a una longitud de onda de 595 nm [Tonder et al., 2015].

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De cada experimento se realizaron de 3 a 4 repeticiones, de los resultados obtenidos se calculó la media y la desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t* de Student para muestras no pareadas, como criterio de significancia se consideró $P \leq 0.05$ o $P \leq 0.01$.

Para la comparación de la expresión del marcador CD44 a lo largo de la curva de proliferación (figura 8) se realizó una ANOVA de una vía con una prueba de Scheffe con un criterio de significancia de $P \leq 0.05$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 MARCADORES DE CSC EN CÉLULAS DE SELECCIÓN

Al mimetizar el microambiente donde se encuentran las CSC (hipoxia, baja concentración de glucosa y exposición a drogas), se permitió la selección de una subpoblación con algunas características de CSC [Gallardo-Pérez, et al. manuscrito en preparación]. Al finalizar la selección en la línea celular original MCF-7 de CaMa, las presiones de selección ocasionaron una disminución de la viabilidad en un 80% pero en las células sobrevivientes se observó un cambio en la morfología celular, presentando un fenotipo parecido a fibroblastos (Figura 3) tal y como se ha reportado para CSC [Thomas et al., 2016]; a estas células les llamamos “células de selección”. Posteriormente, a estas células obtenidas por el protocolo de selección se les midieron los marcadores de troncalidad reportados para CSC de CaMa (CD44+, CD24-, ALDH1A3+ y Oct 3/4) [Fillmore y Kuperwasser, 2008; Al-Hajj et al., 2003; Schwarz-Cruz et al., 2016]. En la figura 4 se observa un incremento en CD44 de más de 20 veces en las células de selección. Se ha reportado que CD44 se expresa hasta en un 10% más en CSC que en las células cancerígenas no troncales cuando se obtienen por citometría de flujo [Jaggupilli y Elkord., 2012]; CD24 no se expresa en CSC como en lo reportado por Fillmore y Kuperwasser [2008] y observamos que nuestras células de selección tampoco lo están expresando; ALDH1A3 aumentó 4 veces en las células de selección en comparación con las células MCF-7 y el factor de transcripción de pluripotencia Oct 3/4 aumentó 5 veces respecto al control (MCF-7) (Figura 4). Se realizaron otros procedimientos para caracterizar el fenotipo de nuestras células (inmediatamente después de aplicar el protocolo de selección) que se relatan a continuación.

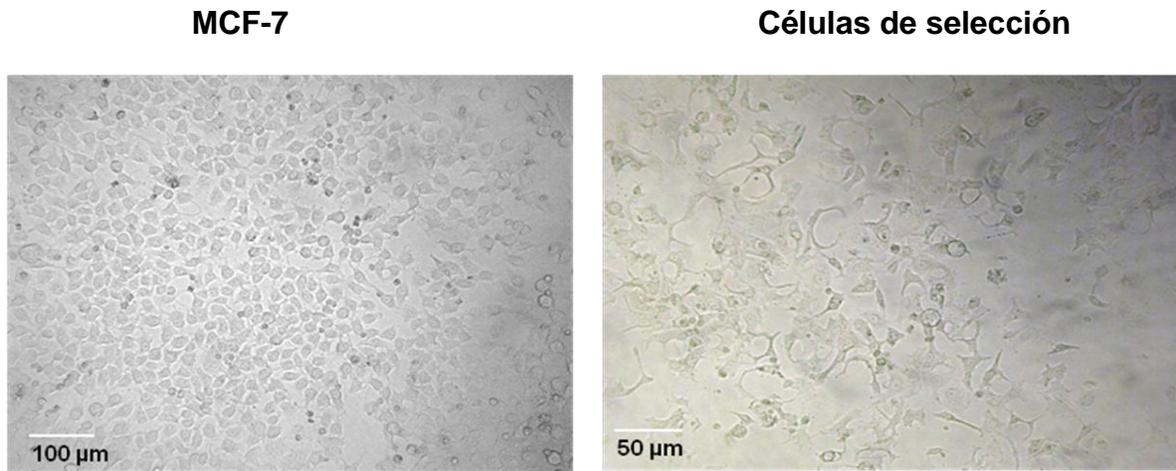


Figura 3. Morfología de MCF7 y de células de selección.

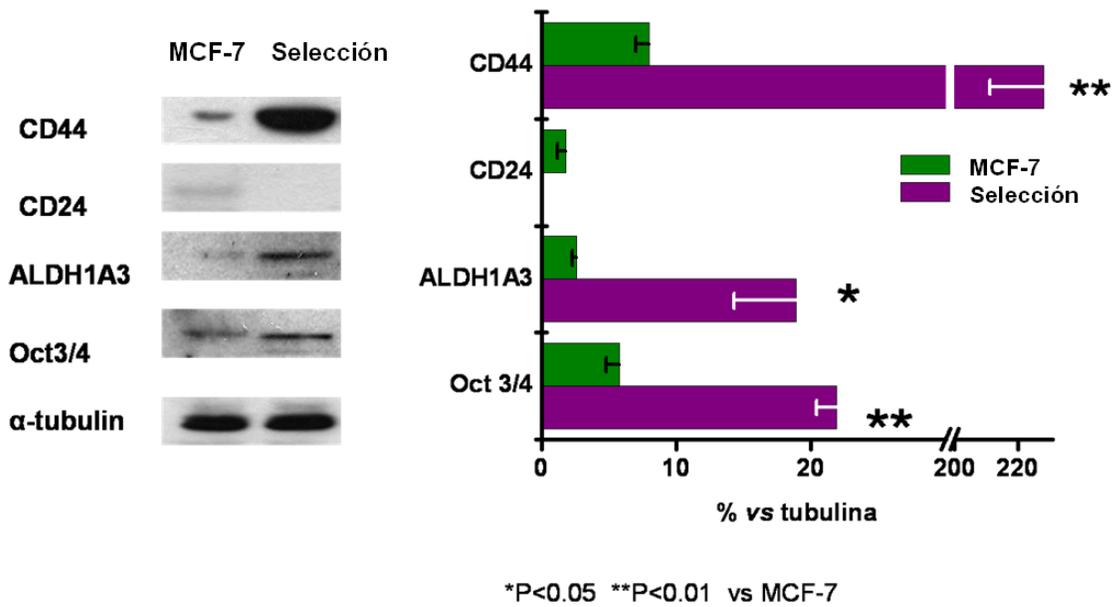


Figura 4. Marcadores CSC de CaMa en células de selección y MCF-7, n=4.

4.2 EXPRESIÓN DE PGP/MDR1

A continuación, se evaluó el contenido de proteína de la PGP/MDR1 que está relacionado con la resistencia a fármacos y observamos que nuestras células de selección tienen un aumento en el contenido de proteína de hasta 6 veces en comparación con las células MCF-7 (Figura 5).

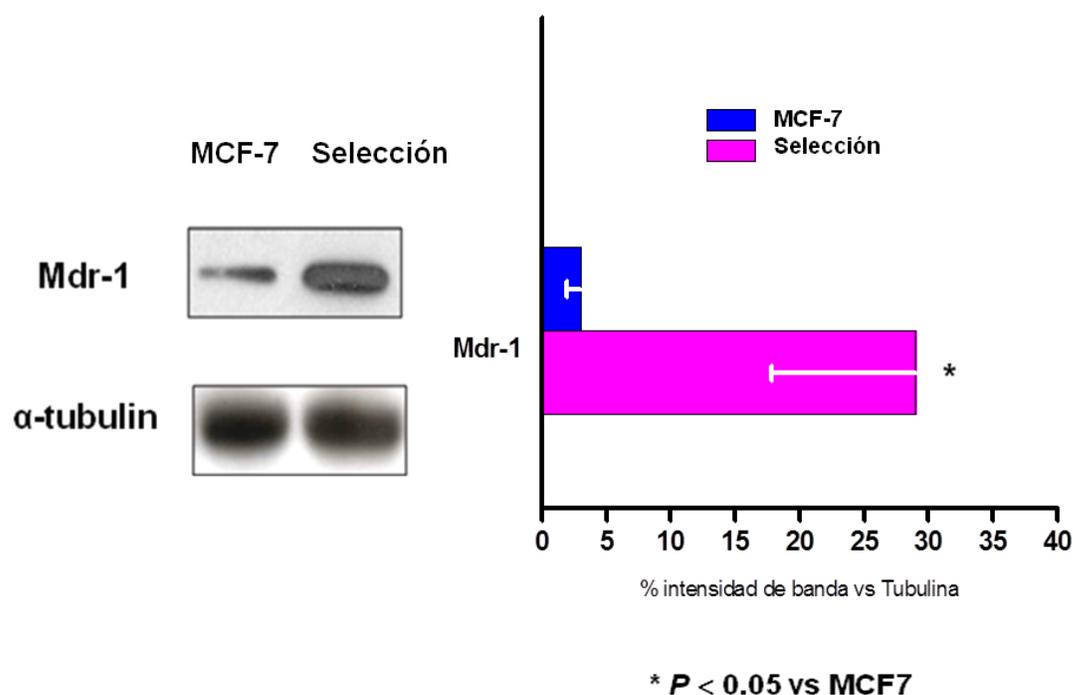


Figura 5. Expresión de PGP/MDR1 en células de selección n=3

4.3 CAPACIDAD DE INVASIÓN

Una de las características de las CSC es su capacidad para realizar metástasis [Schwarz-Cruz et al., 2016] por lo tanto, se evaluó la capacidad de invasión de las células de selección y encontramos que su población de origen (MCF-7) no

invaden en las cámaras de Boyden (como se ha reportado al ser células de etapa II no metastásicas) mientras que las células de selección si adquirieron la capacidad de atravesar la matriz extracelular de dicha cámara (compuesta de laminina, colágeno IV, entactina y el proteoglicano heparán sulfato) (Figura 6). También se midieron otros parámetros para determinar si nuestras células de selección compartían más características con las CSC como son la formación de mamoesferas y clonogenicidad, las células de selección fueron más eficientes para formar mamoesferas y colonias vs las MCF-7 (Anexo 1) [Gallardo-Pérez, manuscrito en preparación; García-Amezcuca, 2016].

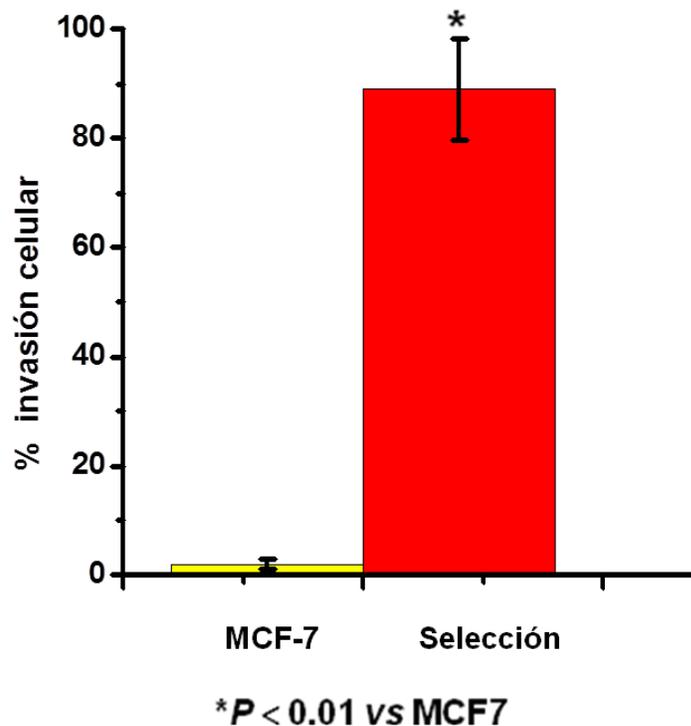


Figura 6. Capacidad de invasión de células de selección vs MCF-7 n=3

4.4 CURVA DE PROLIFERACIÓN

A continuación, se realizó una curva de proliferación para determinar la fase exponencial de esta subpoblación tumoral y se midió el marcadores de troncalidad CD44 a lo largo de dicha curva (siete días de cultivo). Encontramos que los primeros tres días de proliferación con DMEM 25 mM y con 10% de SFB las células de selección presentaron una baja tasa de proliferación como lo reportado por Song et al., 2015. Sin embargo, del tercer al sexto día las células presentan su fase exponencial de crecimiento estabilizándose en el séptimo día de cultivo (Figura 7). Se determinó el número de generaciones entre el día 3 y 5 de cultivo, para MCF-7 fue de 3.2 ± 0.8 vs 0.9 ± 0.07 para las células de selección. Además hubo un incremento de 62% en la densidad celular después de los 7 días de cultivo de las células de selección vs las MCF-7. Al medir el marcador de troncalidad CD44 a lo largo de la curva de crecimiento (día 0, 4 y 7) pudimos observar una disminución en la expresión de éste con el paso de los días de cultivo (Figura 8).

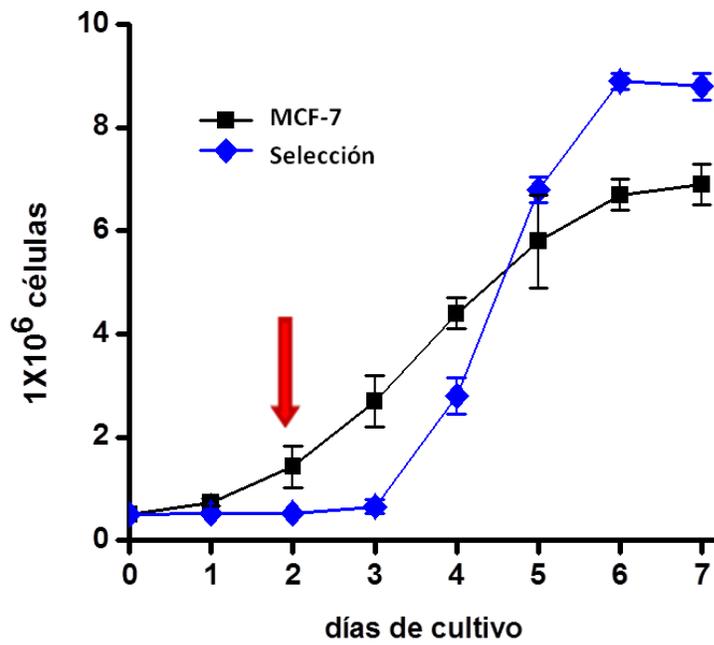
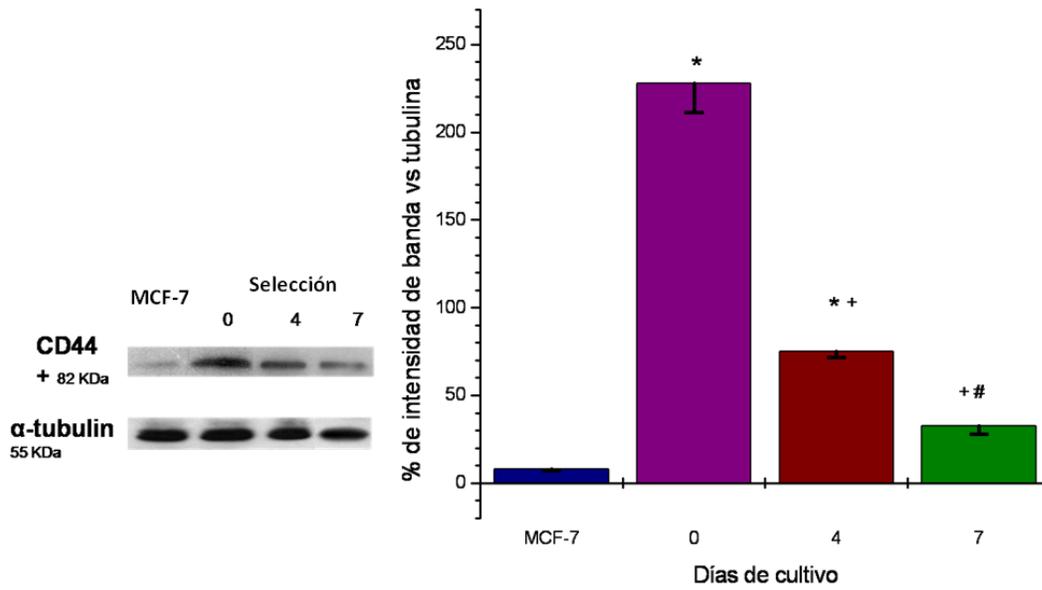


Figura 7. Curva de proliferación de las células de selección y de la línea celular MCF-7 n=3. La flecha roja indica el día donde se determinaron las IC₅₀ de los inhibidores (24 hrs).



* P < 0.05 vs MCF7
 + P < 0.05 vs 0
 # P < 0.05 vs 4

Figura 8. Contenido de proteína determinado por Western Blot del marcador de superficie CD44 a través de 7 días de cultivo con medio DMEM 25 mM con 10% de SFB n=3. Para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de una vía.

4.5 IC₅₀ DE VIABILIDAD DE INHIBIDORES

Por último se evaluaron diferentes inhibidores mitocondriales, glucolíticos, canónicos y no canónicos por 24 horas en una caja de 96 pozos en concentraciones exponenciales (0.1, 1, 10 y 100 μM) y se midió la viabilidad mediante MTT. Se obtuvo una IC₅₀ ajustando la curva de inhibición a un decaimiento exponencial con el programa estadístico Origin 8, con el objeto de dilucidar el efecto sobre la viabilidad de las células de selección y de las MCF-7 (Tabla 3). Podemos observar que las células de selección son más sensibles a inhibidores mitocondriales como α -Tea, casiopeína IIgly, y a los fármacos no canónicos (antiinflamatorios) sulindac y celecoxib (IC₅₀ de 0.8 a 36 μM), sin embargo oligomicinaA y α -Tos no se alcanzó la concentración inhibitoria 50 en esta subpoblación. La línea celular de CaMa MCF-7 también fue sensible a los inhibidores mitocondriales, mostrando una IC₅₀ en rango de 1 a 40 μM , siendo más sensible a casiopeína IIgly. Las de selección no fueron sensibles a ningún inhibidor glucolítico a pesar de que se evaluaron concentraciones más altas (hasta 15 mM) para tratar de alcanzar la IC₅₀ y es importante resaltar que los fármacos utilizados actualmente en la clínica (canónicos) tampoco repercutieron en la viabilidad de esta subpoblación, a pesar de que se incrementaron las concentraciones hasta rangos mM. Sin embargo doxorubicina y paclitaxel si son eficientes para erradicar a las MCF-7 a bajas concentraciones (de 5 a 9 μM); cisplatino y 5-fluorouracilo también tienen efecto sobre la viabilidad de MCF-7 pero a concentraciones mayores (50 y 700 μM respectivamente).

Tabla 3. IC₅₀ de viabilidad de inhibidores en células de selección.

Inhibidor	Efecto	IC ₅₀ MCF-7 μM	IC ₅₀ Selección μM
Mitocondriales			
Oligomicin A	Bloquea subunidad F0 de la ATP sintetasa	37 ± 5	>100
CasIgly	Induce muerte celular y fragmentación del DNA	1 ± 0.5	0.8 ± 0.05 **
Alfa Tea	Inhibe a succinato deshidrogenasa	35 ± 8	8 ± 0.8
Alfa Tos	Análogo de la Vitamina E, Antioxidante	20 ± 0.8	>100
Glucolíticos			
Gossipol	Inhibe deshidrogenasas	>100	>100
IAA	Inhibe a la GAPDH	>100	>100
3-BP	Inhibe GAPDH, HKII, LDH	68 ± 21	>15mM
2 -DG	Inhibe HKII, HPI	370 ± 67	>15mM
No canónicos (antiinflamatorios)			
Sulindac	Inhibe cicloxigenasas (1 y 2) → Prostaglandinas	>100	36 ± 8
Celecoxib	Inhibe COX 2 → Prostaglandinas	2 ± 0.4	1 ± 0.2 *
Canónicos			
Doxorrubicina	Intercalante del DNA, inhibe a la topoisomerasa II	9 ± 0.5	>15
Paclitaxel	Evita desensamblaje de microtubulos	5 ± 0.4	>10
5 -FU	Inhibe a timidilato sintasa	708 ± 61	> 1mM
Cisplatino	Alquilante DNA	51 ± 37	>100

* P ≤ 0.05 vs MCF-7 ** P ≤ 0.01 vs MCF-7

CAPÍTULO V.

DISCUSIÓN

Las CSC representan una subpoblación tumoral con características particulares que mantienen y ayudan al crecimiento del tumor, su capacidad de auto-renovación, su resistencia a fármacos antineoplásicos y su capacidad para realizar invasión y metástasis son puntos importantes para erradicar el tumor por completo y así evitar la recurrencia de la enfermedad [Thomas et al., 2016].

Es de gran importancia el estudio de nuevos blancos terapéuticos y también de nuevos fármacos que puedan tener efecto para eliminar a las CSC pues los fármacos que se administran actualmente en la clínica no son efectivos para evitar la recurrencia del tumor ya que éstos eliminan a las células de la masa tumoral que no son troncales dejando viva a esta subpoblación tumoral que puede iniciar un nuevo tumor con características malignas incrementadas [Ahmad, 2013].

Selección de células con fenotipo troncal

La obtención de esta subpoblación tumoral se hace generalmente por citometría de flujo tanto para células cultivadas en monocapa como para biopsias. Sin embargo esta técnica no nos permite obtener una gran densidad celular con este fenotipo además de que las células no están sometidas a las presiones intrínsecas de hipoxia, baja concentración de glucosa y exposición a drogas antineoplásicas que permiten el enriquecimiento y la activación del fenotipo troncal [Philip et al., 2013; Ahmad, 2013; Flavahan et al., 2013] tal y como ocurren dentro de un tumor sólido *in vivo*. Por lo que se estableció un protocolo de selección o enriquecimiento de células troncales con base en las características del microambiente tumoral de las CSC sometiéndolas a estrés y así estimulando el fenotipo troncal.

El cultivo en monocapa de las MCF-7 al exponerlas a bajas concentraciones de glucosa (hipoglucemia 2.5 mM glc), bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia severa 0.1% O₂) y exposición a agentes antineoplásicos (doxorrubicina 100 nM y paclitaxel 100 nM) se logró enriquecer la fracción de células que expresan algunas

características de CSC (células de selección). El primer cambio que se observó fue la morfología de la población original (MCF-7) y la de las células de selección, estas últimas mostraron una morfología más alargada similar a la que presentan los fibroblastos esto ya se ha reportado para las CSC [Thomas et al., 2016; Fillmore y Kuperwasser, 2008]. Posteriormente obtuvimos el porcentaje de expresión de los marcadores de CSC para CaMa CD44+, CD24-, ALDH1A3 y Oct 3/4 de nuestras células de selección y observamos que con nuestro protocolo se sobreexpresan de 4 a 20 veces (figura 4). Es importante tomar en cuenta que lo reportado de sobreexpresión para CD44 es de alrededor de 10 veces por el método de citometría de flujo [Jaggupilli y Elkord, 2012] y con nuestro protocolo obtuvimos una sobreexpresión de hasta 20 veces respecto al control (MCF-7) lo que nos indica que nuestro método de recrear las condiciones de estrés microambiental está enriqueciendo la fracción de células con expresión de este marcador.

Flavahan et al., 2013 reportan que bajas concentraciones de glucosa incrementan marcadores de CSC de cerebro como son los factores de transcripción Oct 4, Nanog y Sox2 y el marcador de superficie CD133. Prud'homme et al., 2010 demostraron que se pueden seleccionar y enriquecer la fracción de CSC de las líneas celulares MDA-MB 231 y BT474 de cáncer de mama con exposición de fármacos antineoplásicos como mitoxantrona, ellos observaron un incremento en los marcadores ALDH+, transportador ABCG2 y el factor de transcripción Oct 4. En células de glioblastoma sometidas a hipoxia (1% O₂) se observa que favorece la expresión del marcador de superficie CD133 [Bar et al., 2010]. Todo lo anterior demuestra que estas condiciones por separado promueven la expresión de características de CSC por eso, al someter a la línea celular MCF-7 a combinaciones de estrés microambiental se enriqueció aún más la fracción de células con características de CSC *in vitro*.

También se evaluó la formación de colonias (clonogenicidad) donde se encontró que las células de selección generaron 105 colonias vs. 6 colonias de MCF-7 después de 96 horas [Anexo 1; García-Amezcuca, 2016]. Esto correlaciona con la

formación de mamoesferas pues las células de selección fueron más eficientes al formar dichas mamoesferas; en un cultivo de 7 días las mamoesferas de las células con fenotipo troncal eran 7 veces más grandes que las mamoesferas de MCF-7 (Anexo 1). La formación de mamoesferas es una característica de las CSC y esto se debe a la capacidad que tienen de expansión clonal y no a la capacidad que tengan de auto agregación [Lamb et al., 2014], además de que en este modelo tridimensional se mimetizan las condiciones de gradientes de oxígeno, glucosa y nutrientes tal y como se encuentran dentro de un tumor sólido [Sutherland, 1988].

Recientemente, se ha reportado que las CSC tienen un fenotipo más maligno por todas las características antes mencionadas. Una de ellas es su capacidad de invadir y hacer metástasis [Mimeault y Batra, 2013]. En este trabajo se evaluó la capacidad de las células de selección de invadir en cámaras de Boyden y encontramos que después de estar expuestas a las condiciones de estrés microambiental éstas adquieren la capacidad de invadir (>80%) a diferencia de su población de origen las MCF-7 que no tienen esta capacidad (figura 6). Hay trabajos que reportan que el factor inducido por hipoxia 2α (HIF- 2α) desencadena la respuesta a hipoxia severa y actúa como inductor de genes implicados en la invasión tumoral como metaloproteinasas y Oct 4 [Koh et al., 2011; Gordan et al., 2007]. También HIF- 1α inducido por hipoxia promueve la transición epitelio mesénquima (EMT) por la activación de Snail y una pérdida en E-cadherina y la localización nuclear de β -catenina [Cannito et al., 2008]. Mathieu y colaboradores [2011] reportaron que la hipoxia (2% de O_2) induce la expresión de factores de pluripotencia de stem cells como Oct 4, Sox 2, KLF4 Y C-Myc en cáncer de próstata, cerebro riñón, cérvix, pulmón, colon y mama. Esto demuestra que las condiciones de hipoxia severa favorecen el fenotipo invasivo de las CSC.

Las células de selección muestran un patrón de crecimiento similar al reportado para las células troncales normales [Cheung y Rando, 2013]. Los primero 3 días de cultivo con DMEM 25 mM de glucosa y SFB están en un estado quiescente y del tercer al sexto día muestran un crecimiento exponencial, en comparación con

las MCF-7, este crecimiento exponencial es mayor (3.5 veces) y al estabilizarse en el día siete se tiene un mayor número de células de selección que de MCF-7 (Incremento de densidad celular de 62%) como se muestra en la figura 7. Es importante tomar en cuenta que este patrón de crecimiento se llevó a cabo con DMEM 25 mM de glc y con SFB por lo que se decidió medir el marcador de troncalidad CD44 a lo largo de la curva de crecimiento para determinar si las células mantenían la expresión de éste marcador de troncalidad y observamos una disminución en la expresión de éste hasta en un 50% por lo que deducimos que con el paso de los días en nuestro cultivo en monocapa puede ser que se encuentre una población heterogénea la cual va perdiendo algunas características del fenotipo troncal al estar en presencia de mucha concentración de oxígeno y glucosa; por esta razón su crecimiento exponencial es mayor (figura 7). Este comportamiento se puede relacionar con tumores *in vivo* que, después de administrar fármacos antineoplásicos, puede resultar en una recurrencia tumoral y la formación de nuevos tumores con un fenotipo más maligno en poco tiempo [Borovski et al., 2011].

El protocolo de selección puede ser mejorado si, a través de los días las células se mantienen en un estado de estrés mínimo como bajas concentraciones de drogas, o bien, si se utilizan medios de cultivo establecidos para CSC. Durante los primeros 3 días de crecimiento las células de selección se mantienen en un estado quiescente, se sabe que muchas drogas no pueden acceder a la célula en esta condición [Cheung y Rando, 2013]. Sin embargo, el diseño de algunos inhibidores mitocondriales presentan características de lipofilia y de una carga positiva deslocalizada (cationes lipofílicos) lo que les permite penetrar con facilidad la membrana plasmática y mitocondrial, siendo más específicos para esta última por su potencial de membrana más electronegativo; estos inhibidores pudieran no tener problema en su mecanismo de acción, aún cuando la célula se encuentre en estado quiescente [Cheung y Rando, 2013], además de que no son sustrato de la P-glicoproteína lo que indica que no serían expulsados de las CSC.

Terapia anti-mitocondrial en células selección

El metabolismo energético es un *hallmark* o sello característico del cáncer [Hanahan y Weinberg, 2011]. A pesar de la heterogeneidad dentro del tumor sólido el suministro de ATP continúa siendo dependiente de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa (FO). De esta manera, se establece que la inhibición selectiva del metabolismo energético tumoral prevalente puede tener un impacto significativo en el tratamiento del cáncer. Estudios previos han determinado que las células resultantes del protocolo de selección dependen energéticamente de la FO que es la vía que aporta en mayor proporción ATP sobre la glucólisis [García-Amezcu, 2016]. Lo anterior indica la necesidad de realizar una terapia anti-mitocondrial en las CSC de mama por las características que comparten dichas células de selección con las CSC ya que el metabolismo energético es la única forma que tiene la célula de adquirir ATP para llevar a cabo sus funciones biológicas. Sin embargo, hasta el momento no se ha inhibido el metabolismo energético mitocondrial y evaluado su efecto sobre la viabilidad en CSC de CaMa. Dicha terapia podría ser más selectiva para las CSC y las células cancerígenas no troncales y así mejorar la calidad de vida de las pacientes ya que los tratamientos actuales tienen diversos efectos secundarios como se mencionó anteriormente. Los inhibidores mitocondriales al ser cationes lipofílicos tienen la capacidad de acumularse con mayor facilidad a la mitocondria tumoral por su incremento en el potencial de membrana eléctrico [Rodríguez-Enríquez et al., 2012]; las células de selección al depender en mayor proporción de la mitocondria para el suministro de ATP se ven más afectadas al inhibir la función mitocondrial, por esta razón observamos que Casiopeína IIgly y α -Tea tienen una IC_{50} menor que los inhibidores glucolíticos (Tabla 3).

La resistencia a fármacos antineoplásicos es una característica de las CSC. Uno de los mecanismos de resistencia a drogas en CSC es la sobreexpresión de bombas de expulsión de fármacos como la P-glicoproteína (PGP) la cual es dependiente de ATP y tiene como sustratos a varios agentes quimioterapéuticos [Dean et al., 2005; Chen et al., 2016; Chu, 2010] entre ellos a las antraciclinas

como la doxorubicina y a los taxanos como el paclitaxel, como se muestra en la Tabla 2, pero que carecen de especificidad para cationes lipofílicos (como los drogas anti-mitocondriales). Estos dos fármacos (doxorubicina y paclitaxel) fueron utilizados en el protocolo de selección por lo que se muestra que las células resultantes fueron poco sensibles a éstos (Tabla 3) y correlaciona con la sobreexpresión del contenido de proteína de la PGP de las células seleccionadas ya que hubo un incremento de 6 veces con respecto a las MCF-7 (Figura 5). Se ha reportado que las condiciones de estrés microambiental como la hipoxia o los bajos niveles de pH inducen la expresión de los transportadores ABC [Alfarouk et al., 2015] por lo que nuestro protocolo de selección incrementó la expresión de la PGP.

Diversas drogas que son utilizadas actualmente en la clínica son sustrato de la PGP por lo que no son tratamientos eficientes para erradicar por completo la enfermedad ni la recurrencia del cáncer; por esta razón los inhibidores mitocondriales, como los que se muestran en la tabla 3, podrían ser una alternativa terapéutica contra el CaMa y específicamente contra la subpoblación celular de CSC, al erradicar a dichas células se puede evitar la recurrencia de la enfermedad.

Al exponer a células de selección a los diferentes inhibidores podemos observar que fueron más sensibles a los inhibidores mitocondriales como casiopéina Ilgly ($IC_{50} 0.8 \pm 0.05$), α -Tea ($IC_{50} 8 \pm 0.8$) y a los antiinflamatorios tanto sulindac ($IC_{50} 36 \pm 8$) como celecoxib ($IC_{50} 1 \pm 0.2$) sin embargo al exponerlos a inhibidores glucolíticos no observamos un efecto sobre la viabilidad de las células con fenotipo troncal; se aumentaron las concentraciones para tratar de encontrar la concentración inhibitoria 50 hasta 15 mM de los inhibidores y tampoco hubo repercusión en la viabilidad de éstas células, por lo que podemos deducir que la viabilidad de esta subpoblación depende energéticamente de la mitocondria más que de la glucólisis. Sancho et al., 2016 reportan que la reprogramación del metabolismo energético en las CSC a FO hace que éstas resistan la inhibición de

la glucólisis además de que les ayuda a resistir el estrés nutricional, lo que correlaciona con los datos obtenidos en este estudio.

Glucólisis en CSC

En las células de selección la glucólisis sólo aportó menos del 20% al ATP tumoral [García-Amezcu, 2016]. Las enzimas de la glucólisis tienen dobles funciones además de la vía glucolítica lo cual puede estar ocurriendo en las CSC.

La glucólisis tiene un papel importante durante la progresión tumoral y sobre todo en la metástasis ayudando a la acidificación extracelular y así promover la migración celular [Payen et al., 2016]. Además, la hexosa fosfato isomerasa (HPI), enzima glucolítica, al ser secretada extracelularmente tiene un mecanismo de citocina que regula la motilidad celular, esta citocina se conoce como factor de motilidad autócrino (AMF) y se ha encontrado que regula la transición epitelio-mesénquima (EMT) [Gallardo-Pérez et al., 2014; Niinaka et al., 2010]. Otras enzimas glucolíticas tienen funciones alternas (moonlighting) a parte de su participación en el metabolismo energético. La GAPDH es una enzima glucolítica que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a glicerato-1,3-bifosfato produciendo una molécula de NADH, H^+ que es un cofactor necesario para la producción de ATP en la FO [Lincet y Icard, 2015]. Se ha observado que se encuentra sobre-expresado en varios tumores (como carcinoma renal, hígado, páncreas, colorectal, ovario, melanoma, glioma y mama) en comparación con tejido sano. Además de tener un papel importante en la glucólisis y en la producción de cofactores para la generación de ATP, se han encontrado funciones alternas. En cáncer de mama se ha observado que hay una correlación con su sobreexpresión con la agresividad del tumor y también promueve la proliferación de las células cancerígenas de CaMa [Guo et al., 2013].

Sin embargo al depender energéticamente de la FO, las células de selección no se ven afectadas por inhibidores glucolíticos. Lo anterior indica que es probable que las enzimas de la glucólisis pudieran tener efectos sobre mecanismos de

progresión tumoral mientras que su contribución de ATP al tumor pudiera ser mínima en las CSC.

Fármacos anti-inflamatorios y canónicos

Adicional a los inhibidores anti-mitocondriales, los fármacos anti-inflamatorios como celecoxib y sulindac fueron usados en este trabajo debido a que se propone que actúan como desacoplantes mitocondriales y así comprometer la proliferación celular. Estos tuvieron un efecto sobre la viabilidad de las células de selección. Como se mencionó anteriormente se ha observado que estos fármacos repercuten en la función mitocondrial sin embargo, no se ha dilucidado el mecanismo de acción. Se ha reportado que tienen capacidad pro- apoptótica y anti- proliferativa y que éstas dos no están relacionadas con su inhibición de las ciclooxygenasas [Ralph et al., 2015]. Se propone que los antiinflamatorios no esteroideos son desestabilizadores del sistema antioxidante, esto porque incrementan la concentración de ROS y esto induce a muerte celular [Liggett et al., 2014]. Esta puede ser una posible explicación de su favorable actividad sobre las células de selección.

Se evaluó el efecto sobre la viabilidad de inhibidores canónicos (los que se utilizan actualmente en la clínica) como paclitaxel, doxorubicina, Cisplatino y 5-fluorouracilo y se observó una resistencia a éstos como lo reportan para esta subpoblación [Liu et al., 2013; Li et al., 2008]. Por lo que seguir usando estos fármacos quimioterapéuticos no es una buena estrategia ya que no son eficientes para evitar la recurrencia del tumor pues no erradican a las CSC, además de que deterioran la calidad de vida de las pacientes [Liu et al., 2013; Li et al., 2008].

Finalmente, estos estudios dan indicios de que la terapia anti-mitocondrial podría ser una alternativa para erradicar a las CSC de CaMa ya que nuestras células de selección comparten ciertas características de CSC y estas dependen de la energía en forma de ATP suministrada por la mitocondria. Las diferentes

características de las CSC como auto-renovación, resistencia a fármacos, invasión, metástasis y formación de nuevos tumores son altamente demandantes de energía por lo que inhibir la fuente de ese ATP puede inhibir la progresión de las CSC.

En este trabajo también pudimos observar que con la terapia anti-mitocondrial las células de selección resultaron ser más sensibles que la población heterogénea (Tabla 3). Lo que indica que la terapia anti-mitocondrial puede ser dirigida y sensibilizar a las CSC las cuales no cuentan con un tratamiento actualmente en la clínica.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES

El protocolo de selección mediante condiciones de estrés microambiental fue efectivo para enriquecer la fracción de células que comparten ciertas características con las CSC provenientes de la línea celular MCF-7 en monocapa. En este trabajo se muestra que el comportamiento y las características de dicha subpoblación corresponden a lo reportado en la literatura para células troncales de cáncer de mama obtenidas por otros métodos como la citometría de flujo.

Los inhibidores mitocondriales casiopeína IIgly, α -Tea y los antiinflamatorios celecoxib y sulindac fueron más efectivos con una menor IC_{50} para inhibir la viabilidad de las células resultantes del protocolo de selección, en comparación con la población heterogénea (MCF-7), por lo que se propone que una terapia anti-mitocondrial podría ser una buena estrategia terapéutica para erradicar a las CSC de CaMa y así evitar la recurrencia del tumor.

REFERENCIAS

Aguirre-Alvarado C, Segura-Cabrera A, Velázquez-Quesada I, Hernández-Esquivel MA, García-Pérez CA, Guerrero-Rodríguez SL, Ruiz-Moreno AJ, Rodríguez-Moreno A, Pérez-Tapia SM, Velasco-Velázquez MA. Virtual screening-driven repositioning of etoposide as CD44 antagonist in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016; 26;7(17):23772-84.

Ahmad A. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncol*. 2013; 290568.

Ajani JA, Song S, Hochster HS, Steinberg IB. Cancer stem cells: the promise and the potential. *Semin Oncol*. 2015; 42 Suppl 1:S3-17.

Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, Bashir AH, Mohammed OY, Elhassan GO, Harguindey S, Reshkin SJ, Ibrahim ME, Rauch C. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int*. 2015; 15:71.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(7):3983-8.

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

Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009; 9 Suppl 2:S73-81.

Arce C, Bargalló E, Villaseñor Y, Gamboa C, Lara F, Pérez V, Villarreal P. Cáncer de Mama. *Oncogüía* 2011; 6. 77 - 86.

Aschauer L, Muller PA. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochem Soc Trans*. 2016; 44(2):460-6.

B. Beck, C. Blanpain. Unravelling cancer stem cell potential *Nat. Rev. Cancer*, 13 2013; 727–738.

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

Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*. 2011; 1;71(3):634-9.

Cannito S, Novo E, Compagnone A, Valfrè di Bonzo L, Busletta C, Zamara E, Paternostro C, Povero D, Bandino A, Bozzo F, Cravanzola C, Bravoco V, Colombatto S, Parola M. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29(12):2267-78.

Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826(2):370-84.

Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*. 2016; 370(1):153-64.

Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat rev Mol cell biol*. 2013; 14(6):10.

Chu E. *Pocket Guide to Chemotherapy Protocols* (Jones & Bartlett, Sudbury, MA) 2010.

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

Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *Cell Mol Med*. 2008; 13 (8B): 2236-2252.

De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pagès M, Ozsvári B, Smith DL, Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Cappello AR, Pezzi V, Lisanti MP, Sotgia F. Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget*. 2015; 6(17):14777-95.

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

Draga M, Madgett EB, Vandenberg CJ, du Plessis D, Kaufmann A, Werler P, Chakraborty P, Lowndes NF, Hiom K. BRCA1 Is Required for Maintenance of Phospho-Chk1 and G2/M Arrest during DNA Cross-Link Repair in DT40 Cells. *Mol Cell Biol*. 2015; 35(22):3829-40.

Farnie G, Sotgia F, Lisanti MP. High mitochondrial mass identifies a sub-population

of stem-like cancer cells that are chemo-resistant. *Oncotarget*. 2015; 6(31):30472-86.

Fata F, O'Reilly E, Ilson D, Pfister D, Leffel D, Kelsen DP, Schwartz GK, Casper ES. Paclitaxel in the treatment of patients with angiosarcoma of the scalp or face. *Cancer*. 1999.15; 86(10):2034-7.

Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, Strano S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Frontiers in Oncology*. 2016; 6:77.

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

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

Fu Y, Chang H, Peng X, Bai Q, Yi L, Zhou Y, Zhu J, Mi M. Resveratrol inhibits breast cancer stem-like cells and induces autophagy via suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. *PLoS One*. 2014; 9(7):e102535.

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

García Amezcua M, Gallardo Pérez JC. Análisis Del Metabolismo Energético En Células MCF-7 De Cáncer De Mama Con Fenotipo Troncal. 2016. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. México.

Gehlot P, Shukla V, Gupta S, Makidon PE. Detection of ALDH1 activity in rabbit hepatic VX2 tumors and isolation of ALDH1 positive cancer stem cells. *J Transl Med*. 2016; 14:49.

Geisberg C, Pentassuglia L, Sawyer DB. Cardiac side effects of anticancer treatments: new mechanistic insights. *Curr Heart Fail Rep*. 2012; 9(3):211-8.

GLOBOCAN, W.H.O. 2012., http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*. 2007;

11(4):335-47.

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

Guo C, Liu S, Sun MZ. Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor. *Clin Transl Oncol*. 2013; 15(3):167-72.

Guo W, Lasky JL 3rd, Wu H. Cancer stem cells. *Pediatr Res*. 2006; 59 (4 Pt 2):59R-64R.

Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. Cancer stem cells: Therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *APSB*. 2013; 3 (2): 65-75.

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

Harrison H, Rogerson L, Gregson HJ, Brennan KR, Clarke RB, Landberg G. Contrasting hypoxic effects on breast cancer stem cell hierarchy is dependent on ER- α status. *Cancer Res*. 2013; 73(4):1420-33.

Helczynska K, Larsson AM, Holmquist Mengelbier L, Bridges E, Fredlund E, Borgquist S, Landberg G, Pålman S, Jirström K. Hypoxia-inducible factor-2 α correlates to distant recurrence and poor outcome in invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2008; 68(22):9212-20.

Helczynska K, Larsson AM, Holmquist Mengelbier L, Bridges E, Fredlund E, Borgquist S, Landberg G, Pålman S, Jirström K. Hypoxia-inducible factor-2 α correlates to distant recurrence and poor outcome in invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2008; 68(22):9212-20.

Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012:708036.

Jez M, Ambady S, Kashpur O, et al. Expression and Differentiation between OCT4A and Its Pseudogenes in Human ESCs and Differentiated Adult Somatic Cells. Cooney AJ, ed. *PLoS ONE*. 2014; 9(2):e89546.

Kim YS, Kang MJ, Cho YM. Low production of reactive oxygen species and high DNA repair: mechanism of radioresistance of prostate cancer stem cells. *Anticancer Res*. 2013; 33(10):4469-74.

Koh MY, Lemos R Jr, Liu X, Powis G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics,

aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 2011; 71(11):4015-27.

Kurth I, Hein L, Mäbert K, Peitzsch C, Koi L, Cojoc M, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovskaja A. Cancer stem cell related markers of radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015; 6(33):34494-509.

Kwon MJ, Shin YK. Regulation of ovarian cancer stem cells or tumor-initiating cells. *Int J Mol Sci.* 2013; 25; 14(4):6624-48.

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

Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer.* 2011; 104(11):1730-8.

Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cell in metastasis. *Cell Res.* 2007; 17: 3-14.

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

Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(9):672-9.

Liggett JL, Zhang X, Eling TE, Baek SJ. Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase-independent targets. *Cancer Lett.* 2014; 346(2):217-24.

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

Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, Tang JZ, Jiang W, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2013; 109(7):1876-85.

Marcato P, Dean CA, Liu RZ, Coyle KM, Bydoun M, Wallace M, Clements D, Turner C, Mathenge EG, Gujar SA, Giacomantonio CA, Mackey JR, Godbout R, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential

retinoic acid signaling. *Mol Oncol*. 2015; 9(1):17-31.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Rodríguez-Enríquez S, Encalada R, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Modeling cancer glycolysis. *Biochim Biophys Acta*. 201; 1807(6):755-67.

Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol*. 2003; 65(12):1979-89.

Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011; 71(13):4640-52.

Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011; 71(13):4640-52.

Maugeri-Saccà M, Zeuner A, De Maria R. Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells. *Frontiers in Oncology*. 2011; 1:10.

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

Mercurio V, Pirozzi F, Lazzarini E, Marone G, Rizzo P, Agnetti G, Tocchetti CG, Ghigo A, Ameri P. Models of Heart Failure Based on the Cardiotoxicity of Anticancer Drugs. *J Card Fail*. 2016; 22(6):449-58.

Mimeault M, Batra S. Molecular Biomarkers of Cancer Stem/Progenitor Cells Associated with Progression, Metastases, and Treatment Resistance of Aggressive Cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 23 (2): 234-254.

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

Morales-Vásquez F. Estrategias clínicas y desarrollo de las bases científicas en el empleo de hormonoterapia para cáncer de mama. *Cancerología*. 2006; 1. 163 – 175.

Moreno-Sánchez R, Bravo C, Vásquez C, Ayala G, Silveira LH, Martínez-Lavín M.

Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochem Pharmacol.* 1999; 57(7):743-52.

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

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

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

Neuzil J, Moreno-Sánchez R. The Bioenergetics of Cancer, the Warburg Hypothesis and the Mitochondrial Function. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2013; 14: 249-250.

Neuzil J, Weber T, Gellert N, Weber C. Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate. *Br J Cancer.* 2001; 84(1):87-9.

Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, Oda M, Haga A, Hosoki M, Uzawa N, Arai N, Yamaguchi S, Yamashiro M, Raz A. Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis. *Cancer Res.* 2010; 70(22):9483-93.

Payen VL, Porporato PE, Baselet B, Sonveaux P. Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(7):1333-48.

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

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

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

Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. *Cancer Res.* 2007; 1;67(15):7139-46.

Paternostro C, Povero D, Bandino A, Bozzo F, Cravanzola C, Bravoco V, Colombatto S, Parola M. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008; 29(12):2267-78.

Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovskaya A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother Oncol.* 2013; 108(3):378-87.

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

Ralph SJ, Pritchard R, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, Ralph RK. Hitting the Bull's-Eye in Metastatic Cancers-NSAIDs Elevate ROS in Mitochondria, Inducing Malignant Cell Death. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015; 8(1):62-106.

Rapp UR, Ceteci F, Schreck R. Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2008; 7(1):45-51.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414(6859):105-11

Reyes L, Fuentes-Noriega I, Ruiz-Ramírez L, Macías L. Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina IIgly in rat plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 791(1-2):111-6.

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

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

Rodríguez-Enríquez S, Hernández-Esquivel L, Marín-Hernández A, Dong LF, Akporiaye ET, Neuzil J, Ralph SJ, Moreno-Sánchez R. Molecular mechanism for the selective impairment of cancer mitochondrial function by a mitochondrially

targeted vitamin E analogue. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1817(9):1597-607.

Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Moreno-Sánchez R. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53(1):29-48.

Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer*. 2016; 114(12):1305-12.

Schwarz-Cruz Y Celis A, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Advances in the knowledge of breast cancer stem cells. A review. *Histol Histopathol*. 2016; 31(6):601-12.

Song IS, Jeong JY, Jeong SH, Kim HK, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. Mitochondria as therapeutic targets for cancer stem cells. *World J Stem Cells*. 2015; 7(2):418-27.

Stankov A, Bargallo-Rocha JE, Namendys-Silva A, Ramirez MT, Stankova-Ninova K, Meneses-Garcia A. Prognostic factors and recurrence in breast cancer: experience at the national cancer institute of Mexico. *ISRN Oncol*, 2012.

Sutherland RM, Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model, *Science* 240 1988; 177-184.

Takahashi T, Yamasaki F, Sudo T, Itamochi H, Adachi S, Tamamori-Adachi M, Ueno NT. Cyclin A-associated kinase activity is needed for paclitaxel sensitivity. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4(7):1039-46.

Tomita Hiroyuki, Tanaka Kaori, Hisamatsu Kenji y Hara Akira. The role of aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer stem cells. *Can Cell Microenviron* 2015; 2: e1064.

Thomas D, Thiagarajan PS, Rai V, Reizes O, Lathia J, Egelhoff T. Increased cancer stem cell invasion is mediated by myosin IIB and nuclear translocation. *Oncotarget*. 2016.

Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015; 8:47.

Tosoni D, Di Fiore PP, Pece S. Functional purification of human and mouse mammary stem cells. *Methods Mol Biol*. 2012; 916:59-79.

Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast Cancer Stem Cells. *Int J of Biochem Cell Biol.* 2012; 44(4):573-577.

Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, Reue K, Frohnen P, Chan M, Alhiyari Y, Dratver MB, Pajonk F. Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 146(3):525-34.

Vogelstein B y Kinzler K. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine.* 2004; 10 (8): 789-99.

Wang Q-E. DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World Journal of Biological Chemistry.* 2015; 6(3):57-64.

Wang YJ, Herlyn M. The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015; 309(11):C709-18.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956; 123 (3191): 309-14.

Xu H, Tian Y, Yuan X, Liu Y, Wu H, Liu Q, Wu GS, Wu K. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *Onco Targets Ther.* 2016; 9:431-44.

Zentella A, Frías S, Galicia G, Ruíz J, Córdova E, Ventura JL, Ramírez J, Castro N, Montes D, Ibarra M. Cáncer de glándula mamaria y metastasis: un creciente problema de salud pública en México. *Mensaje Bioquímico* 2007; 31:172-795.

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

ANEXO 1

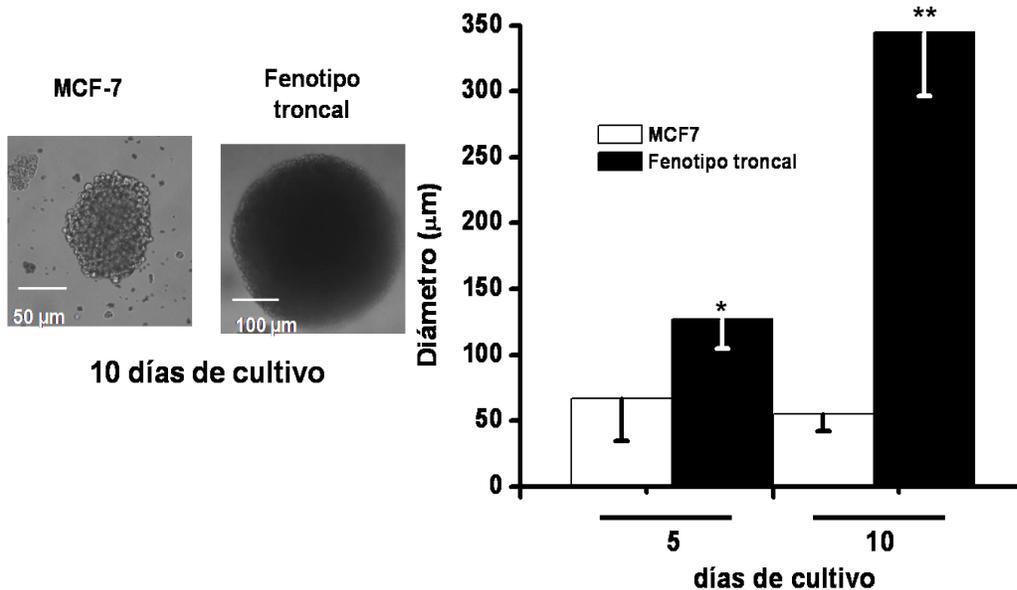
Tabla 1A. Estandarización del protocolo de selección de células con fenotipo troncal por estrés microambiental.

Condiciones microambientales		Tiempo (hrs)		Viabilidad (%)	CD44 (veces vs. MCF-7)
		24	12+12		
Individual					
Hipoxia	1% O ₂	√		85±4.6	3.7 ± 0.8
	0.1% O ₂	√		83±5.8	3.1 ± 1.2
Hipoglucemia (2.5 mM glc)		√		82±6.4	0.9 ± 0.12
Taxol 10, 50, 100 nM (25 mM glc)		√		93-98	0
Doxorrubicina 10, 50, 100 nM (25 mM glc)		√		91-99	0
Combinaciones				49±3.5	8.25 ± 2.1
Hipoglucemia (2.5 mM glc)+ taxol 100 nM			√		
Hipoxia 0.1% O ₂ + doxorrubicina 100 nM (25 mM glc)			√	42±6.9	7.25 ± 1.5

<p><i>Hipoglucemia (2.5mM glc) y taxol 100 nM</i></p> <p style="text-align: center;">+</p> <p><i>Hipoxia 0.1% de O₂ y doxorubicina 100 nM (25 mM glc)</i></p>		√	23.5±3.7	25.8 ± 5.2
		√		

Se expusieron células en monocapa MCF-7 a diferentes condiciones de estrés microambiental y se evaluó el marcador CD44 por Western Blot. El protocolo que se eligió fue el último y para tratar de no diferenciar a las células se dejaron con medio sin suero por 24 hrs.

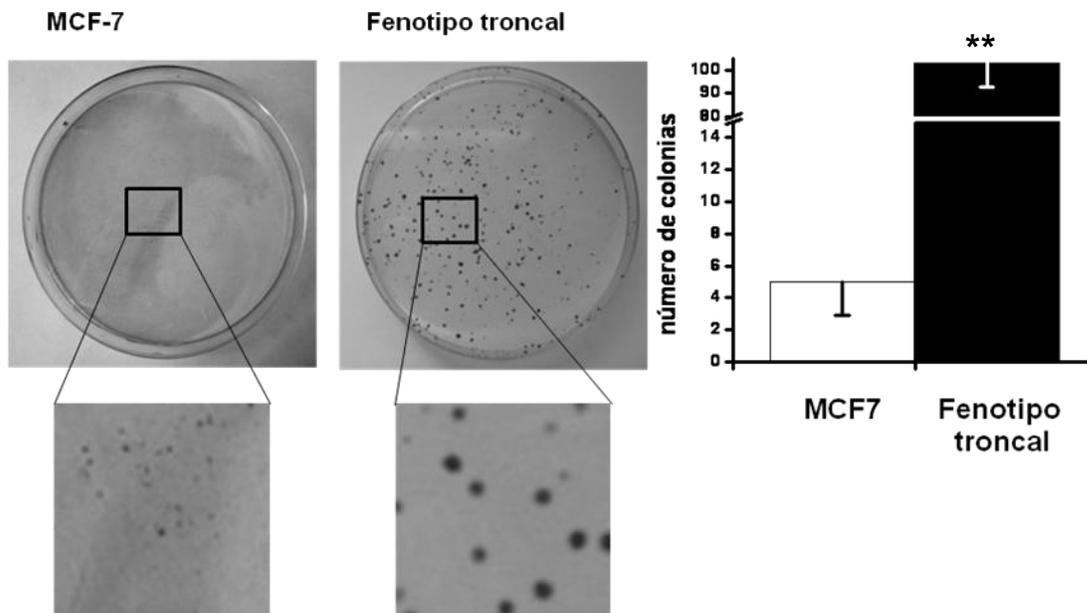
Figura 1A. Formación de mamoesferas en MCF-7 y células con fenotipo troncal.



n=60 *P<0.05; **P<0.01 vs. MCF-7.

Se cultivaron 1×10^5 células MCF-7 y células con fenotipo troncal en un matraz Erlenmeyer con medio DMEM sin SFB. Fueron colocadas de manera inmediata en agitación orbital a 50rpm por 10 días a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂. Se le realizó cambio de medio cada 3 días.

Figura 2A. Ensayo de formación de colonias (Clonogenicidad).



n=4 **P<0.01 vs MCF-7

Las células MCF-7 y las células con fenotipo troncal fueron sembradas a una densidad de 2×10^4 células/mL en cajas petri de 150x20 mm con DMEM completo a 37°C por 96 hrs. Posteriormente se fijaron las células añadiendo etanol (70%) frío (-20°) por 20 min. Se dejaron secar y se tiñeron con cristal violeta al 0.1%. Se escanearon las cajas y se contaron las colonias con el software Clono-Counter.